

Inmunomodulación en malaria asociada al embarazo y su efecto en la respuesta materno-neonatal a antígenos vacunales

Catalina Álvarez Larrotta

Corporación Académica Ciencias Básicas Biomédicas

Grupo Salud y Comunidad-César Uribe Piedrahíta

Universidad de Antioquia

Medellín, octubre 2019

Inmunomodulación en malaria asociada al embarazo y su efecto en la respuesta materno-neonatal a antígenos vacunales

Catalina Álvarez Larrotta

Tesis presentada para optar al título de Doctora en Ciencias Básicas Biomédicas, Área Microbiología y Parasitología

Eliana María Arango Flórez
Directora

Paula Andrea Velilla
Codirectora

Jaime Carmona-Fonseca
Amanda Elena Maestre
Robinson Ramírez Pineda
Stephanie Yanow
Comité asesor

Corporación Académica Ciencias Básicas Biomédicas
Grupo Salud y Comunidad-César Uribe Piedrahíta
Universidad de Antioquia

Nota de aceptación:

Manuel Alfonso Patarroyo

Jurado 1

Ana Claudia Trocoli Torrecilhas

Jurado 2

Hernando del Portillo

Jurado 3

Medellín, 1 de octubre de 2019

Agradecimientos

A Dios

A mis padres, hermanos y novio por estar ahí siempre.

A los profesores Jaime Carmona, Eliana Arango y Amanda Maestre por su orientación durante todo este proceso.

A los profesores Paula Velilla y Robinson Ramírez por su acompañamiento como miembros del comité asesor.

A mis compañeros y amigos del Grupo Salud y Comunidad.

A la doctora Stephanie Yanow y a todo su equipo de trabajo por recibirme en su laboratorio y por sus valiosos aportes a este trabajo.

A todo el personal que participó en el proceso de recolección de las muestras en los municipios de Puerto Libertador y Tierralta, Córdoba y Quibdó, Chocó.

A todas las voluntarias y sus hijos que participaron en el estudio.

Al personal de los hospitales locales por su colaboración.

Al programa de financiación de estudiantes “Emerging Leaders in the Americas Program (ELAP)” y a la Universidad de Alberta-Canadá.

A Colciencias, por la financiación de mi doctorado.

Universidad de Antioquia CODI convocatoria programática salud 2014 y Grupo Salud y Comunidad-César Uribe Piedrahíta por la financiación de este trabajo.

A la Corporación Ciencias Básicas Biomédicas por aceptarme como su alumna.

Resumen

Introducción: la malaria asociada al embarazo (MAE) es común en regiones endémicas, en especial las infecciones submicroscópicas, que por ser asintomáticas no son tratadas. Es importante entender el impacto de estas infecciones con bajas cargas parasitarias en las poblaciones afectadas. Las infecciones asintomáticas crónicas favorecen la persistencia del parásito, especialmente en áreas donde las condiciones ecoepidemiológicas óptimas para para la transmisión del parásito fluctúan. En infecciones crónicas, la persistencia del estímulo antigénico cambia los perfiles transcripcionales de mediadores inmunes y promueve la constante regulación inmune, incluyendo el aumento de células T reguladoras. Estas alteraciones del sistema inmune pueden comprometer la respuesta a la vacunación de rutina.

Objetivo: evaluar el efecto de la MAE sobre la respuesta inmune materna y neonatal frente a vacunas incluidas en el Plan Ampliado de Inmunización (PAI) colombiano.

Metodología: en gestantes con 1) infección plasmodial submicroscópica en el parto, 2) historia de malaria durante el embarazo y 3) sin infección plasmodial, así como en sus lactantes de 6 meses, fue cuantificada la expresión de diferentes mediadores inmunes en sangre periférica materna, tejido placentario y sangre periférica del lactante. Los niveles de anticuerpos contra toxoide tetánico (TT) y rotavirus (RV) fueron cuantificados en sangre periférica materna, de cordón y de lactantes; mientras que los niveles de anticuerpos contra hepatitis B (HB), tres polisacáridos (PSC) de neumococo y BCG, así como la respuesta inmune celular frente a BCG, fueron cuantificados en sangre periférica de lactantes.

Resultados: la MAE se asoció con disminución en los niveles de anticuerpos antiTT en madres, así como con disminución en los niveles de anticuerpos antiTT, antiRV, antiBCG, antiPSC y en la respuesta inmune celular frente a BCG en los lactantes, asociadas a la vacunación. Además, la MAE se asoció con defectos en la inmunidad pasiva transplacentaria encontrándose una disminución en las concentraciones de IgG específicas frente a TT. Se observaron alteraciones en la expresión transcripcional de genes como Foxp3, TNF-RII, IL-10, IL-13, CD-163, CD-40 e IFN- γ , asociados con regulación, activación y función de poblaciones de células T reguladoras, macrófagos M2 y células Th1 y Th2 en sangre periférica materna y del lactante y en tejido placentario.

Conclusión: la MAE modifica el perfil transcripcional de mediadores inmunes en sangre periférica materna y del lactante, así como en el tejido placentario; además, la MAE se asocia con la alteración de la respuesta inmune frente algunas vacunas aplicadas a gestantes y lactantes colombianos, así como con la transferencia transplacentaria de anticuerpos (inmunidad pasiva).

Palabras clave: Inmunomodulación, submicroscópica, malaria, vacunas, inmunidad pasiva, gestación, lactantes

Abstract

Introduction: Pregnancy-associated malaria (PAM) is common in endemic areas, in particular submicroscopic infections that are asymptomatic, and as result, are not treated. Therefore, it is important to understand the impact of these low-level infections in the affected populations. The asymptomatic chronic infections are advantageous for parasite persistence, particularly in areas where the optimal eco-epidemiological conditions for parasite transmission fluctuate. In chronic infections, the persistence of the antigenic stimulus changes the expression of immune mediators and promotes constant immune regulation, including increases in regulatory T cell populations. These alterations of the immune system could compromise the response to routine vaccination.

Objective: To evaluate the effects of PAM on the maternal and neonatal immune response to the vaccines included in the in Colombian national immunization plan.

Methodology: The expression of different immune mediators in maternal and infant peripheral blood and in placental tissue was quantified in pregnant women with 1) submicroscopic plasmodial infection at delivery, 2) history of malaria during pregnancy, and 3) without plasmodial infection, as well as their infants aged 6 months. Levels of antibodies against tetanus toxoid (TT) and rotavirus (RV) were quantified in maternal, cord and infant peripheral bloods; meanwhile the levels of antibodies against hepatitis B (HB), three polysaccharides (PSC) of pneumococcus, and BCG, as well as the cellular immune response against BCG were quantified in infant peripheral blood.

Results: PAM was associated with decreased levels of antiTT in mothers, as well as decreased levels of antiTT, antiRV, antiBCG, antiPSC, and cellular immune response against BCG in infants. In addition, PAM was associated with decreased transplacental passive immunity against TT.

Transcriptional alterations of immune mediators associated with regulation, activation and function of T regulator cells, macrophages M2 and Th1 and Th2 cells such as Foxp3, TNF-RII, IL-10, IL-13, CD-163, CD-40 and IFN- γ were observed in maternal and infant peripheral bloods as well as in placental tissue.

Conclusion: PAM modified the transcriptional profile of immune mediators in both maternal and infant peripheral blood, as well as in placental tissue. These changes interfered with the development of an adequate immune response against some vaccines applied to Colombian pregnant women and infants, as well as with the transplacental transference of antibodies (neonatal passive immunity).

Key words: Immunomodulation, submicroscopic, malaria, vaccines, passive immunity, gestation, infants

Tabla de contenido

Índice de tablas.....	14
Índice de figuras.....	15
Lista de abreviaturas y símbolos.....	17
1 Capítulo 1: Marco Conceptual	19
1.1 Introducción.....	19
1.2 Generalidades de la respuesta inmune	21
1.3 Inmunidad en gestantes.....	24
1.3.1 Respuesta inmune y hormonas	24
1.3.2 Modificaciones inmunes en gestantes	25
1.4 Tolerancia materno-fetal y respuesta inmune neonatal	26
1.5 Vacunas: características y respuesta inmune efectiva	29
1.6 Respuesta inmune frente a diferentes antígenos vacunales	33
1.6.1 Respuesta inmune frente a toxoide tetánico	33
1.6.2 Respuesta inmune frente a la vacuna contra Hepatitis B.....	34
1.6.3 Respuesta inmune frente a BCG.....	35
1.6.4 Respuesta inmune frente a la vacuna contra rotavirus	37
1.6.5 Respuesta inmune frente a la vacuna contra neumococo	37
1.7 Vacunación en neonatos	40
1.8 Vacunación materna e inmunidad pasiva neonatal.....	41
1.9 Aspectos inmunes en las infecciones con <i>Plasmodium</i> spp	43
1.9.1 Inmunidad frente a estadios preeritrocitarios de <i>Plasmodium</i> spp.....	44
1.9.2 Inmunidad frente a estadios eritrocitarios de <i>Plasmodium</i> spp.....	45
1.10 Mecanismos de inmunomodulación propuestos en infección por <i>Plasmodium</i> spp	48
1.10.1 Interacción de <i>Plasmodium</i> spp con monocitos, macrófagos y células dendríticas.....	49
1.10.2 Equilibrio células T reguladoras versus células T efectoras.....	51

1.11	Malaria e infección plasmodial asociadas al embarazo	54
1.12	Panorama actual de la MAE	56
1.13	Consecuencias de la MAE en el desarrollo inmune del neonato	58
1.13.1	Tolerancia inmune frente a <i>Plasmodium</i> spp en niños hijos de madres con malaria placentaria.....	58
1.13.2	Infecciones maláricas e inmunomodulación de la respuesta a antígenos vacunales	59
1.14	Referencias.....	62
2	Capítulo 2:.....	77
	Inmunomodulación en MAE y su efecto en la respuesta materna contra el toxoide tetánico	77
2.1	Planteamiento del problema.....	77
2.1.1	Infección plasmodial en la gestación.....	77
2.1.2	Tétanos en el embarazo	78
2.1.3	MAE y respuesta materna a vacunas.....	79
2.2	Objetivos específicos	80
2.3	Metodología.....	81
2.3.1	Lugar del estudio	81
2.3.2	Población de estudio y diseño	85
2.3.3	Criterios de inclusión y exclusión	86
2.3.4	Recolección de datos y muestras	86
2.3.5	Diagnóstico de la infección plasmodial.....	87
2.3.6	Cuantificación relativa de la expresión de mediadores inmunes en sangre periférica.....	89
2.3.7	Cuantificación de los niveles de IgG contra TT.....	90
2.3.8	Análisis estadístico	90
2.4	Resultados	91
2.4.1	Características generales de las gestantes.....	91
2.4.2	Niveles de IgG antiTT sangre periférica materna	92

2.4.3	Efecto de MAE sobre la expresión de mediadores inmunes en sangre periférica materna.....	95
2.4.4	Resumen de resultados	99
2.5	Discusión	100
2.5.1	Disminución en los niveles de IgG antiTT.....	100
2.5.2	Disminución en los niveles de IgG antiTT según la especie plasmodial causante de la infección gestacional.....	102
2.5.3	Cambios transcripcionales en sangre periférica materna de mujeres con infección plasmodial.....	102
2.6	Referencias.....	107
3	Capítulo 3:.....	113
	Efecto de la MAE sobre la inmunización pasiva neonatal contra toxoide tetánico y rotavirus	113
3.1	Planteamiento del problema.....	113
3.1.1	Importancia de la inmunidad pasiva neonatal transplacentaria	113
3.1.2	MAE e inmunidad pasiva neonatal transplacentaria	115
3.1.3	Importancia de la inmunidad pasiva neonatal antitetánica.....	116
3.1.4	Inmunidad pasiva neonatal frente a rotavirus.....	117
3.2	Objetivos específicos	119
3.3	Metodología.....	119
3.3.1	Lugar de estudio	119
3.3.2	Población de estudio y diseño	119
3.3.3	Criterios de inclusión y recolección de datos y muestras.....	120
3.3.4	Cuantificación relativa de la expresión de mediadores inmunes en tejido placentario.	120
3.3.5	Cuantificación de los niveles de IgG contra TT.....	121
3.3.6	Cuantificación de los niveles de IgG contra rotavirus.....	121
3.3.7	Análisis estadístico	122
3.4	Resultados	123
3.4.1	Características generales de las mujeres y los neonatos.....	123

3.4.2	Niveles de IgG antiTT y antiRV en sangre periférica materna y de cordón umbilical	124
3.4.3	Efecto de la MAE sobre la expresión de mediadores inmunes en tejido placentario	128
3.4.4	Efecto de la especie plasmodial sobre el cambio del perfil transcripcional placentario	129
3.4.5	Correlaciones significativas entre la expresión de mediadores inmunes en tejido placentario y los niveles de antiRV y antiTT en cordón umbilical	133
3.4.6	Resumen de Resultados	137
3.5	Discusión	138
3.5.1	Niveles de IgG antiTT y antiRV en sangre periférica materna y de cordón umbilical	138
3.5.2	Efecto de la MAE sobre la expresión de mediadores inmunes en tejido placentario	141
3.5.3	Correlaciones significativas entre la expresión de mediadores inmunes en tejido placentario y los niveles de antiRV y antiTT en cordón umbilical	144
3.6	Referencias.....	147
4	Capítulo 4:.....	153
	Efecto de la MAE sobre la respuesta inmune de lactantes a algunas vacunas.....	153
4.1	Planteamiento del problema.....	153
4.1.1	Características de la inmunidad neonatal	153
4.1.2	Estrategias de protección neonatal	154
4.1.3	Microbiota y respuesta inmune	155
4.1.4	Tipos de vacunas y receptores sensores en células dendríticas	156
4.1.5	Inmunomodulación por <i>Plasmodium</i> spp en la vida temprana y la respuesta a vacunas	157
4.2	Objetivos específicos	159
4.3	Metodología	159
4.3.1	Lugar del estudio	159
4.3.2	Población de estudio y diseño	159
4.3.3	Criterios de inclusión.....	160

4.3.4	Recolección de datos y muestras	161
4.3.5	Diagnóstico de infección plasmoidal y cuantificación de mediadores inmunes 161	
4.3.6	Cuantificación de IgG contra TT y Rotavirus	162
4.3.7	Cuantificación de los niveles de IgA contra rotavirus.....	162
4.3.8	Respuesta inmune humoral contra BCG: cuantificación de los niveles de IgG contra PPD	163
4.3.9	Cuantificación de los niveles de IgG contra polisacáridos capsulares de neumococo.....	164
4.3.10	Cuantificación de los niveles de IgG contra antígeno de superficie de Hepatitis B	165
4.3.11	Respuesta inmune celular contra BCG: Cuantificación de niveles de interferón contra PPD en mononucleares de sangre periférica (MNSP).....	165
4.3.12	Análisis estadístico	166
4.4	Resultados	166
4.4.1	Características generales de la población de estudio.....	166
4.4.2	Niveles de anticuerpos contra antígenos vacunales en lactantes de mujeres con MAE	168
4.4.3	Efecto de la MAE sobre la respuesta inmune celular de los lactantes frente a PPD	172
4.4.4	Efecto de la MAE sobre la expresión de mediadores inmunes en sangre periférica materna, tejido placentario y sangre periférica de lactantes de 6 meses....	173
4.4.5	Correlaciones significativas entre los mediadores inmunes de lactantes de madres con y sin MAE	178
4.4.6	Resumen de resultados	182
4.5	Discusión	183
4.5.1	Efecto de la MAE en la respuesta inmune frente al TT.....	183
4.5.2	Efecto de la MAE en la respuesta inmune frente al HB	184
4.5.3	Efecto de la MAE en la respuesta inmune frente al PPD	185
4.5.4	Efecto de la MAE en la respuesta inmune frente a rotavirus	187
4.5.5	Efecto de la MAE en la respuesta inmune frente a la vacuna PCV10.....	187

4.5.6	Cambios transcripcionales asociados a la infección plasmodial y su posible rol en la modulación de la respuesta inmune frente a vacunas del PAI colombiano en lactantes	189
4.5.7	Correlaciones entre los grupos de lactantes hijos de madres con MAE y el grupo control	192
4.6	Referencias.....	195
5	Discusión general.....	201
6	Conclusiones generales	204
7	Limitaciones del estudio.....	205
8	Perspectivas	206
9	Anexos.....	208
	Anexo 1. Urabá antioqueño-Cuencas altas de los ríos Sinú y San Jorge en Córdoba-Bajo Cauca antioqueño.....	208
	Anexo 2. Material complementario.....	209
	Anexo 3. Publicaciones.....	210

Índice de tablas

Tabla 1.1. Esquema nacional de vacunación vigente.....	20
Tabla 1.2. Algunos parámetros inmunes que difieren entre infantes, adultos y gestantes	29
Tabla 1.3. Tipos de vacunas administradas en el PAI colombiano.....	30
Tabla 1.4. Numero de dosis del esquema básico y de refuerzos, por vacuna administrada en el PAI colombiano.....	32
Tabla 1.5. Efecto de la infección por <i>Plasmodium</i> spp en la respuesta a vacunas.....	61
Tabla 2.1. Número de casos e índices de malaria en Tierralta y Puerto Libertador, Córdoba entre los años 2008 y primer semestre de 2018.....	84
Tabla 2.2. Número de casos e índices de malaria en Quibdó, Chocó entre los años 2016 y primer semestre de 2018.....	84
Tabla 2.3. Cebadores y sondas para el diagnóstico molecular de la infección plasmodial.....	89
Tabla 2.4. Cebadores y sondas empleadas para la cuantificación relativa de mediadores inmunes.....	91
Tabla 2.5. Características generales de gestantes de acuerdo a su estado de infección.....	92
Tabla 2.6. Niveles de antiTT en sangre materna según el estado de infección y el momento de la gestación.....	93
Tabla 3.1. Características generales de gestantes y neonatos según estado de infección.....	124
Tabla 3.2 Niveles de IgG anti TT y anti RV en sangre periférica materna y cordón umbilical.....	124
Tabla 4.1 Características clínicas de gestantes, neonatos y lactantes.....	168
Tabla 4.2. Niveles de anticuerpos contra antígenos vacunales en lactantes de 6 meses según el grupo de estudio.....	170
Tabla 4.3 Niveles de IFN- γ en MNSP de lactantes estimulados con PPD.....	172
Tabla 4.4 Correlaciones significativas entre mediadores inmunes de lactantes exclusivas de los grupos asociados a infección.....	180

Índice de figuras

Figura 1.1. Perfiles de diferenciación de los linfocitos T (LT) vírgenes.....	24
Figura 1.2. Esquema de los diferentes tipos de respuesta inmune durante la vida de un individuo.....	27
Figura 1.3. Tipos de vacuna y respuesta inmune.....	39
Figura 1.4. Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> spp. de humanos.....	44
Figura 1.5. Diferentes mecanismos de interacción del Ei con las CPA.....	47
Figura 1.6. Cinética de la respuesta inmune contra estadios asexuales sanguíneos de <i>Plasmodium</i> spp.....	48
Figura 1.7. Efecto de la activación no específica de las células Treg en infección por <i>P. chabaudi</i>	54
Figura 2.1. Mapa ubicación geográfica del lugar de estudio en Córdoba.....	82
Figura 2.2. Mapa ubicación geográfica del lugar de estudio en Chocó.....	83
Figura 2.3. Niveles de IgG antiTT sangre periférica materna.....	94
Figura 2.4. Cuantificación relativa de la expresión de mediadores inmunes de inflamación y antiinflamación en los grupos de estudio.....	97
Figura 2.5. Cuantificación relativa de la expresión de mediadores inmunes de regulación y coestimulación en los grupos de estudio.....	98
Figura 2.6. Resumen gráfico de resultados capítulo	99
Figura 3.1. Niveles de IgG antiTT y antiRV en sangre periférica materna y de cordón umbilical.....	127
Figura 3.2. Cuantificación relativa de la expresión de mediadores inmunes proinflamatorios y antiinflamatorios en los grupos de estudio.....	130
Figura 3.3. Cuantificación relativa de la expresión de mediadores inmunes regulación inmune en los grupos de estudios.....	131
Figura 3.4. Cuantificación relativa de la expresión de mediadores inmunes de coestimulación en los grupos de estudio.....	131
Figura 3.5. Cuantificación relativa de la expresión de mediadores inmunes en los grupos de estudio, de acuerdo a la especie infectante.....	132

Figura 3.6. Correlaciones significativas entre mediadores inmunes placentarios y antiRV o antiTT en cordón.....	135
Figura 3.7. Resumen correlaciones obtenidas entre los niveles de antiTT y antiRV en cordón y las demás variables evaluadas.....	136
Figura 3.8. Resumen gráfico de resultados capítulo 3.....	137
Figura 4.1. Niveles de anticuerpos contra antígenos vacunales en lactantes de 6 meses.....	171
Figura 4.2. Respuesta inmune celular frente a PPD en lactantes	173
Figura 4.3. Comparación de los niveles de expresión de mediadores inmunes de antiinflamación en gestantes y lactantes de los tres grupos de estudio.....	176
Figura 4.4. Comparación de los niveles de expresión de mediadores inmunes de regulación y coestimulación en gestantes y lactantes de los tres grupos de estudio	177
Figura 4.5. Mapa de correlaciones significativas entre mediadores inmunes de los lactantes, de acuerdo a la condición de infección materna.....	181
Figura 4.6. Resumen gráfico de resultados capítulo 4.....	182
Figura 5.1. Aproximación teorica del efecto de los mediadores inmunes alterados en ISP-P y su papel en los cambios encontrados en la respuesta a las vacunas.....	203

Lista de abreviaturas y símbolos

- μL:** microlitro
- ADN:** ácido desoxirribonucleico
- AgsHB:** antígeno de superficie de hepatitis B
- ARN:** ácido ribonucleico
- BCG:** Bacillus Calmette-Guérin
- BPN:** bajo peso al nacer
- Breg:** células B reguladoras
- CD:** del inglés *cluster of differentiation* (clúster de diferenciación)
- CMH:** complejo mayor de histocompatibilidad (*major histocompatibility complex MHC* en inglés)
- CPA:** células presentadoras de antígeno
- CSA:** condroitín sulfato A
- CSP:** proteína circunsporozoítica
- CTLA-4:** del inglés *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*
- C_T:** del inglés *cycle threshold* (ciclo umbral)
- DPT:** vacuna difteria, pertusis, tétanos
- DTaP:** vacuna difteria, tétanos, pertusis acelular
- Ei:** eritrocito infectado con *Plasmodium* spp
- EPCR:** del inglés *Endothelial protein C receptor*
- FasL:** ligando Fas
- Fcγ:** receptores Fcγ para inmunoglobulina G
- FcRn:** del inglés *neonatal Fc receptor*
- FoxP3:** del inglés *Forkhead box transcription factor 3*
- GATA3:** factor de transcripción codificado por el gen GATA3.
- GG:** Gota gruesa
- GPI:** glicosilfosfatidilinositol
- HB:** hepatitis B
- HZ:** hemozoína.
- ICAM-1:** del inglés *Intercellular Adhesion Molecule 1* (Molécula de Adhesión Intercelular 1)
- IFNγ:** interferón gamma
- Ig:** inmunoglobulina
- IgG:** inmunoglobulina G
- IgM:** inmunoglobulina M
- IL:** interleuquina
- LAG3:** del inglés *Lymphocyte-activation gene 3*
- M1:** macrófagos activados clásicamente inducidos por el IFNγ y TNF, son efectores inflamatorios
- M2:** macrófagos activados alternativamente, que incluye por lo menos tres fenotipos diferentes solapados. Están involucrados a la resolución de la inflamación y la curación del tejido
- MAE:** malaria asociada al embarazo

