



**EVALUACIÓN DE LA ANTIGENICIDAD DE PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA  
PROTEÍNA Pv12 DE *Plasmodium vivax* EN MUESTRAS OBTENIDAS DE  
INDIVIDUOS DE ZONAS ENDÉMICAS DE COLOMBIA**

**LEIDY ESTEFANIA RODRIGUEZ CASAS**

**RENZO STEVEN JAIMES BLANCO**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA**

**TRABAJO DE GRADO**

**BOGOTA D.C.**

**2018**



**EVALUACIÓN DE LA ANTIGENICIDAD DE PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA  
PROTEÍNA Pv12 DE *Plasmodium vivax* EN MUESTRAS OBTENIDAS DE  
INDIVIDUOS DE ZONAS ENDÉMICAS DE COLOMBIA**

**CAROLINA LÓPEZ SANTANA MSc.**

Asesora Externa

**EDITH HERNANDEZ R MSc.**

Asesora Interna

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca**

**Bacteriología y Laboratorio Clínico**

**Bogotá D.C**

**2018**

## DEDICATORIA

A Dios por ser nuestra guía y fortaleza en cada paso mi vida.  
A mi madre y hermano por creer en mí y darme todo su apoyo a lo largo de mi vida y durante la carrera, especialmente, a mi madre a quien admiro por su superación personal siendo un ejemplo y pilar fundamental en mi vida.  
A mi abuela quien con su amor y dedicación ha logrado ser un apoyo incondicional e indispensable, buscando siempre motivarme y reconfortarme para ver mis metas cumplidas.

Leidy Estefanía Rodríguez Casas

Dedico este proyecto de grado a Dios, porque ha estado conmigo a cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar.

A mi madre, ya que ella es la persona que con su constante esfuerzo y dedicación, ha permitido que mi camino este lleno de apoyo y fortaleza.

Renzo Steven Jaimes Blanco

## **AGRADECIMIENTOS**

En esta oportunidad queremos agradecer a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por ser nuestra segunda casa durante todo este proceso, además de brindarnos toda la formación necesaria para ser los profesionales que somos hoy en día.

A la Magister Carolina López por su apoyo, dirección, acompañamiento y asesoramiento, ya que sin su ayuda este trabajo de grado no hubiera sido posible  
A la Fundación Instituto Inmunología de Colombia-FIDIC, por recibirnos de una manera tan grata y así mismo darnos la oportunidad de crecer tanto personal como profesionalmente dentro de sus instalaciones.

Al grupo funcional de inmunología a cargo de la doctora Carolina López, donde se llevaron a cabo los ensayos para este proyecto.

Adicionalmente a la docente Edith Del Carmen Hernández Rojas por su asesoría y apoyo en esta última etapa, y de tal manera brindarnos la ayuda necesaria para que el proyecto de grado culminara de forma exitosa.

Por último, pero no menos importante a nuestras madres, familiares y amigos, por darnos la motivación necesaria de seguir adelante cada día, así como ser incondicionales en los momentos de dificultad.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
<b>RESUMEN.</b>	12
<b>INTRODUCCIÓN.</b>	13
<b>1. MARCO TEÓRICO</b>	15
<b>1.1 MALARIA</b>	16
<b>1.1.1 Transmisión.</b>	16
<b>1.1.2 Características clínicas.</b>	17
<b>1.2 MALARIA EN EL MUNDO.</b>	17
<b>1.2.1 Distribución mundial de la malaria</b>	18
<b>1.3 MALARIA EN COLOMBIA</b>	21
<b>1.4 CICLO BIOLÓGICO DE LA MALARIA CAUSADA POR <i>P. vivax</i></b>	24
<b>1.4.1 Fase asexual</b>	24
<b>1.4.1.1 Fase exoeritrocitaria (hepática)</b>	24
<b>1.4.1.2 Fase eritrocitaria</b>	27
<b>1.4.2 Fase sexual</b>	30

<b>1.5 PATOGÉNESIS</b>	<b>32</b>
<b>1.6 RESPUESTA INMUNE EN MALARIA</b>	<b>34</b>
<b>1.7 PROTEINA Pv12</b>	<b>35</b>
<b>1.8 ANTIGENICIDAD</b>	<b>36</b>
<b>2. OBJETIVO</b>	<b>37</b>
<b>2.1 GENERAL</b>	<b>37</b>
<b>2.2 ESPECIFICOS</b>	<b>37</b>
<b>3. ANTECEDENTES</b>	<b>38</b>
<b>4. METODOLOGIA</b>	<b>40</b>
<b>4.1.1 Tipo de estudio</b>	<b>40</b>
<b>4.1.2 Población de estudio</b>	<b>40</b>
<b>4.1.3 Muestra</b>	<b>40</b>
<b>5. PROCEDIMIENTOS</b>	<b>40</b>
<b>5.1 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS</b>	<b>40</b>
<b>5.2 SELECCIÓN DE PÉPTIDOS</b>	<b>41</b>
<b>5.3 OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES</b>	<b>42</b>
<b>5.4 ENSAYO DE LINFOPROLIFERACIÓN PARA EPITOPES T</b>	<b>43</b>
<b>5.5 EVALUACIÓN DEL PERFIL DE CITOQUINAS POR CYTOMETRIC BEAD ARRAY (CBA)</b>	<b>44</b>
<b>5.6 ELISA PARA DETERMINACION DE REACTIVIDAD DE EPÍTOPES B</b>	<b>44</b>
<b>5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DESCRIPTIVO</b>	<b>45</b>
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>46</b>

<b>6.1 MUESTRAS EVALUADAS EN EL ESTUDIO</b>	<b>46</b>
<b>6.2 SELECCION DE PÉPTIDOS</b>	<b>47</b>
<b>6.3 ENSAYO DE LINFOPROLIFERACIÓN</b>	<b>48</b>
<b>6.4 CUANTIFICACIÓN DE CITOQUINAS POR CBA</b>	<b>51</b>
<b>6.5 REACTIVIDAD DE LOS EPÍTOPES B</b>	<b>58</b>
<b>7. DISCUSIÓN</b>	<b>61</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>65</b>
<b>9. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>66</b>

## LISTA DE TABLAS

	<b>pág</b>
<b>Tabla 1.</b> <i>Diferencias entre las especies de Plasmodium.</i>	<b>15</b>
<b>Tabla 2.</b> <i>Estimado de casos y muertes por paludismo, por región de la OMS, 2010-2016.</i>	<b>19</b>
<b>Tabla 3</b> <i>Número de pacientes tipificados por DRB1*.</i>	
<b>41</b>	
<b>Tabla 4.</b> <i>Diseño experimental para el ensayo de linfoproliferación.</i>	<b>43</b>
<b>Tabla 5.</b> <i>Codigos y número de muestras evaluadas en el estudio.</i>	<b>46</b>
<b>Tabla 6.</b> <i>Péptidos seleccionados como epítopes T para los ensayos de linfoproliferación y cuantificación de citoquinas.</i>	
<b>47</b>	
<b>Tabla 7.</b> <i>Péptidos seleccionados Como epítopes B para los ensayos de ELISA.</i>	<b>48</b>
<b>Tabla 8.</b> <i>Reactividad del péptido universal y los péptidos específicos.</i>	<b>51</b>
<b>Tabla 9.</b> <i>Diferencias significativas en las concentraciones de citoquinas de las muestras y los controles.</i>	
<b>52</b>	

## LISTA DE FIGURAS

	<b>pág</b>
<i>Figura 1. Distribución de malaria a nivel mundial para año 2017.</i>	<b>18</b>
<i>Figura 2. Estimado de la tasa de incidencia y mortalidad por paludismo a nivel mundial, 2000-2015.</i>	<b>20</b>
<i>Figura 3. Cambio estimado en la incidencia a nivel mundial de paludismo entre 2000-2015.</i>	<b>21</b>
<i>Figura 4. Casos notificados de malaria en Colombia 2000-2016.</i>	
<b>23</b>	
<i>Figura 5. Casos notificados de malaria por especie, semanas epidemiológicas 01-52, 2017</i>	
<b>23</b>	
<i>Figura 6. Ciclo de vida Plasmodium.</i>	<b>25</b>
<i>Figura 7. Fase exoeritrocitaria o hepática.</i>	<b>26</b>
<i>Figura 8. Mecanismos de reconocimiento e invasión de P. falciparum (A) y P. vivax (B).</i>	
<b>28</b>	
<i>Figura 9. Fase eritrocitaria.</i>	<b>29</b>
<i>Figura 10. Fase sexual Plasmodium.</i>	<b>31</b>
<i>Figura 11. Ficoll Hypaque.</i>	<b>42</b>
<i>Figura 12. Linfoproliferación de los linfocitos CD4+.</i>	<b>49</b>

<b>Figura 13.</b> <i>Indice de estimulación para cada DR.</i>	
<b>50</b>	
<b>Figura14.</b> <i>CBA para lisado de parasite.</i>	<b>53</b>
<b>Figura 15.</b> <i>CBA para peptido de baja union.</i>	
<b>54</b>	
<b>Figura 16.</b> <i>CBA para peptido universal.</i>	<b>55</b>
<b>Figura 17.</b> <i>CBA papa peptido específico 39117.</i>	<b>56</b>
<b>Figura 18.</b> <i>CBA para peptido específico 39113.</i>	<b>57</b>
<b>Figura 19.</b> <i>Reactividad epítope B1.</i>	<b>58</b>
<b>Figura 20.</b> <i>Reactividad epítope B2.</i>	<b>59</b>
<b>Figura 21.</b> <i>Reactividad epítope B3.</i>	<b>59</b>
<b>Figura 22.</b> <i>Reactividad epítope B4.</i>	<b>60</b>

## RESUMEN

La malaria es una enfermedad que afecta poblaciones en todo el mundo, y se presenta en áreas geográficamente adecuadas para la supervivencia del mosquito transmisor del género *Anopheles*. Este vector es el encargado de transmitir el parásito intracelular del género *Plasmodium*, el cual presenta 5 especies clínicamente relevantes en el ser humano.

*Plasmodium vivax* es la segunda especie más relevante, ya que presenta mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial después de *Plasmodium falciparum*. Cabe resaltar que esta especie por sus características fisiológicas, no dispone de un cultivo continuo *in vitro*, por lo cual los avances en investigaciones son muy limitados.

En este estudio se evaluó la antigenicidad de péptidos identificados como epitopes T, derivados de la proteína Pv12 de *P. vivax* en pacientes tipificados para HLA-DRB1\*, mediante ensayos de linfoproliferación y cuantificación de citoquinas, además se evaluó la reactividad de epitopes B por medio de inmunoensayos. Los resultados permitieron evidenciar la respuesta antigénica de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de los individuos que habían cursado la enfermedad, esta estimulación se evidenció en mayor medida por los péptidos 39113 y 39117, presentando una visible linfoproliferación y altos niveles de IL-6 e IL-10, encaminando así un perfil inmune por la vía Th2, por malaria causada por *P. vivax*, por otra parte, no se identificó diferencias significativas con relación al reconocimiento de epitopes B.

**PALABRAS CLAVES:** Malaria, *Plasmodium vivax*, proteína Pv12, polimorfismo, péptidos sintéticos, linfoproliferación, epitopes.

## INTRODUCCIÓN

En el pasado, la malaria era común en las áreas pantanosas de Roma y por ende su nombre se deriva del italiano “mal-aria” o "mal aire", también era conocida como fiebre romana. La Malaria o también llamada paludismo, es una enfermedad potencialmente mortal, causada por protozoarios del género *Plasmodium*. Las especies relevantes que infectan al humano son *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi*. Es transmitido por la picadura del mosquito hembra del género *Anopheles*, el cual está catalogado como el vector de la enfermedad (1).

Es una enfermedad parasitaria caracterizada por fiebre, escalofrío y anemia, estos síntomas están relacionados con los diferentes estadios que presenta el parásito en el proceso infectivo y a la respuesta inmune del paciente. El aumento en el número de parásitos en la fase eritrocitaria provoca la lisis del glóbulo rojo, lo que desencadena los signos y síntomas de la enfermedad (2). Las cinco formas de paludismo humano pueden ser tan semejantes respecto a sus síntomas iniciales, dificultando así su diferenciación por especie, por lo cual debe ser acompañado de estudios de laboratorio. Aún más el patrón febril de los primeros días de la infección se asemeja al que se observa en las etapas incipientes de otras enfermedades bacterianas, víricas o parasitarias (3).

Cabe resaltar que la malaria causada por *Plasmodium falciparum* puede infectar más del 30% de los eritrocitos en poco tiempo llevando a un significativo grado de hemólisis. Una posible razón es el hecho que *P. falciparum* invade las células rojas de todas las edades, mientras que *P. vivax* y *P. ovale* prefieren células rojas jóvenes (reticulocitos). Dentro de los signos característicos ocasionados por la infección con *P. vivax*, se describe las recaídas en el paciente debido a la reactivación de los hipnozoítos, que son formas latentes que se ubican en el hígado (2).

La malaria es un grave problema de salud pública a nivel mundial, con una elevada prevalencia. Para el año 2015 se estimó un número de muertes de 236.000 a 680.000 personas. El 90% de las personas que mueren corresponde a niños menores de 5 años (4). En Sur América hay transmisión de paludismo en nueve países que comparten la selva amazónica, en América Central y el Caribe en ocho países. Los desplazamientos de la población asociados a la explotación de minas de oro y bosques, han provocado epidemias aisladas aunque las características de transmisión son muy variables entre regiones e incluso en un mismo país (2).

Colombia presenta varias zonas endémicas, según la organización mundial de la salud, 12 millones de personas que habitan zonas de riesgo. A raíz de esto, se hace necesario el control, la prevención y la vigilancia de la enfermedad. Además, está estrechamente relacionada con el nivel socioeconómico de la población, aunque un factor de buen pronóstico es el tratamiento eficaz, ya que si se obtiene un diagnóstico oportuno, se espera un alto porcentaje de efectividad (5).

Para Colombia representa un grave problema de salud pública, debido a que el 85% del territorio rural, está situado por debajo de los 1.600 metros sobre el nivel del mar y presenta condiciones climáticas, geográficas y epidemiológicas aptas para la transmisión de la enfermedad. En el territorio colombiano, la transmisión es de tipo inestable y baja con patrones endemo-epidémicos variables y focales en las diferentes regiones eco-epidemiológicas (2).

# 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1 MALARIA

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la malaria y/o el paludismo, es una enfermedad potencialmente mortal causada por parásitos intracelulares del género *Plasmodium*, estos son transmitidos al ser humano por la picadura de mosquitos hembra infectados del género *Anopheles*. Las 5 especies de parásitos que afectan al ser humano son: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi* (Tabla 1). El nombre de malaria deriva (del italiano medieval «mal aire») o paludismo (de paludis, genitivo del término latino palus: ciénaga o pantano y de -ismo, en este caso acción o proceso patológico) (1). Esta enfermedad tiene un alto poder epidémico, relacionado con las condiciones socio-económicas y ambientales de poblaciones vulnerables, que todavía no cuentan con acceso a los servicios necesarios para prevenir y tratar el paludismo. Está presente en las zonas tropicales y subtropicales del mundo, donde el vector puede subsistir, constituyendo un evento de vigilancia, prevención y control (3).

**Tabla 1.** Diferencias entre las especies de *Plasmodium*. Modificado de (1)

	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. knowlesi</i>
<b>Ubicación geográfica</b>	Trópico. El más frecuente, sobre todo en África subsahariana.	Trópico. El más frecuente en Sudamérica, Asia y Oceanía.	África occidental. Filipinas, Indonesia, Papúa Nueva Guinea.	Focos en África subsahariana, Sudeste asiático, Indonesia, islas del Pacífico occidental y zonas de la cuenca del Amazonas.	Zonas selváticas de Malasia, Indonesia y Filipinas.

<b>Periodo de incubación</b>	8-25 días	10-30 días (ocasionalmente meses)	10-20 días (ocasionalmente meses)	15-25 días (ocasionalmente meses o años)	incierto
<b>Recaídas</b>	no	sí (formas quiescentes en el hígado, hipnozoítos)	sí (formas quiescentes en el hígado, hipnozoítos)	sí (formas quiescentes en el eritrocito)	no
<b>Resistencia a la Cloroquina</b>	Si	Si	No	Rara	no
<b>Parasitemia (rango mm<sup>3</sup>)</b>	1 000 a 50 000	2 000	1	6 000	1

### 1.1.1 Transmisión

- Vectorial: El *Anopheles* infectado al picar inocula los esporozoitos, que son la forma infectante del parásito.
- Transmisión vertical: De una madre embarazada infectada al feto.
- Inoculación directa: Con glóbulos rojos infectados por vía transfusional o casual por pinchazos con jeringas contaminadas.