MyD88: del inglés *Myeloid differentiation primary response 88*
MCP-1: del inglés *Monocyte chemoattractant protein 1*
NK cells: del inglés *natural killer* (células asesinas naturales)
NF- κ B: del inglés *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (Factor nuclear kappa - acelerador de la cadena ligera de células B activadas)
OMS: Organización Mundial de la Salud
ON: óxido nítrico
PAI: Plan Ampliado de Inmunización
PCR: del inglés *Polymerase Chain Reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)
PCV: vacuna de polisacáridos conjugados
PD-1: del inglés *Programmed cell death protein 1*
PD-L1: del inglés *Programmed Death-ligand 1*
PHA: del inglés *Phytohaemagglutinin*
PMC: Proyecto Malaria Colombia
qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real
PSC: polisacárido capsular
RC: receptor de complemento
RCIU: restricción del crecimiento intrauterino
ROR γ : del inglés *RAR-related orphan receptor gamma* (factor de transcripción células Th17)
RV1: vacuna de rotavirus monovalente
RV5: vacuna de rotavirus pentavalente
SBF: suero bovino fetal
TB: tuberculosis
Tbet: del inglés *T-box transcription factor* (factor de transcripción células Th1)
TD: antígeno T dependiente
Th: del inglés *T helper cells* (linfocito T ayudador)
Th1: linfocito T ayudador tipo 1
Th2: linfocito T ayudador tipo 2
Th17: linfocito T productor principalmente de IL17
TI: antígeno T independiente
TIM3: del inglés *T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*
Teff: linfocitos T efectores
Treg: linfocitos T reguladores
TGF β : factor de crecimiento transformante beta
TLR: del inglés *Toll-like receptor* (receptores tipo Toll)
TNF: del inglés *Tumor necrosis factor* (factor de necrosis tisular)
TNFR2: del inglés *Tumor necrosis factor receptor 2*
TT: toxoide tetánico

1 Capítulo 1: Marco Conceptual

1.1 Introducción



La salud materna es fundamental para el sustento de la gestación y la integridad y el sano desarrollo del feto. El mantenimiento del equilibrio inmunológico materno, es el punto clave que permite llevar un embarazo a término con éxito (1); por esta razón, es necesario conocer los factores que pueden alterar el equilibrio inmunológico y sus posibles consecuencias. La malaria asociada al embarazo (MAE) es una infección frecuente, ya que, las gestantes tienen un mayor riesgo de infección por *Plasmodium* spp que las mujeres no embarazadas (2). Además, recientemente se ha observado un incremento en la frecuencia de infecciones plasmodiales submicroscópicas asociadas al embarazo; en Colombia se estima una frecuencia en sangre periférica entre 23 y 49% y en sangre placentaria entre 4,9 y 57% (3, 4). Estas infecciones submicroscópicas son consideradas crónicas porque no son diagnosticadas por los métodos de rutina y generalmente son asintomáticas.

El establecimiento de infecciones crónicas es definido por un perfil transcripcional alterado y por inflamación persistente (5, 6). En infecciones plasmodiales submicroscópicas asociadas al embarazo se encontraron cambios en la expresión de diferentes mediadores inmunes (7, 8); estos cambios transcripcionales pueden explicar el aumento de células T reguladoras (Treg) reportados en infecciones plasmodiales placentarias y periféricas (9, 10). Se desconoce el impacto que generan los cambios transcripcionales de mediadores inmunes causados por estas infecciones submicroscópicas durante la gestación en el desarrollo normal de feto.

Teniendo en cuenta que las células Treg pueden suprimir respuestas inmunes no relacionadas de manera no específica de antígeno, mediante un mecanismo conocido como “supresión del espectador” (11) y que las infecciones crónicas se asocian con agotamiento de células T, con funciones efectoras menos robustas y con alteración en la diferenciación de células T de

memoria (12). La hipótesis de este trabajo es que cambios en la expresión de diferentes mediadores inmunes involucrados en la respuesta inmune efectora en infecciones plasmodiales durante el embarazo, podrían alterar la respuesta inmune frente antígenos vacunales en gestantes y neonatos y la inmunidad pasiva neonatal transplacentaria.

Tabla 1.1. Esquema nacional de vacunación vigente.

 REPÚBLICA DE COLOMBIA MINISTERIO DE SALUD Y PROTECCIÓN SOCIAL ESQUEMA NACIONAL DE VACUNACIÓN 			
EDAD	VACUNA	DOSIS	ENFERMEDAD QUE PREVIENE
Recién nacido	Tuberculosis (BCG) Hepatitis B	Única De recién nacido	Meningitis tuberculosa Hepatitis B
A los 2 meses	PENTAVA-LENTE Difteria - Tos ferina - Tétanos (DPT) <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b (Hib)	Primera	Difteria - Tos ferina - Tétanos
			Meningitis y otras enfermedades causadas por <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b
	Hepatitis B	Hepatitis B	
	Polio	Primera	Poliomielitis
	Rotavirus	Primera	Diarrea por Rotavirus
Neumococo	Primera	Neumonía, otitis, meningitis y bacteremia	
A los 4 meses	PENTAVA-LENTE Difteria - Tos ferina - Tétanos (DPT) <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b (Hib)	Segunda	Difteria - Tos ferina - Tétanos
			Meningitis y otras enfermedades causadas por <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b
	Hepatitis B	Hepatitis B	
	Polio	Segunda	Poliomielitis
	Rotavirus	Segunda	Diarrea por Rotavirus
Neumococo	Segunda	Neumonía, otitis, meningitis y bacteremia	
A los 6 meses	PENTAVA-LENTE Difteria - Tos ferina - Tétanos (DPT) <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b (Hib)	Tercera	Difteria - Tos ferina - Tétanos
			Meningitis y otras enfermedades causadas por <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b
	Hepatitis B	Hepatitis B	
	Polio	Tercera	Poliomielitis
Influenza estacional	Primera	Enfermedad respiratoria causada por el virus de la influenza	
A los 7 meses	Influenza estacional*	Segunda	Enfermedad respiratoria causada por el virus de la influenza
A los 12 meses	Sarampión - Rubeola - Paperas (SRP)	Única	Sarampión - Rubeola - Paperas
	Varicela	Única	Varicela
	Neumococo	Refuerzo	Neumonía, otitis, meningitis y bacteremia
A los 18 meses	Hepatitis A	Única	Hepatitis A
	Difteria - Tos ferina - Tétanos (DPT)	Primer refuerzo	Difteria - Tos ferina - Tétanos
	Polio	Primer refuerzo	Poliomielitis
A los 5 años	Fiebre amarilla (FA)	Única	Fiebre amarilla
	Difteria - Tos ferina - Tétanos (DPT)	Segundo refuerzo	Difteria - Tos ferina - Tétanos
	Polio	Segundo refuerzo	Poliomielitis
Niñas escolarizadas de cuarto grado de básica primaria y no escolarizadas que hayan cumplido 9 años	Virus del Papiloma Humano (VPH)	Primera: Fecha elegida	Cáncer de cuello uterino
		Segunda: 6 meses después de la primera dosis	
		Tercera: 60 meses después de la primera dosis	
Mujeres en edad fértil (MEF) entre los 10 y 49 años	Toxoide tetánico y diftérico del adulto (Td)**	5 dosis: Td1: dosis inicial Td2: al mes de Td1 Td3: a los 6 meses de Td2 Td4: al año de la Td3 Td5: al año de la Td4	Difteria - Tétanos - Tétanos neonatal
		Refuerzo: cada diez años	
Gestantes	Influenza estacional	Una dosis a partir de la semana 14 de gestación	Enfermedad respiratoria causada por el virus de la influenza
	Tdap (Tétanos - Difteria - Tos ferina Acelular)	Dosis única a partir de la semana 26 de gestación en cada embarazo	Tétanos neonatal - Difteria - Tos ferina al recién nacido

* Aplicar una dosis de refuerzo de influenza estacional entre los 12 y 23 meses de edad.

** De acuerdo al antecedente vacunal

La vacunación es una de las acciones de mayor costo efectividad, probada a nivel sanitario, como intervención tanto individual, como colectiva, para prevenir la morbimortalidad infantil por enfermedades infecciosas (13). En cuanto a la eficacia del Plan Ampliado de Inmunización (PAI) en Colombia, se encuentran cifras alentadoras (14) (**Tabla 1.1**); sin embargo, hay que considerar que la eficacia del PAI está sujeta condiciones sociales y de salud de los niños; un factor importante es el estado nutricional y la influencia de la desnutrición sobre la susceptibilidad a la infección se ha documentado bien (15). Estos factores pueden ser fácilmente medibles y prevenibles, pero, las infecciones plasmodiales, y aún más, las que no son detectadas por los métodos diagnósticos de rutina, no han sido estudiadas como un posible factor que afecta los procesos de inmunización en nuestro país.

1.2 Generalidades de la respuesta inmune

La respuesta inmune frente a antígenos extraños requiere una coordinación perfecta de todas las células que participan en las diferentes fases de esa respuesta. La principal función del sistema inmune es proteger al hospedero de patógenos. Esta función depende de la capacidad del sistema inmune innato para coordinar la migración celular para la vigilancia y para reconocer y responder a los microorganismos invasores, así como de la capacidad del sistema inmune adaptativo para generar una respuesta inmune específica y establecer una memoria inmunológica contra determinado antígeno. El objetivo de la respuesta es la destrucción rápida de tales antígenos, al tiempo que garantiza la mínima repercusión sobre la totalidad de las células y tejidos del organismo. Las células T, de manera principal, llevan a cabo la coordinación de estos procesos. Las células encargadas de dirigir la respuesta frente a los agentes patógenos son las *células T ayudadoras*, mientras que las *células T reguladoras* son las que cuidan la integridad de lo propio y, una vez controlada la invasión, desmontan la respuesta. Hay varios tipos de células ayudadoras (Th, del inglés *T helper*) que coordinan respuestas frente a parásitos intracelulares, entre ellos: las células Th1, Th2 y Th17 (16).

La generación de una respuesta efectora de células T es consecuente con el tipo de antígeno que genera el estímulo. En respuesta a patógenos intracelulares como virus y ciertos protozoos, se desarrolla una respuesta efectora de células Th1, la que, se caracteriza por la

producción de interleuquinas (IL) como interferón gamma (IFN- γ), IL-12 y factor de necrosis tumoral (TNF, siglas en inglés) que promueve la activación de macrófagos. El IFN- γ promueve mayor diferenciación de células Th1 y el cambio de isotipo a IgG2 en los linfocitos B (**Figura 1.1**) (17, 18).

En respuesta a patógenos extracelulares como bacterias y hongos se genera una respuesta efectora tipo Th17, la cual, se caracteriza por la producción de interleuquinas como IL-17A, IL-17F e IL-22, además de la activación de neutrófilos, monocitos y macrófagos. La familia de IL-17 activa el endotelio y a los macrófagos para producir interleuquinas con fuerte actividad proinflamatoria como IL-1 β y TNF. Adicionalmente, la familia de IL-17 promueve la expresión de quimioquinas que estimulan la migración de los neutrófilos a las zonas de infección. Las células Th17 se diferencian por acción del factor de crecimiento transformante β (TGF- β siglas en inglés) y de la IL-6, secretados por células endoteliales y macrófagos, importantes en los procesos de inflamación (**Figura 1.1**) (17, 18).

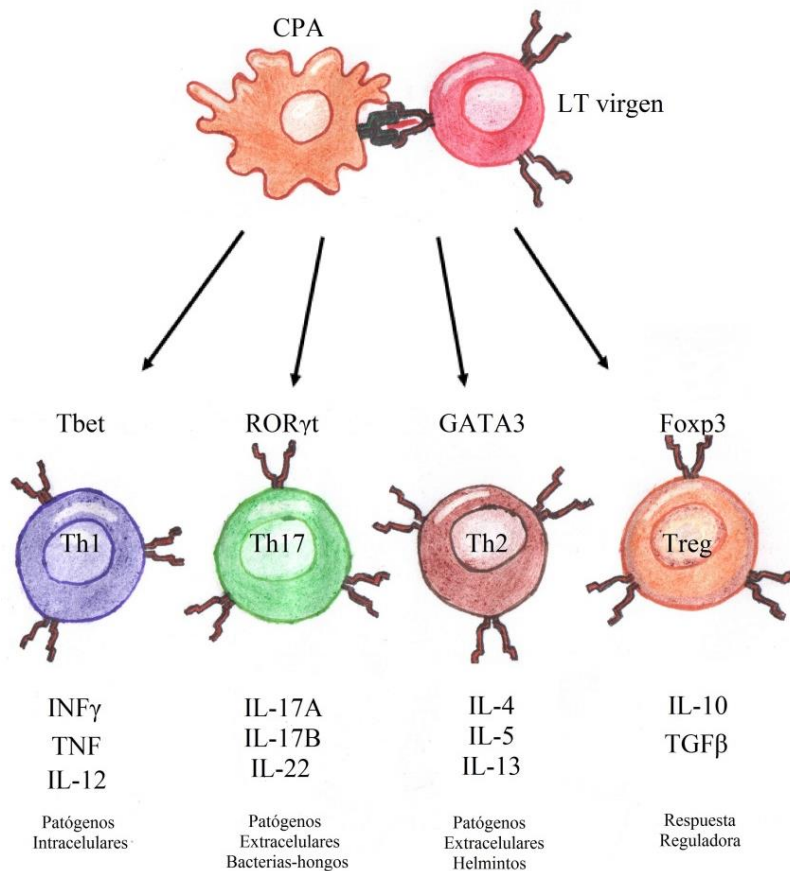
Además de las respuestas proinflamatorias tipo Th1 y Th17, existe la respuesta tipo Th2 activada por patógenos extracelulares como helmintos. Es una respuesta de carácter humoral en la que se producen interleuquinas como IL-4, IL-5 e IL-13 que favorecen la diferenciación de células Th2, así como, la activación de mastocitos, macrófagos, eosinófilos y la producción de inmunoglobulina (Ig) E (**Figura 1.1**) (17, 18).

Las respuestas inmunes de tipo proinflamatorio (Th1-Th17) requieren de mecanismos reguladores que eviten la exacerbación de la misma y la generación de daños en el individuo. La respuesta inmune tipo Th1 está asociada con enfermedades autoinmunes y daño a tejido asociada a infecciones crónicas, y la respuesta tipo Th17, se relaciona con autoinmunidad órgano específica. Adicionalmente, la respuesta Th2 se asocia a la generación de inflamación alérgica y cronicidad. En esta medida, los mecanismos reguladores son fundamentales en el desarrollo de la respuesta inmune. Estos procesos reguladores dependen de la producción de interleuquinas y la diferenciación de células con funciones antiinflamatorias, que son inducidas en simultáneo con las respuestas proinflamatorias. Las interleuquinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- β promueven la diferenciación de células reguladoras como macrófagos tipo M2 y células Treg (17, 18).

Los macrófagos M2 o también conocidos como macrófagos con activación alternativa, son una población celular que exhibe variedad de fenotipos diferenciados de acuerdo al microambiente de interleuquinas. Esta población celular está involucrada en la resolución de la inflamación y la remodelación tisular (cicatrización); puede tener alta producción de IL-10 y TGF- β , que regulan negativamente la expresión de complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase II, CD-80, CD-86 y CD-40, atenuando de esta manera la presentación antigénica. Adicionalmente, regulan negativamente la producción de interleuquinas proinflamatorias como IFN- γ , TNF, IL-1 β e IL-17 y la producción de quimioquinas involucradas en la migración de células polimorfonucleares neutrófilos como IL-8 (19).

Existen diferentes poblaciones de células T CD4 que tienen funciones reguladoras; entre éstas, las células Treg (originadas en el timo (Treg tímicas)) constituyen del 6 al 10% de la población total de células T CD4⁺ de sangre periférica. Además, las células Treg pueden ser diferenciadas a partir de células T CD4⁺ vírgenes por estimulación específica del antígeno y en presencia de la acción de citocinas como TGF β e IL-10 denominándose células Treg periféricas. Ambas poblaciones celulares (Treg tímicas y periféricas) son CD4⁺, CD25⁺ y FoxP3⁺; este último marcador, corresponde al factor de transcripción típico de esta población celular (**Figura 1.1**). Estas células tienen la capacidad de inhibir la actividad efectora de células T CD4⁺ y CD8⁺, células NKT (del inglés *natural killer T*), linfocitos B, células dendríticas y macrófagos. Los linfocitos Treg tienen una gran capacidad inhibitoria, para la cual emplean los siguientes mecanismos: 1) compromiso de los receptores coestimuladores de las células presentadoras de antígenos (CPA), 2) secreción de interleuquinas antiinflamatorias, 3) efecto citotóxico directo, 4) alteración metabólica de las células efectoras, 5) competencia con las células efectoras por interleuquinas vitales como la IL-2 (20, 21).

Figura 1.1. Perfiles de diferenciación de los linfocitos T (LT) vírgenes



Los LT vírgenes se diferencian en diferentes poblaciones de células T ayudadoras (Th), dependiendo del tipo de patógeno que estimule a la célula presentadora de antígeno (CPA)

1.3 Inmunidad en gestantes

1.3.1 Respuesta inmune y hormonas

Durante el embarazo los niveles de hormonas cambian drásticamente y son más altos que en cualquier otro momento (22). El aumento en los niveles de estrógeno y progesterona con el avance del embarazo, conduce a una involución reversible del timo; el mecanismo de modulación generado por estas dos hormonas sobre componentes individuales del sistema inmune se ha estudiado ampliamente *in vitro*, pero no en humanos (23). Se piensa que los mononucleares de sangre periférica expresan una serie de receptores endocrinos que incluyen

receptores de progesterona, glucocorticoides y estrógenos (24-27), y que a través de estos receptores se modula su respuesta.

En diferentes estudios se demostró que la progesterona puede suprimir la respuesta inmune materna alterando el equilibrio entre las respuestas Th1 y Th2, limitando la actividad de células T citotóxicas y reduciendo la producción de interleuquinas proinflamatorias (1, 22, 28, 29). Esto se logra mediante una combinación de efectos sobre las interacciones mediadas por células, que incluyen la alteración de la sensibilidad al antígeno de las células T de memoria y la regulación de la migración de leucocitos (30). Además de la progesterona, el estradiol, un tipo de estrógeno, en altas concentraciones se asoció con aumento en la respuesta inmune Th2 y la inmunidad humoral (31).

1.3.2 Modificaciones inmunes en gestantes

Se deben reconocer tres trimestres diferentes en la gestación: en el primer trimestre ocurre la implantación y placentación, en el segundo trimestre se da el crecimiento fetal y en el tercer trimestre se genera el parto; cada una de estas etapas requiere un entorno inmune diferente. En este sentido, un embarazo exitoso depende de la capacidad del sistema inmune materno de adaptarse en cada etapa específica del embarazo (1). La etapa de implantación y placentación requiere de un entorno proinflamatorio Th1; mientras que la etapa de crecimiento fetal, requiere un entorno antiinflamatorio y de tolerancia Th2, y finalmente la etapa del parto, requiere un entorno proinflamatorio Th1 (1, 32).

Durante los dos últimos trimestres hay hallazgos que se asocian con la supresión materna del sistema inmune (**Tabla 1.2**). La evidencia indica que componentes de la inmunidad innata como la actividad fagocítica, la expresión de α -defensinas y la cantidad de neutrófilos, monocitos y células dendríticas, se mantienen o potencian durante el embarazo, principalmente durante el segundo y tercer trimestre de gestación (33, 34). En contraste, el número de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ disminuye (35, 36), así como la capacidad de activación de respuestas Th1 y Th2 (34, 37); y el número de células Treg aumenta (38). Además, los niveles de interleuquinas y quimioquinas inflamatorias como IFN- γ , MCP-1 (del inglés: *monocyte chemoattractant protein 1*) y eotaxina, se reducen, mientras que los niveles de

interleuquinas que inducen el reclutamiento o actividad de células fagocíticas como TNF, IL-10 y factor estimulante de colonias de granulocitos, aumentan (33).

Por otro lado, durante la gestación se evidencian cambios en la homeostasis de las células B (39, 40) asociados a un aumento en los niveles de inmunoglobulinas séricas durante el embarazo. Además, se observa mayor frecuencia de células B reguladoras (Breg), las cuales podrían estar involucradas en la tolerancia materna y la protección contra infecciones (41).

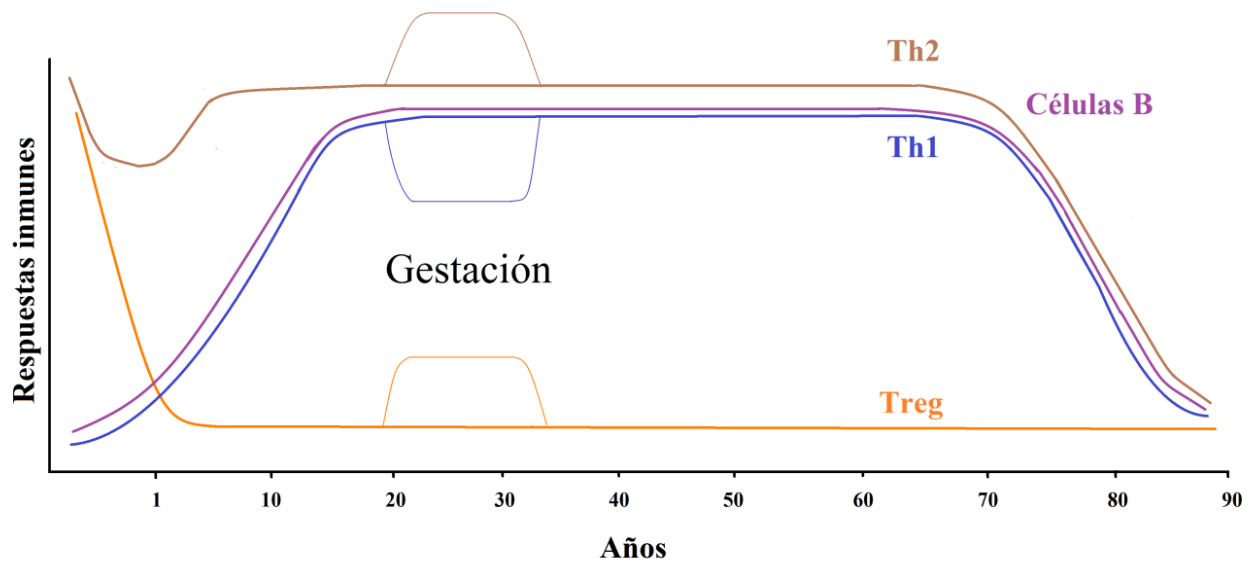
1.4 Tolerancia materno-fetal y respuesta inmune neonatal

Durante el embarazo la comunicación cruzada entre la madre y el feto es crucial para el mantenimiento de la tolerancia materno-fetal y el desarrollo de un neonato inmunocompetente (42). Debido al mantenimiento de la tolerancia materno-fetal hasta el término del embarazo, el sistema inmunitario neonatal está sesgado a respuestas tolerogénicas y de tipo Th2 (43). Los mecanismos inmunosupresores maternos que le permiten mantener la tolerancia fetal se asocian con células T y NK reguladoras y con la expresión de moléculas reguladoras como PD-L1 (del inglés: *programmed death-ligand 1*) y TIM3 (del inglés: *t-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*) (44-47). Consecuente con esto, durante la gestación se encuentra una alta proporción de células Treg en el feto, que disminuyen hasta alcanzar los niveles normales del adulto al término del embarazo (48). En este sentido, la predisposición fetal hacia la tolerancia podría limitar la respuesta inmune a agentes patógenos y aumentar la susceptibilidad a infecciones graves, en particular en recién nacidos prematuros (49).

Existen diferencias marcadas entre la respuesta inmune de los infantes, en comparación con la respuesta inmune en adultos (**Tabla 1.2, Figura 1.2**). Con respecto a las células inmunes innatas de los recién nacidos, a partir de sangre de cordón, se ha descrito que varían en cantidad y funcionamiento, en comparación con células de adultos. Los neonatos tienen de 50 a 60% menos cantidad de neutrófilos; además, estos tienen baja expresión de receptor tipo toll (TLR, sigla en inglés) 2 y TLR4, así como baja actividad de la proteína de diferenciación mieloide MyD88 y de la proteína de unión de actina p58, tras la estimulación de estos TLR (50, 51). La baja actividad en esas proteínas de señalización resulta en una disminución en la

capacidad de generar respuestas inflamatorias frente a estímulos antigénicos. En cuanto a las CPA (células dendríticas y monocitos), presentan baja expresión del CMH clase II (52) y menor cantidad de moléculas coestimuladoras CD-80, CD-86 y CD-40 (53-56). Así mismo, se observa limitada producción de IL-12p70, vital para la generación de respuestas inmunes Th1 (53, 55). De modo que, las CPA tienen baja capacidad de presentación y activación de células T.

Figura 1.2. Esquema de los diferentes tipos de respuesta inmune durante la vida de un individuo



En relación con la respuesta inmune adaptativa, en modelos murinos se describe que las células T ayudadoras $CD4^+$ neonatales, tienen una polarización Th2 y una disminución en la producción de interleuquinas proinflamatorias como $IFN-\gamma$, IL-2 y TNF, cruciales para desarrollar una respuesta efectora tipo Th1, tras estímulos antigénicos (57, 58). Con respecto a las células T citotóxicas $CD8^+$, la polarización Th2 de las células T $CD4^+$ y la limitada producción de interleuquinas Th1, afecta su diferenciación y función (59). Sobre las células

Treg CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺, se ha descrito que se encuentran con alta frecuencia en cordón umbilical y nódulos linfáticos de neonatos (60).

Por otra parte, de los linfocitos B depende la inmunidad mediada por anticuerpos con actividad específica de fijación de antígenos. Se describió que *in vitro* las células B vírgenes de sangre de cordón, tienen una limitada capacidad para sobrevivir, proliferar y diferenciarse (61). En comparación con células B de adultos, las células B neonatales tienen baja expresión del receptor IL-4R α y como consecuencia se observa baja sobrevivencia; las células B neonatales parecen ser menos susceptibles al rescate de la apoptosis mediado por IL-4. (61). En este mismo estudio, de manera *in vitro* se logró rescatar la sobrevivencia de las células B estimulándolas con IL-13, interleuquina que tiene un rol importante en la supervivencia y diferenciación de células B. Lo anterior indica que la función de la IL-13 y su receptor pueden compensar la capacidad reducida del eje de IL-4 y desatar la respuesta humoral. La IL-4 además estimula la activación y proliferación de las células B y el cambio de isotipo a IgG1 e IgE. (61).

En resumen, este panorama indica que en el momento del nacimiento los niños tienen limitaciones en la generación de respuestas inmunes tanto celulares como humorales frente a antígenos bacterianos y virales, según el perfil de células y moléculas encontradas en cordón umbilical. Sin embargo, es importante aclarar que las mediciones realizadas en sangre de cordón umbilical no son predictivas de la capacidad inmune posnatal (62) y se debe agregar que el establecimiento de la microbiota intestinal en las primeras cuatro semanas de vida, tiene un fuerte impacto en el desarrollo del sistema inmune neonatal (63). Adicionalmente, esta condición de susceptibilidad también está sujeta a factores de la madre como la nutrición (64), las infecciones durante la gestación (65-67) y los niveles de anticuerpos (68-70).

Tabla 1.2. Algunos parámetros inmunes que difieren entre infantes, adultos y gestantes

Parámetro inmune	Infantes <1 año	Adultos no gestantes	Gestantes
Células dendríticas	Mayor proporción de células dendríticas plasmocitoides (56).	Mayor respuesta a estimulación de TLR9 (53).	Aumento en la frecuencia de células dendríticas y su capacidad fagocítica (33, 34).
Células NK	Expresión de CD-16 comparable a la de los adultos no gestantes, pero con baja capacidad citotóxica (71).	Menor número de células NK en comparación con infantes (72).	Las células NK periféricas disminuyen en número y en actividad citotóxica durante la gestación, y aumentan su expresión de receptores de inhibición (73-75).
Células T CD4⁺	Predominio de respuesta inmune tipo Th2 (43, 58).	Desarrollo de respuestas Th1 y Th2 (58).	Predominio de respuesta Th1 durante primer y tercer trimestres y de Th2 durante el segundo trimestre de la gestación (1, 32).
Células reguladoras	Altos niveles de células Treg en comparación con adultos no embarazados (76).	Niveles normales de células Treg (76).	Mayor frecuencia de células Breg y células Treg, en comparación con adultos no embarazados (38, 41).
Formación de células B de memoria	Baja expresión de marcadores de células B de memoria (77, 78).	Alta expresión de marcadores de células B de memoria (77, 78).	Bajo número de células B de memoria durante el tercer trimestre de gestación, en comparación con no gestantes (79).
IgG subclases	Niveles de IgG1 e IgG3 rápidamente comparables con los niveles del adulto. Bajos niveles de IgG2 contra polisacáridos bacterianos (80).	Buena respuesta IgG2 frente a polisacáridos bacterianos (81).	Aumento en los niveles de IgG total a expensas de IgG 1, 2 y 3, en comparación con no gestantes (82).

1.5 Vacunas: características y respuesta inmune efectiva

En el último siglo la vacunación ha sido la intervención médica más efectiva para reducir la muerte y la morbilidad causada por enfermedades infecciosas. Las vacunas han logrado erradicar la viruela y falta poco para eliminar la poliomielitis en el mundo; además para otras infecciones tanto bacterianas como virales, se ha logrado reducir francamente su morbilidad y mortalidad. Las vacunas se agrupan en diferentes clases de acuerdo a su método de producción (**Tabla 1.3**).

La inmunogenicidad de una vacuna se mide por su capacidad de generar una memoria inmunológica específica de antígeno que persista en el tiempo. La *eficacia vacunal* es el porcentaje de reducción de la incidencia de la enfermedad en vacunados, respecto a los no vacunados. La *evaluación de la efectividad* se efectúa después de la autorización y el registro de la vacuna, mediante estudios observacionales (cohortes y de casos y controles) (83, 84).

Tabla 1.3. Tipos de vacunas administradas en el PAI colombiano

Método de producción	Vacunas incluidas
Vivas atenuadas	Triple viral (rubéola, sarampión y paperas) (SRP) BCG (Bacillus Calmette-Guérin) Fiebre amarilla (Stamaryl®) Vacuna oral de polio (VOP) (Vacuna Sabin) Varicela (Varivax®) Rotavirus (Rotarix®)
Organismo entero muerto	Vacuna inactivada de polio (VIP) (Vacunal Salk modificada) <i>Bordetella pertusis</i> (DPT) Hepatitis A (Havrix®)
Toxoide/Proteína	Difteria (DPT, DTaP y TD) Tétanos (DPT, DTaP y TD) <i>Bordetella pertusis</i> acelular (DTaP)
Glicoconjugada/Polisacáridos	Pneumococo (PCV10) (Synflorix®) <i>Haemophilus influenzae</i> tipo B (Hib)
Recombinante	Hepatitis B (AgHBs) Virus papiloma humano (Gardasil™)

La protección a largo término se basa en la persistencia de los anticuerpos vacunales en niveles protectores y el mantenimiento de las células de memoria con capacidad de reaccionar rápida y efectivamente tras una nueva exposición antigénica. La generación de esta memoria está ligada al tipo de antígeno y a su capacidad de activar células T y B; la ayuda de la células T es importante para el cambio de isotipo y maduración de la afinidad, seguido de la diferenciación a células B de memoria de larga vida y a células plasmáticas de (17).

La capacidad de generar memoria inmunológica está estrechamente ligada al tipo de antígeno, ya sea de naturaleza T dependiente (TD) o T independiente (TI). Los antígenos TD son proteínas o péptidos que requieren ser presentados en el contexto CMH por CPA

(macrófagos/monocitos, células dendríticas, células B) a las células T ayudadoras, para generar una respuesta inmune. Los antígenos TD son efectivos para diferenciar células T foliculares y B de memoria en centros germinales de órganos linfoides, produciendo anticuerpos de alta afinidad de múltiples isotipos. En contraste, los antígenos TI no producen memoria y no requieren de células T ayudadoras para promover una respuesta inmune; estos antígenos son polisacáridos y pueden activar la respuesta inmune en células B de zona marginal en órganos linfoides, sin ser presentados en el contexto CMH a células T ayudadoras; además, generan principalmente anticuerpos tipo IgM. Los antígenos TI se dividen en dos clases TI-1 o TI-2, basado en su manera de interacción con las células B. Tanto los antígenos TI-1 como los TI-2 pueden generar la producción de anticuerpos; para los antígenos TI-1 participan los linfocitos de respuesta innata B1 y los linfocitos B de zona marginal para los antígenos TI-2. Los antígenos TI-1 como lipopolisacáridos, generan activación directa y policlonal no específica, actuando como potentes mitógenos de la mayoría de células B. Los antígenos TI-2 son moléculas repetitivas como los polisacáridos capsulares de bacterias (17, 85, 86).

La naturaleza de los antígenos es una de las grandes limitaciones en el desarrollo de vacunas. Varios antígenos de microorganismos que causan infecciones de interés en salud pública son de naturaleza TI. Debido a esto, los antígenos con características TI son conjugados con proteínas para hacerlos TD y llevarlos a generar memoria inmunológica. Adicionalmente, son utilizados adyuvantes para inducir una respuesta primaria de células T y estimular la expresión de moléculas coestimuladoras en las CPA, para reforzar la activación de las células T (87). En el contexto de la vacunación, para generar un mecanismo efector que garantice la protección contra microorganismos de interés, se recomienda un esquema de varias dosis vacunales que incluyen la inmunización primaria (primera dosis de vacunación y subsecuentes dosis) y refuerzos de acuerdo al tipo de vacuna y antígeno (**Tabla 1.4**).

Tabla 1.4: Número de dosis del esquema básico y de refuerzos, por vacuna administrada en el PAI colombiano

Vacuna	Número de dosis básicas	Número de refuerzos
BCG	1	
Hepatitis B recién nacido	1	
Hepatitis B	3	
DPT	3	2
<i>Haemophilus influenzae</i>	3	
Polio	3	2
Rotavirus	2	
Neumococo	2	1
Influenza estacional	2	
Triple viral	1	1
Varicela	1	
Hepatitis A	1	
Fiebre amarilla	1	

Además de la naturaleza del antígeno, el tipo de vacuna también define las características de la respuesta inmune que se produce. Las vacunas de organismos enteros muertos, toxoides/proteínas, glicoconjugadas/polisacáridos y recombinantes se caracterizan por generar fundamentalmente respuesta inmune humoral (88, 89). Por otro lado, las vacunas vivas atenuadas que simulan una infección natural y de acuerdo a su vía de administración, contribuyen en la generación de respuesta inmune tanto celular T CD4⁺ y T CD8⁺, como humoral con células B de memoria de larga vida y múltiples isotipos de anticuerpos y en la generación de respuesta inmune en mucosas (90).

En cuanto a los mecanismos efectoros que desencadenan las vacunas tenemos:

- Anticuerpos: previenen y reducen las infecciones mediante: 1) unión a sitios activos de toxinas (91); 2) neutralización de la replicación viral, evita la entrada del virus a la célula diana (92), 3) facilita la opsonofagocitosis (93) y 4) activa la cascada del complemento.
- Células T CD8⁺: no previenen la infección, pero ayudan al eliminar el agente patógeno. Estas células realizan su función de citotoxicidad directa mediante la liberación de enzimas líticas o indirectamente contribuyendo a la producción de interleuquinas (94).

- Células T CD4⁺: no previenen la infección, pero ayudan al control y eliminación del patógeno. Hay varios subgrupos:
 - Células T ayudadoras foliculares: producción IL21 y activación células B
 - Células Th1 efectoras: producción de IFN- γ , TNF e IL-2; protección contra patógenos intracelulares (95).
 - Células Th2 efectoras: producción de IL-4, IL-5 e IL-13; protección contra patógenos extracelulares (96).
 - Células Th17 efectoras: producción de IL-17, IL-22 e IL-26; contribuye a la defensa de mucosas (97).

1.6 Respuesta inmune frente a diferentes antígenos vacunales

Existe un modelo canónico de respuesta inmune para antígenos de diferente naturaleza, sin embargo, el sistema inmune está compuesto por gran cantidad moléculas y células con alta plasticidad, lo que hace que estas respuestas inmunes pasen de un modelo simple a uno complejo. De acuerdo al modelo canónico, el tipo de respuesta inmune frente a antígenos vacunales se resume en la **Figura 1.3**, pero es importante indicar que para vacunas hay poca evidencia del mecanismo de generación de la respuesta inmune. A continuación se resumen los hallazgos encontrados en la literatura para cada tipo de vacuna:

1.6.1 Respuesta inmune frente a toxoide tetánico

La vacuna DPT, incluida en la vacuna pentavalente aplicada en el PAI colombiano, está compuesta de los toxoides tetánico y diftérico y de bacterias de *Bordetella pertussis* enteras inactivadas con formol (vacuna DPT), esta vacuna es emulsificada con sales de aluminio y la vía de administración es intramuscular. Además del estímulo antigénico de los microorganismos, las sales de aluminio inducen la secreción de quimioquinas como MCP-1 e IL8 que potencian la movilización de monocitos y neutrófilos al músculo (98), que naturalmente tiene menos células inmunes que la dermis. Este aumento en el número de neutrófilos y monocitos se mantiene por lo menos por 48 horas en vacunas emulsificadas con sales de aluminio (99), pero vuelven a niveles normales en el músculo después de 5 a 7 días postinyección (98, 100).

El proceso inflamatorio debido al estímulo antigénico y el mantenimiento del antígeno en el sitio de inoculación generado por la sal de aluminio contribuyen a la activación de CPA, con la consecuente regulación positiva del CMH-II y las moléculas coestimuladoras CD-80, CD-86 y CD-40; además de la producción de interleuquinas proinflamatorias necesarias para la presentación eficiente del antígeno y la activación específica de las células T vírgenes (98, 100-103). Las células dendríticas activadas migran por vía linfática a nódulos linfáticos para la activación de células T específicas de antígeno, ya que el TT es un antígeno TD (17). En respuestas frente al TT en adultos, tanto la respuesta de interleuquinas Th1, como de Th2 están implicadas en la protección inducida por la vacunación (104-106). En este sentido, tras la inmunización con TT se obtienen, tanto células específicas Th1 productoras de IFN- γ , como células Th2 y altos niveles de anticuerpos protectores tipo IgG (107).

En centros germinales de nódulos linfáticos las células dendríticas foliculares, los linfocitos foliculares y los linfocitos Th2 específicos para TT favorecen la diferenciación de células B en células de memoria y en células plasmáticas productoras de IgG de alta afinidad (17). La vacunación con TT se fundamenta en la generación de anticuerpos que tienen mayor capacidad de unirse a la toxina, compitiendo con los sitios de unión al receptor de la toxina en las células nerviosas; la neutralización de la toxina previene el desarrollo de la enfermedad. Concentraciones de IgG anti-TT que exceden 0,1-0,15 UI/mL cuantificados mediante la técnica de ELISA indirecta son considerados como protectores (108, 109). En la **Figura 1.3 A** se describe el mecanismo general de la respuesta inmune frente a TT.

1.6.2 Respuesta inmune frente a la vacuna contra Hepatitis B

La vacuna contra hepatitis B se encuentra en dos presentaciones: monovalente, aplicada dentro de las primeras 24 horas de vida, y la incluida en la vacuna pentavalente, aplicada en los meses subsiguientes. Es una vacuna compuesta de la proteína recombinante del antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B (AgsHB), emulsificada con alumbre (cristales con aluminio). La eficacia de la vacuna contra hepatitis B (HB) puede ser verificada mediante la cuantificación de anticuerpos IgG antiHB; niveles de antiHB mayores a 10 IU/ μ L, después de la vacunación, son consideradas como protectores (110, 111). La vacuna contra HB es

administrada por vía intramuscular, por lo que opera el mismo mecanismo de reconocimiento y activación de la respuesta inmune ya descrito para la vacuna DPT (**Figura 1.3 B**).

La respuesta de anticuerpos antiHB es variable, encontrando individuos que responden a la vacunación e individuos que no responden; en cuanto a los factores asociados a esta variabilidad en la respuesta se encuentran edad, género, factores genéticos y comorbilidades (112). La vacuna contra la HB genera tanto respuesta inmune celular, como humoral; los estudios indican que existe una correlación entre los niveles de antiHB y la proliferación de células T, con el aumento en los niveles de IFN- γ , IL-10 y TNF en individuos con adecuada respuesta; en contraste, en los individuos sin respuesta inmune humoral, se encontró una débil respuesta proliferativa de células T y menor producción de IFN- γ , IL-10, IL-13 y TNF (111, 113-120).

Adicionalmente, el estímulo vacunal con AgsHB promueve diferenciación de células T CD4⁺ y CD8⁺ productoras de IFN- γ (120, 121). En estudios *in vitro* se demostró que la producción de IFN- γ mejora la respuesta humoral específica contra HB (122); y además, que el IFN- γ producido por las células T CD8⁺ es necesario para la controlar la infección por el virus de la HB (123). Asimismo, los niveles de IL-10 se correlacionaron positivamente con los niveles de antiHB, la IL-10 es un factor que media la diferenciación a células plasmáticas y favorece el cambio de isotipo a IgG1 e IgG3 (124).

1.6.3 Respuesta inmune frente a BCG

La vacuna BCG está compuesta de bacterias vivas atenuadas de una cepa de *Mycobacterium bovis*; la porción lipídica de la pared celular es muy similar entre la BCG y *Mycobacterium tuberculosis*, por lo que se asumía que infectaba los macrófagos de manera similar (**Figura 1.3 C**) (123). De acuerdo a lo anterior, el objetivo original de la vacuna era prevenir la tuberculosis (TB) pulmonar, sin embargo, ha fallado en suministrar esta protección. En cambio, esta vacuna ha sido altamente efectiva en la prevención de meningitis tuberculosa y TB extrapulmonar diseminada (126, 127). Las dificultades en la eficacia de la BCG para prevenir la TB pulmonar se atribuyen a varios factores: la genética humana y de la

micobacteria (128, 129), coinfecciones con virus y parásitos, localización geográfica y factores socioeconómicos que influyen en las condiciones de vivienda y nutrición (130, 131).

La BCG se administra por vía intradérmica, que es una vía ideal para la administración de vacunas debido a la diversidad de células inmunes residentes y reclutadas en este tejido, tales como, macrófagos, células de Langerhans y varios subgrupos de células dendríticas dérmicas (132, 133); todas estas células expresan una gran variedad de receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (134). En particular, se comprobó que la vacuna BCG interactúa con el receptor 3 de complemento (135) y los TLR 2 y 4 (136). La estimulación de macrófagos con BCG a través de TLR2 o 4 conduce a diferencias en la respuesta proinflamatoria, proliferación de células T y secreción de IFN- γ *in vitro*, e *in vivo* resulta en diferencias en la carga de bacterias en el pulmón (136). Para receptores de lectinas tipo C, como el receptor de manosa expresado en los macrófagos, se presume activación por la composición de la pared celular de la micobacteria, sin embargo, no se ha demostrado su interacción directa con la vacuna BCG (137-139). La estimulación de las células dendríticas con BCG conduce a un aumento en la expresión de CMH-II, CD-40, CD-44, CD-54, CD-80 y CD-86, que corresponden a todos los receptores involucrados en la activación, maduración y migración de células dendríticas y en la presentación antigénica a células T (140).

La respuesta inmune frente a la vacuna BCG es de tipo celular Th1, por ser una vacuna viva atenuada (141), y diferentes estudios demuestran el papel crucial del IFN- γ para controlar la infección por *M. tuberculosis* (142, 143), aunque también se observa respuesta inmune humoral (144, 145). En contraste, la IL-4 polariza la respuesta inmune hacia un perfil Th2 y se asocia con disminución en la eficacia de la BCG (146); además, la IL-10 puede no solo disminuir la migración de células dendríticas a los órganos linfoides, si no también, regular la expresión de IL-12, una interleuquina vital para el desarrollo de respuestas de tipo Th1 (147, 148). En consecuencia, se altera la capacidad de maduración de células dendríticas, se disminuye la activación y proliferación de células T y se disminuye el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa.

1.6.4 Respuesta inmune frente a la vacuna contra rotavirus

La vacuna de aplicación oral monovalente G1P[8] (RV1) contra rotavirus (Rotarix™) (149) administrada en Colombia, es derivada de un solo aislamiento clínico de rotavirus humano (cepa 89-12) (**Figura 1.3 D**); esta cepa fue empleada como vacuna con base en la observación de protección cruzada (inmunidad heterotípica) que se desarrolla en infecciones naturales por rotavirus (150); esta vacuna representa los antígenos de rotavirus humano VP7 y VP4 más comunes (151). La vacuna RV1 ha mostrado alta protección contra la enfermedad grave por rotavirus, lo que indica, que la inmunización con una vacuna monovalente provee inmunidad protectora contra la infección por múltiples serotipos de rotavirus (152). El desarrollo de inmunidad homotípica versus heterotípica en individuos después de una infección natural o vacunación, es un fenómeno que no es completamente entendido (153, 154). Sin embargo, se presume que la generación de anticuerpos protectores frente a epítopes heterotípicos en VP4 o VP7, que posibles anticuerpos protectores contra antígenos comunes en VP6 o NSP1 o que respuestas de células T protectoras con reactividad cruzada son las posibles explicaciones a este tipo de inmunidad (155).