### 1.1.2 Características clínicas

Los signos y síntomas que se presentan varían según la especie de *Plasmodium*. De manera general se presenta fiebre, escalofríos, sudoración y dolor de cabeza, además se puede presentar náuseas, vómitos, tos, heces con sangre, dolores musculares, ictericia, defectos de la coagulación sanguínea, shock, insuficiencia renal o hepática, trastornos del sistema nervioso central y coma (2).

*Plasmodium vivax* se caracteriza por la producción de la fiebre terciaria, infecta exclusivamente a los reticulocitos y suele causar recaídas en el paciente, debido a la reactivación de los hipnozoítos, que son las formas latentes que se ubican en el hígado (2). *Plasmodium malariae* produce la forma de paludismo más leve, por lo cual es conocida como malaria benigna y produce fiebres cuartanas. *Plasmodium falciparum* es el causante de la mayoría de las muertes por malaria, en la patogénesis tiene una característica importante que es la habilidad para secuestrarse en la micro-vasculatura venosa profunda y producir manifestaciones severas que incluyen: malaria cerebral, anemia profunda, insuficiencia respiratoria, insuficiencia renal y malaria severa del embarazo; además infecta a todos los estadios de maduración del glóbulo rojo llevando con mayor facilidad a posibles complicaciones (5).

## **1.2 MALARIA EN EL MUNDO**

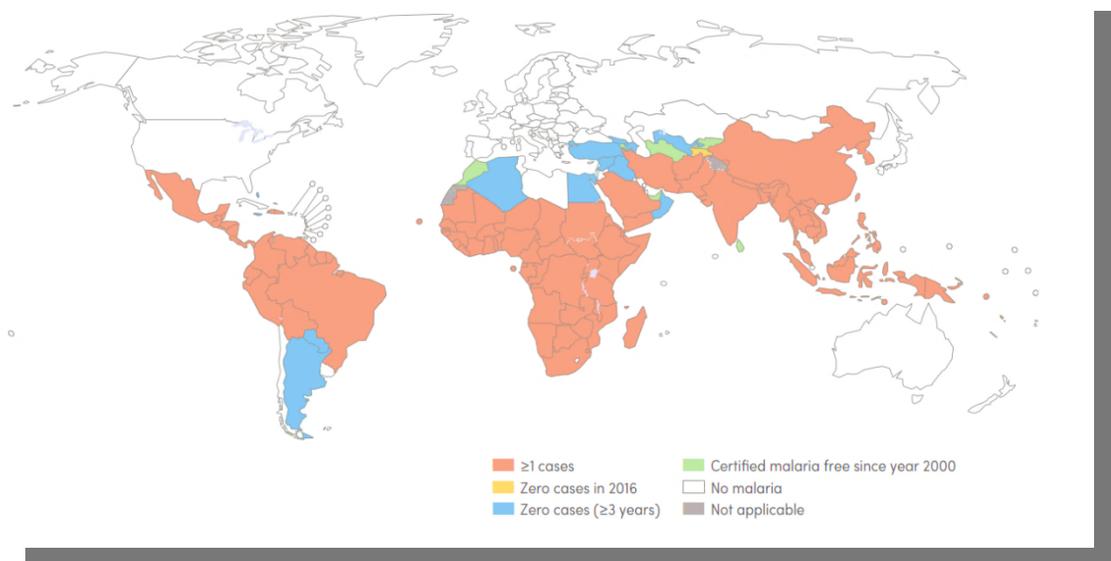
La malaria ha afectado a la humanidad desde tiempos remotos, se ha encontrado información en papiros antiguos en la época a.C, que hacían referencia a las características fiebres intermitentes u ondulantes como lo describe Hipócrates en su libro, el primero en las epidemias (400 a.C) y en el libro Medicina de Celso (25-54 a.C) (11). Aunque en la actualidad se cuenta con variada y consistente información sobre cómo tratar y a la vez prevenir esta enfermedad, aun se presentan numerosos casos en diferentes puntos geográficos, por lo cual es catalogada como un problema de salud pública a nivel mundial.

Según el último reporte de la OMS, estima que el número de casos de paludismo en el 2016, fue de 216 millones en todo el mundo, en comparación con los 211 millones de casos en 2015. El 90% de los casos de paludismo en el 2016 se registraron en la región de África, seguidos por la región de Asia Sudoriental con un 7% y la región del Mediterráneo Oriental con 2%. *P. falciparum* produce el paludismo más prevalente en el África subsahariana, representando el 99% de los casos estimados de paludismo en 2016 y *P.vivax* predominante en las Américas,

representando el 64% de los casos, cabe resaltar que está por encima con el 58% en las regiones del Asia Suroriental y el 40% en el Mediterráneo Oriental (1).

### 1.2.1 Distribución mundial de la malaria

La enfermedad a nivel mundial ha presentado una disminución según el último informe de paludismo de la OMS del año 2017, se evidenció que a lo largo de 16 años, pasaron de ser 106 países y/o territorios con transmisión activa de la enfermedad a 93 países, ya que Kirguistán y Sri Lanka fueron certificados por la OMS como libres de paludismo en este año (Figura 1) (1).



**Figura 1.** Distribución de malaria a nivel mundial para año 2017. Tomado de (2).

En 2016, hubo un estimado de 445.000 muertes por paludismo a nivel mundial, en comparación con 446.000 muertes estimadas en 2015, siendo el 91% de las muertes por paludismo en la región Africana en 2016, seguida por el 6% en la región de Asia Suroriental (Tabla 2) (1).

Africa	516 000	494 000	446 000	430 000	423 000	418 000	411 000
América Latina y el Caribe	7 000	7 000	7 000	7 000	7 000	7 000	6 000
Europa	0	0	0	0	0	0	0
India	600	780	600	600	600	480	650
Región del Mediterráneo Oriental	4 700	34 000	13 000	10 000	15 000	16 000	17 000
Región del Sudeste Asiático	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000
World	591 000	529 000	487 000	465 000	459 000	446 000	445 000

**Tabla 2.** Estimado de casos y muertes por paludismo, por región de la OMS, 2010-2016. Tomado de. (2)

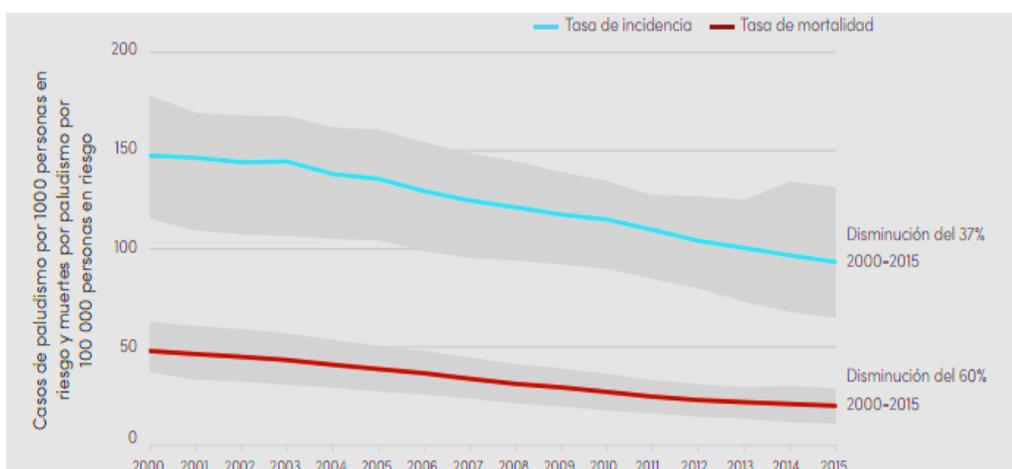
Nigeria, República Democrática del Congo, Burkina Faso y la India representó el 58% de todas las muertes por malaria a nivel mundial, haciendo parte de los 15 países que presentaron el 80% de las muertes en el año 2016. Todas las regiones registraron reducciones en la mortalidad en 2016 en comparación con 2010, a excepción de la región del Mediterráneo Oriental, donde las tasas de mortalidad se

mantuvieron prácticamente sin cambios. El mayor descenso se produjo en las regiones de Asia Sudoriental (44%), África (37%) y en las Américas (27%).

Estos datos han evidenciado que aunque en las poblaciones más necesitadas y/o vulnerables, se puede ver un número elevado en los casos con relación a otras regiones. También demuestra que los planes de acción han sido efectivos presentando tendencias positivas en diagnóstico oportuno, mortalidad e incidencia. Es importante resaltar los esfuerzos que se están siguiendo en el diagnóstico, ya que dos tercios de las muertes por paludismo a nivel mundial se presentan en niños menores de 5 años. En 22 países africanos, todo niño que presente síntomas característicos y se encuentre en un centro de salud, se le debe realizar un diagnóstico para malaria; por lo cual hubo un incremento del 77% en el diagnóstico oportuno durante los últimos 6 años (1).

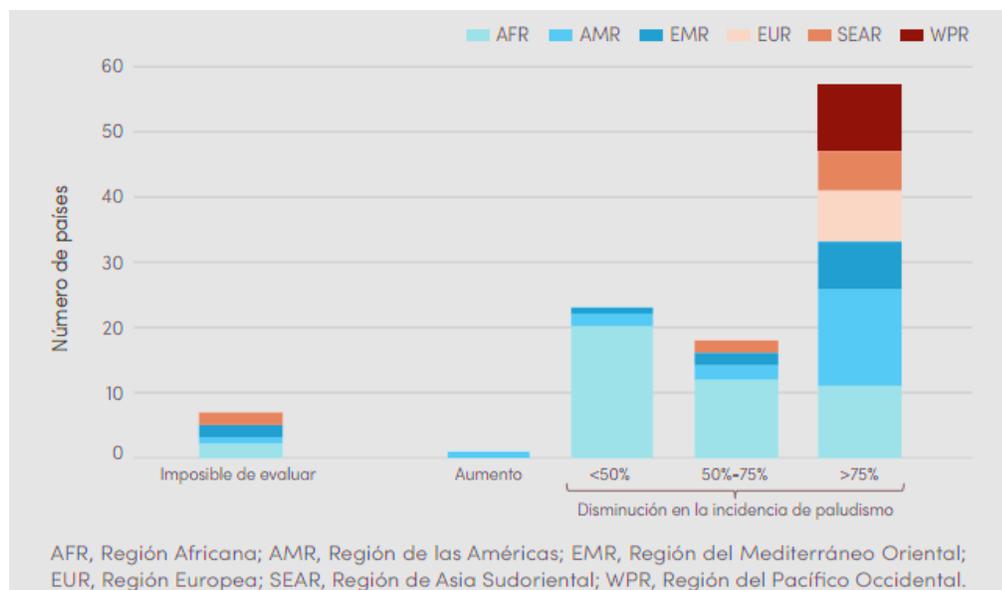
En el último reporte de la OMS se estima que la incidencia por paludismo, teniendo en cuenta el crecimiento demográfico, ha disminuido en un 37% a nivel mundial entre los años 2000 a 2015 (Fig. 2). Y las tasas de mortalidad por paludismo también disminuyeron en un 60%. Por lo tanto, se ha alcanzado la meta 6C del componente del paludismo de los ODM (Objetivos de Desarrollo del Milenio). Además, se ha realizado un progreso importante de la Asamblea Mundial de la Salud, en el objetivo de reducir la carga del paludismo en un 75% para 2015 y la meta de la iniciativa Hacer Retroceder la Malaria (RBM por sus siglas en inglés Roll Back Malaria) de reducir las muertes a casi cero (12).

**Figura 2.** Estimado de la tasa de incidencia y mortalidad por paludismo a nivel mundial, 2000-2015. Tomado de (12)



Como lo muestra el reporte de la OMS, se presentaron reducciones importantes en las tasas de incidencia y mortalidad por paludismo en todo el mundo, 57 países y territorios disminuyeron la incidencia de los casos en más del 75% (Figura 3) (3,12). La prevalencia de infección entre los niños de 2-10 años ha disminuido, del 33% en el año 2000 al 16% en el 2015.

**Figura 3.** Cambio estimado en la incidencia a nivel mundial de paludismo entre 2000-2015. Tomado de (12)



### 1.3 MALARIA EN COLOMBIA

Colombia se ha visto afectada significativamente, por sus características geográficas climáticas, entre otras, debido a que predisponen positivamente la reproducción del vector y por ende la transmisión de la enfermedad, volviéndose así un problema de salud pública. Se estima que en la actualidad aproximadamente 25 millones de personas se encuentran en riesgo de enfermar o morir por esta causa (2).

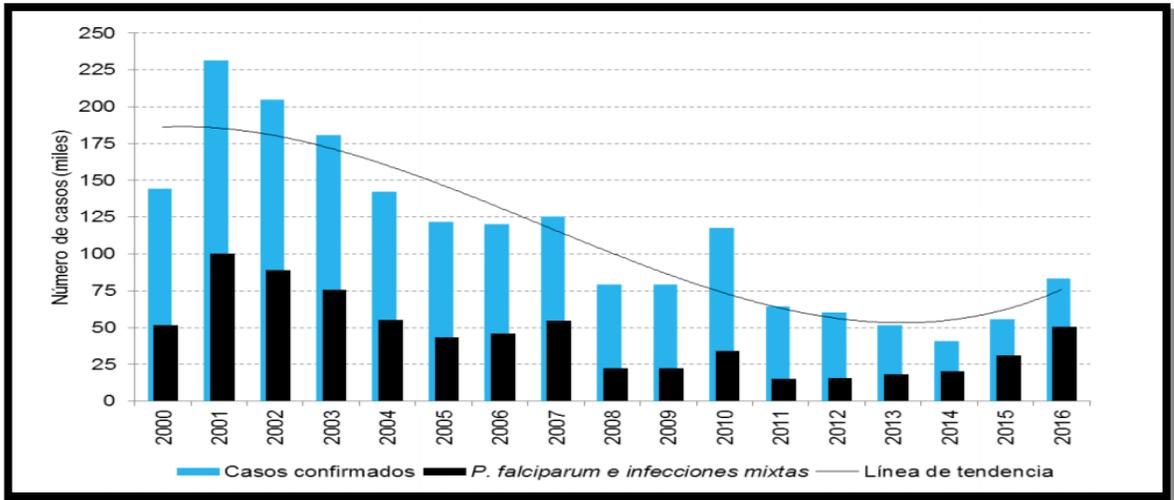
En las últimas tres décadas la morbilidad por malaria en Colombia, ha mantenido una tendencia ascendente, ya que se ha registrado un comportamiento con promedios anuales de 120.000 a 140.000 casos. Desde 1974, los casos de

malaria producidos por *P. vivax* predominan en el país (60 a 65%), aun cuando en regiones como la costa Pacífica la relación favorece a *P. falciparum*. El comportamiento que se registra en Colombia, se caracteriza por la presencia de ciclos epidémicos que ocurren cada 2 a 7 años, relacionados con la ocurrencia del fenómeno del Niño-Oscilación Sur (2).

Según el reporte del 2017 de La Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS), en el 2015 se registró un total de 451.242 casos de malaria en la Región de las Américas, lo que significó una reducción de 62% con respecto al año 2000, pero un aumento de 16% con respecto a lo observado en 2014 cuando se registró el menor número de casos de malaria en las últimas cuatro décadas. En 2016, la tendencia al aumento se mantuvo en países como Colombia, Ecuador y la República Bolivariana de Venezuela.

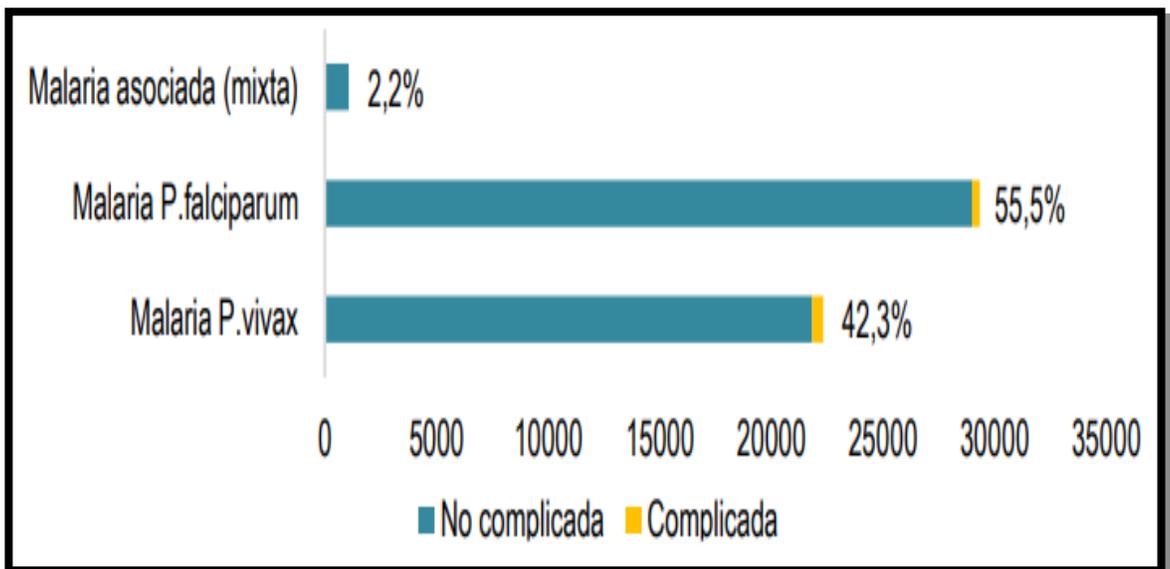
En Colombia entre las Semanas epidemiológicas (SE) 1 a 52 de 2016, se notificaron 83.356 casos de malaria de los cuales 47.4979 casos correspondieron a *P. falciparum* (57%), 33.055 a *P. vivax* (39,7%) y 2.804 a infección mixta (3,3%). Si bien hasta 2013 la mayoría de los casos eran causados por *P. vivax* a partir de 2014 esta proporción cambió y actualmente la mayor proporción de casos corresponde a *P. falciparum*. El número de casos de malaria por *P. falciparum* e infecciones mixtas notificado en 2016 fue superior al número notificado en los últimos 5 años (Figura 4). El 94% de los casos de malaria por *P. falciparum* e infecciones mixtas notificados en 2016 proceden de cinco entidades territoriales: Choco (62%), Nariño (21%), Antioquia (5%), Buenaventura (3%) y Cauca (3%) (3,13).