La generación de inmunoglobulinas neutralizantes determina la capacidad protectora de la vacunación con RV1. Se ha propuesto que los niveles séricos de anticuerpos IgA son probablemente la mejor opción que determina la correlación con la protección clínica contra rotavirus (156-158); sin embargo, hay estudios que no observan esta correlación (155,159). De hecho, se ha establecido que la inmunidad local, es decir, la producción de la IgA intestinal es necesaria para la protección antiviral; se indica que el nivel total de IgA anti rotavirus (antiRV) medida en suero poco tiempo después de la infección, generalmente refleja los niveles de IgA intestinales (157).

1.6.5 Respuesta inmune frente a la vacuna contra neumococo

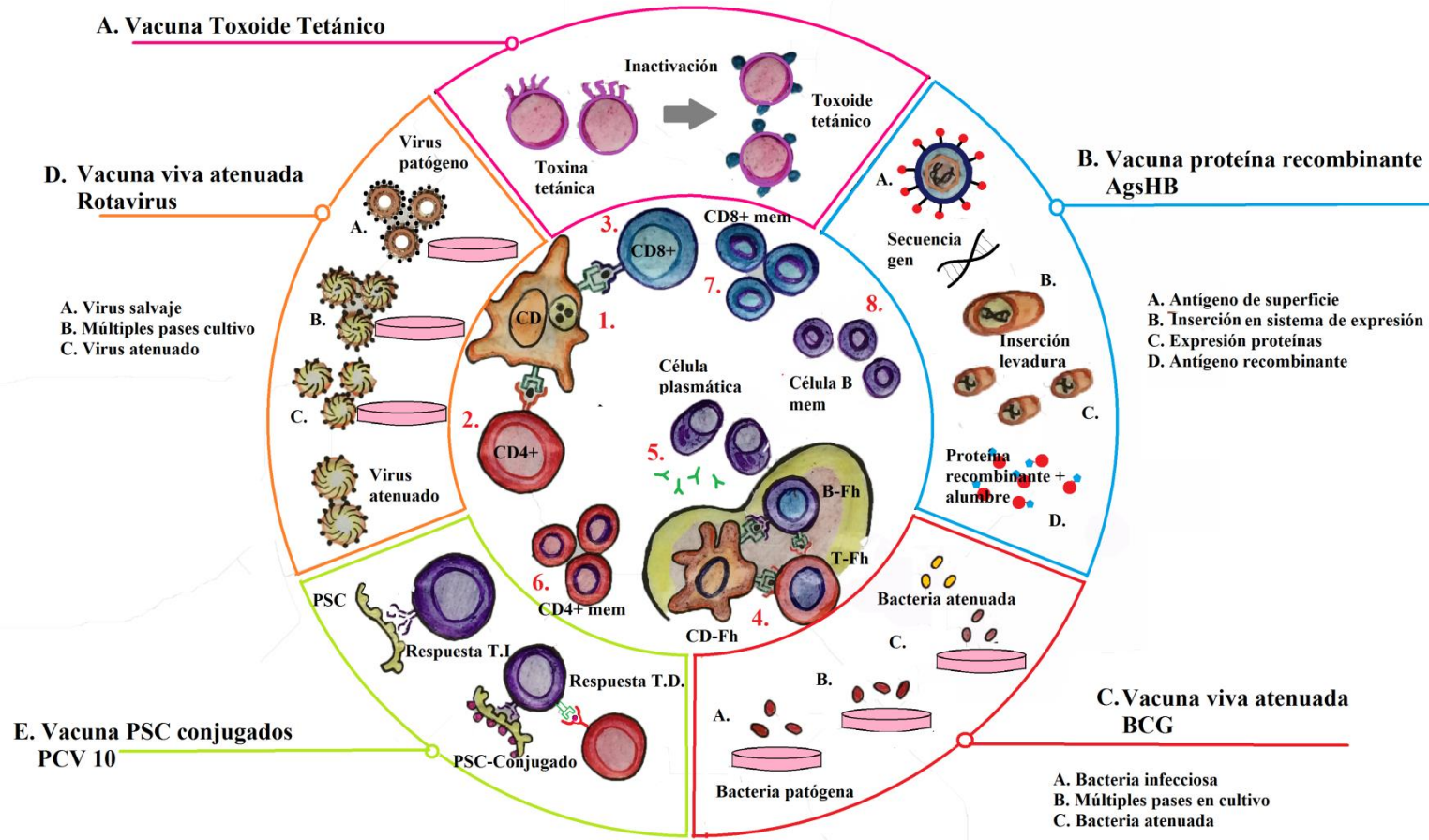
Las vacunas de polisacáridos (PSC) conjugados (PCV, siglas en inglés: *pneumococcal conjugate vaccine*), dentro de las que se encuentra la PCV de 10 serotipos (PCV10) está compuesta de los PSC 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5 y 7F de neumococo. De estos PSC, 8 están conjugados con la proteína D de *Haemophilus influenzae*, mientras que, el PSC 18C

está conjugado con TT y el PSC 19F está conjugado con toxoide diftérico (160). El proceso de conjugación a proteína induce una respuesta inmune TD, frente a antígenos que son naturalmente TI (161) (**Figura 1.3 E**)

En diversos programas de vacunación infantil se ha determinado la capacidad de PCV para llevar a niveles de anticuerpos protectores después de la aplicación de tres dosis (162); además de los estudios que reportan la alta producción de anticuerpos, también se encontró una efectiva actividad opsonofagocítica medida después de la vacunación con estas vacunas (163); pero la correlación entre la protección y la enfermedad invasiva por neumococo varía ampliamente de acuerdo al serotipo (164). De acuerdo a esto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda la aplicación de 3 dosis de las PCV en niños menores de 2 años (165).

El principal objetivo de la vacunación con PCV10 es la prevención de la enfermedad invasiva por neumococo (166, 167); sin embargo, varios estudios epidemiológicos que evalúan el impacto de la PCV10 indican que su mayor contribución a la salud pública es debida al efecto indirecto por la reducción en la colonización de *S. pneumoniae* de las superficies mucosas de la nasofaringe de los infantes vacunados, lo que disminuye la transmisión de serotipos de *S. pneumoniae* de interés en salud pública a grupos vulnerables no vacunados (168-170). Hasta el momento, el mecanismo inmunológico que induce la protección contra la colonización en humanos es desconocido, sin embargo, en modelos murinos se demostró que los anticuerpos IgG bloquean la colonización mediante aglutinación (171).

Figura 1.3. Tipos de vacuna y respuesta inmune



A. Vacuna de toxoide tetánico: antígeno proteico presentado a través de CMH-II a células T CD4⁺ (2), luego en órganos linfoides las células dendríticas foliculares (CD-Fh) presentan el antígeno a células T foliculares (T-Fh y exponen, a través de diferentes receptores, el antígeno a células B (B-Fh) y (4), posteriormente se producen células plasmáticas productoras de IgG (5), además de células T CD4⁺ (6) y B de memoria (8) específicas de antígeno. **B. Vacuna antígeno de superficie de Hepatitis B (AgsHB):** es reconocida por CD (1) y presentada a células T CD4⁺ (2) y CD8⁺ (3), luego en órganos linfoides se presenta por células dendríticas foliculares (CD-Fh) a células B (B-Fh) y T foliculares (T-Fh) (4), posteriormente se producen células plasmáticas productoras de IgG (5), además de células T CD4⁺ (6), CD8⁺ (7) y B de memoria (8) específicas de antígeno. **C. Vacuna BCG:** opera el mismo mecanismo que para la vacuna AgsHB. **D. Vacuna rotavirus:** opera el mismo mecanismo de la vacuna BCG con producción de IgG, IgA e IgA secretora. **E. Vacuna PCV10:** debido a la proteína D de *H. influenzae*, al TT y Toxoide diftérico el PSC es reconocido como antígeno T dependiente (TD) y es procesado igual que el antígeno TT.

1.7 Vacunación en neonatos

La vacunación es una exitosa estrategia global que apunta a reducir la morbilidad y mortalidad por infecciones en la vida temprana (13). La vacunación neonatal es fácil de implementar, ya que el nacimiento es un punto de contacto obligatorio con los sistemas de salud en el mundo entero. En este sentido, la cobertura y la protección temprana antes de la exposición al agente, son grandes ventajas. El objetivo de la vacunación es reducir el período de vulnerabilidad a infecciones de interés en salud pública; sin embargo, está limitada al establecimiento de esquemas de rutina que se desarrollan principalmente en los primeros meses de vida. La OMS da lineamientos básicos para que cada país construya su esquema. El PAI es una acción conjunta de las naciones del mundo y de organismos internacionales interesados en apoyar acciones tendientes a lograr coberturas universales de vacunación, con el fin de disminuir las tasas de mortalidad y morbilidad causadas por las enfermedades inmunoprevenibles y con un fuerte compromiso de erradicar, eliminar y controlar las mismas. Este plan debe contemplar las limitaciones que tiene la vacunación neonatal como la baja inmunogenicidad dada por la polarización Th2 neonatal, la seguridad vacunal y el desarrollo de tolerancia o hiporespuesta a un antígeno o a antígenos administrados concomitantes al nacer o en los meses subsiguientes (172).

El esquema nacional de vacunación en Colombia contempla tres grupos poblacionales como susceptibles a infecciones de interés en salud pública: 1) neonatos y niños desde las primeras 24 horas de vida hasta los 5 años de edad; 2) niñas mayores de 9 años y mujeres gestantes y en edad fértil; 3) adultos mayores de 60 años. El PAI colombiano contempla las siguientes enfermedades: meningitis tuberculosa; hepatitis B; infecciones por *Haemophilus influenzae* tipo B; diarrea por rotavirus; infecciones invasivas y no invasivas por neumococo; infección respiratoria por influenza virus; fiebre amarilla; difteria; tosferina; tétanos neonatal, materno y accidental; poliomielitis; sarampión; rubeola; paperas; varicela; hepatitis A y cáncer de cuello uterino. En la **tabla 1.1** se observa el esquema nacional de vacunación vigente.

Existen varios factores que determinan la efectividad de un esquema de vacunación, que puede ser calificada en términos de cantidad y calidad de la respuesta de anticuerpos durante

la infancia temprana (173). Estos factores incluyen: la etapa del desarrollo inmune del infante (174), el tipo de vacuna y su inmunogenicidad intrínseca (175), el número de dosis e intervalos de tiempo entre ellos y la influencia de los anticuerpos maternos (176-178). Todas las limitaciones en la vacunación neonatal anteriormente descritas, se solucionan con el diseño del esquema de vacunación que incluye: inmunización primaria y refuerzos de vacunas en diferentes tiempos del crecimiento neonatal, abarcando diferentes etapas del desarrollo inmune del infante, número de dosis de acuerdo al tipo de vacuna y su inmunogenicidad y a la influencia de los anticuerpos maternos (179, 180).

1.8 Vacunación materna e inmunidad pasiva neonatal

La vacunación materna tiene tres puntos de acción importantes:

- 1) Generación de protección inmunológica a las gestantes, ya que, cambios en su sistema inmune generan un aumento de riesgo de infección durante el embarazo (33, 181, 182);
- 2) Activación de la inmunidad innata y adaptativa humoral y celular específica que contribuye a la resistencia contra infecciones que se transmiten verticalmente al feto (183); y
- 3) Generación de IgG específica que puede ser transferida al feto vía cordón umbilical e IgG, IgA e IgM secretadas en el calostro y la leche materna ingerida por el neonato durante la lactancia (184).

Por el momento, sólo la vacuna DTaP (Difteria-Tétanos-Tosferina acelular) y la vacuna de influenza inactivada son universalmente recomendadas por los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC sigla en inglés) para ser administradas a todas las gestantes (185) (**tabla 1.1**). Es claro que las vacunas vivas atenuadas pueden causar complicaciones potencialmente graves en pacientes embarazadas inmunocomprometidas. Por lo tanto, generalmente están contraindicadas en esta población (186). Actualmente, existen vacíos en el conocimiento sobre la eficacia y seguridad de nuevas vacunas con formulaciones útiles para prevenir infecciones de interés en salud pública en las gestantes y

neonatos, y el uso experimental de éstas está restringido por el riesgo en la alteración del desarrollo fetal (187).

La inmunidad pasiva se basa en la transferencia de IgG al feto, a través del cordón umbilical, para conferir protección inmunológica temprana hasta que se inicie la vacunación habitual del neonato. Esta transferencia de IgG inicia desde la semana 13, pero la mayor cantidad es transferida en el tercer trimestre de la gestación (188). La IgG transferida a través de la placenta al feto se correlaciona con la concentración sérica materna de IgG, el nivel de expresión de receptor FcRn en el sincitiotrofoblasto placentario y la subclase de IgG, siendo IgG1 e IgG4 las que se transfieren de manera más eficiente (189, 190). De acuerdo lo anterior, vacunas con antígenos proteicos, como DTaP, que producen predominantemente IgG1 e IgG3, generan mejor inmunidad pasiva que las vacunas de polisacáridos bacterianos que producen predominantemente anticuerpos subclase IgG2 (191).

En cuanto al tiempo de duración de los niveles de IgG maternos en el neonato, aún no es claro; el tiempo de vida media de la IgG es aproximadamente de 25 días, pero hay estudios que indican que pueden persistir por más tiempo en el neonato. En un estudio se encontró que en más de 50% de los neonatos de cuatro a seis meses de vida, los anticuerpos maternos específicos para sarampión ya no eran detectables (192). Para anticuerpos específicos de dengue se encontró que a los 6 meses de vida el 72% de los infantes eran seronegativos (193). Para anticuerpos específicos contra varicela el tiempo duración en el neonato fue de 2,4 meses y para rubeola fue de 2,1 meses (194).

Con la vacunación materna, la inmunidad pasiva se convierte en una estrategia para reducir la susceptibilidad neonatal a infecciones. En Colombia, el esquema de vacunación neonatal contra infecciones como la tosferina y *Haemophilus influenzae* tipo B empieza a los dos meses de edad, lo que deja una ventana de vulnerabilidad del neonato (**tabla 1.1**).

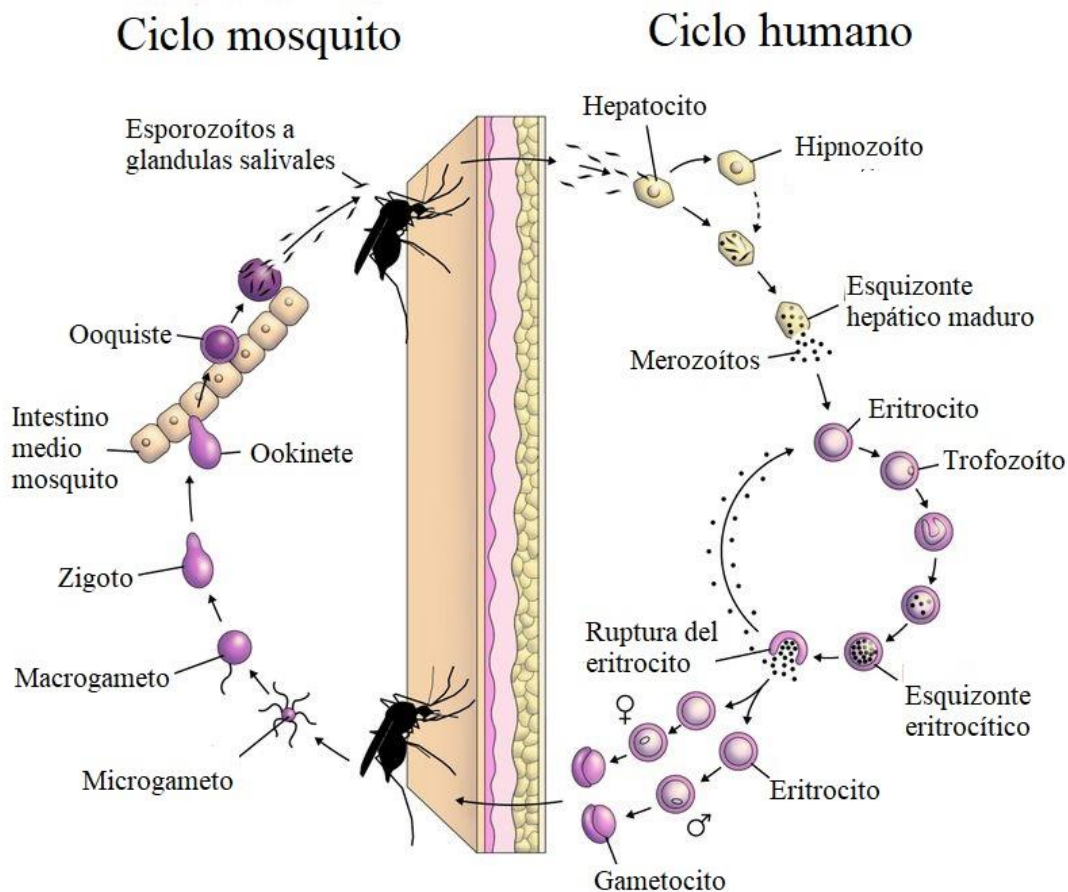
A pesar de que hay muy pocas vacunas aceptadas para aplicación durante la gestación, la recomendación es acudir a la consulta preconcepcional para verificar el estado de inmunización y garantizar que la mujer en edad reproductiva complete su esquema de

vacunación al menos tres meses antes de embarazarse. Las vacunas indicadas en este caso son: virus del papiloma humano, AgsHB, varicela, triple viral, influenza y DPT (195)

1.9 Aspectos inmunes en las infecciones con *Plasmodium* spp

El ciclo vital de *Plasmodium* spp es complejo debido a las múltiples formas o estadios que genera y a la enorme cantidad de antígenos que acompañan a cada forma parasitaria. Todo esto es suficiente para generar una respuesta inmune de extrema complejidad, que además se conoce de manera incompleta.

Figura 1.4. Ciclo de vida de *Plasmodium* spp. de humanos



Fuente: "Life cycle of the malaria parasite" from Epidemiology of Infectious Diseases. Available at: <http://ocw.jhsph.edu>. Copyright © Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health. Creative Commons BY-NC-SA.

1.9.1 Inmunidad frente a estadios preeritrocitarios de *Plasmodium* spp

Los esporozoítos son formas móviles que ingresan al hospedero humano con la picadura de la hembra *Anopheles* spp. Después de la picadura, estas formas parasitarias pueden detectarse en la dermis, epidermis e incluso en folículos pilosos (196). Los esporozoítos migran desde la piel mediante un movimiento de deslizamiento (*gliding*), hacia los vasos sanguíneos o linfáticos, cuyo alcance les permite llegar al hígado, donde invaden los hepatocitos a través de varias interacciones entre proteínas parasitarias y receptores y moléculas del hígado; la unión más clara es entre proteína de superficie circumsporozoítica (CSP, en inglés) y el heparán sulfato, un glicosaminoglicano presente en la membrana de estas células hepáticas (197). El esporozoíto puede atravesar varios hepatocitos hasta establecerse finalmente para formar su vacuola parasitófora, que genera el esquizonte hepático (**Figura 1.4**).

Durante el recorrido, los esporozoítos tienen contacto con células del sistema inmune tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa. En el caso de inmunidad innata, se involucran el sistema de complemento y los TLR, entre otros receptores. En el caso de respuesta adaptativa se observa la participación de células T efectoras e inmunoglobulinas específicas de antígeno. Uno de los contactos descritos en inmunidad innata es mediante el reconocimiento de las moléculas de glicosil fosfatidil inositol (GPI) contenidas en la membrana parasitaria por el TLR2. Esta interacción promueve la activación de la respuesta inmune con reconocimiento, fagocitosis, presentación antigénica y diferenciación de células T efectoras (198, 199). La CSP parece ser la proteína presentada con más frecuencia por el CMH en estadios preeritrocitarios. Esta puede generar títulos detectables de anticuerpos específicos y es una proteína diana en el diseño de vacunas antimalaria.

En individuos con historia previa de malaria y seropositivos para la CSP, la respuesta inmune se inicia con la opsonización de los esporozoítos por anticuerpos IgG específicos, la captación de los complejos por las CPA mediante receptores Fcγ, activación y amplificación de células T efectoras, activación y amplificación de células B, con maduración de afinidad de los anticuerpos (200). Los anticuerpos antiCSP neutralizan al esporozoíto de manera independiente de la subclase de inmunoglobulina y participan en los procesos de opsonización junto con el complemento, lo que favorece el control de la infección (201, 202).

Estos anticuerpos antiCSP son detectables en el suero de individuos sanos y residentes de zonas endémicas, en quienes, además, se han detectado células B de memoria específicas para CSP de *P. falciparum* (200).

Una vez el esporozoíto se encuentra en el hígado, se despliega otro mecanismo de respuesta inmune, como es la fagocitosis por las células de Kupffer o de Browicz-Kupffer. Se pueden diferenciar células efectoras del tipo T CD8⁺ que reconocen epítopes del parásito mediante el CMH clase I, en la superficie de los hepatocitos infectados. Estas células efectoras promueven la lisis de los hepatocitos mediante perforinas, FasL, granzimas y la producción de IFN- γ y TNF (196). Mediante el reto *in vitro* de células dendríticas con *P. berghei* (plasmodio de roedores), se demostró la inducción de células T citotóxicas CD8⁺ específicas contra la proteína CSP y la posterior producción de IFN- γ e inducción de una respuesta inmune tipo Th1 (203).

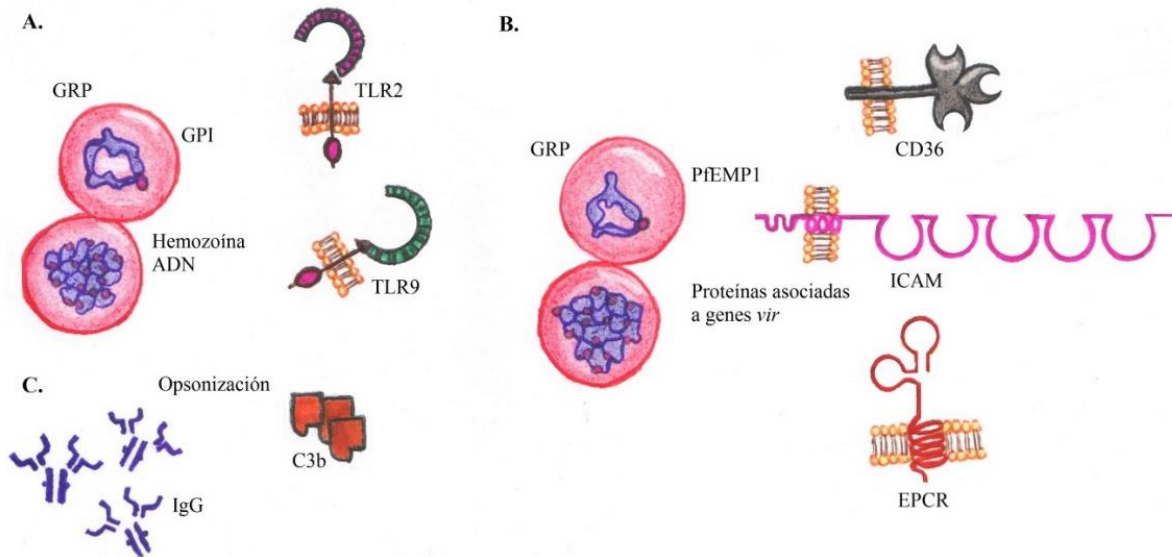
1.9.2 Inmunidad frente a estadios eritrocitarios de *Plasmodium* spp

Igual que en estadios preeritrocitarios, las CPA pueden tener un primer contacto con los parásitos mediante respuesta inmune innata o adquirida (204). Las moléculas asociadas a estadios eritrocitarios reconocidos por diferentes receptores de la respuesta inmune innata son: a) GPI, producto de la ruptura del eritrocito infectado (Ei), que promueve el estímulo en CPA a través del TLR2 (205); b) hemozoína, producto de degradación de la hemoglobina, reconocida por el TLR9 (206); c) complejo ADN-hemozoína de *P. falciparum*, reconocido por el TLR9 (207). Cada uno de estos receptores es prescindible en la generación de la respuesta inmune (208) (**Figura 1.5A**).

Las diferentes moléculas de *Plasmodium* spp reconocidas por los TLR promueven una respuesta inmune inflamatoria Th1, la cual es mantenida principalmente por IFN- γ . Esta respuesta se caracteriza por la producción de TNF, IL-12, IL-1 β e IL-6 y por aumento en la expresión de CMH-II (209). El IFN- γ induce aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno y de óxido nítrico (ON) en las células fagocíticas, lo que lleva a la eliminación de los Ei y favorece la presentación antigénica (210). El IFN- γ promueve aumento de la población de linfocitos efectoras Th1 que apoyan su producción y amplifican la respuesta;

además, la IL-12 estimula la producción de IFN- γ en las células T, lo que fomenta un perfil Th1 (211).

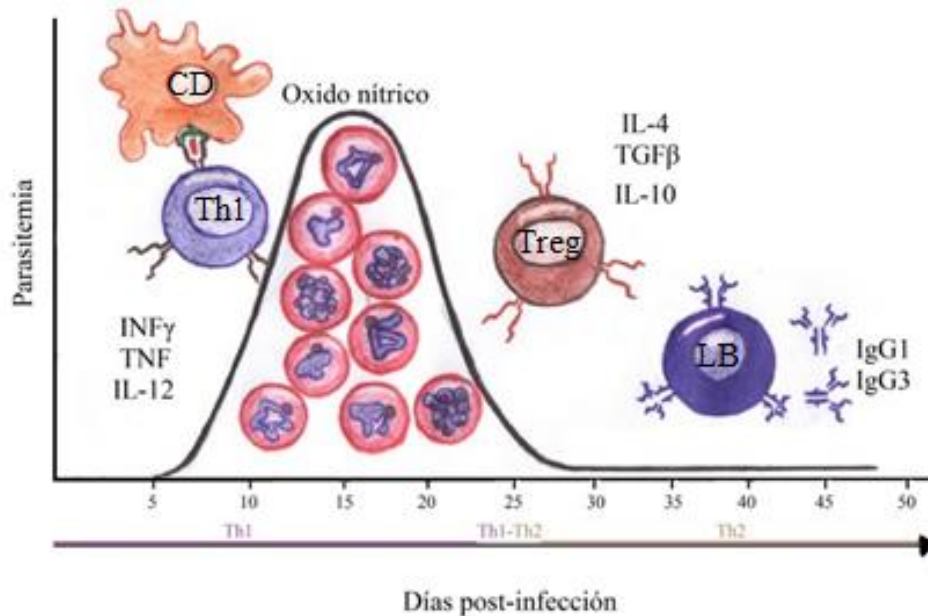
Figura 1.5. Diferentes mecanismos de interacción del Ei con las CPA



A. Receptores TLR2 y TLR9 de la respuesta inmune innata interactúan con el GPI y la hemozoina más ADN respectivamente. **B.** Los Ei expresan en su superficie proteínas específicas del parásito que tienen diferentes fenotipos de adhesión a varios receptores, dentro de estos, CD-36, ICAM y el receptor endotelial de la proteína C reactiva (EPCR). **C.** Adicionalmente, a través de su opsonización con anticuerpos puede interactuar con los receptores Fc γ y con los receptores CR1 y CR2 a través de la fracción C3b del complemento.

Los niveles de ON producido por las células fagocíticas se incrementan a medida que aumenta la parasitemia, consecuente con la respuesta Th1. Sin embargo, durante el proceso de regulación de la respuesta se producen interleuquinas antiinflamatorias como IL-10 que previenen el daño tisular. Tras la captación de los antígenos y la presentación no canónica a través de las células dendríticas en los órganos linfoides, se fomenta la diferenciación de linfocitos B específicos contra antígenos de *Plasmodium* spp. La diferenciación de la población celular B supone el desarrollo de la respuesta humoral. Las IgG1 e IgG3 (212) son las más frecuentes y producidas en mayores cantidades tras la respuesta inmune a este patógeno; ellas se caracterizan por tener una alta capacidad de fijación de complemento, por presentar facilidad de unión a receptores Fc γ de CPA y además pueden realizar traspaso placentario (**Figura 1.6**) (213).

Figura 1.6. Cinética de la parasitemia y la respuesta inmune contra estadios asexuales sanguíneos de *Plasmodium* spp



Las CPA realizan el primer contacto con el patógeno y producen Interleuquinas proinflamatorias que promueven la respuesta Th1 y la migración y activación de macrófagos que producen óxido nítrico para el control de la infección. Posteriormente se produce un aumento de interleuquinas antiinflamatorias para controlar la respuesta y se induce la respuesta tipo Th2 caracterizada por la IL-4 y la siguiente diferenciación de linfocitos B y producción de anticuerpos específicos. (Adaptada (214)). **CD**. Células dendríticas; **LB**: linfocitos B. La línea indica la cinética de la parasitemia.

El desarrollo de la respuesta inmune contra los estadios eritrocitarios de *Plasmodium* spp tiene tres aspectos importantes. El primero es la intracelularidad del parásito en los eritrocitos, lo que le confiere la capacidad de evadir mecanismos de la respuesta inmune innata como la interacción directa con receptores como TLR y el sistema complemento; además, la falta de expresión del CMH-I en la superficie de los eritrocitos ayuda a evitar el reconocimiento por células T CD8⁺ (215, 216). El segundo es la gran variabilidad antigénica asociada a estas formas parasitarias (trofozoítos jóvenes, trofozoítos maduros y esquizontes), lo que le confiere la capacidad de evadir la respuesta inmune adquirida, puesto que el parásito tiene diferentes familias de genes multicopias y alelos polimórficos que hacen que el control de la infección se dificulte (216, 217). Y el tercero es la capacidad de adhesión que contribuye a la formación de rosetas que camuflan los Ei entre eritrocitos no infectados y la capacidad

de secuestrarse al endotelio vascular lo que protege a los parásitos del aclaramiento por el bazo (215, 218).

1.10 Mecanismos de inmunomodulación propuestos en infección por *Plasmodium spp*

Como se ha mencionado, la interacción de *Plasmodium spp* con los componentes del sistema inmune es compleja e involucra diversos procesos que conducen a un rango amplio de respuestas, que pueden ser de un perfil proinflamatorio (modulación positiva/activación) o un perfil antiinflamatorio o regulador (modulación negativa/supresión). Estos procesos son, por ejemplo: a) Variabilidad antigénica del parásito en cada uno de sus estadios durante la infección; b) Genotipo y fenotipo de adherencia de la cepa parasitaria infectante; c) Clase de antígeno (proteínas parasitarias, productos como hemozoína, glicosil fosfatidil inositol (GPI) y vesículas extracelulares) reconocido por los diferentes receptores de las CPA; d) Tipo de receptor del sistema inmune que capta el antígeno (receptores tipo Toll (TLR siglas en inglés), receptores recolectores o basureros (*scavenger*), receptores de complemento, receptores Fc γ , entre otros. La estimulación de cada uno de estos receptores genera una señal que forma las características de la respuesta inmune.

Las infecciones por *Plasmodium spp* promueven cambios en la respuesta inmune; sin embargo, cada componente del sistema inmune ha sido evaluado de manera individual. Este estudio estrictamente analítico o fragmentado resulta en una visión en un solo plano de la modulación. *Plasmodium spp* y sus productos (hemozoína, vesículas extracelulares, etc.) alteran la respuesta de CPA y conducen a un aumento de células reguladoras (219, 220), lo cual puede contribuir tanto a los procesos fisiopatológicos de la enfermedad como a la evasión de la respuesta inmune. Estos sucesos generan un desequilibrio inmunológico que puede resultar en limitaciones en la respuesta inmune generada por células T ayudadores, vitales en los procesos de vacunación tanto en las gestantes como en los neonatos.

1.10.1 Interacción de *Plasmodium* spp con monocitos, macrófagos y células dendríticas

Los monocitos, macrófagos y células dendríticas, en su papel de CPA, interactúan de dos maneras con los Ei: directa (contacto directo con ellos) o indirecta (contacto con productos del parásito). Las CPA tienen diferentes receptores que median la interacción: unos se unen/ligan a distintas moléculas expresadas en los Ei y otros a productos del parásito. Cada forma de interacción, ya sea de manera dependiente o independiente de contacto, promueve un estímulo y una función efectora en la célula inmune (221).

La interacción de las CPA con *Plasmodium* spp en reconocimiento típico de patógenos dentro de la respuesta inmune se puede realizar por varias vías:

- (1) por la vía del complemento, por medio de C3b, el cual opsoniza al agente patógeno y promueve su fagocitosis por los receptores CR1 (receptor 1 del complemento), sinónimo de CD-35 (**Figura 1.5 C**);
- (2) por opsonización con anticuerpos específicos, cuando hay exposición previa al parásito; en este contexto se promueve la fagocitosis del patógeno mediante los receptores Fcγ (**Figura 1.5 C**);
- (3) mediante los TLR, por medio de moléculas como GPI y hemozoína, se promueve fagocitosis (**Figura 1.5 A**) (221).

La captación y fagocitosis de los Ei es una vía importante en la eliminación o aclaramiento parasitario. Esta captación genera una respuesta inmune de acuerdo al antígeno parasitario reconocido y al receptor que lo reconoce. En todos estos casos se promueve una respuesta proinflamatoria que contribuye a combatir la infección (222).

En otro contexto, existen interacciones no típicas mediadas por la capacidad de adhesión del parásito a diferentes moléculas presentes en distintos tipos celulares. En este sentido, el parásito puede ser captado por receptores recolectores o recicladores de desechos (*scavenger*) por ser un patógeno intracelular. Estos receptores reconocen y captan cuerpos apoptóticos e

inducen la inhibición de la función de las CPA. Además, el receptor recolector CD-36, que es una molécula presente en fagocitos y células NK, es un blanco de anclaje frecuente de *Plasmodium* spp ya que proteínas producidas por el parásito tienen afinidad por este receptor (**Figura 1.5 B**) (223); por lo tanto, cuando el parásito interactúa con las CPA mediante este receptor, se genera una respuesta inmune antiinflamatoria favoreciendo la viabilidad del parásito.

La característica de adhesión propia del parásito define el perfil de la respuesta que se desarrollará. De esta manera, la modulación de la respuesta inmune se fundamenta en el fenotipo de adhesión del parásito, el tipo de receptor al que se adhiere el parásito, la afinidad de unión con el receptor y la cantidad de estímulos que recibe cada célula (amplificación de la respuesta). En este sentido, la unión con el receptor CD-36 está asociada a casos de malaria no complicada, debido a que la señalización intracelular generada tras la activación de este receptor es una respuesta antiinflamatoria que regula el reciclaje de las moléculas que capta (224); mientras que la unión al receptor ICAM (*intercellular adhesion molecule 1*) o CD-54, se asocia a casos de malaria complicada, porque la señalización intracelular mediada por este receptor conduce a una respuesta proinflamatoria. Recientemente, se describió la unión al receptor de proteína C endotelial (*endothelial protein C receptor EPCR*), con lo que se inhibe la activación de la proteína C reactiva (PCR), que tiene actividad antiinflamatoria, antitrombótica y protectora endotelial, ayudando a mantener la integridad vascular. Este tipo de unión se describió en casos de malaria cerebral y malaria complicada (**Figura 1.5 B**) (222, 224, 225).

Además, el secuestro de los Ei en diferentes órganos y la formación de rosetas, ayudan a la fisiopatología de la enfermedad. Estos fenómenos (secuestro y rosetas) se asocian directamente con la producción de proteínas con propiedades de adhesión típicas del parásito y su exportación a la membrana del Ei. Las rosetas facilitan la invasión de los eritrocitos adyacentes, dificultan el reconocimiento de los Ei por las células del sistema inmune y pueden generar obstrucción vascular (224, 225). Por lo tanto, hay una relación directa entre el fenotipo adherente del parásito y la respuesta inmune inducida en las CPA (223). Asimismo, las diferentes vías de fagocitosis modulan de manera variable la producción de

interleuquinas; por esta razón, se observa gran variedad de fenotipos clínicos de la enfermedad, que van desde casos de malaria complicada hasta infecciones asintomáticas.

Se ha planteado que la función de las CPA se puede ver reducida en las infecciones maláricas. La hemozoína no siempre activa a las CPA; la captación e ingreso de Ei con contenido de hemozoína al macrófago, inhibe la fagocitosis y altera la formación del fagolisosoma por disminución en la generación de radicales libres de oxígeno y nitrógeno (226). Esta disfunción en los macrófagos afecta la respuesta del individuo y favorece la supervivencia del parásito; adicionalmente, podría explicar la frecuente asociación de las infecciones maláricas con bacteremia en niños (227, 228).

Las células dendríticas son las CPA “profesionales”; por esta razón, tienen el papel importante en la resolución de los procesos infecciosos. En células dendríticas expuestas *in vitro* a Ei, se observó disminución de la expresión de CMH clase II, moléculas de adhesión y coestimuladoras y, adicionalmente, reducción en la respuesta a estímulos posteriores con lipopolisacárido (229). Se describió que las diferencias en los estímulos (tipo de receptor y afinidad de interacción) pueden generar tanto la activación de las células dendríticas como la inhibición de sus funciones. Por otra parte, hay pruebas de que las formas asexuales de *P. berghei*, *P. chabaudi* y *P. yoelii* (plasmodio de roedores) tienen tropismo por las CPA de muridos. Por esta razón, los parásitos pueden invadir a las CPA y asegurar un lugar inmunoprivilegiado en el hospedero, con la opción de llegar incluso a bazo y médula ósea (230, 231).

En síntesis, la participación de las CPA en la respuesta a *Plasmodium* spp es importante y abarca un amplio espectro de desenlaces. La variación no solo depende del tipo de contacto con la célula, sino que también depende de las características fenotípicas del parásito para mediar esta interacción.

1.10.2 Equilibrio células T reguladoras versus células T efectoras

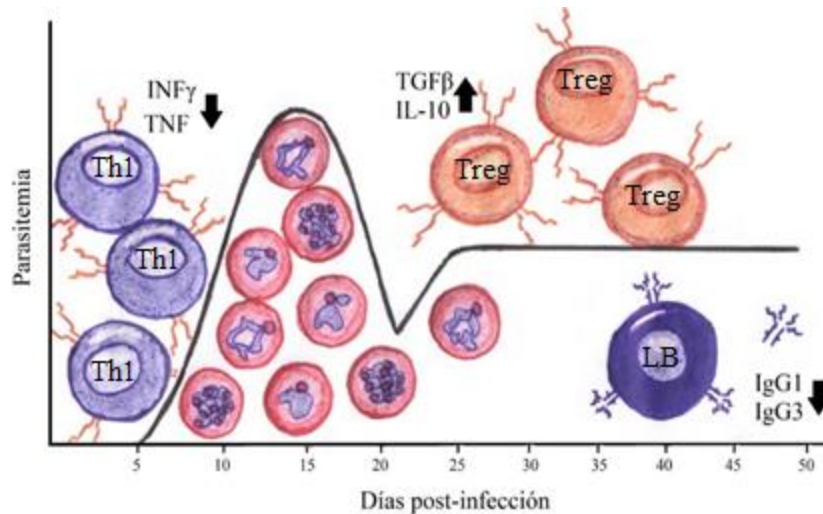
La acción inmunosupresora de los T reguladores contempla la producción de interleuquinas inmunomoduladoras, como TGF- β e IL-10, y la inducción de apoptosis en células T efectoras

de manera no específica (232, 233). Aunque se han descrito diferentes subpoblaciones de células T reguladoras, se reconoce el papel que tiene las células T CD4⁺ CD25⁺Foxp3⁺ en la modulación de la magnitud de la respuesta inmune dirigida contra antígenos propios y no propios; como se mencionó previamente de acuerdo al sitio de diferenciación, estas células se clasifican en Treg tímicas y Treg periféricas (232). Además, las células Treg Foxp3- pueden ser inducidas por citoquinas como IL-10 y TGF- β , que se reconocen como células Tr1 y Th3, respectivamente. La acción inmunosupresora de las células T reguladores contempla la producción de interleuquinas inmunomoduladoras, como TGF- β e IL-10, y la inducción de apoptosis en células T efectoras de manera no específica (232, 233).

La respuesta inmune a infección por *Plasmodium* spp se ha descrito como de baja efectividad (234), es decir, de baja capacidad para controlar y eliminar la infección. Varios factores dificultan el desarrollo de la respuesta inmune y de la generación de una adecuada inmunidad adquirida. Dentro de estos factores se encuentran los inherentes a la biología del parásito, que dificultan el desarrollo de un estándar inmunogénico; esto se evidencia en la variación de la presentación clínica de la enfermedad alrededor del mundo. Estos factores inherentes a la biología del parásito corresponden a la capacidad de variación antigénica de *Plasmodium* spp y la variedad de formas parasitarias que componen su ciclo de vida en el hospedero humano.

En modelos murinos infectados con *P. chabaudi* se halló disminución de IFN- γ , TNF e IL-12, antes del control de la parasitemia periférica (235). Estos hallazgos sugirieron la importancia del papel de las células Treg, mediadores de las células T efectoras en las respuestas inflamatorias, y aclaran su implicación en la transición de respuesta Th1 a Th2 (**Figura 1.7**) (236).

Figura 1.7. Efecto de la activación no específica de las células Treg en infección por *P. chabaudi*



En ratones infectados con *P. chabaudi* se observa aumento de las células Treg; estas células, controlan la respuesta Th1 antes del aclaramiento parasitario y dificultan la generación de la respuesta Th2. Este aumento de células reguladoras dificulta el control de la infección y el desarrollo de una eficiente respuesta de inmunidad adquirida y producción de IgG. (Adaptada (214)) LB: linfocitos B. La línea indica la cinética de la parasitemia.

Hay evidencia del aumento de la población de células Treg en muridos y humanos con infección malárica. En ratones infectados con *P. yoelii*, *P. berghei* y *P. chabaudi* se observó que el número de Treg es proporcional a la carga parasitaria, pero esta proporcionalidad se vio en los casos de malaria grave, mientras que en los casos de malaria no complicada no se conservó (237). En ratones infectados con *P. yoelii* se halló mayor producción de IL-10 en la población de células Treg periféricas que en la población de Treg tímicas (219). Es clara la diferenciación de Treg en infecciones maláricas, pero es discutido el sentido en el que pueden irrumpir en el desarrollo de una respuesta inmune adecuada. En ratones se asocia una temprana diferenciación de Treg, con una inmunidad adquirida deficiente por alteración de la expansión de células efectoras. Los cambios en los niveles relativos de Treg y T efectoras generan más información respecto a la afectación del sistema inmune y su homeostasis. En el mismo modelo experimental, se indicó que cuando se presenta una inducción temprana de Treg, aumenta la razón Treg: T efectoras y se genera una potencial inmunosupresión, por predominio de la respuesta reguladora (238).

In vitro, *P. falciparum* induce diferenciación de células Treg, e IL-10 y TGF- β son indispensables para su generación. En infectados con *P. falciparum* hubo aumento en la población de Treg, lo que apoya que la infección con *Plasmodium* spp diferencia Treg (220). En adición, tanto en individuos con malaria asintomática como grave, hay mayor expresión del receptor del TNF celular tipo II en la población de Treg. El receptor del TNF celular tipo II es un marcador de la actividad inmunosupresora de Treg, importante en el control de la proliferación de T efectoras, pues es receptor asociado a apoptosis (239).

Se propuso que antígenos y factores solubles de *Plasmodium* spp inducen la diferenciación de Treg, lo que indica un mecanismo de inducción adicional a las moléculas diferenciadoras y de proliferación: IL-2, IL-10 y TGF- β . Se plantea que *Plasmodium* spp puede inducir Treg mediante los receptores tipo Toll. En ensayos *in vitro*, hay inducción de Treg mediante TLR9, el cual está involucrado en el reconocimiento antigénico de *Plasmodium* spp (240).

1.11 Malaria e infección plasmodial asociadas al embarazo

La *malaria* es la infección por *Plasmodium* spp asociada a la presencia de síntomas y signos clínicos de la enfermedad; mientras que la *infección plasmodial* se refiere a la presencia de *Plasmodium* spp en sangre periférica o tejido, en ausencia de síntomas o signos característicos de la enfermedad. Durante el embarazo se pueden presentar malaria e infección plasmodial tanto gestacional como placentaria y congénita. Por tanto, aquí nos referiremos a la MAE como cualquier forma de infección plasmodial durante la gestación.

El embarazo genera cambios hormonales, inmunológicos, fisiológicos y físicos que promueven un aumento en la susceptibilidad a contraer la infección plasmodial (241, 242). Esa mayor susceptibilidad está determinada por el aumento de la atracción de los vectores *Anopheles* spp (243-245), de la superficie corporal y de la frecuencia de micciones que causa la salida nocturna de la habitación o del toldillo. Por otro lado, el embarazo condiciona a la mujer a un estado de tolerancia inmunológica (246, 247), sustentada por un predominio Th2 en el perfil de respuesta inmune durante el segundo trimestre (248). Esta condición limita las respuestas inmunes de perfil Th1, aumentando la susceptibilidad de la gestante a la infección (22, 181).