**Figura 4.** Casos en malaria en Colombia, 2000-2016. Tomado de (2)



Según el Instituto Nacional de Salud (INS) para la última semana epidemiológica del año 2017, se reportaron 29.404 casos por *P. falciparum* (55,5%), seguido por *P. vivax* con 22.405 casos (42,3%) y 1.148 casos de infección mixta por *P. falciparum* y *P. vivax* (2,2%) (Figura 5) (13).

**Figura 5.** Casos notificados de malaria por especie, semanas epidemiológicas 0152, 2017. Tomado de (13)



## **1.4 CICLO BIOLÓGICO DE LA MALARIA CAUSADA POR *P. vivax***

El parasito cumple su ciclo en dos huéspedes, uno invertebrado (fase sexual) y otro vertebrado (fase asexual), además presenta varios estadios. El vector infectado es capaz de inyectar aproximadamente 1,000 esporozoitos, los cuales viajan por el torrente sanguíneo y pueden llegar al hígado (14).

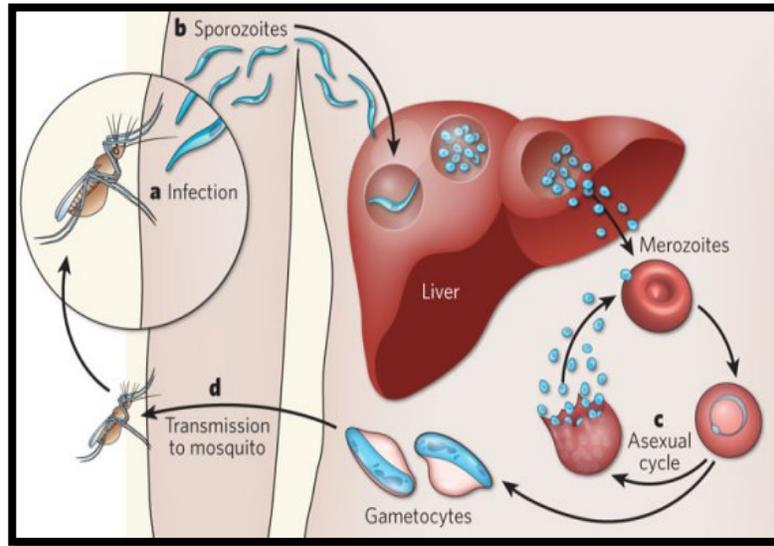
### **1.4.1 Fase asexual**

La reproducción asexual presenta dos fases: exoeritrocitaria (hepática) que comprende el esquizonte tisular y el criptozoito y la fase eritrocitaria (sanguínea) que comprende trofozoíto, esquizonte, merozoítos y gametocitos (14).

#### **1.4.1.1 Fase exoeritrocitaria (hepática)**

El ciclo comienza cuando los esporozoitos son inyectados a través de la dermis al hospedero humano, durante la alimentación sanguínea del mosquito hematófago. Se cree que estos tardan de 1 a 3 horas en salir de este sitio por deslizamiento, permitiendo que cierta proporción entre a un vaso sanguíneo y posteriormente pase al torrente sanguíneo; Aquellos que permanecen en la piel son destruidos y drenados por vía linfática, donde se inicia la generación de la respuesta inmune (Figura 6).

**Figura 6. CICLO DE VIDA DE PLASMODIUM.** (A) La infección tiene lugar cuando el mosquito pica al huésped humano, inyectando esporozoítos. (B) Los esporozoítos infectan las células del hígado, donde proliferan y se convierten en merozoítos, que a su vez infectan los glóbulos rojos. (C) En los glóbulos rojos, los merozoítos proliferan, reventando la célula y permitiendo la infección de nuevas células. (D) Los gametocitos se producen a partir de los merozoítos y pueden transmitirse a los mosquitos que muerden al huésped humano. Tomado de (15)

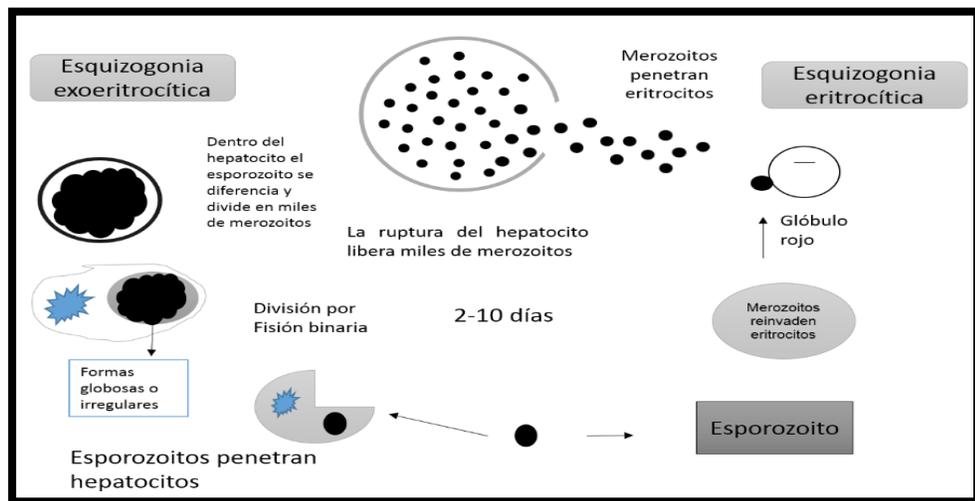


La proteína similar a Trap (TLP) juega un papel importante en la salida de la dermis, por ende los mutantes de esporozoítos que carecen de un desplazamiento funcional por alteración de esta proteína no entran en circulación (16). Se ha identificado que *P. vivax* posee la proteína *PvMSP3* ortóloga de la proteína de superficie *PfMSP3* de *P. falciparum* (17).

Los esporozoítos que llegan al torrente sanguíneo acceden al hígado rápidamente por un proceso conocido como recorrido. Este consiste en atravesar la barrera sinusoidal, comprometiendo las células endoteliales fenestradas y células de Kupffer. En este proceso son esenciales proteínas como SPECT, SPECT2, CeTOS y GEST. Los esporozoítos atraviesan las células formando una vacuola transitoria con ayuda de SPECT, que luego gracias a SPECT2 y cambios de pH, generan la salida de esta estructura (16).

El esporozoito invade los hepatocitos donde pasaran de un “modo migratorio” a un “modo invasivo”. Una señal para este cambio, es el reconocimiento de los hepatocitos mediante uniones a formas hiper sulfatadas de proteoglicanos heparán sulfato (HSGPs) activando la proteína 6 quinasa dependiente de calcio (CDPK6). Una vez el parásito se ha establecido en el hepatocito, se desarrollará dentro de los 2 a 10 días siguientes y generará alrededor de 40.000 merozoitos por hepatocito este proceso se denomina esquizogonia tisular primaria (18,19). Los merozoitos formados de esta manera pueden infectar otros hepatocitos o ser fagocitados por macrófagos y se liberaran a través de la brotación de los merosomas (16) (Figura 7). En el caso de *P. vivax* y *P. ovale*, tiene la capacidad de retener algunos elementos en el hepatocito, denominados hipnozoitos que continúan con el ciclo esquizogónico tisular en forma muy lenta, siendo los responsables de recidivas (19,20)

**FIGURA 7. FASE EXOERITROCITARIA O HEPATICA.** La maduración del *Plasmodium* (en forma de esporozoíto) en el hígado de una persona alcanza cuando, desde las células hepáticas y por disgregación (esquizogénesis), el *Plasmodium* se transforma en esquizonte o esquizonte hepático. En el hepatocito, el esquizonte lleva a cabo una replicación asexual que le permite alcanzar la forma de merozoíto. En cada célula hepática infectada puede producir entre diez mil y treinta mil merozoíto en un plazo de entre dos semanas y un mes desde la picadura. Al transformarse en merozoíto, *Plasmodium* rompe la célula hepática en la que se ha producido la reproducción asexual, liberándose de nuevo en el torrente sanguíneo. Tomado de (19).

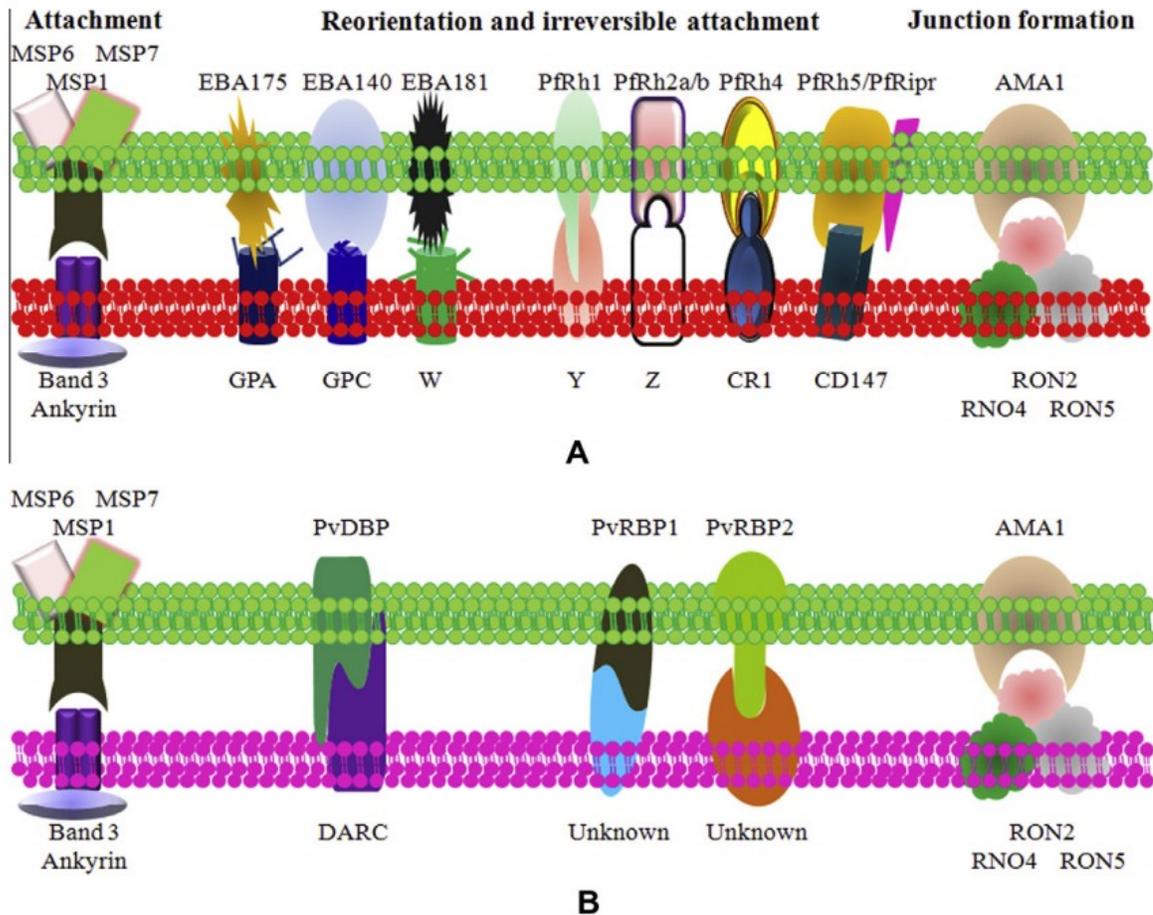


#### 1.4.1.2 Fase eritrocitaria

Esta fase se realiza a partir de la penetración en los reticulocitos por parte del estadio parasitante del merozoito. Previamente al reconocimiento de reticulocitos, los merozoitos son atraídos a estos ya que presentan en su superficie receptores de transferrina CD71+, a pesar que aún se desconoce su ligando e interacción (21). Una vez son liberados a la circulación hepática, los merozoitos libres entran en una transformación rápida, dinámica y multifacética incluyendo procesos que se realizan en un tiempo aproximado de 2 minutos como los son: la pre- invasión, invasión activa y equinocitosis.

La pre-invasión involucra una fuerte interacción entre el merozoito y el eritrocito generando una deformación en el motor de actina-miosina de la célula hospedera. En el caso de *P. vivax*, su ligando para el reconocimiento de reticulocitos son la Proteína de Unión a Duffy *PvDBP* (Duffy Binding Protein) y la familia de Proteínas de Unión a Reticulocitos *PvRBP* (Reticulocytes Binding Proteins). DBP se une específicamente al receptores DARC (Duffy Antigen Receptor for Chemokines), aunque aún se desconoce el receptor de la *PvRBP* (22,23,24). La familia de la proteínas *PvRBP* está constituida por 11 miembros y sus roles estas relacionados con el reconocimiento a la célula diana, además son de gran importancia porque es necesaria su integridad para la supervivencia del parásito (23).

Después de la unión irreversible del merozoito con el eritrocito, que se da gracias a los complejos AMA1 y RON, se anclan a la superficie del merozoito, luego entra por acción del motor de actina-miosina. Cuando esta fase de invasión activa termina por la fusión de membranas y la posterior salida del merozoito de la vacuola parasitófora, generando que el eritrocito se encoja y forme protuberancias puntiagudas que están relacionadas con la entrada de  $Ca^{+2}$  (16). En la figura 8 se puede observar los mecanismos de interacción con la célula blanco de *P. falciparum* y *P. vivax*.



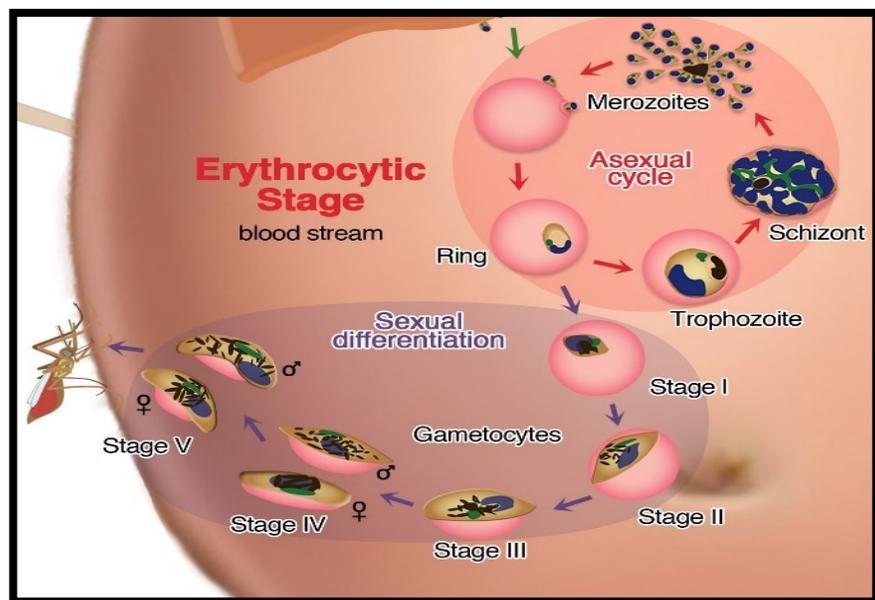
**Figura 8.** Mecanismos de reconocimiento e invasión de *P. falciparum* (A) y *P. vivax* (B). Tomado de (22)

Una vez establecida la invasión inicia la división celular (esquizogonia), los merozoitos comienzan a alimentarse de la parte proteica de la hemoglobina contenida en los glóbulos rojos, apareciendo entonces el trofozoito. Nuevamente por esquizogénesis se multiplica en el interior de dichas células, formándose el

esquizonte hemático, se rompe la célula destruyendo la membrana del eritrocito, llevando así a la liberación de merozoitos ya desarrollados. La coordinación de los procesos de salida de los merozoitos es dirigida por proteínas quinasas (16) en este caso se liberan nuevos merozoitos; la mayoría de los merozoitos continúan con este ciclo replicativo infectando nuevos eritrocitos.