Dentro de los mecanismos fisiopatológicos de *Plasmodium* spp se encuentra su capacidad de adhesión a diferentes receptores. La familia de proteínas VAR con 59 variantes (249), codifica para las proteínas denominadas EMP1 (del inglés *erythrocyte membrane protein*), que se expresan en la membrana del Ei con *P. falciparum* y están involucradas en el fenómeno de la adhesión a moléculas como CD-36 (250), ICAM-1 (CD-54) (251), condroitín sulfato A (CSA) (252, 253), receptor de complemento 1 (RC1) (254), heparán sulfato (255), entre otras. En la malaria gestacional, los estadios de *P. falciparum* expresan la proteína VAR2CSA, codificada por una variante de los genes *var* y que tienen tropismo específico de adhesión al CSA presente en altas cantidades en tejido placentario (256-258). De esta manera, las gestantes que adquieren la infección plasmodial, pueden contraer infección placentaria plasmodial, la cual solo puede ser diagnosticada hasta después del alumbramiento.

En infecciones por *P. vivax* el fenómeno de la citoadherencia aún no es totalmente claro, pero sin duda alguna existen infecciones placentarias (259, 260) y muchas clases de complicaciones y casos de malaria complicada por *P. vivax* (261). Se describió que esta especie puede adherirse a células endoteliales pulmonares humanas (262, 263), células endoteliales cerebrales, criosecciones placentarias (262) y al parecer a glucosaminoglicanos como CSA y ácido hialurónico (264). En la citoadherencia de *P. vivax* se cree que las proteínas variantes antigénicas VIR son las principales involucradas (265), pero este fenómeno aun es materia de investigación.

Hay una marcada subestimación de la infección plasmodial. Las infecciones detectadas solo por métodos moleculares son llamadas submicroscópicas y son frecuentes en mujeres embarazadas (4, 266-268). En cuanto al impacto o consecuencias de estas infecciones submicroscópicas en el embarazo, se describen como comparables entre las especies *P. vivax* y *P. falciparum* en cambios histológicos placentarios (4, 259, 269). También se informan efectos de tales infecciones submicroscópicas por *P. falciparum* en anemia materna (270), parto prematuro (270) y bajo peso al nacer en los neonatos (270, 271). Además, tanto para *P. vivax* como para *P. falciparum* se encuentran cambios en los niveles de interleuquinas en sangre periférica y placenta; se observa aumento en los niveles de interleuquinas proinflamatorias como IFN- γ y TNF, así como, aumento de interleuquinas antiinflamatorias

como IL-10 e IL-4 (7, 269). Es importante resaltar que estas infecciones submicroscópicas, tanto gestacionales como placentarias, deben ser infecciones crónicas que generan un constante estímulo antigénico, y por ende, alteración en los ambientes habituales de moléculas en sangre periférica y placenta. El impacto de estos cambios en los ambientes de moléculas en el desarrollo fetal aun no es claro.

1.12 Panorama actual de la MAE

La MAE puede causar malaria gestacional, que es infección en sangre periférica materna; malaria placentaria, que es infección en sangre o tejido placentarios; y malaria congénita, que es infección del neonato manifestada entre los 0 y los 30 días de vida (272). En América, Brasil y Colombia son los países con mayor número de estudios acerca de la MAE; en Colombia, ellos están concentrados, en general, en los últimos quince años y en la zona de Urabá antioqueño-cuencas altas de los ríos Sinú y San Jorge en Córdoba-Bajo Cauca antioqueño (273). En esta región se encontró una frecuencia de MAE diagnosticada por gota gruesa entre el 9 y 14% (274-276) y entre 25 y 45% determinada a través de PCR cuantitativa en tiempo real (q-RT-PCR por la sigla en inglés) (3, 4); la malaria placentaria es el evento que mayor frecuencia presentó con 4,9 a 57% de infección, seguida de MG con 23 a 49% y MC con 29% (3, 4); es clave decir que la mayoría de infecciones encontradas en estos estudios correspondieron a infecciones submicroscópicas (3, 4). El historial de malaria durante la gestación también se asoció con cambios histológicos en la placenta y bajo peso al nacer (4). De igual manera, en esta población de mujeres se logró identificar en la placenta aumento de infiltrado inflamatorio, de células en preapoptosis y apoptosis y de expresión de interleuquinas proinflamatorias (7).

En Colombia, los pocos estudios conocidos indican que el peso del neonato puede ser inferior (269, 272, 277) o normal (3), cuando se compara con el de los no expuestos a MG. En la región donde se han concentrado los estudios colombianos sobre MAE, la anemia materna es frecuente y más si sufren infección plasmodial en el embarazo (259, 272, 274).

El embarazo modifica la respuesta inmune y aumenta la susceptibilidad a infecciones plasmodiales y los efectos de estas van más allá de la infección gestacional, pues diversos

autores informan que las consecuencias se extienden al neonato y a los primeros años de vida (278, 279). Al parecer, la exposición en útero a antígenos del parásito resulta en el estímulo de una respuesta inmune inadecuada para el normal desarrollo del lactante (279). Actualmente, hay diversos estudios que asocian las infecciones maláricas con baja eficiencia en la respuesta inmune a otros tipos de infecciones (65), con tolerancia a la malaria (280) e incluso, con deficiencia en la respuesta a la vacunación (281, 282). La mayoría de los hallazgos asociados a la influencia de la malaria en la vacunación, tanto materna como neonatal, se centran en África y en *P. falciparum*. Estos estudios indican disminución en los niveles de anticuerpos frente a vacunas como toxoide tetánico, toxoide diftérico, *Haemophilus influenzae* tipo B, meningococo y BCG, en niños con exposición a antígenos del parásito durante la gestación (mujeres con malaria gestacional y placentaria microscópica) (283-285). Algo similar se ha hallado en gestantes africanas con malaria frente al toxoide tetánico (286) y, al parecer, también sucede en gestantes colombianas con infección malárica submicroscópica frente a ese toxoide (287). Es necesario aclarar que los procesos de vacunación son influenciados por múltiples factores, como estado nutricional (desnutrición proteico-calórica, deficiencia de vitamina A), infección por parásitos intestinales, entre otros (288).

En todos los países endémicos de malaria, gran parte de las infecciones maternas y placentarias son submicroscópicas (3, 4, 7, 277). Pese a conocer la frecuencia y el impacto que estas infecciones generan en la salud pública, aún no se conoce la magnitud de sus consecuencias.

Las infecciones por *Plasmodium* spp promueven cambios en la respuesta inmune; sin embargo, cada componente del sistema inmune ha sido evaluado de manera individual. Este estudio estrictamente analítico o fragmentado resulta en una visión en un solo plano de la modulación. *Plasmodium* spp y sus productos (hemozoína, vesículas extracelulares, etc.) alteran la respuesta de CPA y conducen a un aumento de células reguladoras (219, 220). Estos sucesos generan un desequilibrio inmunológico que puede resultar en limitaciones en la respuesta inmune generada por células T ayudadores, vitales en los procesos de vacunación tanto en las gestantes como en los neonatos.

1.13 Consecuencias de la MAE en el desarrollo inmune del neonato

1.13.1 Tolerancia inmune frente a *Plasmodium* spp en niños hijos de madres con malaria placentaria

La exposición temprana en útero a antígenos plasmociales podría resultar en tolerancia inmune en los recién nacidos de mujeres con malaria placentaria. Hay estudios que señalan que estos niños presentan mayor riesgo de infección malárica y que esta vulnerabilidad podría persistir durante años (289). Los modelos murinos apoyan este planteamiento: en ratones recién nacidos se confirmó que la exposición a células T específicas contra la proteína del circunsporozoítica de *P. falciparum*, conduce a tolerancia inmune en las crías (290). Además, el paso de anticuerpos específicos contra antígenos de *P. falciparum* a las crías, conllevó a una deficiente producción de anticuerpos en respuesta a los antígenos para los cuales habían adquirido inmunidad pasiva por traspaso vertical (291). En humanos, la exposición a antígenos del parásito conduce a una sensibilización prenatal y genera niños con fenotipos tolerantes a infecciones por *Plasmodium* spp (292).

La alteración de la inmunidad de los niños es apoyada por un aumento en la frecuencia de células Treg en sangre del cordón umbilical de los recién nacidos en zonas endémicas de malaria (292). En Kenia se describió que un subconjunto de niños expuestos a malaria placentaria puede adquirir un fenotipo tolerante a los antígenos eritrocitarios del parásito. Esta tolerancia puede persistir en la infancia y está asociada con mayor susceptibilidad a la infección malárica y la anemia (281). En la generación de tolerancia inmune en los neonatos no solo ha sido asociada la proliferación de células Treg, sino también, el paso de células T y linfocitos B activos y de anticuerpos específicos contra *Plasmodium* spp vía cordón umbilical (278). Sin embargo, este fenómeno de tolerancia inmune en los neonatos aún es objeto de investigación, pues los resultados obtenidos aún son contradictorios.

En un estudio en Camerún no se encontraron diferencias durante los dos primeros años de vida en la frecuencia de la malaria entre los nacidos de madres con malaria placentaria y los

nacidos de madres sanas (293). Mientras que en otros estudios recientes, los resultados obtenidos sugieren que los niños nacidos de madres con malaria placentaria presentan un alto riesgo de adquirir mayor número de infecciones por *P. falciparum* en los dos primeros años de vida, en comparación con los nacidos de mujeres sin malaria placentaria (294). A pesar de las discrepancias, la hipótesis de que la MAE puede generar efectos prolongados sobre la inmunidad y susceptibilidad a la malaria en los hijos, parece ser acertada (295, 296).

1.13.2 Infecciones maláricas e inmunomodulación de la respuesta a antígenos vacunales

Plasmodium spp puede causar infecciones crónicas y asintomáticas y se sugiere que el mecanismo inmunológico que soporta el desarrollo de este tipo de infecciones es la modulación negativa del sistema inmune, la cual limita la generación de la respuesta inflamatoria responsable de los síntomas maláricos (235, 297, 298). Diferentes estudios asocian las infecciones parasitarias con el aumento de IL-10 y células reguladoras (11, 217, 299). Adicionalmente, las infecciones crónicas están asociadas con el agotamiento de células T, con funciones efectoras menos robustas y con alteraciones en la diferenciación de las células T de memoria (12). Las células T agotadas manifiestan características que incluyen un aumento en la expresión sostenida de múltiples receptores inhibitorios (300). Esta modulación limita la activación y proliferación de células efectoras como T CD4⁺, T CD8⁺ y NK, que son importantes en la vacunación y en la defensa contra otros patógenos. La limitación de la respuesta efectora de células T previene la amplificación de la respuesta inmune necesaria para el desarrollo adecuado de memoria inmunológica (301).

Adicionalmente, para antígenos de vacunas como BCG, la respuesta inmune celular, en particular, la producción de IFN- γ por las células T CD4⁺ es importante para la defensa inmune contra *M. tuberculosis* (302), y se ha observado que las infecciones parasitarias crónicas pueden limitar la amplificación de la respuesta de IFN- γ .

Diferentes estudios evalúan el efecto de las infecciones por *Plasmodium* spp en la respuesta inmune a las vacunas (**Tabla 1.5**). La mayoría de estos son estudios realizados en África e involucran infecciones agudas por *P. falciparum* en niños entre los 6 meses y los 6 años de

edad y en gestantes. Las vacunas evaluadas son: toxoide tetánico, toxoide diftérico, BCG, polisacáridos bacterianos de meningococo tipo C y *Haemophilus influenzae* tipo B y *Bordetella pertusis*. Los resultados obtenidos son discordantes en algunas vacunas; por ejemplo, solo dos de seis estudios que evaluaron el efecto de la malaria en la respuesta inmune contra el toxoide tetánico mostraron disminución en los niveles de IgG frente a la vacuna (284, 303) (**Tabla 1.5**). Sin embargo, es importante resaltar que cada estudio incluyó diferentes grupos y diferentes presentaciones clínicas de la malaria.

Por otro lado, en todos los estudios en los que se evaluó el efecto de la malaria en la respuesta inmune generada por vacunas de polisacáridos bacterianos se observó disminución en los niveles de anticuerpos (**Tabla 1.5**). En general, la naturaleza de los antígenos polisacáridos plantea un desafío para la generación de memoria inmunológica a largo plazo (304) y de acuerdo a lo revisado, es probable que la malaria interfiera con la respuesta inmune esperada frente a estas vacunas. Además, es importante resaltar que las bacterias encapsuladas son las principales causas de bacteriemia, neumonía y meningitis en la infancia en todo el mundo (305).

Tabla 1.5. Efecto de la infección por *Plasmodium* spp en la respuesta a vacunas

Referencia; lugar	Población (edad)	Clínica de malaria	Conclusión de los autores
Toxoide tetánico			
(303) Nigeria	Niños (6 meses-6 años)	Aguda; <i>P. falciparum</i>	Se demostró una forma de inmunosupresión.
(306) Papua Nueva Guinea	Niños (8-11 años)	Asintomática; <i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i> , <i>P. malariae</i>	No afectó respuesta inmune a toxoide tetánico.
(284) Kenia	Gestantes (>14 años)	Placentaria; <i>P. falciparum</i>	Niveles de IgG significativamente bajos en mujeres con malaria placentaria activa, crónica o pasada
(307) Gabón	Niños (7-12 años)	Aguda; <i>P. falciparum</i>	No afectó respuesta a refuerzo de toxoide tetánico.
(308) Kenia	Gestantes; niños (>14 años; 6-36 meses)	Exposición en útero a <i>P. falciparum</i>	Niveles de IgG a vacuna toxoide tetánico no fueron afectados.
Toxoide diftérico			
(308) Kenia	Gestantes; niños (>14 años; 6-36 meses)	Exposición en útero a <i>P. falciparum</i>	Disminuyeron niveles de IgG a toxoide diftérico.
BCG			
(309) Uganda	Niños (1-5 años)	Asintomática; <i>P. falciparum</i>	Disminución IFN- γ tras estímulo con <i>M. tuberculosis</i>
(283) Gambia	Niños (0-12 meses)	Placentaria; <i>P. falciparum</i>	Causó débil respuesta de IFN- γ a tuberculina en 12 meses de edad.
Polisacáridos bacterianos			
(310) Nigeria	Niños (6 meses-6 años)	Aguda; <i>P. falciparum</i>	Bajos títulos de anticuerpos contra <i>S. typhi</i> y polisacáridos de meningococo grupo C
(311) Nigeria	Todas las edades	Asintomática; <i>P. falciparum</i>	Respuesta de anticuerpos a meningococo grupo C fue baja en casos de alta parasitemia, en cada grupo de edad.
(282) Gambia	Niños (12-30 meses)	Aguda; <i>P. falciparum</i>	Bajos niveles de anticuerpos contra <i>H. influenzae</i> tipo B.
(308) Kenia	Gestantes; niños (>14 años; 6-36 meses)	Exposición en útero a <i>P. falciparum</i>	Niños sensibilizados con <i>P. falciparum</i> tienen significativamente menos niveles de IgG contra <i>H. influenzae</i> tipo B.
Otras vacunas			
(312) Senegal toxina Pertussis	Niños (1-2 meses)	Exposición en útero a <i>P. falciparum</i>	Respuesta de anticuerpos a toxina pertussis fue baja.
(308) Kenia Hepatitis B	Gestantes; niños (>14 años; 6-36 meses)	Exposición en útero a <i>P. falciparum</i>	Niveles IgG contra Hepatitis B no se afectaron

1.14 Referencias

1. Mor G, Cardenas I. The immune system in pregnancy: a unique complexity. *American journal of reproductive immunology* (New York, NY : 1989). 2010;63(6):425-33.
2. Brabin BJ. An analysis of malaria in pregnancy in Africa. *Bull World Health Organ.* 1983;61(6):1005-16.
3. Gavina K, Gnidehou S, Arango E, Hamel-Martineau C, Mitran C, Agudelo O, et al. Clinical Outcomes of Submicroscopic Infections and Correlates of Protection of VAR2CSA Antibodies in a Longitudinal Study of Pregnant Women in Colombia. *Infect Immun.* 2018;86(4). 1-14.
4. Arango EM, Samuel R, Agudelo OM, Carmona-Fonseca J, Maestre A, Yanow SK. Molecular detection of malaria at delivery reveals a high frequency of submicroscopic infections and associated placental damage in pregnant women from northwest Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2013;89(1):178-83.
5. Maizels RM. Infections and allergy - helminths, hygiene and host immune regulation. *Curr Opin Immunol.* 2005;17(6):656-61.
6. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(8):486-99.
7. Agudelo OM, Aristizabal BH, Yanow SK, Arango E, Carmona-Fonseca J, Maestre A. Submicroscopic infection of placenta by Plasmodium produces Th1/Th2 cytokine imbalance, inflammation and hypoxia in women from north-west Colombia. *Malar J.* 2014;13:122.
8. Ibitokou SA, Boström S, Brutus L, Tuikue Ndam N, Vianou B, Agbowai C, et al. Submicroscopic infections with Plasmodium falciparum during pregnancy and their association with circulating cytokine, chemokine, and cellular profiles. *Clin Vaccine Immunol.* 2014;21(6):859-66.
9. Flanagan KL, Halliday A, Burl S, Landgraf K, Jagne YJ, Noho-Konteh F, et al. The effect of placental malaria infection on cord blood and maternal immunoregulatory responses at birth. *Eur J Immunol.* 2010;40(4):1062-72.
10. Walther M, Tongren JE, Andrews L, Korbel D, King E, Fletcher H, et al. Upregulation of TGF-beta, FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. *Immunity.* 2005;23(3):287-96.
11. Belkaid Y. Role of Foxp3-positive regulatory T cells during infection. *Eur J Immunol.* 2008;38(4):918-21.
12. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol.* 2011;12(6):492-9.
13. Bustreo F, Kieny M-P. Las vacunas: un éxito para la salud mundial que nos mantiene alerta. WHO; 2016.
14. OPS. Informe de País del PAI, Colombia 2017. Organización Panamericana de la Salud; 2018.
15. Gaayeb L, Sarr JB, Cames C, Pinçon C, Hanon J-B, Ndiath MO, et al. Effects of malnutrition on children's immunity to bacterial antigens in Northern Senegal. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 2014;90(3):566-73.
16. Serrano Hernández A. Células colaboradoras (TH1, TH2, TH17) y reguladoras (Treg, TH3, NKT) en la artritis reumatoide. *Reumatología Clínica.* 2009;5:1-5.
17. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. Séptima edición. 2012.
18. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:591-619.
19. Duque Correa MA, Rojas López M. Activación alternativa del macrófago: La diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente. *Inmunología.* 2007;26(2):73-86.
20. Caridade M, Graca L, Ribeiro RM. Mechanisms Underlying CD4+ Treg Immune Regulation in the Adult: From Experiments to Models. *Front Immunol.* 2013;4:378.
21. Schmidt A, Oberle N, Krammer PH. Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Front Immunol.* 2012;3:51.
22. Robinson DP, Klein SL. Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis. *Horm Behav.* 2012;62(3):263-71.
23. Kourtis AP, Read JS, Jamieson DJ. Pregnancy and infection. *The New England journal of medicine.* 2014;370(23):2211-8.

24. Dosiou C, Hamilton AE, Pang Y, Overgaard MT, Tulac S, Dong J, et al. Expression of membrane progesterone receptors on human T lymphocytes and Jurkat cells and activation of G-proteins by progesterone. *Journal of Endocrinology*. 2007;196(1):67-77.
25. Li L-b, Leung DYM, Hall CF, Goleva E. Divergent expression and function of glucocorticoid receptor β in human monocytes and T cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 2006;79(4):818-27.
26. Tomasicchio M, Avenant C, Du Toit A, Ray RM, Hapgood JP. The progestin-only contraceptive medroxyprogesterone acetate, but not norethisterone acetate, enhances HIV-1 Vpr-mediated apoptosis in human CD4+ T cells through the glucocorticoid receptor. *PloS one*. 2013;8(5):e62895-e.
27. Areia A, Vale-Pereira S, Alves V, Rodrigues-Santos P, Moura P, Mota-Pinto A. Membrane progesterone receptors in human regulatory T cells: a reality in pregnancy. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2015;122(11):1544-50.
28. LaŠKarin G, TokmadŽIĆ VS, ŠTrbo N, Bogović T, Szekeres-Bartho J, Randić L, et al. Progesterone Induced Blocking Factor (PIBF) Mediates Progesterone Induced Suppression of Decidual Lymphocyte Cytotoxicity. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2002;48(4):201-9.
29. Szekeres-Bartho J, Wegmann TG. A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1/Th2 balance. *Journal of Reproductive Immunology*. 1996;31(1):81-95.
30. Shah NM, Imami N, Johnson MR. Progesterone Modulation of Pregnancy-Related Immune Responses. *Frontiers in immunology*. 2018;9:1-19.
31. Straub RH. The Complex Role of Estrogens in Inflammation. *Endocrine Reviews*. 2007;28(5):521-74.
32. Mor G, Cardenas I, Abrahams V, Guller S. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011;1221(1):80-7.
33. Pazos M, Sperling RS, Moran TM, Kraus TA. The influence of pregnancy on systemic immunity. *Immunol Res*. 2012;54(1-3):254-61.
34. Kraus TA, Engel SM, Sperling RS, Kellerman L, Lo Y, Wallenstein S, et al. Characterizing the Pregnancy Immune Phenotype: Results of the Viral Immunity and Pregnancy (VIP) Study. *Journal of Clinical Immunology*. 2012;32(2):300-11.
35. Zoller AL, Schnell FJ, Kersh GJ. Murine pregnancy leads to reduced proliferation of maternal thymocytes and decreased thymic emigration. *Immunology*. 2007;121(2):207-15.
36. Clarke AG, Kendall MD. The thymus in pregnancy: the interplay of neural, endocrine and immune influences. *Immunology Today*. 1994;15(11):545-52.
37. Forbes RL, Gibson PG, Murphy VE, Wark PAB. Impaired type I and III interferon response to rhinovirus infection during pregnancy and asthma. *Thorax*. 2012;67(3):209.
38. Somerset DA, Zheng Y, Kilby MD, Sansom DM, Drayson MT. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. *Immunology*. 2004;112(1):38-43.
39. Muzzio DO, Soldati R, Ehrhardt J, Utpatel K, Zygmunt M, Evert M, Zenclussen AC, et al. B Cell Development Undergoes Profound Modifications and Adaptations During Pregnancy in Mice1. *Biology of Reproduction*. 2014;91(5) 115, 1-11.
40. Norton MT, Fortner KA, Bizargity P, Bonney EA. Pregnancy alters the proliferation and apoptosis of mouse splenic erythroid lineage cells and leukocytes. *Biology of reproduction*. 2009;81(3):457-64.
41. Rolle L, Memarzadeh Tehran M, Morell-García A, Raeva Y, Schumacher A, Hartig R, et al. Cutting Edge: IL-10-Producing Regulatory B Cells in Early Human Pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2013;70(6):448-53.
42. Fragiadakis GK, Baca QJ, Gherardini PF, Ganio EA, Gaudilliere DK, Tingle M, et al. Mapping the Fetomaternal Peripheral Immune System at Term Pregnancy. *J Immunol*. 2016;197(11):4482-92.
43. Lewis DB, Gern JE, Hill HR, Friedlander SL, La Pine TR, Lemanske RF, et al. Newborn immunology: relevance to the clinician. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2006;36(5):189-204.
44. Blois SM, Kammerer U, Alba Soto C, Tometten MC, Shaikly V, Barrientos G, et al. Dendritic cells: key to fetal tolerance? *Biol Reprod*. 2007;77(4):590-8.
45. Chabtni L, Mfarrej B, Mounayar M, Zhu B, Batal I, Dakle PJ, et al. TIM-3 regulates innate immune cells to induce fetomaternal tolerance. *J Immunol*. 2013;190(1):88-96.
46. D'Addio F, Riella LV, Mfarrej BG, Chabtni L, Adams LT, Yeung M, et al. The link between the PDL1 costimulatory pathway and Th17 in fetomaternal tolerance. *J Immunol*. 2011;187(9):4530-41.