Durante la esquizogonia continúa el desarrollo del parásito y conlleva a una diferenciación sexual, generando formas sexuales femeninas y masculinas tales como macrogametos y microgametos, respectivamente. Estos estadios sexuales son fundamentales para la transmisión al humano, por lo cual también son reconocidos como blancos para vacunas y medicamentos antiparasitarios (16) (fig 9).

**Figura 9. FASE ERITROCITARIA.** Los merozoitos se liberan a sangre después de la ruptura celular, teniendo la capacidad de invadir más glóbulos rojos, donde replicarse asexualmente hasta 5 veces en 48-72 horas produciendo alrededor de 32 merozoitos; el glóbulo rojo se degrada y liberando los nuevos merozoitos que pueden infectar otros glóbulos rojos vecinos. El merozoito entra en el glóbulo rojo se forma un trofozoito, este madura (24-72 horas) perdiendo su morfología de anillo y mediante un fenómeno de división nuclear, comienza a formarse el estado de Esquizogonia eritrocítica. Algunos de los trofozoitos intraeritrocitarios maduran en formas sexuadas. Son los denominados gametocitos (macho y hembra) que serán absorbidos por el mosquito. Tomado de (25)



### 1.4.2 Fase sexual

Esta fase se realiza en el mosquito y dura siete a catorce días. Esta reproducción es esporogónica porque en el mosquito da lugar a la formación de esporozoitos. Se inicia con la ingesta de sangre de una persona infectada que contenga las formas sexuales del parásito, los gametocitos (19).

El mosquito *Anopheles* hembra succiona la sangre de un humano infectado, donde se encuentran los gametocitos maduros, que llegan al estómago del mosquito. En este punto los gametocitos reciben señales ambientales, para iniciar la diferenciación a gametos; en sólo 10 minutos ambos gametocitos, masculino y femenino, disgregan la membrana eritrocítica quedando libres en el estómago. En este período, el macrogametocito se forma en un gameto haploide no móvil, mientras que el microgametocito replica su genoma 3 veces y produciendo 8 flagelos, proceso llamado exflagelación.

Estos microgametos exflagelados se adhieren normalmente a eritrocitos vecinos que se encuentran en el lumen del estómago del vector, y son ocultos dentro de rosetas, formando lo que se denominan centros de exflagelación. La fusión de los gametos es seguida por la meiosis, y el cigoto se convierte en tetraploide. Durante las siguientes 24 horas, el cigoto se transforma en ooquineto, marcando así el final de la fase sexual del *Plasmodium* (18,19).

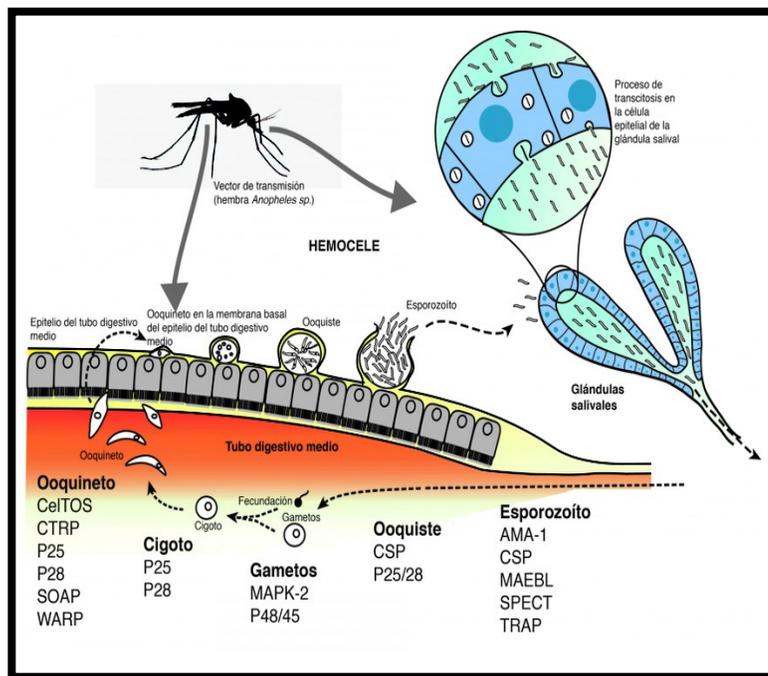
El ooquineto que sale de la célula epitelial, se enfrenta al medio ambiente del hemocele donde hay reconocimiento por los receptores inmunes dando lugar al proceso de enquistamiento, rápido y efectivo en la superficie de los parásitos que están expuestos, los parásitos que no murieron por este continúan hasta llegar a la lámina basal, donde la interacción con dicha lámina parece inhibir la motilidad

“gliding” (migración). El ooquineto inicia la transformación a una forma replicativa y trófica, llamado ooquiste (26,27).

El ooquiste realiza diferenciación celular y en el retículo endoplasmático (ER) y aparato de Golgi se expanden significativamente (28); el desarrollo dura aproximadamente de 10 a 12 días. El ooquiste es la única etapa de desarrollo del parásito que es extracelular del ciclo de vida del parásito (29).

Luego de la división nuclear, el citoplasma de la célula comienza a subdividirse por la expansión del espacio cisternal del Retículo Endoplasmático, y las células hijas (los esporozoítos) se desarrollan en la superficie de la célula. Los esporozoítos en desarrollo salen del esporoblasto. Luego de que la maduración de los esporozoítos se completa, millones de estos serán liberados del ooquiste cuando este estalle, en la hemolinfa del mosquito. Aún no se sabe si el estallido del ooquiste ocurre debido a la ruptura pasiva de la pared celular o por la activa degradativa mediada por el esporozoíto (30) (fig.10).

**Figura 10. FASE SEXUAL PLASMODIUM.** Desarrollo del parásito en el mosquito, mostrando las proteínas que intervienen en cada estadio parasitario. Tomado de (14)



## 1.5 PATOGÉNESIS

La malaria causada por *P. vivax* ha sido descrita como terciaria, ya que era poco probable que sus episodios clínicos llegaran a causar una malaria severa como en el caso de *P. falciparum*. Sin embargo, *P. vivax* conlleva a muchos casos de morbilidad; es una infección simple que generalmente se desarrolla como una enfermedad febril, en algunos casos en presencia de co-morbilidades. Puede desencadenar una enfermedad severa con resultados fatales, además de infecciones recurrentes dadas en zonas endémicas provocando anemia y malnutrición, afectando en su mayoría a niños de la primera infancia (31).

Otras presentaciones poco frecuentes son lesiones pulmonares, lesión aguda de riñón y muy rara vez coma; la falla multisistémica se relaciona con infecciones concomitantes. En mujeres embarazadas puede producir anemia maternal, aborto espontáneo, bajo peso de nacimiento al bebé y malaria congénita. Aunque se sabe que *P. vivax* genera una mayor respuesta inflamatoria, contiene una citoadherencia menor a células endoteliales. Su predilección por células rojas inmaduras no conlleva a altas biomasas causantes de malaria severa como en la infección con *P. falciparum*. A pesar que aún se desconoce la patogenia de la malaria severa por *P. vivax* (31).

Hay diferentes factores claves que definen la patogenia de la malaria severa que se presenta en su mayoría por *P. falciparum* en niños. El primero, es debido al incremento del reconocimiento del parásito, que desemboca en un desorden inmune pro-inflamatorio generando lesiones en tejidos y órganos. La principal característica fisiopatológica es una acidosis metabólica, con la que atraviesa la clínica clásica de la malaria anémica severa y cerebral. Otro factor determinante es el desencadenamiento de una acidosis láctica por el síndrome de agotamiento respiratorio, el cual es la principal causa de acidosis metabólica en niños. Cursa con malaria severa, con el incremento en la producción de ácido láctico por parte de los parásitos debido a la estimulación de las citoquinas. Es acompañado de

una filtración fallida por el riñón, además de los demás factores de la malaria severa que reducen el oxígeno delegado a los tejidos (32).

En infecciones por *P. vivax*, se ha visto que uno de los factores relacionados a la hipoxia isquémica durante la malaria es el óxido nítrico (ON); es generado por los monocitos a partir de la arginina e inducido por la óxido nítrico sintasa (ONS). Gracias a sus roles en el sistema renal, respiratorio y metabolismo de la glucosa puede ocasionar insuficiencia renal, edema pulmonar y aumento de la glucolisis, respectivamente. Durante la hipoxia se producen citoquinas inflamatorias como el interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), esto genera una inducción de ONS lo que crea un marco de referencia que ayuda a explicar la diferencia a nivel molecular entre la patogénesis debido a la respuesta inflamatoria de *P. vivax* respecto a *P. falciparum* (33).

Aunque, no se ha mostrado aun datos que esta consecuencia conlleve a la malaria cerebral y a la supresión de la medula ósea (31). Se había sugerido que la patogenia de la malaria cerebral es debida al ON que se produce, sin embargo, la concentración de ON es más elevada a nivel sistémico que cerebral. No obstante, se cree que la causa del coma por malaria es debido a la activación de astrocitos y microglías con su consecuente toxicidad. Además, se relaciona con concentraciones de ON cerebral produciendo una presión craneal acompañada de convulsiones, edemas y daño cerebral permanente. Esta neurotoxicidad es generalmente regulada por N-metil D- aspartato (NMDA), por medio de entrada de  $Ca^{+}$  al medio citoplasmático lo que retrasa la desintegración neuronal (34,35).

*P. vivax* actualmente es reconocido por ser causante de casos de malaria severa y fatal, además de su alta tasa de morbilidad. Ha sido estudiado y reconocido por su incremento en la habilidad de deformación de las células rojas infectadas, además de una escasa retención de células parasitadas. La anemia severa, se ha asociado a las crisis hemolíticas predominantemente por eritrocitos no infectados, pero que presentan un incremento en su fragilidad; acompañada por lesiones

pulmonares con inflamación que provoca un aumento en la permeabilidad de la membrana de los capilares alveolares. Aunque rara vez se ha asociado con los casos de coma, se sabe que todos estos hallazgos son dependientes de las condiciones y características del hospedero, que pueden o no contribuir a la morbilidad que pueda causar (35).

## **1.6 RESPUESTA INMUNE EN MALARIA**

En la literatura, existen diversas variables del parásito y del agente hospedero, las cuales pueden generar diversos tipos de respuestas inmunes. Sin embargo, es posible describir una respuesta inmune general a la infección: Desde la entrada en la dermis los esporozoitos son captados por los macrófagos epiteliales y por las células dendríticas (CDs), las cuales presentarán tanto a linfocitos T CD4+ como a CD8+, de la misma manera las células presentadoras de antígenos (CPA) en los nódulos linfáticos capturan y presentan a los esporozoitos que migraron por los vasos linfáticos (10).

Una vez en los vasos sanguíneos, anticuerpos IgG son capaces de bloquear la migración e invasión a los hepatocitos. En el estadio hepático los hepatocitos infectados se convierten en blancos de las células T CD8+, CD4+ y células T gamma/delta. Los CD8+ generan IFN- $\gamma$  que activarán macrófagos para la producción de citoquinas pro-inflamatorias como la IL-18, IL-12 (que activa a las NK para la producción de más IFN- $\gamma$  desencadenando la diferenciación hacia TH1), TNF- $\alpha$  e IL10. El esporozoito al lisar a los hepatocitos inducen inflamación, lo cual no es conveniente para los parásitos por lo que inhiben el gen MyD88, encargado de activar el factor NF-KB que induce inflamación, mediante unión con los TLR de los hepatocitos (36,37).

Una vez liberados los merozoitos de los hepatocitos, pueden ser atacados por anticuerpos opsonizantes que pueden interferir con las proteínas de superficie en el proceso de reconocimiento e invasión. Luego durante el estadio intraeritrocítico

se llevara a cabo una respuesta principalmente mediada por anticuerpos, esto debido a que los eritrocitos no cuentan con MHC I ni II, por lo cual no pueden presentar antígenos a linfocitos CD8+ por lo que la respuesta se mediará por los linfocitos B previamente estimulados. Estos linfocitos son capaces de interrumpir algunas rupturas de los eritrocitos dada en la liberación de los merozoitos, por ende se tiende a pensar que la respuesta celular cobra más importancia para los estadios hepáticos y la humoral para los eritrocíticos, ya que esta última dependerá de los linfocitos B (LB) que fueron previamente estimulados por linfocitos CD8+ (36,37).

### **1.7 PROTEINA Pv12**

Gracias a la secuenciación completa de *P. vivax*, durante el desarrollo intraeritrocitario, se dio la oportunidad de perfilar la respuesta inmune que se genera por las diferentes proteínas. Tras la secuenciación, clonación y expresión de proteínas de 94 ORFs, se obtuvieron patrones de inmunorreactividad para el 19.1% de las proteínas, dentro de las que se encontraba la proteína Pv12. Evidenciando su similitud ortóloga con la proteína Pf12 de *P. falciparum*, cuya antigenicidad ya se ha demostrado anteriormente (38).

Esta proteína junto con la Pv38 revelo tener una baja variabilidad genética entre parásitos obtenidos de diferentes zonas endémicas de Colombia. Mediante análisis bioinformáticos de secuencias referenciadas de GenBank entre 2007 a 2010, las cuáles arrojaron resultados de la presencia de los diferentes haplotipos entre regiones conservadas codificantes de funcionalidad en el caso de Pv12 o de característica estructural del parásito, aunque encontraron una frecuencia relativamente baja para los diferentes haplotipos (39).

El estudio de localización de la proteína ortóloga Pf12 la ubica en la superficie del merozoito, al igual que Pv12 (29). No obstante, por medio de ensayos de inmunofluorescencia se sugirió que el patrón de localización de Pv12 en

merozoitos maduros, se encuentra en el polo apical en las roptrias (ya sea en el cuello o en el cuerpo (11).

La caracterización de la proteína *Pv12* realizada por medio de ensayos de inmunoquímica y biología molecular, determina que está constituida por 362 aminoácidos con un peso molecular de 41kDa. Es codificada por un solo exón del gen *pvx\_113775*, contiene 2 dominios de 6-Cys limitados por enlaces de disulfuro, también contiene un dominio transmembranal de anclaje tipo GPI en la región C terminal (11).

### **1.8 ANTIGENICIDAD**

Es la capacidad que tiene un antígeno para producir una reacción inmune específica con los productos finales de la respuesta inmune, anticuerpos y/o con receptores de células T (TCR), en la actualidad se define como toda sustancia propia o ajena, que pueda ser reconocida por el sistema inmune (40). El antígeno es reconocido por el anticuerpo gracias a la región determinante de complementariedad ubicada en la fracción Fab del mismo (30). Los Epítopes o determinantes antigénicos son las unidades expuestas de un antígeno que es reconocido individualmente por el anticuerpo específico o TCR, es decir, los epítopes son las regiones inmunológicamente activas de un antígeno. Pueden ser lineales (continuos) o conformacionales (discontinuos) (40,41).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 GENERAL**

Evaluar la antigenicidad de péptidos derivados de la proteína *Pv12* de *Plasmodium vivax* a partir de muestras obtenidas de individuos de zonas endémicas en Colombia.

### **2.2 ESPECIFICOS**

- Determinar la capacidad de linfoproliferación de epítopes T de la proteína *Pv12* en muestras de individuos de zonas endémicas.
- Establecer la producción de citoquinas en los sobrenadantes de linfoproliferación a partir de las muestras de los individuos del estudio.
- Evaluar la respuesta inmune humoral de epítopes B en las muestras de los mismos individuos.

### 3. ANTECEDENTES

Las cuatro especies de este parasito que afectan al hombre se habían diferenciado en la era del pleistoceno medio y se cree luego del conceso de cierto debate, que la dispersión de la enfermedad entre África, Asia y Europa hacia el nuevo mundo se dio a través de viajes europeos de exploración durante el siglo XV (6).

Aunque en la época medieval se supo poco sobre malaria, ya se reportaban signos de fiebres intermitentes en Italia en el siglo XVII. Luego en la expansión colonial de Europa hacia los trópicos siglo XIX, llevo consigo el contacto con muchas enfermedades nuevas y diseminación de las ya conocidas (6). En 1880, se dieron los primeros indicios del agente etiológico de la malaria por Charles Louis Alphons. Sin embargo, solo hasta 1884 se determinó que era un organismo parasitante, al cual Ettore Marchiafava y Angelo Celli denominaron como *P.malariae*; luego en 1886 Camilo Golgi, expone a *P.vivax* como uno de los agentes causales de la malaria y sugiere una tercera especie (6).