47. Gervassi A, Lejarcegui N, Dross S, Jacobson A, Itaya G, Kidzeru E, et al. Myeloid derived suppressor cells are present at high frequency in neonates and suppress in vitro T cell responses. *PLoS One*. 2014;9(9):e107816.
48. Takahata Y, Nomura A, Takada H, Ohga S, Furuno K, Hikino S, et al. CD25+CD4+ T cells in human cord blood: an immunoregulatory subset with naive phenotype and specific expression of forkhead box p3 (Foxp3) gene. *Exp Hematol*. 2004;32(7):622-9.
49. Khadilkar V, Tudehope D, Fraser S. A prospective study of nosocomial infection in a neonatal intensive care unit. *J Paediatr Child Health*. 1995;31(5):387-91.
50. Erdman SH, Christensen RD, Bradley PP, Rothstein G. Supply and release of storage neutrophils. A developmental study. *Biol Neonate*. 1982;41(3-4):132-7.
51. Weinberger B, Laskin DL, Mariano TM, Sunil VR, DeCoste CJ, Heck DE, et al. Mechanisms underlying reduced responsiveness of neonatal neutrophils to distinct chemoattractants. *J Leukoc Biol*. 2001;70(6):969-76.
52. Jones CA, Holloway JA, Warner JO. Phenotype of fetal monocytes and B lymphocytes during the third trimester of pregnancy. *J Reprod Immunol*. 2002;56(1-2):45-60.
53. De Wit D, Tonon S, Olislagers V, Goriely S, Boutriaux M, Goldman M, et al. Impaired responses to toll-like receptor 4 and toll-like receptor 3 ligands in human cord blood. *J Autoimmun*. 2003;21(3):277-81.
54. Langrish CL, Buddle JC, Thrasher AJ, Goldblatt D. Neonatal dendritic cells are intrinsically biased against Th-1 immune responses. *Clin Exp Immunol*. 2002;128(1):118-23.
55. Levy O, Wynn JL. A prime time for trained immunity: innate immune memory in newborns and infants. *Neonatology*. 2014;105(2):136-41.
56. Willems F, Vollstedt S, Suter M. Phenotype and function of neonatal DC. *Eur J Immunol*. 2009;39(1):26-35.
57. Webster RB, Rodriguez Y, Klimecki WT, Vercelli D. The human IL-13 locus in neonatal CD4+ T cells is refractory to the acquisition of a repressive chromatin architecture. *J Biol Chem*. 2007;282(1):700-9.
58. Zaghouni H, Hoeman CM, Adkins B. Neonatal immunity: faulty T-helpers and the shortcomings of dendritic cells. *Trends Immunol*. 2009;30(12):585-91.
59. McCarron MJ, Reen DJ. Neonatal CD8+ T-cell differentiation is dependent on interleukin-12. *Hum Immunol*. 2010;71(12):1172-9.
60. Mold JE, Michaëlsson J, Burt TD, Muench MO, Beckerman KP, Busch MP, et al. Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. *Science*. 2008;322(5907):1562-5.
61. Tian C, Kron GK, Dischert KM, Higginbotham JN, Crowe JE. Low expression of the interleukin (IL)-4 receptor alpha chain and reduced signalling via the IL-4 receptor complex in human neonatal B cells. *Immunology*. 2006;119(1):54-62.
62. Olin A, Henckel E, Chen Y, Lakshminanth T, Pou C, Mikes J, et al. Stereotypic Immune System Development in Newborn Children. *Cell*. 2018;174(5):1277-92.e14.
63. Basu S. Neonatal sepsis: the gut connection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34(2):215-22.
64. Macpherson AJ, de Agüero MG, Ganai-Vonarburg SC. How nutrition and the maternal microbiota shape the neonatal immune system. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(8):508-17.
65. Dauby N, Goetghebuer T, Kollmann TR, Levy J, Marchant A. Uninfected but not unaffected: chronic maternal infections during pregnancy, fetal immunity, and susceptibility to postnatal infections. *Lancet Infect Dis*. 2012;12(4):330-40.
66. Hesselting AC, Johnson LF, Jaspan H, Cotton MF, Whitelaw A, Schaaf HS, et al. Disseminated bacille Calmette-Guérin disease in HIV-infected South African infants. *Bull World Health Organ*. 2009;87(7):505-11.
67. Lisciandro JG, van den Biggelaar AH. Neonatal immune function and inflammatory illnesses in later life: lessons to be learnt from the developing world? *Clin Exp Allergy*. 2010;40(12):1719-31.
68. Cáceres VM, Strebel PM, Sutter RW. Factors determining prevalence of maternal antibody to measles virus throughout infancy: a review. *Clin Infect Dis*. 2000;31(1):110-119.
69. Morein B, Blomqvist G, Hu K. Immune responsiveness in the neonatal period. *J Comp Pathol*. 2007;137 Suppl 1:S27-31.

70. Siegrist CA. Mechanisms by which maternal antibodies influence infant vaccine responses: review of hypotheses and definition of main determinants. *Vaccine*. 2003;21(24):3406-12.
71. Dalle J-H, Menezes J, Wagner É, Blagdon M, Champagne J, Champagne MA, et al. Characterization of Cord Blood Natural Killer Cells: Implications for Transplantation and Neonatal Infections. *Pediatric Research*. 2005;57:649.
72. Guilmot A, Hermann E, Braud VM, Carlier Y, Truyens C. Natural Killer Cell Responses to Infections in Early Life. *Journal of Innate Immunity*. 2011;3(3):280-8.
73. Beer AE, Kwak JYH, Ruiz JE. Immunophenotypic Profiles of Peripheral Blood Lymphocytes in Women With Recurrent Pregnancy Losses and in Infertile Women With Multiple Failed In Vitro Fertilization Cycles. *American Journal of Reproductive Immunology*. 1996;35(4):376-82.
74. Gregory CD, Lee H, Rees GB, Scott IV, Shah LP, Golding PR. Natural killer cells in normal pregnancy: analysis using monoclonal antibodies and single-cell cytotoxicity assays. *Clinical and experimental immunology*. 1985;62(1):121-7.
75. Gregory CD, Lee H, Scott IV, Golding PR. Phenotypic heterogeneity and recycling capacity of natural killer cells in normal human pregnancy. *Journal of Reproductive Immunology*. 1987;11(2):135-45.
76. Rabe H, Lundell A-C, Andersson K, Adlerberth I, Wold AE, Rudin A. Higher proportions of circulating FOXP3+ and CTLA-4+ regulatory T cells are associated with lower fractions of memory CD4+ T cells in infants. *Journal of Leukocyte Biology*. 2011;90(6):1133-40.
77. Belnoue E, Pihlgren M, McGaha TL, Tougne C, Rochat A-F, Bossen C, et al. APRIL is critical for plasmablast survival in the bone marrow and poorly expressed by early-life bone marrow stromal cells. *Blood*. 2008;111(5):2755.
78. Pihlgren M, Schallert N, Tougne C, Bozzotti P, Kovarik J, Fulurija A, et al. Delayed and deficient establishment of the long-term bone marrow plasma cell pool during early life. *European Journal of Immunology*. 2001;31(3):939-46.
79. Lima J, Martins C, Leandro MJ, Nunes G, Sousa M-J, Branco JC, et al. Characterization of B cells in healthy pregnant women from late pregnancy to post-partum: a prospective observational study. *BMC pregnancy and childbirth*. 2016;16(1): 1-13.
80. Umetsu DT, Ambrosino DM, Quinti I, Siber GR, Geha RS. Recurrent Sinopulmonary Infection and Impaired Antibody Response to Bacterial Capsular Polysaccharide Antigen in Children with Selective IgG-Subclass Deficiency. *New England Journal of Medicine*. 1985;313(20):1247-51.
81. Aucouturier P, Mounir S, Preud'Homme J-L. Distribution of IgG subclass levels in normal adult sera as determined by competitive enzyme immunoassay using monoclonal antibodies 1985 (3):191-196.
82. Wilson R, Maclean MA, Jenkins C, Kinnane D, Mooney J, Walker JJ. Abnormal immunoglobulin subclass patterns in women with a history of recurrent miscarriage. *Fertility and Sterility*. 2001;76(5):915-7.
83. Salleras L, Domínguez A, Borrás E, Soldevila N. Eficacia protectora de las vacunas y efectividad de las vacunaciones: introducción a la medición de la protección directa e indirecta. *Vacunas*. 2011;12(4):136-46.
84. Salleras Sanmartí L, Domínguez García A, Navas Alcalá E. Eficacia protectora, efectividad y eficiencia de las vacunaciones. 2011 [cited 3 de diciembre de 2018]. In: Bases celulares de la respuesta inmunitaria a las vacunas [Internet]. Argentina, [cited 3 de diciembre de 2018]; [118-36]. Available from: http://www.colfarsfe.org.ar/newsfiles/abril2011/dap/Eficacia_protectora_efectividad_y_eficiencia_de_las_vacunaciones.pdf.
85. Cerutti A, Cols M, Puga I. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(2):118–132.
86. Martin F, Oliver A, Kearney J. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity*. 2001;14:617–629.
87. Coffman RL, Sher A, Seder RA. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity*. 2010;33(4):492-503.
88. Cooper NR, Nemerow GR. The role of antibody and complement in the control of viral infections. *J Invest Dermatol*. 1984;83(1 Suppl):121s-7s.
89. Igiertseme JU, Eko FO, He Q, Black CM. Antibody regulation of Tcell immunity: implications for vaccine strategies against intracellular pathogens. *Expert Rev Vaccines*. 2004;3(1):23-34.

90. Clem AS. Fundamentals of vaccine immunology. *J Glob Infect Dis.* 2011;3(1):73-8.
91. Björkholm B, Böttiger M, Christenson B, Hagberg L. Antitoxin antibody levels and the outcome of illness during an outbreak of diphtheria among alcoholics. *Scand J Infect Dis.* 1986;18(3):235-9.
92. Benhnia MR, McCausland MM, Su HP, Singh K, Hoffmann J, Davies DH, et al. Redundancy and plasticity of neutralizing antibody responses are cornerstone attributes of the human immune response to the smallpox vaccine. *J Virol.* 2008;82(7):3751-68.
93. Borrow R, Balmer P, Miller E. Meningococcal surrogates of protection--serum bactericidal antibody activity. *Vaccine.* 2005;23(17-18):2222-7.
94. Korenkov D, Isakova-Sivak I, Rudenko L. Basics of CD8 T-cell immune responses after influenza infection and vaccination with inactivated or live attenuated influenza vaccine. *Expert Rev Vaccines.* 2018. (11):977-987.
95. Kurubi J, Vince J, Ripa P, Tefuarani N, Riddell M, Duke T. Immune response to measles vaccine in 6 month old infants in Papua New Guinea. *Trop Med Int Health.* 2009;14(2):167-73.
96. Stetson DB, Voehringer D, Grogan JL, Xu M, Reinhardt RL, Scheu S, et al. Th2 cells: orchestrating barrier immunity. *Adv Immunol.* 2004;83:163-89.
97. Lin Y, Slight SR, Khader SA. Th17 cytokines and vaccine-induced immunity. *Semin Immunopathol.* 2010;32(1):79-90.
98. Calabro S, Tortoli M, Baudner BC, Pacitto A, Cortese M, O'Hagan DT, et al. Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. *Vaccine.* 2011;29(9):1812-23.
99. Lu F, HogenEsch H. Kinetics of the inflammatory response following intramuscular injection of aluminum adjuvant. *Vaccine.* 2013;31(37):3979-86.
100. Didierlaurent AM, Collignon C, Bourguignon P, Wouters S, Fierens K, Fochesato M, et al. Enhancement of Adaptive Immunity by the Human Vaccine Adjuvant AS01 Depends on Activated Dendritic Cells. *The Journal of Immunology.* 2014;193(4):1920.
101. Mosca F, Tritto E, Muzzi A, Monaci E, Bagnoli F, Iavarone C, et al. Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2008;105(30):10501-6.
102. Morel S, Didierlaurent A, Bourguignon P, Delhay S, Baras B, Jacob V, et al. Adjuvant System AS03 containing α -tocopherol modulates innate immune response and leads to improved adaptive immunity. *Vaccine.* 2011;29(13):2461-73.
103. Didierlaurent AM, Morel S, Lockman L, Giannini SL, Bisteau M, Carlsen H, et al. AS04, an Aluminum Salt- and TLR4 Agonist-Based Adjuvant System, Induces a Transient Localized Innate Immune Response Leading to Enhanced Adaptive Immunity. *The Journal of Immunology.* 2009;183(10):6186.
104. Cooper PJ, Espinel I, Wieseman M, Paredes W, Espinel M, Guderian RH, et al. Human onchocerciasis and tetanus vaccination: impact on the postvaccination antitetanus antibody response. *Infect Immun.* 1999;67(11):5951-7.
105. Elghazali GEB, Paulie S, Andersson G, Hansson Y, Holmquist G, Sun J-B, et al. Number of interleukin-4- and interferon- γ -secreting human T cells reactive with tetanus toxoid and the mycobacterial antigen PPD or phytohemagglutinin: distinct response profiles depending on the type of antigen used for activation. *European Journal of Immunology.* 1993;23(11):2740-5.
106. Rowe J, Macaubas C, Monger TM, Holt BJ, Harvey J, Poolman JT, et al. Antigen-specific responses to diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine in human infants are initially Th2 polarized. *Infection and immunity.* 2000;68(7):3873-7.
107. Piersma SJ, Leenaars MP, Guzylack-Piriou L, Summerfield A, Hendriksen CF, McCullough KC. An in vitro immune response model to determine tetanus toxoid antigen (vaccine) specific immunogenicity: Selection of sensitive assay criteria. *Vaccine.* 2006;24(16):3076-83.
108. Simonsen O, Bentzon‡ MW, Heron I. ELISA for the routine determination of antitoxic immunity to tetanus. *Journal of Biological Standardization.* 1986;14(3):231-9.
109. Simonsen O, Schou C, Heron I. Modification of the ELISA for the estimation of tetanus antitoxin in human sera. *Journal of Biological Standardization.* 1987;15(2):143-57.

110. Mendy M, Peterson I, Hossin S, Peto T, Jobarteh ML, Jeng-Barry A, et al. Observational study of vaccine efficacy 24 years after the start of hepatitis B vaccination in two Gambian villages: no need for a booster dose. *PloS one*. 2013;8(3):e58029-e.
111. Zhu C-L, Liu P, Chen T, Ni Z, Lu L-L, Huang F, et al. Presence of immune memory and immunity to hepatitis B virus in adults after neonatal hepatitis B vaccination. *Vaccine*. 2011;29(44):7835-41.
112. Hollinger BF. Factors influencing the immune response to hepatitis B vaccine, booster dose guidelines, and vaccine protocol recommendations. *The American Journal of Medicine*. 1989;87(3):S36-S40.
113. Leroux-Roels G, Van Hecke E, Michielsen W, Voet P, Hauser P, Pêtre J. Correlation between in vivo humoral and in vitro cellular immune responses following immunization with hepatitis B surface antigen (HBsAg) vaccines. *Vaccine*. 1994;12(9):812-8.
114. Larsen CE, Xu J, Lee S, Dubey DP, Uko G, Yunis EJ, et al. Complex cytokine responses to hepatitis B surface antigen and tetanus toxoid in responders, nonresponders and subjects naive to hepatitis B surface antigen. *Vaccine*. 2000;18(26):3021-30.
115. Chedid MG, Deulofeut H, Yunis DE, Lara-Marquez ML, Salazar M, Deulofeut R, et al. Defect in Th1-Like Cells of Nonresponders to Hepatitis B Vaccine. *Human Immunology*. 1997;58(1):42-51.
116. Jafarzadeh A, Shokri F. The antibody response to HBs antigen is regulated by coordinated Th1 and Th2 cytokine production in healthy neonates. *Clinical and experimental immunology*. 2003;131(3):451-6.
117. Velu V, Saravanan S, Nandakumar S, Shankar E-M, Vengatesan A, Jadhav S-S, et al. Relationship between T-lymphocyte cytokine levels and sero-response to hepatitis B vaccines. *World journal of gastroenterology*. 2008;14(22):3534-40.
118. Jarrosson L, Kolopp-Sarda MN, Aguilar P, Béné MC, Lepori ML, Vignaud MC, et al. Most humoral non-responders to hepatitis B vaccines develop HBV-specific cellular immune responses. *Vaccine*. 2004;22(27):3789-96.
119. Kardar GA, Jeddi-Tehrani M, Shokri F. Diminished Th1 and Th2 Cytokine Production in Healthy Adult Nonresponders to Recombinant Hepatitis B Vaccine. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2002;55(3):311-4.
120. Gelinas L, Abu-Raya B, Ruck C, Cai B, Kollmann TR. Hepatitis B Virus Vaccine-Induced Cell-Mediated Immunity Correlates with Humoral Immune Response following Primary Vaccination during Infancy. *ImmunoHorizons*. 2017;1(4):42-52.
121. Young HA, Hardy KJ. Role of interferon-gamma in immune cell regulation. *J Leukoc Biol*. 1995;58(4):373-81.
122. Böcher WO, Herzog-Hauff S, Schlaak J, Meyer zum Büschenfelde K-H, Löhr HF. Kinetics of hepatitis B surface antigen-specific immune responses in acute and chronic hepatitis B or After HBs vaccination: Stimulation of the in vitro antibody response by interferon gamma. *Hepatology*. 1999;29(1):238-44.
123. Phillips S, Chokshi S, Riva A, Evans A, Williams R, Naoumov NV. CD8⁺ T Cell Control of Hepatitis B Virus Replication: Direct Comparison between Cytolytic and Noncytolytic Functions. *The Journal of Immunology*. 2010;184(1):287.
124. Rousset F, Garcia E, Defrance T, Péronne C, Vezzio N, Hsu DH, et al. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992;89(5):1890.
125. Rhoades E, Hsu FF, Torrelles JB, Turk J, Chatterjee D, Russell DG. Identification and macrophage-activating activity of glycolipids released from intracellular *Mycobacterium bovis* BCG. *Molecular Microbiology*. 2003;48(4):875-88.
126. Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HV, et al. Efficacy of BCG Vaccine in the Prevention of Tuberculosis: Meta-analysis of the Published Literature. *JAMA*. 1994;271(9):698-702.
127. Kaufmann SHE, Hussey G, Lambert P-H. New vaccines for tuberculosis. *The Lancet*. 2010;375(9731):2110-9.
128. Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *Journal of bacteriology*. 1996;178(5):1274-82.
129. Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, et al. Comparative Genomics of BCG Vaccines by Whole-Genome DNA Microarray. *Science*. 1999;284(5419):1520.

130. Fine PEM. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *The Lancet*. 1995;346(8986):1339-45.
131. Moliva JI, Turner J, Torrelles JB. Prospects in *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette et Guérin (BCG) vaccine diversity and delivery: why does BCG fail to protect against tuberculosis? *Vaccine*. 2015;33(39):5035-41.
132. Klechevsky E. Human dendritic cells — stars in the skin. *European Journal of Immunology*. 2013;43(12):3147-55.
133. Haniffa M, Gunawan M, Jardine L. Human skin dendritic cells in health and disease. *Journal of dermatological science*. 2015;77(2):85-92.
134. Kawai T, Akira S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity*. 2011;34(5):637-50.
135. Sendide K, Reiner NE, Lee JSI, Bourgoin S, Talal A, Hmama Z. Cross-Talk between CD14 and Complement Receptor 3 Promotes Phagocytosis of *Mycobacteria*: Regulation by Phosphatidylinositol 3-Kinase and Cytohesin-1. *The Journal of Immunology*. 2005;174(7):4210.
136. Heldwein KA, Liang MD, Andresen TK, Thomas KE, Marty AM, Cuesta N, et al. TLR2 and TLR4 serve distinct roles in the host immune response against *Mycobacterium bovis* BCG. *Journal of Leukocyte Biology*. 2003;74(2):277-86.
137. de Koning HD, Simon A, Zeeuwen PLJM, Schalkwijk J. Pattern recognition receptors in infectious skin diseases. *Microbes and Infection*. 2012;14(11):881-93.
138. Bugarcic A, Blanchard H, Beckhouse AG, Wells CA, Hitchens K, Ashman RB. Human and mouse macrophage-inducible C-type lectin (Mincle) bind *Candida albicans*. *Glycobiology*. 2008;18(9):679-85.
139. Linehan SA. The mannose receptor is expressed by subsets of APC in non-lymphoid organs. *BMC immunology*. 2005;6(4). 1-11.
140. Kim KD, Lee HG, Kim JK, Park SN, Choe IS, Choe YK, et al. Enhanced antigen-presenting activity and tumour necrosis factor-alpha-independent activation of dendritic cells following treatment with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *Immunology*. 1999;97(4):626-33.
141. Shaik J, Pillay M, Jeena P. The role of interferon gamma release assays in the monitoring of response to anti-tuberculosis treatment in children. *Paediatric Respiratory Reviews*. 2014;15(3):264-7.
142. Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *The Journal of experimental medicine*. 1993;178(6):2249-54.
143. Cooper AM. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annual review of immunology*. 2009;27:393-422.
144. Tangye SG, Avery DT, Deenick EK, Hodgkin PD. Intrinsic Differences in the Proliferation of Naive and Memory Human B Cells as a Mechanism for Enhanced Secondary Immune Responses. *The Journal of Immunology*. 2003;170(2):686.
145. Tangye SG, Tarlinton DM. Memory B cells: Effectors of long-lived immune responses. *European Journal of Immunology*. 2009;39(8):2065-75.
146. Martino A, Sacchi A, Sanarico N, Spadaro F, Ramoni C, Ciaramella A, et al. Dendritic cells derived from BCG-infected precursors induce Th2-like immune response. *Journal of Leukocyte Biology*. 2004;76(4):827-34.
147. Demangel C, Bertolino P, Britton WJ. Autocrine IL-10 impairs dendritic cell (DC)-derived immune responses to mycobacterial infection by suppressing DC trafficking to draining lymph nodes and local IL-12 production. *European Journal of Immunology*. 2002;32(4):994-1002.
148. Demangel C, Palendira U, Feng CG, Heath AW, Bean AG, Britton WJ. Stimulation of dendritic cells via CD40 enhances immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infection and immunity*. 2001;69(4):2456-61.
149. Madhi SA, Cunliffe NA, Steele D, Witte D, Kirsten M, Louw C, et al. Effect of Human Rotavirus Vaccine on Severe Diarrhea in African Infants. *New England Journal of Medicine*. 2010;362(4):289-98.
150. Velázquez FR, Matson DO, Calva JJ, Guerrero ML, Morrow AL, Carter-Campbell S, et al. Rotavirus Infection in Infants as Protection against Subsequent Infections. *New England Journal of Medicine*. 1996;335(14):1022-8.
151. Dennehy PH. Rotavirus Vaccines: an Overview. *Clinical Microbiology Reviews*. 2008;21(1):198.