En 1989 durante estudios de variantes electroforéticas de la enzima glucosa fosfato isomerasa de muestras aisladas en Tailandia de *P.malariae*, *P.vivax* y *P.falciparum*, encontraron que estas especies demostraban amplia diversidad genética a través de un tiempo relativamente corto (7). Posteriormente, en 1992 se reportan estudios de caracterización serológica y molecular de los antígenos de *Plasmodium*.

Gracias al reporte del genoma de *P. vivax*, el departamento de biotecnología del instituto médico de la India aisló un nuevo antígeno recombinante llamado “Pv12”. A través de técnicas inmunológicas de tamizaje mostró una secuencia homologa a la apolipoproteína B-100 humana. Esta demostró ser de interés debido a que podría estar jugando un papel dual en la supervivencia del parasito y en la activación de una respuesta humoral, además arrojó resultados concomitantes de

la alta cantidad del contenido de las bases nitrogenadas G-C en el genoma de *P. vivax* (8).

En 1998 otro estudio de caracterización molecular llevado a cabo por el mismo instituto, indicó que el antígeno *Pv12* contenía elementos Alu y que se expresaba durante la fase eritrocitaria del parásito. El gen *Pv12* codifica para más de 200 aminoácidos, es altamente hidrofóbico, rico en leucina (19.4%), serina (15.9%), prolina (15.4%) y fenilalanina (15.4%). La región 5' no traducida y parte de la 3' codificante mostró una homología significativa a diferentes familias Alu, concluyendo que la existencia de elementos Alu en la región codificante del parásito es importante desde el punto de vista funcional y evolutivo del antígeno (9).

A finales de 2012 se tenía caracterizada la proteína *Pf12* de *P. falciparum*, la cual se identificó como una proteína de superficie del merozoito y que se transcribía durante el estadio del esquizonte. *Pv12* se catalogó como un gen ortólogo dentro del genoma de *P. vivax*, esta proteína contiene 2 dominios (6-Cys) unidos por enlaces disulfuro, un dominio de anclaje a membrana tipo GPI; la proteína recombinante *Pv12* es reconocida por los anticuerpos en sueros de pacientes expuestos naturalmente a *P. vivax*. Inicialmente se localizó en las roptrías (a diferencia de *Pf12*), y tiene una función importante en la invasión eritrocitaria (10).

En el mismo año, se llevó a cabo una nueva caracterización de la misma proteína la cual fue realizada por la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), donde se determinó la localización de esta en la superficie del parásito, además que está presente en los microdominios resistentes a detergentes (DRM) y se propuso como un posible candidato para el desarrollo de una vacuna contra *P. vivax* (11).

## **4. METODOLOGÍA**

### **4.1 Tipo de estudio**

Este estudio fue de carácter experimental con un enfoque cuantitativo.

### **4.2 Población de estudio**

Individuos provenientes de zonas endémicas para la infección causada por *P. vivax* de los departamentos de Córdoba y Choco en Colombia.

### **4.3 Muestra**

Veintinueve individuos provenientes de zonas endémicas para la infección causada por *P. vivax* de los departamentos de Córdoba y Choco en Colombia y 8 de zona no endémica como grupo control.

## **5. PROCEDIMIENTOS**

### **5.1 Obtención de las muestras**

Se tomaron muestras de sangre periférica obtenidas por venopunción, en tubos con citrato-fosfato-dextrosa (CPD) y en tubos sin anticoagulante, las cuales fueron utilizadas posteriormente para los ensayos de linfoproliferación y ELISA, respectivamente.

Para la toma de muestra de sangre periférica de los individuos del estudio, el grupo funcional de Inmunología de la FIDIC, tuvo en cuenta los siguientes criterios de inclusión: Ser mayor de edad, residir en zonas endémicas de malaria causada por *P. vivax*, haber presentado uno o más episodios de malaria causada por *P. vivax* (no infecciones mixtas con *Plasmodium* spp) con al menos 6 meses de anterioridad y haber recibido tratamiento idóneo para la enfermedad.

Las muestras de los individuos fueron previamente tipificadas para los alelos HLA-DRB1\*04, \*07, \*11 y \*13 (Tabla 3) por Histogenetics LLC (USA), empleando la tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS) Illumina Miseq. Todos los individuos que hicieron parte del estudio firmaron un consentimiento informado para la toma de muestras y todos los procedimientos fueron evaluados y aprobados por el comité de ética de la FIDIC. Los alelos seleccionados son los que presentan mayor distribución en zonas donde predomina la malaria por *P. vivax*, por lo cual fueron seleccionados para el presente estudio (42).

**Tabla 3.** Número de pacientes tipificados por DRB1\*

<b>Alelo DRB1*</b>	<b>NUMERO</b>
<b>*04</b>	8
<b>*07</b>	8
<b>*11</b>	7
<b>*13</b>	6

## **5.2 Selección de Péptidos**

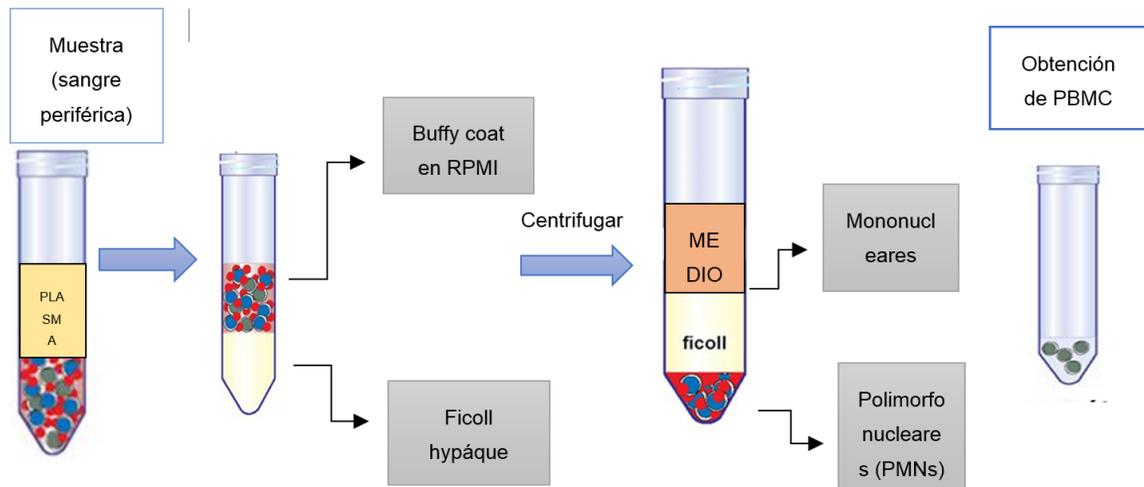
Los péptidos evaluados de la proteína *Pv12* fueron previamente seleccionados por la FIDIC de acuerdo a su capacidad de unión a moléculas HLA-DRB1 para los epítopes T y por medio de herramientas bioinformáticas para los epítopes B; estos péptidos fueron sintetizados por el grupo funcional de Síntesis Química de la FIDIC. Los péptidos para epítopes T evaluados se denominaron con los códigos 39113 (péptido común DR\*4-DR\*11), 39117 (péptido común DR\*7-DR\*13), 39114

(péptido universal, por demostrar alta capacidad de unión a los 4 alelos de interés) y 39115 (péptido de baja capacidad de unión a los 4 alelos de interés).

### **5.3 Obtención de células mononucleares**

A cada individuo del estudio se le tomaron 40 mL de sangre periférica en tubos con CPD. Las muestras fueron centrifugadas a 2000 rpm por 5 min (se guardó el plasma a -20°C), se extrajo el buffy coat, el cual fue resuspendido en 8 ml de medio RPMI para su posterior separación con Ficoll Hyaque en una proporción 1:2 (Ficoll: Muestra) (Figura 11). Las muestras con Ficoll hypaque se centrifugaron a 2000 rpm por 30 minutos, se recuperó la capa de células mononucleares (PBMCs), se procedió a hacer 2 lavados con RPMI y suero fetal bovino (SFB) al 10%, centrifugando a 1800 rpm por 5 minuto cada uno. Los PBMCs se resuspendieron en medio RPMI, posterior a ello se realizó el recuento y la viabilidad celular con azul de tripan en cámara de Neubauer.

**Figura 11. FICOLL HYPAQUE.** Procedimiento para la obtención de PBMCs, a partir de gradientes de densidad empleando la técnica Ficoll hypaque.



#### 5.4 Ensayo de Linfoproliferación para epítopes T

Los PBMCs fueron cultivados en 200  $\mu$ L de RPMI suplementado con plasma autólogo al 10%. El ensayo se realizó en una caja de 96 pozos fondo redondo. Se utilizaron pozos individuales con PHA y lisado del parásito *P. vivax* (como controles positivos) y como control negativo se utilizaron células sin estimular.

Se le adicionó  $2 \times 10^5$  de PBMCs con el marcador Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester (CFSE) para evaluar la linfoproliferación junto con el estímulo correspondiente según el diseño experimental (Tabla 4),

**Tabla 4.** Diseño experimental para el ensayo de linfoproliferación.

COMPONENTES EVALUADOS	CONCENTRACIÓN FINAL
1. PHA	2%
2. Lisado de parásito	5 $\mu$ g/ml
4. Péptido de baja unión 39115	10 $\mu$ g/ml
5. Péptido 39117 DRB1*07 y *13	10 $\mu$ g/ml
5. Péptido 39113 DRB1*04 y *11	10 $\mu$ g/ml
6. Péptido universal 39114	10 $\mu$ g/ml
7. Control sin estimular	-----

Se procedió a incubar la caja a 37°C en una atmosfera con 5% de CO<sub>2</sub> durante 5 días; a las 72 horas, se recolecto 125 µL de sobrenadante por pozo y se almaceno a -80° centígrados, para la posterior cuantificación de citoquinas con el kit comercial CBA. Al término de la incubación, se marcaron las células con el anticuerpo anti-CD4 incubando a 4°C durante 30 minutos en oscuridad, se realizo un lavado con PBS 1X por centrifugación y finalmente, las células se resuspendieron en PBS 1X, para su lectura en el citómetro de flujo FACS Canto II.

### **5.5 Evaluacion del perfil de citoquinas por Cytometric Bead Array (CBA)**

Para la cuantificación de las citoquinas presentes en el sobrenadante de los cultivos de las células previamente estimuladas en los ensayos de linfoproliferación, se utilizó el kit Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2 Cytokine Kit II, de la casa comercial Becton Dickinson™, para evaluar el perfil Th1/Th2 (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN-γ); según las indicaciones del fabricante. Las muestras control eran las de individuos de zonas no endémicas.

Para la lectura del ensayo primero se relizó la validación de la curva de calibración y posteriormente las lecturas del ensayo en el citómetro de flujo FACS Canto II, para finalmente analizar los resultados con el software FCAP Array.

## 5.6 ELISA para determinación de Reactividad de epítopes B

Se realizó la técnica de ELISA en sándwich, utilizando el suero de los individuos del estudio y de los controles negativos (muestras de pacientes de zonas no endémicas). Se evaluó la presencia de anticuerpos reactivos frente a los péptidos de epítopes B de la proteína Pv12 seleccionados por herramientas bioinformáticas.

Se incubaron los péptidos con una concentración final de 10ug/ml toda la noche a 4°C en inmunomódulos. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados a las placas de ELISA con PBS 1X-Tween 20 al 0.05%. Se realizó el bloqueo de los sitios inespecíficos, adicionando 100 µL de la solución de bloqueo (leche descremada al 2,5% en PBS 1X ) a temperatura ambiente durante 1 hora, luego se realizaron 3 lavados a las placas con PBS-Tween 20 al 0.05% para eliminar el material no unido.

Después se adicionó 100 µL de los sueros de los pacientes en dilución 1:100 en solución de bloqueo, incubando a temperatura ambiente durante 2 horas. Se realizaron 3 lavados a las placas con PBS-Tween 20 al 0.05%. Se incubó durante 1 hora con el anticuerpo secundario Anti-IgG humana acoplado a peroxidasa en dilución 1:10.000. Se realizaron 3 lavados a las placas con PBS-Tween 20 al 0.05%. Por último se adicionó el sustrato o-fenilendiamina dihidrocloruro-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que se reducirá y formará el cromógeno, cuya reacción se determinará por espectrofotometría a una longitud de 450 nm, utilizando el espectrofotómetro Multiskan GoThermo scientific.

## **5.7 Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico de los resultados de los ensayos de linfoproliferación, se utilizaron las medias de los controles negativos; por otro lado para el análisis de la reactividad de epitopes B y cuantificación de citoquinas por CBA, se utilizó como punto de corte dos desviaciones estándar.

Se realizó el test de Shapiro–Wilk, para contrastar la normalidad del conjunto de datos obtenidos, a partir de los resultados, se procedió a aplicar el test correspondiente para la determinación de diferencias significativas entre las muestras de los ensayos.

En el ensayo de reactividad de epitopes B, se identificó las diferencias significativas, a partir de las absorbancias obtenidas en cada una de las muestras, previa a la estimulación generada con los respectivos estímulos, frente al control. Para el ensayo de cuantificación de CBA se evaluó cada una de las concentraciones de citoquinas generadas por las muestras post estimulación con cada péptido, frente a su respectivo control. Cabe resaltar que, se evaluó las concentraciones generadas de IL-6 y control frente a la estimulación con el lisado de parásito y la IL-10 frente a la estimulación con el péptido específico 39113 con el test UnpairedT, para datos paramétricos, mientras que las demás citoquinas se analizaron con el test de Mann Whitney para datos no paramétricos. Por último los análisis y gráficos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 5.0 (15).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 MUESTRAS EVALUADAS EN EL ESTUDIO

Las muestras obtenidas para el estudio, pertenecían a zonas endémicas en Colombia (Chocó y Córdoba), en la tabla 5 se describe la procedencia de la muestras y el código interno asignado para cada una.

**Tabla 5.** *Codigos y número de muestras evaluadas en el estudio.*

MUESTRA EVALUADAS					
CHOCO			CORDOBA		
<b>BS019</b>	BS022	BS010	COR029	COR010	COR015
<b>BS014</b>	BS013	P4BS003	COR004	COR046	COR018
<b>BS005</b>	BS008	BS025	P4COR030	P4COR038	P4COR039
<b>BS026</b>	BS028	P4BS009	COR025	COR033	COR011
<b>P4BS004</b>			COR047	COR040	COR044
			COR021	COR043	
<b>Total</b>	<b>13</b>		<b>Total</b>	<b>17</b>	

## 6.2 SELECCION DE PÉPTIDOS

En la tabla 6 se muestran los péptidos evaluados según la selección de los alelos HLA-DRB1\*, péptidos 39113 y 39117 para DRB1\*04 y \*11, péptido universal 39114 y péptido de baja unión 39115. También se puede observar la secuencia de aminoácidos identificada con un color para cada péptido, para los péptidos específicos 39113 (Rojo) y 39117 (amarillo), péptido universal (verde) y finalmente el péptido de baja unión (azul). Posteriormente estos péptidos fueron evaluados en los ensayos de linfoproliferación y cuantificación de citoquinas.

**Tabla 6.** Péptidos seleccionados como epítopes T para los ensayos de linfoproliferación y cuantificación de citoquinas. Se muestra el código, la secuencia y la ubicación de los péptidos en la secuencia de la proteína Pv12, sentido N a C terminal.

DR	PEPTIDO ESPECIFICO	PEPTIDO UNIVERSAL	PEPTIDO DE BAJA UNION	UBICACIÓN
				EN PROTEINA 3' a 5'
DR*04	39113 EECFLQGFNLSG	39114 YNKIFYARVPQRI YQ	39115 KKSYYDDVSFRVP PNL	MRIAKAALCGQLLIWWLSAPAEFTHTCDFNDELSLEF
DR*11	KKE			DERQMTNGEQICTLKPVDLKVWIKCGAERKNYELLPN
DR*07	39117 LGIIEVLIPSLPKKI			NCFEQVFTSKSIEDAKNAHNAHNVHNVQNAQQLVEYLH
DR*13				GAAAVKRKQKETNADEKKSYYDDVSFRVPPNLEKEQKA
				LYCVCQNKAKIRVRKRSGEEDYKEIFNLGIIEVLIPSLPKKI
				DGCDFTKNTSPLFTKGYDANFYKTIENKDDVICKVKATE
				GKLGFKCPADYAIPEEECFLQGFNLSGKKEQLRRTKIET
				DLVMDHYNKIFYARVPQRIYQNMHFFCACVLEEKRLVAH
				FEFATTPDDQNSVSEPPRAANVLQGRSAGSAAFPGPFL
				IIII SGM FEIM

En la tabla 7, se pueden observar los epítopes B evaluados con sus respectivos códigos 39038 (EB1), 39039 (EB2), 39040 (EB3) y 39165 (EB4), con código de colores: EB1 (azul), EB2 (amarillo), EB3 (verde) Y EB4 (rojo), ubicados en la secuencia proteica. Los cuales fueron evaluados posteriormente en el ensayo de reactividad de epítopes B.

**Tabla 7.** Péptidos seleccionados como epítopes B para los ensayos de ELISA. En la tabla se muestra el código del epítope, la secuencia con un color específico y Su ubicación en la secuencia de la proteína Pv12.

EPITOPE	CODIGO	SECUENCIA PEPTIDO	Ubicación 3' a 5'
EB1	39038	AKIRVRKRSGEEDYK EIFNL	MRIAKAALCGQLLIWWLSAPAEFTHTCDFNDELSLEFDE RQMTNGEQICTLKPDVLDKWKCGAERKNYELLPNNCFF QVFTSKSIEDAKNAHNAHNVHNQNAQQLVEYLHGAAAVK
EB2	39039	AHFEFATTPDDQNSV SEPR	RKQKETNADEKKS YDDVS FRVPPNLEKEQKALYCVCQNK AKIRVRKRSGEEDYK EIFNL GIIIEVLIPSLPKKIDGCDFTKNT
EB3	39040	FNLGKKEQLRTKIEL TDLV	SPLFTKGYDANFYKTIENKDDVICKVKATEGKLIGFKCPADY AIEPEECFLQGFNLGKKEQLRTKIELTDLVMDHYNKIFYA
EB4	39165	VKRKQKETNADEKKS YDDVS	RVPQRIYQNMHFFCACVLEEKRLVAHFEFATTPDDQNSV SEPR ANVLQGRSAGSAAFPGPFLLLLLSGVLFIM

### 7.3 ENSAYO DE LINFOPROLIFERACIÓN

El porcentaje de proliferación de células T CD4+, se midió mediante la dilución del marcador CFSE, es decir que el índice de estimulación (SI), se determinó por la pérdida relativa de intensidad de fluorescencia, utilizando la siguiente formula:

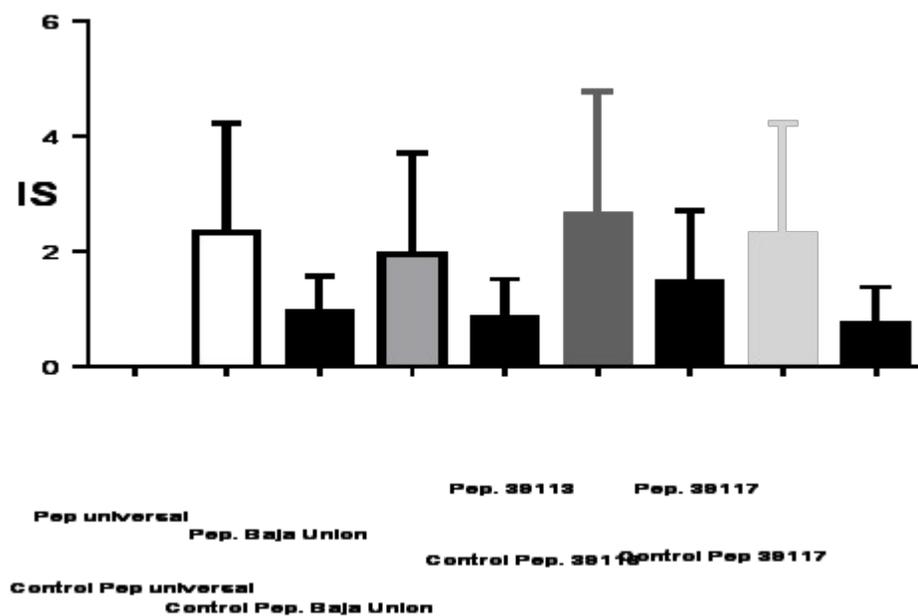
$$IF = \frac{(\% \text{ de intensidad de fluorescencia de células con CFSE co-cultivadas con antígeno})}{(\% \text{ de intensidad de fluorescencia de células con CFSE co-cultivadas sin antígeno})}$$

La proliferación de linfocitos, se analizó en 7 picos o generaciones de células. G = generación. Se determinó un IS positivo igual o mayor a 2.0 (43). Para obtener el porcentaje de intensidad de fluorescencia de las células se calculó como:

$$IS = \frac{(\text{Células diluidas (Generación 1 - Generación 7)})}{(\text{Recuento de células totales (G0 - G7)})} * 100$$

Las muestras que fueron estimuladas con los péptidos 39117, 39113 y 39114, presentaron un  $IS \geq 2.0$ , a diferencia de aquellas que fueron estimuladas con el péptido de baja unión 39115 que presentó un  $IS \leq 2.0$ . Cabe mencionar que como era de esperarse todos los controles presentaron un IS negativo. El péptido específico 39113 fue el que presentó mayor linfoproliferación a nivel grupal (Figura 12).

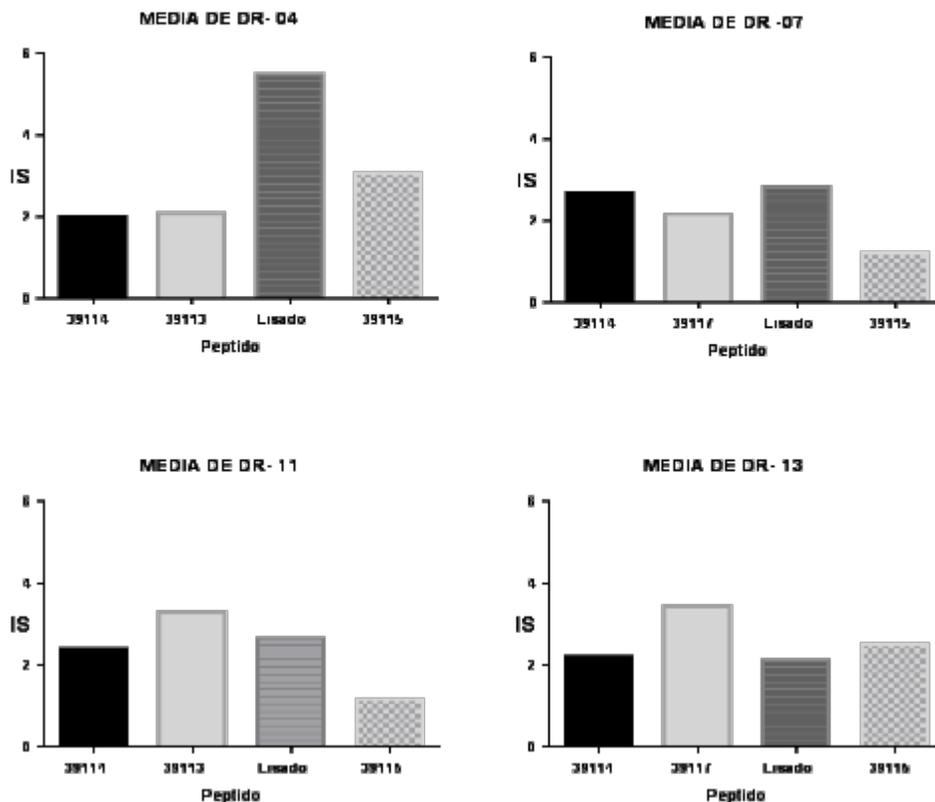
**Figura 12. Linfoproliferación de los linfocitos CD4+.** Se muestra el índice de estimulación de las muestras y los controles con cada péptido: 39115 péptido baja unión, 39114 péptido universal, péptido 39113 (DR1\*4\*11) y péptido 39117 (DR1\*7\*13).



Al evaluar el IS por cada DR se encontró que el péptido universal indujo estimulación positiva en tres de los cuatro DRs correspondientes a las muestras tipificadas como HLA-DRB-1\*07, \*11 y \*13. Por otro lado el péptido 39113 (HLA-DRB-1\*04 y \*11) solo presentó estimulación positiva en las muestras HLA-DRB1\*11, para el péptido 39117 (HLA-DRB1\*07 y \*13) se evidenció estimulación positiva en todas las muestras correspondientes a estos alelos, cabe resalta que

este péptido presento un índice de estimulación mayor en contraste con las muestras estimuladas con el péptido 39113. Se observo que todas las muestras evaluadas presentaron un IS positivo frente al lisado del parásito; incluyendo al péptido de baja unión que arrojó un IS positivo en las muestras tipificadas como HLA-DRB1\*04\*13 (Figura 13).

**Figura 13. INDICE DE ESTIMULACIÓN PARA CADA DR,** teniendo en cuenta los péptidos seleccionados por DR, universal, control y lisado de parásito: a) Media DR1\*04, b) Media DR1\*11, c) Media DR1\*07 y d) Media DR1\*13.



En la Tabla 8 se observa que por medio del valor de SIG (Promedio del índice de estimulación para cada grupo de exposición), se determino que el péptido 39113 fue el que genero mayor estimulación a nivel grupal para los alelos DRB1\*04-\*11,

ya que, 7/15 muestras mostraron un  $IS \geq 2.0$ . Por otra parte, todos los péptidos mostraron un promedio de estimulación en las muestras  $\geq 2.0$ , con excepción del péptido de baja unión.

**Tabla 8.** REACTIVIDAD DEL PÉPTIDO UNIVERSAL Y LOS PÉPTIDOS ESPECÍFICOS. R: número de muestras evaluadas que presentaron un índice de estimulación positivo (igual o mayor 2.0); SIG: Promedio del índice de estimulación para cada grupo de exposición. SD SI: Desviación estándar del SI para cada grupo de exposición.

PÉPTIDO UNIVERSAL 39114			PÉPTIDO 39113			PÉPTIDO 39117			PÉPTIDO BAJA UNIÓN		
R	SIG	SD SI	R	SIG	SD SI	R	SIG	SD SI	R	SIG	SD SI
14/29	2,33	1,64	7/15	2,65	2,06	6/14	2,31	1,85	4/29	1,33	1,23

#### 6.4 CUANTIFICACIÓN DE CITOQUINAS POR CBA

En el ensayo de cuantificación de citoquinas, se evaluó la producción de tres citoquinas del perfil Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) y tres citoquinas del perfil Th2 (IL-4, IL-6 e IL-10), producidas tras la estimulación con lisado de *P. vivax* y con los péptidos 39113, 39114, 39115 y 39117. Los valores considerados como positivos, fueron aquellos mayores a la media más 3 SD del grupo control (individuos no expuestos).

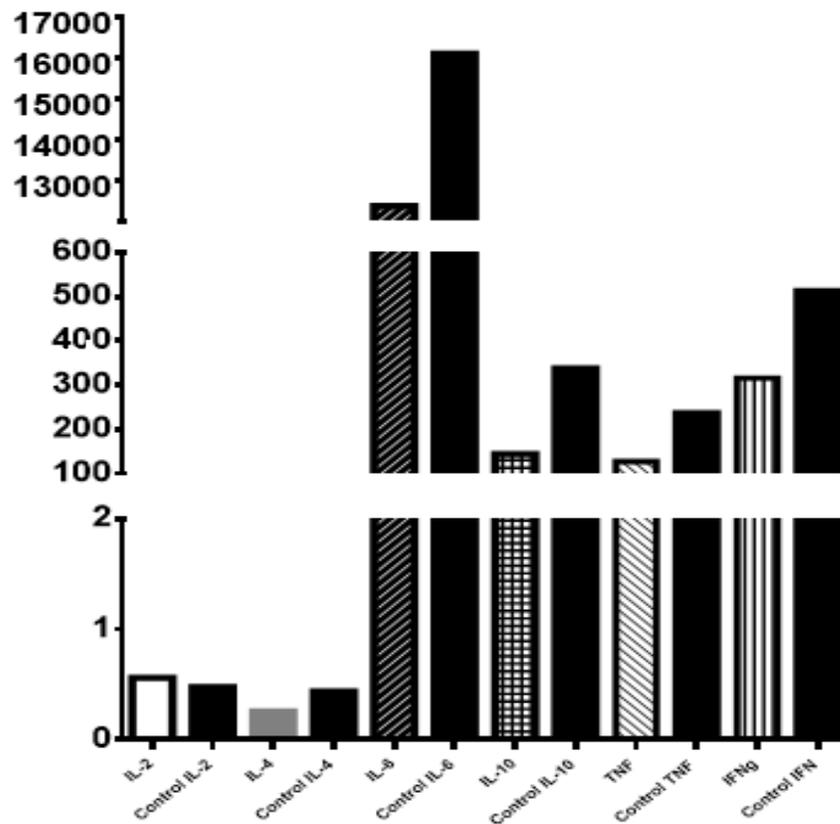
Se evidenciaron diferencias significativas en las muestras de individuos de zonas endémicas y las muestras control para la IL-6 con los péptidos 39114, 39113 y 39117, al igual que para la IL-10 con los péptidos 39114 y 39117, siendo las únicas citoquinas que presentaron diferencias significativas. En la Tabla 9, se observan diferencias significativas entre las muestras evaluadas y sus controles, teniendo en cuenta un valor de  $p < 0.05$ .

**Tabla 9.** Diferencias significativas en las producción de citoquinas. Se observa la reactividad (numero de muestras positivas en el total de muestras estimuladas), estimuladas con los péptidos y el lisado del parásito.

Tabla de diferencias significativas de concentraciones de citoquinas de muestras vs controles							
	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	TNF	IFNg	
Lisado de parásito	2 de 28	1 de 28	0 de 28	0 de 28	0 de 28	0 de 28	Reactividad
	0,8894	0,2936	0,0313	0,0327	0,1564	0,0106	valor de P
Péptido universal 39114	5 de 28	1 de 28	0 de 28	3 de 28	0 de 28	0 de 28	Reactividad
	0,644	0,5338	0,001	0,1459	0,7438	0,0279	valor de F
Péptido de baja union 39115	1 de 28	2 de 28	1 de 28	3 de 28	1 de 28	1 de 28	Reactividad
	0,5139	0,7471	<b>0,0014</b>	<b>0,0157</b>	0,143	0,4429	valor de F
Péptido específico 39113	2 de 14	1 de 14	0 de 14	3 de 14	0 de 14	0 de 14	Reactividad
	0,6848	0,0908	<b>0,0492</b>	0,125	0,182	0,2442	valor de P
Péptido específico 39117	0 de 14	1 de 14	1 de 14	5 de 14	1 de 14	0 de 14	Reactividad
	>0,9999	0,7997	<b>0,0022</b>	<b>0,0499</b>	0,0908	0,4876	valor de P

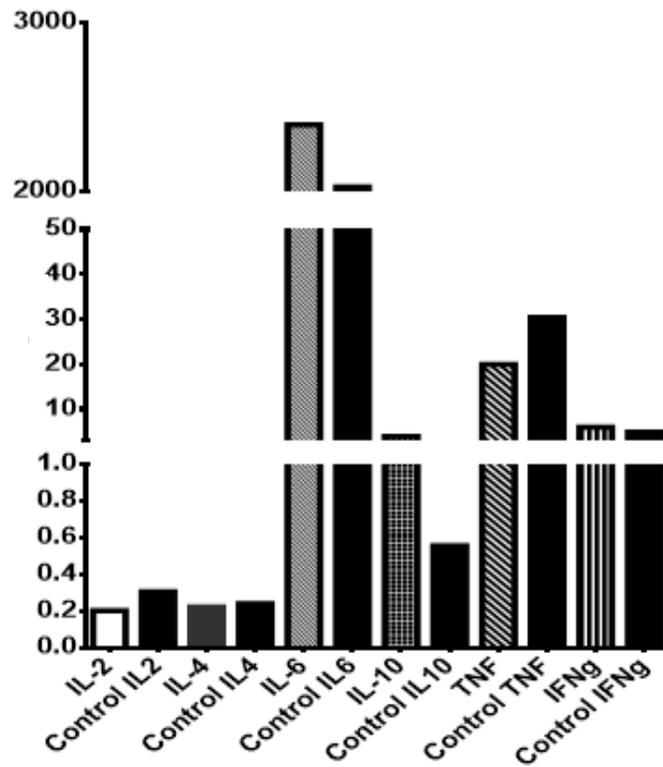
En la figura 14 se evidencia que frente a la estimulación con el Lisado del parásito todos los controles superaron las concentraciones de las muestras evaluadas a excepción de la IL-2 e IL-4 con sus respectivos controles, debido a que se detectaron concentraciones inferiores a 1pg/mL, se observó también altas concentraciones por parte de IL-6 junto con su respectivo control.

**Figura 14.** CBA PARA LISADO DE PARASITO. Distribución de las medias de concentraciones en pg/ml de las muestras y controles producidas por estimulación con el lisado del parásito.



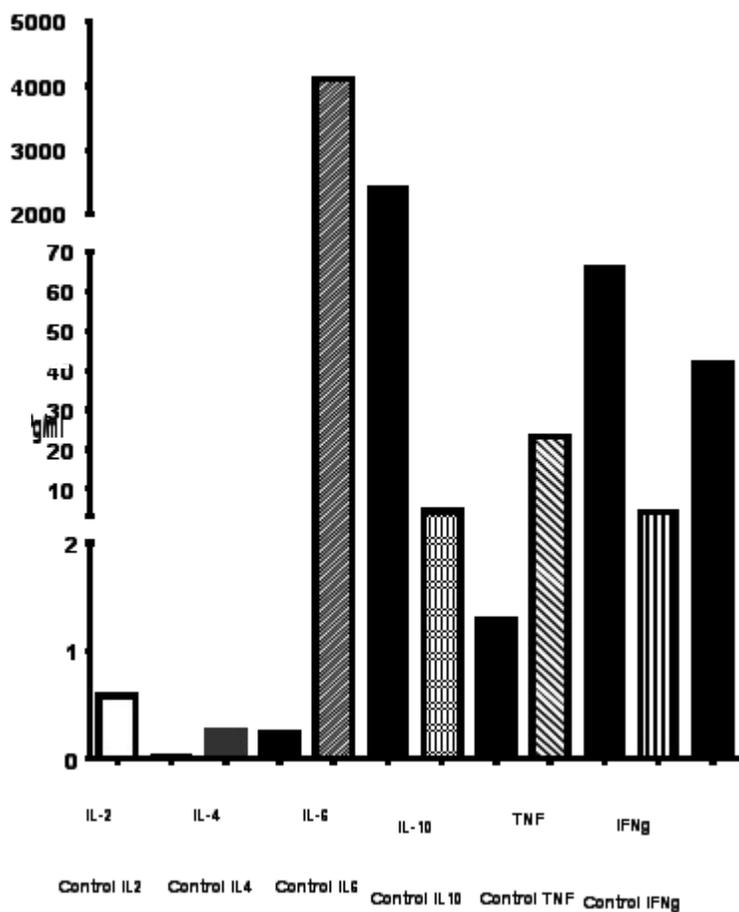
En la figura 15 se observa estimulación de las muestras frente al péptido 39115 de baja unión, se obtuvieron concentraciones por debajo de 1pg/mL de IL-2 e IL-4 al igual que sus respectivos controles, también se evidenciaron concentraciones bajas de IL-10 y su control, mientras que la IL-6 y su control presento altas concentraciones frente a la estimulación.

**Figura 15.** CBA PARA PEPTIDO 39115 DE BAJA UNION. Distribución de las medias de concentraciones en pg/ml de las muestras y controles producidas por estimulación con el Péptido de Baja unión.



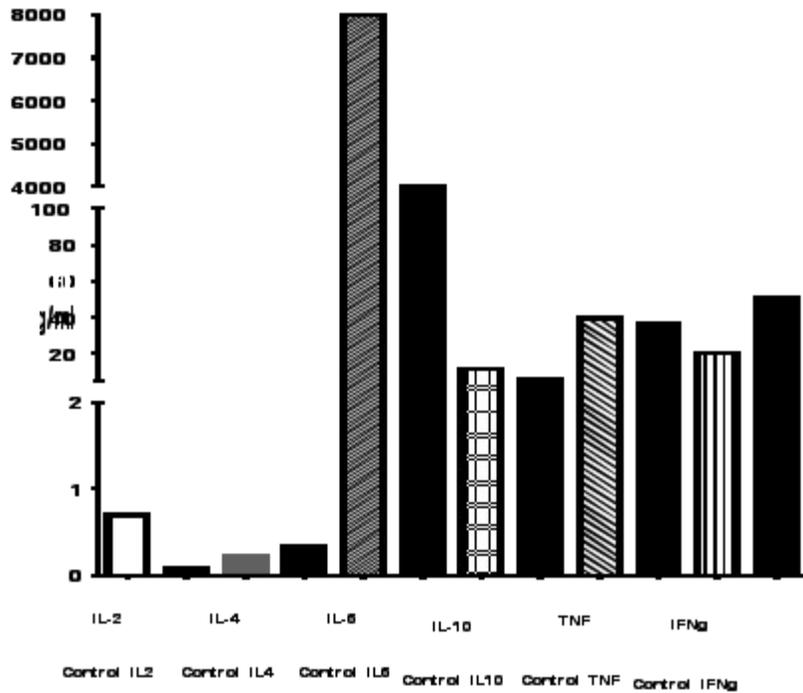
Frente a la estimulación con el péptido universal, se encontraron en las muestras concentraciones de IL-2 e IL-4 muy bajas, por debajo de 1pg/mL, con respecto a sus controles, al igual que valores inferiores a 5 pg/mL de IL-10 respecto a su control e IFN- $\gamma$ . La IL-6 siguió presentando altas concentraciones.(Figura 16).

**Figura 16.** CBA PARA EL PEPTIDO UNIVERSAL 39114. Distribución de las medias de concentraciones de las muestras y controles producidas por estimulación con el Péptido Universal.



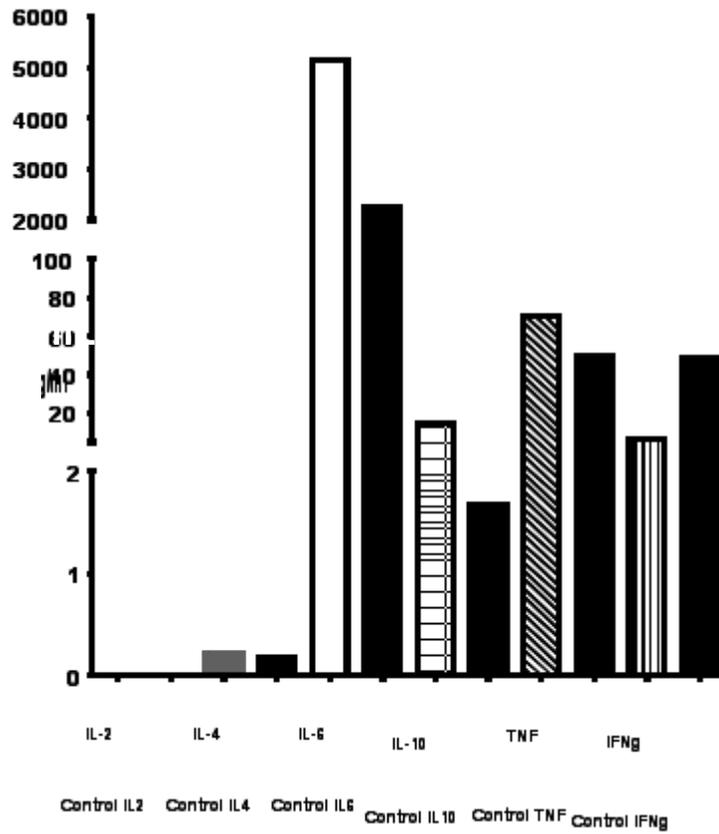
En la figura 17 se observa que la estimulación frente al péptido específico 39113 (con el cual se estimularon las muestras tipificadas como DR1\*04 y \*11) produjo concentraciones de citoquinas por debajo de 1pg/ml para IL-2 e IL-4, con sus respectivos controles y nuevamente se presentó concentraciones de IL-6 y su control.

**Figura 17. CBA PARA EL PEPTIDO ESPECÍFICO 39117.** Distribución de las medias de concentraciones en pg/mL de citoquinas y controles, producidas por estimulación con el péptido específico 39117 correspondientes del DR4 y DR11.



En la figura 18 se observa que la estimulación frente al péptido 39117 (con el cual se estimularon las muestras previamente tipificadas como DR7 y DR13) generó concentraciones por debajo de 1pg/mL para IL-4 y el control de esta y no se detectaron concentraciones de IL-2 ni de su control. Así mismo, el control de IFNg fue mayor que la concentración de la citoquina y adicionalmente también se presentó concentraciones altas de IL-6 junto con su control.

**Figura 18.** CBA PARA PEPTIDO ESPECIFICO 39113. Distribución de las medias de concentraciones en pg/mL de citoquinas y controles, producidas por estimulación con el péptido específico 39113 correspondientes del DR7 y DR13.

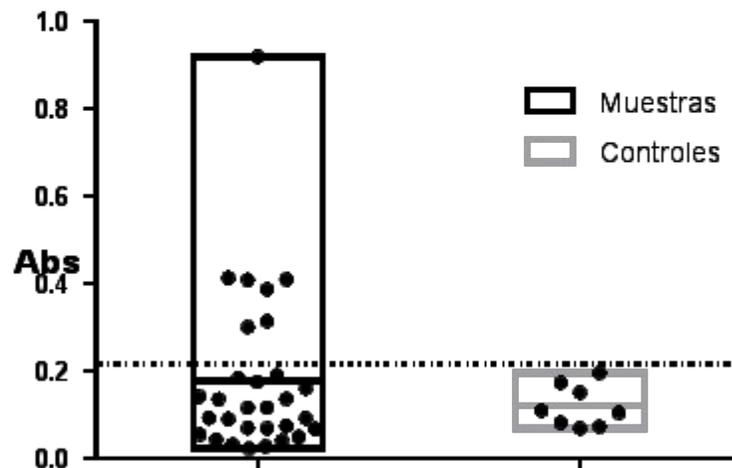


## 6.5 REACTIVIDAD DE LOS EPÍTOPES B

Se definió reactividad positiva con un punto de corte de la media más 2 desviaciones estándar de las absorbancias (Abs) obtenidas de las muestras control (muestras de individuos de zona no endémica).

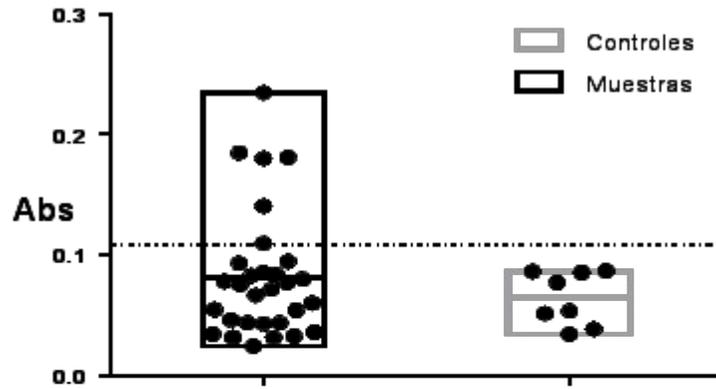
Al determinar la reactividad del péptido 39038 (EB1), teniendo en cuenta que el punto de corte determinado fue de 0,21, se evidenció que 7 de las 29 muestras, presentaron reactividad positiva (COR040, BS005, BS026, COR004, COR033, BS004 y BS009), siendo 4 de ellas provenientes de Chocó y 3 de Córdoba. La mayor absorbancia presentada fue de 0,91 (BS005) (Figura 19).

**Figura 19.** Reactividad epítotope B1. Distribución de las Absorbancias (Abs) de las muestras estimuladas con el epítotope B1 y controles, se observa positividad con referente al punto de corte.



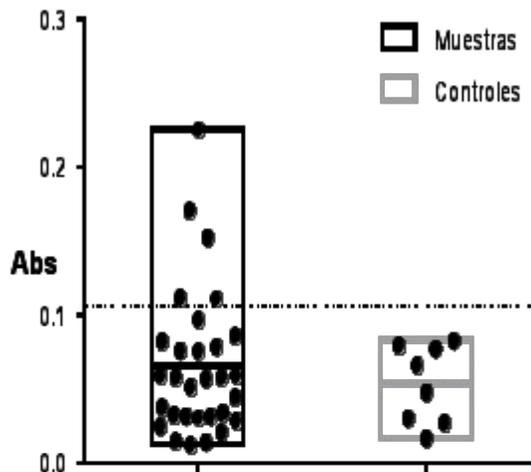
Para el péptido 39039 (EB2), se manejó un punto de corte de 0,10 lo que evidenció reactividad en 6 de 29 muestras (BS005, BS008, BS025, BS026, BS004 y COR039), siendo 5 de Chocó y 1 de Córdoba. La mayor Abs en las muestras fue 0,2344 (BS005) y la menor 0,1095 (COR039) (Figura 20).

**Figura 20.** Reactividad epítoto B2. Distribución de las Absorbancias (Abs) del cromógeno o-fenilendiamina dihidrocloruro-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de las muestras y controles generadas por el EB2, en donde se observa positividad referente al punto de corte.



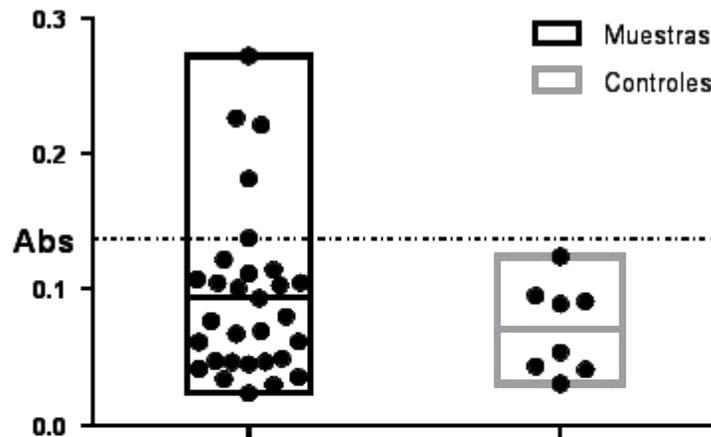
De otro lado, se obtuvo reactividad frente al péptido EB3, en 5 de 30 muestras evaluadas (BS005, BS008, BS025, BS004 y BS003) todas provenientes de Chocó, para este péptido se manejo 0,10 como punto de corte. La mayor Absorbancia fue de 0,2255 (BS004) y la menor de 0,11 (BS025) (Figura 21).

**Figura 21.** Reactividad epítoto B3. Distribución de las Absorbancias (Abs) del cromógeno o-fenilendiamina dihidrocloruro-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de las muestras y controles generadas por el EB3, en donde se observa positividad referente al punto de corte.



A diferencia de los péptidos anteriores, para el péptido EB4 se maneja como punto de corte un valor de 0,14, presentando reactividad solo en 5 de las 29 muestras, (BS010, BS005, BS008, BS025 y BS004) todas provenientes de Choco. La mayor Absorbancia fue de 0,27 (BS005) y la menor 0,14 (BS025) (Figura 22).

**Figura 22.** Reactividad epítotope B4. Distribución de las Absorbancias (Abs) del cromógeno o-fenilendiamina dihidrocloruro-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de las muestras y controles generadas por el EB4, en donde se observa positividad referente al punto de corte.



En la evaluación de la reactividad de los cuatro epítotoes B con los plasmas de las muestras de los individuos de zonas endémicas, se evidencio mayor reconocimiento por parte de las muestras en torno al péptido 39038, seguido de los péptidos 39039, 39040 y 39165. Cabe mencionar que todos los péptidos de los epítotoes B de Pv12 presentaron reactividad, pero no se encontró una diferencia significativa según el test de Mann Whitney entre cada epítotoe y sus controles, para los péptidos 39038, 39039, 39040 y 39165 se obtuvo un valor  $p=0,9857$ ,  $0,7883$ ,  $0,7883$  y  $0,3804$  respectivamente ( $p < 0.05$ ).

## 7. DISCUSIÓN

Los avances en investigación acerca de la malaria producida por *Plasmodium vivax* se encuentran aún en fase de desarrollo debido a su difícil cultivo *in vitro*, entre otras causas, por ende los estudios para la proteína Pv12 también son escasos. En este estudio se evaluó la antigenicidad de los péptidos 39113 (de alta unión a los alelos DRB1\*04 y \*11), 39117 (de alta unión a los alelos DRB1\*07 y \*13), péptido universal 39114 y péptido de baja unión 39115, lo anterior por medio de ensayos de linfoproliferación y producción de citoquinas por parte de los PBMCs aislados de individuos provenientes de regiones endémicas para malaria causada por *P. vivax* que presentaban diferentes alelos HLA-DR.

En primera instancia, se identificó que los péptidos que presentaron mayor índice de estimulación estaban ubicados cerca a la fracción C terminal (Tabla 6). En los resultados obtenidos en los ensayos de linfoproliferación, se identificó que los péptidos presentaron un IS positiva (>2.0), cabe mencionar que el péptido que presentó mejor estimulación fue el 39113 (tabla 8), este péptido presentó diferencias significativas en la producción de IL-6, a diferencia del péptido 39117 que evidenció diferencia significativa en la producción de IL-6 e IL-10.

Estos resultados de producción de citoquinas coinciden con lo reportado por Ismail Sebina y col, (44) donde evidenciaron la presencia de IL-6 por citometría de flujo en muestras de ratones infectados con el parásito *P. vivax*; ellos evidenciaron el papel protector de la IL-6 en malaria aguda ya que esta interleucina apoyó la producción de IgM e IgG específicas, control de la parasitema, el desarrollo de células B y la expresión de ICOS por células Tfh. Por otro lado esta citoquina presenta alta vida media y persistencia en el plasma (45) y altos niveles podrían estar asociados con el aumento en la incidencia de episodios febriles, como se ha informado para *Plasmodium falciparum* (5). Sería importante realizar estudios adicionales, donde se analice el número de episodios febriles para corroborar dicha hipótesis en *P. vivax*.

En la evaluación de citoquinas se obtuvieron concentraciones bajas o nulas de IL-2 e IL-4 frente a todos los estímulos (lisado de parásito y péptidos evaluados) (gráficas 14-18), estos resultados coinciden con el estudio de Martínez y col (43), donde se evaluaron los péptidos de la proteína DBP-II del merozoito, donde se obtuvieron concentraciones bajas de IL-2 en pacientes con 3 o más episodios, cabe resaltar que evidenciaron concentraciones altas de IL-6, IL-10 e INF- $\gamma$ .

La ausencia de IL-2 también que se evidenció en la presente investigación, coincide con los resultados del estudio de M Troye-Blomberg y col. (46), donde la respuesta que se genera *in vitro* en pacientes por antígenos eritrocitarios de *P. falciparum*, muestra una cuantificación escasa de IL-2; esto se correlaciona en primera instancia a su corta vida media (45); así mismo como lo demostraron, Dorothy K et al (47), en un modelo animal donde la producción de IL-2 termina rápidamente de manera *in vivo* y que a su vez la secreción de la misma fue indetectable dentro un periodo de 20 a 24 horas después del estímulo, sugiriendo que esta corta duración en la secreción puede estar influenciada por la competencia celular entre las células T CD4 específicas de Ag.

Es importante tener en cuenta que se obtuvieron niveles significativos de IL-10, que cumple un papel como citoquina inmunosupresora de la IL-2 e IFN- $\gamma$  (48). Los niveles significativos de IL-6 e IL-10, encamina la respuesta de la malaria causada por *P. vivax* al perfil inmunológico Th2.

Por otro lado, los péptidos 39113 y 39117 demostraron ser capaces de inducir proliferación, mayormente en DR\*11 y \*17 respectivamente, y a su vez generaron diferencias significativas de citoquinas, sin embargo, harían falta más estudios para determinar, si en todos los DRs estos péptidos son capaces de inducir tanto linfoproliferación como diferencias significativas de citoquinas. Adicionalmente, el péptido de baja unión 39115 indujo proliferación en un número poco relevante de muestras estimuladas (Tabla 8), cabe resaltar que presentó diferencias significativas en las concentraciones de IL-6 e IL-10. Por otra parte, el péptido

universal 39114 presento linfoproliferación positiva a nivel grupal, pero no se evidencio una diferencia significativa en la producción de citoquinas.

Por otra parte, los resultados obtenidos en la determinación de la reactividad para los péptidos de Epitopes B, no se evidencio diferencias significativas entre los controles y las muestra, por lo que se podría especular, que a pesar de presentar algunos resultados por encima del punto de corte, no genero una respuesta efectiva del reconocimiento por parte de anticuerpos de memoria producidos por los linfocitos B; no se encuentran otros estudios sobre la determinación de epitopes B de la proteína Pv12 ni de su proteína ortóloga Pf12, evidenciando así, el poco estudio que tiene esta proteína.

Los resultados de este estudio, tienen concordancia con el estudio de John H. Adams y col (49), ya que ellos evaluaron muestras de individuos de zonas endémicas, donde determinaron la presencia de anticuerpos de reconocimiento de DBP capaces de inhibir la invasión al reticulocito; por lo que es necesario realizar estudios de inmunogenicidad, con el fin de determinar la capacidad protectora que puedan generar los anticuerpos capaces de reconocer epitopes B frente a la invasión del reticulocito.

Por otra parte, gracias a varios estudios en otras proteínas de superficie, Leidiane Amorim Soares y col (50) junto con el estudio de Jairo Andres Fonseca y col (51), donde se evidencio reactividad con epitopes T de la proteína de superficie PvMSP-1 de *P. vivax*, involucrada en la interacción con el reticulocito. En otro estudio, se obtuvo alta reactividad a epitopes T y B, donde evaluaron las proteínas de superficie MSP1 y 8 de *P. falciparum* y *P. yoelii* (52); por estas razones se esperaba que los péptidos evaluados en el estudio presentaran características antigénicas por ser derivados de la proteína de superficie Pv12, cabe mencionar que se desconoce, si la característica antigénica, dependa de su papel como proteínas de superficie o simplemente sea particular y específico en cada especie.

Los resultados obtenidos generan nueva información para el avance en el desarrollo del conocimiento para la búsqueda de blancos antigénicos e inmunogénicos en malaria causada por *P. vivax* .

## 8. CONCLUSIONES

- Los péptidos estimulantes 39113, 39114 y 39117 fueron capaces de presentar linfoproliferación, obteniendo cada uno de ellos un índice de estimulación positiva.
- Se evidencio producción con diferencias significativas de IL-6 Y IL-10 en muestras estimuladas con el péptido específico 39117 y péptido de baja unión 39115, a su vez se obtuvo producción significativa de IL-6 en muestras estimuladas con el péptido específico 39113.
- Se evidencio que todos los epitopes B mostraron reactividad, sin embargo, el epitopé B1 fue el que presento mayor reactividad con un porcentaje de 24.13%, lo que equivale a 7 de 29 muestras estimuladas, pero no se obtuvo diferencia significativa entre las muestras y los controles.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. Social Mdsyp. Malaria memorias(1). Federacion Medica Colombiana, 2012-2013.
2. Chan DM, Director-General, Organization WH. WORLD 3. MALARIAREPORT 2017 (2). world health organization. 2017.
3. INS. Gestion para la vigilancia entomologica y control de la transmision en malaria(3). Guia entomologica de malaria. 2009-2010.
4. Luis Eduardo Rodriguez, Hernando Curtidor, Mauricio Urquiza, Gladys Cifuentes, Claudia Reyes, and, Manuel Elkin Patarroyo, Intimate Molecular Interactions of *P. falciparum* Merozoite Proteins Involved in Invasion of Red Blood Cells and Their Implications for Vaccine Design(4). CHEMICAL REVIEWS. 2008.
5. Michalakakis Y, Renaud F. Correction. Canadian Medical Association Journal [Internet]. 2009 [cited 5 January 2018];180(10):1038-1038.
6. INS. Guia para la atencion clinica integral del paciente con Malaria (5). Guia clinica malaria. 2009-2010.
6. Power HJ. History of Malaria(9). encyclopedia of life sciences. 2001.
7. S. Thaithong\* NS, N. Seugom\*, D. Buun and G. H. Beale'. Electrophoretic variants of enzymes of isolates of *P. falciparum*, *P. malariae* and *P. vivax* from Thailand(10). 1989.
8. SHARMA\* PRaYD. molecular cloning and serological characterization of a new *p.vivax* recombinant antigen which contain alipoprotein b-100like sequences (11). biochemical and biophysical research communications. 1992.
9. Arindam Dhar SG, Yagma D. Sharma. Alu Elements in *P. vivax* antigen gene(12). Febs letters 1998.
10. Li J, Ito D, Chen JH, Lu F, Cheng Y, Wang B, et al. Pv12, a 6-Cys antigen of *Plasmodium vivax*, is localized to the merozoite rhoptry. *Parasitology international*. 2012;61(3):443-9.
11. Moreno-Perez DA, Areiza-Rojas R, Florez-Buitrago X, Silva Y, Patarroyo ME, Patarroyo MA. The GPI-anchored 6-Cys protein Pv12 is present in detergent-resistant microdomains of *Plasmodium vivax* blood stage schizonts. *Protist*. 2013;164(1):37-48.
12. Chan DM, Director-General, Organization WH. WORLD 3. MALARIA REPORT 2015 (2). world health organization. 2015.
13. Boletín epidemiológico semanal [Internet]. Minsalud.gov.co. 2017 [cited 5 January 2018].

14. Spence L, Mendoza E, Louro A. Mechanisms of invasion from sporozoite of *Plasmodium* into the mosquito vector *Anopheles*. *Bionatura*. 2016;1(3):1-3.
15. Michalakis Y, Renaud F. Evolution in vector control. *Nature*. 2009;462(7271):298-300.
16. Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K. Malaria: Biology and Disease. *Cell*. 2016;167(3):610-24.
17. Beeson JG, Drew DR, Boyle MJ, Feng G, Fowkes FJ, Richards JS. Merozoite surface proteins in red blood cell invasion, immunity and vaccines against malaria. *FEMS microbiology reviews*. 2016;40(3):343-72.
18. Wang Q, Fujioka H, Nussenzweig V. Exit of *Plasmodium* Sporozoites from Oocysts Is an Active Process That Involves the Circumsporozoite Protein. *PLoS Pathogens*. 2005;1(1):72-79.
19. Pumarola, A. 1995. *Microbiología y Parasitología Médica*. 2da Edición. Editorial Salvat. Capítulo (76): 832-843.
20. Llop, A. 2001. *Microbiología y Parasitología Médica*. Editorial de Ciencias Médicas. Tomo III, Capítulo 88:152-167
21. Malleret B, Renia L, Russell B. The unhealthy attraction of *Plasmodium vivax* to reticulocytes expressing transferrin receptor 1 (CD71). *International journal for parasitology*. 2017;47(7):379-83
22. Li J, Han ET. Dissection of the *Plasmodium vivax* reticulocyte binding-like proteins (PvRBPs). *Biochemical and biophysical research communications*. 2012;426(1):1-6
23. Franca CT, He WQ, Gruszczyk J, Lim NT, Lin E, Kiniboro B, et al. *Plasmodium vivax* Reticulocyte Binding Proteins Are Key Targets of Naturally Acquired Immunity in Young Papua New Guinean Children. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016;10(9):e0005014.
24. Kano FS, Souza-Silva FA, Torres LM, Lima BA, Sousa TN, Alves JR, et al. The Presence, Persistence and Functional Properties of *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein II Antibodies Are Influenced by HLA Class II Allelic Variants. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016;10(12):e0005177.
25. Iyer L. NUS scientists discover how anti-malaria drug works - *Biotechnin.Asia* [Internet]. *Biotechnin.Asia*. 2018 [cited 9 January 2018]. Available from: <https://biotechnin.asia/2015/12/23/nus-scientists-discover-how-anti-malaria-drug-artemisinin-works/>
26. Dessens J, Beetsma A, Dimopoulos G, Wengelnik K, Crisanti A, Kafatos F et al. CTRP is essential for mosquito infection by malaria ookinetes. *The EMBO Journal*. 1999;18(22):6221-6227.
27. Hughes A. Malaria Parasites: Genomes and Molecular Biology. *Infection, Genetics and Evolution*. 2004;4(4):322-326.

28. Adini A, Krugliak M, Ginsburg H, Li L, Lavie L, Warburg A. Transglutaminase in Plasmodium parasites: activity and putative role in oocysts and blood stages. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2001;117(2):161-168.
29. Aly A, Vaughan A, Kappe S. Malaria Parasite Development in the Mosquito and Infection of the Mammalian Host. *Annual Review of Microbiology*. 2009;63(1):199-221.
30. Sinden R. Molecular interactions between Plasmodium and its insect vectors. *Cellular Microbiology*. 2002;4(11):713-717.
31. Anstey NM, Douglas NM, Poespoprodjo JR, Price RN. *Plasmodium vivax*: clinical spectrum, risk factors and pathogenesis. *Advances in parasitology*. 2012;80:151-201.
32. Louis H. Miller\* DIB, Kevin Marsh & Ogobara K. Doumbo. The pathogenic basis of malaria(32). *Nature*. 2002;450.
33. Cowden IACaWB. Why is the Pathology of *Falciparum* Worse than that of Vivax Malaria? (33). *Focus*. 1999;15.
34. Fritsche G, Larcher C, Schennach H, Weiss G. Regulatory Interactions between Iron and Nitric Oxide Metabolism for Immune Defense against *Plasmodium falciparum* Infection. *The Journal of Infectious Diseases*. 2001;183(9):1388-1394.
35. Kumar R, Saravu K. Severe vivax malaria: a prospective exploration at a tertiary healthcare centre in Southwestern India. *Pathogens and global health*. 2017;111(3):148-60.
36. Julius Clemence Hafalla<sup>1</sup>, Olivier Silvie<sup>2,3,4</sup>, Kai Matuschewski<sup>2</sup>. Cell biology and immunology of malaria (54). *Immunological reviews*. 2011.
37. Chan JA, Stanistic DI, Duffy MF, Robinson LJ, Lin E, Kazura JW, et al. Patterns of protective associations differ for antibodies to *P.falciparum*-infected erythrocytes and merozoites in immunity against malaria in children. *European journal of immunology*. 2017.
38. Jun-Hu Chen, Jae-Wan Jung, Yue Wang, Kwon-Soo Ha, Feng Lu, Chae Seung Lim, Satoru Takeo, Takafumi Tsuboi, and Eun-Taek Han\*, Immunoproteomics Profiling of Blood Stage *Plasmodium vivax* Infection by High-Throughput Screening Assays(37). *Journal of Proteome Research* 2010.
39. Rtdroiguez. JF, Ospina. DG, Patarroyo MA. Low genetic diversity and functional constraint in loci encoding *Plasmodium vivax* P12 and P38 proteins in the Colombian populations (38). *Malaria Journal*. 2014.
40. Kindt T, Goldsby R, Osborne B. *Inmunología de Kuby* (6a. ed.). 2nd ed. Distrito Federal: McGraw-Hill Interamericana; 2007.

41. Ferreira A, Afani S, Lanza B, Aguillón J, Sepúlveda C. Inmunología básica y clínica. Ed. Mediterráneo, Santiago, Chile. 2005.
42. Parolín ML, Carnese FR. DISTRIBUCION ALELICA DEL LOCUS HLA-DRB1 EN POBLACIONES NATIVAS AMERICANAS. EVALUACION DE AFINIDADES EVOLUTIVAS INTRA E INTERCONTINENTALES(61r). Revista Argentina de Antropología Biológica. 2007.
43. Martinez P, Lopez C, Saravia C, Vanegas M, Patarroyo MA. Evaluation of the antigenicity of universal epitopes from PvDBP1I in individuals exposed to *Plasmodium vivax* malaria. Microbes and infection. 2010;12(14-15):1188-97.
44. Sebina I, Fogg LG, James KR, Soon MSF, Akter J, Thomas BS, et al. IL-6 promotes CD4+ T-cell and B-cell activation during *Plasmodium* infection. Parasite Immunology. 2017:e12455.
45. Kato M, Suzuki H, Murakami M, Akama M, Matsukawa S, Hashimoto Y. Elevated plasma levels of interleukin-6, interleukin-8, and granulocyte colony-stimulating factor during and after major abdominal surgery. Journal of Clinical Anesthesia. 1997;9(4):293-298.
46. Troye-Blomberg. M, Andersson. G, Stoczkowska. M, Shabo. R, Romero. P, Patarroyo. ME, et al. Production of IL-2 and IFN-gamma by T cells from malaria patients in response to *Plasmodium falciparum* erythrocyte antigens in vitro(59). The Journal of Immunology. 1985.
47. Sojka D, Bruniquel D, Schwartz R, Singh N. IL-2 Secretion by CD4+ T Cells In Vivo Is Rapid, Transient, and Influenced by TCR-Specific Competition. The Journal of Immunology. 2004;172(10):6136-6143.
48. Perez-Mazliah D, Langhorne J. CD4 T-cell subsets in malaria: TH1/TH2 revisited. Frontiers in immunology. 2014;5:671.
49. Chootong P, Ntumngia FB, VanBuskirk KM, Xainli J, Cole-Tobian JL, Campbell CO, et al. Mapping epitopes of the Plasmodium vivax Duffy binding protein with naturally acquired inhibitory antibodies. Infection and immunity. 2010;78(3):1089-95.
50. Soares LA, Evangelista J, Orlandi PP, Almeida ME, de Sousa LP, Chaves Y, et al. Genetic diversity of MSP1 Block 2 of *Plasmodium vivax* isolates from Manaus (central Brazilian Amazon). Journal of immunology research. 2014;2014:671050.
51. 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. Scientific reports. 2016;6:34527.
52. James R. Alaro AP, Kazutoyo Miura, Ababacar Diouf, Ana M. Lopez, Evelina Angov, Carole A. Long and James M. Burns Jr. . A Chimeric *Plasmodium*

*falciparum* Merozoite Surface Protein Vaccine Induces Antibodies High Titers of Parasite Growth Inhibitory(64). Journals ASMorg. 2013.