152. Ruiz-Palacios GM, Pérez-Schael I, Velázquez FR, Abate H, Breuer T, Clemens SC, et al. Safety and Efficacy of an Attenuated Vaccine against Severe Rotavirus Gastroenteritis. *New England Journal of Medicine*. 2006;354(1):11-22.
153. Angel J, Franco MA, Greenberg HB. Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. *Nature Reviews Microbiology*. 2007;5:529.
154. Ward RL, Clark HF, Offit PA. Influence of Potential Protective Mechanisms on the Development of Live Rotavirus Vaccines. *The Journal of Infectious Diseases*. 2010;202(Supplement_1):S72-S9.
155. Angel J, Franco MA, Greenberg HB. Rotavirus immune responses and correlates of protection. *Current opinion in virology*. 2012;2(4):419-25.
156. Velazquez FR, Calva JJ, Guerrero ML, Ruiz-Palacios GM, Morrow AL, Matson DO, et al. Serum Antibody as a Marker of Protection against Natural Rotavirus Infection and Disease. *The Journal of Infectious Diseases*. 2000;182(6):1602-9.
157. Franco MA, Angel J, Greenberg HB. Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. *Vaccine*. 2006;24(15):2718-31.
158. Johansen K, Svensson L. Neutralization of rotavirus and recognition of immunologically important epitopes on VP4 and VP7 by human IgA. *Archives of Virology*. 1997;142(7):1491-8.
159. Ward RL, Clemens JD, Knowlton DR, Rao MR, van Loon FPL, Huda N, et al. Evidence that Protection against Rotavirus Diarrhea after Natural Infection Is Not Dependent on Serotype-Specific Neutralizing Antibody. *The Journal of Infectious Diseases*. 1992;166(6):1251-7.
160. Papadatou I, Tzovara I, Licciardi PV. The Role of Serotype-Specific Immunological Memory in Pneumococcal Vaccination: Current Knowledge and Future Prospects. *Vaccines*. 2019;7(1):13.
161. Stein KE. Thymus-Independent and Thymus-Dependent Responses to Polysaccharide Antigens. *The Journal of Infectious Diseases*. 1992;165(Supplement_1):S49-S52.
162. Deloria Knoll M, Park DE, Johnson TS, Chandir S, Nonyane BAS, Conklin L, et al. Systematic review of the effect of pneumococcal conjugate vaccine dosing schedules on immunogenicity. *The Pediatric infectious disease journal*. 2014;33 Suppl 2(Suppl 2 Optimum Dosing of Pneumococcal Conjugate Vaccine For Infants 0 A Landscape Analysis of Evidence Supportin g Different Schedules):S119-S29.
163. Vesikari T, Wysocki J, Chevallier B, Karvonen A, Czajka H, Arsène J-P, et al. Immunogenicity of the 10-Valent Pneumococcal Non-typeable Haemophilus influenzae Protein D Conjugate Vaccine (PHiD-CV) Compared to the Licensed 7vCRM Vaccine. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2009;28(4):66-76.
164. Andrews NJ, Waight PA, Burbidge P, Pearce E, Roalfe L, Zancolli M, et al. Serotype-specific effectiveness and correlates of protection for the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine: a postlicensure indirect cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2014;14(9):839-46.
165. WHO. Meeting of the Strategic Advisory Group of Experts on Immunization, November 2012 – conclusions and recommendations. *Wkly Epidemiol Rec*. 2013;88(1):1-16.
166. Jódar L, Butler J, Carlone G, Dagan R, Goldblatt D, Käyhty H, et al. Serological criteria for evaluation and licensure of new pneumococcal conjugate vaccine formulations for use in infants. *Vaccine*. 2003;21(23):3265-72.
167. Siber GR, Chang I, Baker S, Fernsten P, O'Brien KL, Santosham M, et al. Estimating the protective concentration of anti-pneumococcal capsular polysaccharide antibodies. *Vaccine*. 2007;25(19):3816-26.
168. Whitney CG, Zhou F, Singleton J, Schuchat A, Centers for Disease Control and P. Benefits from immunization during the vaccines for children program era - United States, 1994-2013. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2014;63(16):352-5.
169. Whitney CG, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Bennett NM, Lynfield R, et al. Decline in Invasive Pneumococcal Disease after the Introduction of Protein–Polysaccharide Conjugate Vaccine. *New England Journal of Medicine*. 2003;348(18):1737-46.
170. Miller E, Andrews NJ, Waight PA, Slack MPE, George RC. Herd immunity and serotype replacement 4 years after seven-valent pneumococcal conjugate vaccination in England and Wales: an observational cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2011;11(10):760-8.
171. Zangari T, Wang Y, Weiser JN. Streptococcus pneumoniae Transmission Is Blocked by Type-Specific Immunity in an Infant Mouse Model. *mBio*. 2017;8(2):e00188-17.

172. Wood N, Siegrist CA. Neonatal immunization: where do we stand? *Curr Opin Infect Dis.* 2011;24(3):190-5.
173. Morris MC, Surendran N. Neonatal Vaccination: Challenges and Intervention Strategies. *Neonatology.* 2016;109(3):161-9.
174. Adkins B, Leclerc C, Marshall-Clarke S. Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(7):553-64.
175. Klein NP, Massolo ML, Greene J, Dekker CL, Black S, Escobar GJ, et al. Risk factors for developing apnea after immunization in the neonatal intensive care unit. *Pediatrics.* 2008;121(3):463-9.
176. Polewicz M, Gracia A, Garlapati S, van Kessel J, Strom S, Halperin SA, et al. Novel vaccine formulations against pertussis offer earlier onset of immunity and provide protection in the presence of maternal antibodies. *Vaccine.* 2013;31(31):3148-55.
177. Siegrist CA, Aspinall R. B-cell responses to vaccination at the extremes of age. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(3):185-94.
178. Siegrist CA. The challenges of vaccine responses in early life: selected examples. *J Comp Pathol.* 2007;137 Suppl 1:S4-9.
179. Gervassi AL, Horton H. Is Infant Immunity Actively Suppressed or Immature? *Virology (Auckl).* 2014;2014(5):1-9.
180. Glezen WP. Effect of maternal antibodies on the infant immune response. *Vaccine.* 2003;21(24):3389-92.
181. Jamieson DJ, Theiler RN, Rasmussen SA. Emerging infections and pregnancy. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(11):1638-43.
182. Sappenfield E, Jamieson DJ, Kourtis AP. Pregnancy and susceptibility to infectious diseases. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2013;2013:752852.
183. Plachter B. Prospects of a vaccine for the prevention of congenital cytomegalovirus disease. *Med Microbiol Immunol.* 2016;205(6):537-47.
184. Cabinian A, Sinsimer D, Tang M, Zumba O, Mehta H, Toma A, et al. Transfer of Maternal Immune Cells by Breastfeeding: Maternal Cytotoxic T Lymphocytes Present in Breast Milk Localize in the Peyer's Patches of the Nursed Infant. *PLoS One.* 2016;11(6):e0156762.
185. CDC. Updated recommendations for use of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid, and acellular pertussis vaccine (Tdap) in pregnant women--Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2013;62(7):131-5.
186. WHO. Safety of Immunization during Pregnancy. 2014 13 Noviembre 2018. WHO Press. Available from: http://www.who.int/vaccine_safety/publications/safety_pregnancy_nov2014.pdf.
187. Munoz FM. Current Challenges and Achievements in Maternal Immunization Research. *Front Immunol.* 2018;9:436.
188. Saji F, Samejima Y, Kamiura S, Koyama M. Dynamics of immunoglobulins at the fetomaternal interface. *Rev Reprod.* 1999;4(2):81-9.
189. Costa-Carvalho BT, Vieria HM, Dimantas RB, Arslanian C, Naspitz CK, Solé D, et al. Transfer of IgG subclasses across placenta in term and preterm newborns. *Braz J Med Biol Res.* 1996;29(2):201-4.
190. Vaughn DE, Bjorkman PJ. Structural basis of pH-dependent antibody binding by the neonatal Fc receptor. *Structure.* 1998;6(1):63-73.
191. Nagao AT, Friedlander-Del Nero D, Arslanian C, Carneiro-Sampaio MM. Elevated levels and different repertoire profile of colostrum anti-LPS antibodies may have a significant role in compensating newborn immunity. *Scand J Immunol.* 2001;53(6):602-9.
192. Kiliç A, Altinkaynak S, Ertekin V, Inandi T. The duration of maternal measles antibodies in children. *J Trop Pediatr.* 2003;49(5):302-5.
193. Watanaveeradej V, Endy TP, Samakoses R, Kerdpanich A, Simasathien S, Polprasert N, et al. Transplacentally transferred maternal-infant antibodies to dengue virus. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;69(2):123-8.
194. Leuridan E, Hens N, Hutse V, Aerts M, Van Damme P. Kinetics of maternal antibodies against rubella and varicella in infants. *Vaccine.* 2011;29(11):2222-6.

195. Sarmiento C, Muñoz S, Rodríguez S, Ghisays G, Pastor D, Castillo O. Norma técnica para la vacunación según el Plan Ampliado de Inmunizaciones-PAI. In: Dirección general de promoción y prevención .Editor. Colombia: Ministerio de Salud.
196. Mota MM, Rodriguez A. Invasion of mammalian host cells by Plasmodium sporozoites. *Bioessays*. 2002;24(2):149-56.
197. Kaushansky A, Kappe SH. Selection and refinement: the malaria parasite's infection and exploitation of host hepatocytes. *Curr Opin Microbiol*. 2015;26:71-8.
198. Nussler AK, Rénia L, Pasquetto V, Miltgen F, Matile H, Mazier D. In vivo induction of the nitric oxide pathway in hepatocytes after injection with irradiated malaria sporozoites, malaria blood parasites or adjuvants. *Eur J Immunol*. 1993;23(4):882-7.
199. Seguin MC, Klotz FW, Schneider I, Weir JP, Goodbary M, Slayter M, et al. Induction of nitric oxide synthase protects against malaria in mice exposed to irradiated Plasmodium berghei infected mosquitoes: involvement of interferon gamma and CD8+ T cells. *J Exp Med*. 1994;180(1):353-8.
200. Wipasa J, Suphavitai C, Okell LC, Cook J, Corran PH, Thaikla K, et al. Long-lived antibody and B Cell memory responses to the human malaria parasites, Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax. *PLoS Pathog*. 2010;6(2):e1000770.
201. Yoshida N, Nussenzweig RS, Potocnjak P, Nussenzweig V, Aikawa M. Hybridoma produces protective antibodies directed against the sporozoite stage of malaria parasite. *Science*. 1980;207(4426):71-3.
202. Potocnjak P, Yoshida N, Nussenzweig RS, Nussenzweig V. Monovalent fragments (Fab) of monoclonal antibodies to a sporozoite surface antigen (Pb44) protect mice against malarial infection. *J Exp Med*. 1980;151(6):1504-13.
203. Plebanski M, Hannan CM, Behboudi S, Flanagan KL, Apostolopoulos V, Sinden RE, et al. Direct processing and presentation of antigen from malaria sporozoites by professional antigen-presenting cells in the induction of CD8 T-cell responses. *Immunol Cell Biol*. 2005;83(3):307-12.
204. Wilson NS, Villadangos JA. Regulation of antigen presentation and cross-presentation in the dendritic cell network: facts, hypothesis, and immunological implications. *Adv Immunol*. 2005;86:241-305.
205. Krishnegowda G, Hajjar AM, Zhu J, Douglass EJ, Uematsu S, Akira S, et al. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium falciparum: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *J Biol Chem*. 2005;280(9):8606-16.
206. Kalantari P, DeOliveira RB, Chan J, Corbett Y, Rathinam V, Stutz A, et al. Dual engagement of the NLRP3 and AIM2 inflammasomes by plasmodium-derived hemozoin and DNA during malaria. *Cell Rep*. 2014;6(1):196-210.
207. Yarovinsky F, Zhang D, Andersen JF, Bannenberg GL, Serhan CN, Hayden MS, et al. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science*. 2005;308(5728):1626-9.
208. Baratin M, Roetynck S, Lépolard C, Falk C, Sawadogo S, Uematsu S, et al. Natural killer cell and macrophage cooperation in MyD88-dependent innate responses to Plasmodium falciparum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(41):14747-52.
209. Kinyanjui SM. Malaria Parasites: InTech; 2012. Available from: <http://www.intechopen.com/books/malaria-parasites/immunity-tomalaria->.
210. Legorreta-Herrera M, Rivas-Contreras S, Ventura-Gallegos J, Zentella-Dehesa A. Nitric oxide is involved in the upregulation of IFN- γ and IL-10 mRNA expression by CD8⁺ T cells during the blood stages of P. chabaudi AS infection in CBA/Ca mice. *Int J Biol Sci*. 2011;7(9):1401-11.
211. Namazi MJ, Phillips RS. Immune responses of NIH mice infected with avirulent and virulent strains of Plasmodium chabaudi adami single and mixed infections. *Korean J Parasitol*. 2010;48(1):23-33.
212. Tongren JE, Drakeley CJ, McDonald SL, Reyburn HG, Manjurano A, Nkya WM, et al. Target antigen, age, and duration of antigen exposure independently regulate immunoglobulin G subclass switching in malaria. *Infect Immun*. 2006;74(1):257-64.
213. Stanisc DI, Richards JS, McCallum FJ, Michon P, King CL, Schoepflin S, et al. Immunoglobulin G subclass-specific responses against Plasmodium falciparum merozoite antigens are associated with control of parasitemia and protection from symptomatic illness. *Infect Immun*. 2009;77(3):1165-74.

214. Maestre A. Respuesta inmune a agentes infecciosos. La inmunidad en malaria. Rugeles MT, Patiño PJ, Montoya CJ. *Inmunología ciencia activa*. Segunda edición. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia;2009.573-585.
215. Gomes PS, Bhardwaj J, Rivera-Correa J, Freire-De-Lima CG, Morrot A. Immune Escape Strategies of Malaria Parasites. *Frontiers in microbiology*. 2016;7:1617. 1-7.
216. Dinko B, King E, Targett GAT, Sutherland CJ. Antibody responses to surface antigens of *Plasmodium falciparum* gametocyte-infected erythrocytes and their relation to gametocytaemia. *Parasite immunology*. 2016;38(6):352-64.
217. Belachew EB. Immune Response and Evasion Mechanisms of *Plasmodium falciparum* Parasites. *Journal of Immunology Research*. 2018;2018:6.
218. Stanicic DI, Barry AE, Good MF. Escaping the immune system: How the malaria parasite makes vaccine development a challenge. *Trends in Parasitology*. 2013;29(12):612-22.
219. Couper KN, Blount DG, Wilson MS, Hafalla JC, Belkaid Y, Kamanaka M, et al. IL-10 from CD4CD25Foxp3CD127 adaptive regulatory T cells modulates parasite clearance and pathology during malaria infection. *PLoS Pathog*. 2008;4(2):e1000004.
220. Minigo G, Woodberry T, Piera KA, Salwati E, Tjitra E, Kenangalem E, et al. Parasite-dependent expansion of TNF receptor II-positive regulatory T cells with enhanced suppressive activity in adults with severe malaria. *PLoS Pathog*. 2009;5(4):e1000402.
221. Chua CL, Brown G, Hamilton JA, Rogerson S, Boeuf P. Monocytes and macrophages in malaria: protection or pathology? *Trends Parasitol*. 2013;29(1):26-34.
222. Flick K, Chen Q. var genes, PfEMP1 and the human host. *Mol Biochem Parasitol*. 2004;134(1):3-9.
223. Gowda NM, Wu X, Kumar S, Febbraio M, Gowda DC. CD36 contributes to malaria parasite-induced pro-inflammatory cytokine production and NK and T cell activation by dendritic cells. *PLoS One*. 2013;8(10):e77604.
224. Smith JD, Rowe JA, Higgins MK, Lavstsen T. Malaria's deadly grip: cytoadhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell Microbiol*. 2013;15(12):1976-83.
225. Deshmukh AS, Srivastava S, Dhar SK. *Plasmodium falciparum*: epigenetic control of var generegulation and disease. *Subcell Biochem*. 2013;61:659-82.
226. Schwarzer E, Arese P. Phagocytosis of malarial pigment hemozoin inhibits NADPH-oxidase activity in human monocyte-derived macrophages. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1316(3):169-75.
227. Berkley J, Mwarumba S, Bramham K, Lowe B, Marsh K. Bacteraemia complicating severe malaria in children. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1999;93(3):283-6.
228. Church J, Maitland K. Invasive bacterial co-infection in African children with *Plasmodium falciparum* malaria: a systematic review. *BMC Med*. 2014;12:31.
229. Good MF. Malaria. Tying the conductor's arms. *Nature*. 1999;400(6739):25-6.
230. Wykes MN, Horne-Debets J. Dendritic cells: the Trojan horse of malaria? *Int J Parasitol*. 2012;42(6):583-7.
231. Wykes MN, Kay JG, Manderson A, Liu XQ, Brown DL, Richard DJ, et al. Rodent blood-stage *Plasmodium* survive in dendritic cells that infect naive mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(27):11205-10.
232. Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(3):253-7.
233. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*. 1998;188(2):287-96.
234. Arama C, Troye-Blomberg M. The path of malaria vaccine development: challenges and perspectives. *J Intern Med*. 2014;275(5):456-66.
235. Li C, Corraliza I, Langhorne J. A defect in interleukin-10 leads to enhanced malarial disease in *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection in mice. *Infect Immun*. 1999;67(9):4435-42.
236. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4⁺T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:925135.
237. Walther M, Jeffries D, Finney OC, Njie M, Ebonyi A, Deininger S, et al. Distinct roles for FOXP3 and FOXP3 CD4 T cells in regulating cellular immunity to uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS Pathog*. 2009;5(4):e1000364.

238. Scholzen A, Minigo G, Plebanski M. Heroes or villains? T regulatory cells in malaria infection. *Trends Parasitol.* 2010;26(1):16-25.
239. Wammes LJ, Wiria AE, Toenhake CG, Hamid F, Liu KY, Suryani H, et al. Asymptomatic plasmodial infection is associated with increased tumor necrosis factor receptor II-expressing regulatory T cells and suppressed type 2 immune responses. *J Infect Dis.* 2013;207(10):1590-9.
240. Hisaeda H, Tetsutani K, Imai T, Moriya C, Tu L, Hamano S, et al. Malaria parasites require TLR9 signaling for immune evasion by activating regulatory T cells. *J Immunol.* 2008;180(4):2496-503.
241. Hartman TK, Rogerson SJ, Fischer PR. The impact of maternal malaria on newborns. *Ann Trop Paediatr.* 2010;30(4):271-82.
242. Takem EN, D'Alessandro U. Malaria in pregnancy. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2013;5(1):e2013010.
243. Lindsay S, Ansell J, Selman C, Cox V, Hamilton K, Walraven G. Effect of pregnancy on exposure to malaria mosquitoes. *Lancet.* 2000;355(9219):1972.
244. Ansell J, Hamilton KA, Pinder M, Walraven GE, Lindsay SW. Short-range attractiveness of pregnant women to *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002;96(2):113-6.
245. Robinson A, Busula AO, Voets MA, Beshir KB, Caulfield JC, Powers SJ, et al. -associated changes in human odor attract mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(18):E4209-E18.
246. Bonney EA. Immune Regulation in Pregnancy: A Matter of Perspective? *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2016;43(4):679-98.
247. Gleicher N, Kushnir VA, Barad DH. Redirecting reproductive immunology research toward pregnancy as a period of temporary immune tolerance. *J Assist Reprod Genet.* 2017;34(4):425-30.
248. Saito S, Sakai M, Sasaki Y, Tanebe K, Tsuda H, Michimata T. Quantitative analysis of peripheral blood Th0, Th1, Th2 and the Th1:Th2 cell ratio during normal human pregnancy and preeclampsia. *Clin Exp Immunol.* 1999;117(3):550-5.
249. Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 2002;419(6906):498-511.
250. Baruch DI, Ma XC, Singh HB, Bi X, Pasloske BL, Howard RJ. Identification of a region of PfEMP1 that mediates adherence of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes to CD36: conserved function with variant sequence. *Blood.* 1997;90(9):3766-75.
251. Smith JD, Craig AG, Kriek N, Hudson-Taylor D, Kyes S, Fagan T, et al. Identification of a *Plasmodium falciparum* intercellular adhesion molecule-1 binding domain: a parasite adhesion trait implicated in cerebral malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(4):1766-71.
252. Buffet PA, Gamain B, Scheidig C, Baruch D, Smith JD, Hernandez-Rivas R, et al. *Plasmodium falciparum* domain mediating adhesion to chondroitin sulfate A: a receptor for human placental infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(22):12743-8.
253. Reeder JC, Cowman AF, Davern KM, Beeson JG, Thompson JK, Rogerson SJ, et al. The adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to chondroitin sulfate A is mediated by *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(9):5198-202.
254. Rowe JA, Moulds JM, Newbold CI, Miller LH. *P. falciparum* rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1. *Nature.* 1997;388(6639):292-5.
255. Chen Q, Barragan A, Fernandez V, Sundström A, Schlichtherle M, Sahlén A, et al. Identification of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) as the rosetting ligand of the malaria parasite *P. falciparum*. *J Exp Med.* 1998;187(1):15-23.
256. Fried M, Duffy PE. Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta. *Science.* 1996;272(5267):1502-4.
257. Duffy PE, Fried M. Malaria during pregnancy: parasites, antibodies and chondroitin sulphate A. *Biochem Soc Trans.* 1999;27(4):478-82.
258. Fried M, Duffy PE. Maternal malaria and parasite adhesion. *J Mol Med (Berl).* 1998;76(3-4):162-71.
259. Carmona-Fonseca J, Arango E, Maestre A. Placental malaria in Colombia: histopathologic findings in *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* infections. *Am J Trop Med Hyg.* 2013;88(6):1093-101.
260. Souza RM, Ataíde R, Dombrowski JG, Ippólito V, Aitken EH, Valle SN, et al. Placental histopathological changes associated with *Plasmodium vivax* infection during pregnancy. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(2):e2071.

261. Naing C, Whittaker MA, Nyunt Wai V, Mak JW. Is *Plasmodium vivax* malaria a severe malaria?: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(8):e3071.
262. Carvalho BO, Lopes SC, Nogueira PA, Orlandi PP, Bargieri DY, Blanco YC, et al. On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes. *J Infect Dis*. 2010;202(4):638-47.
263. De las Salas B, Segura C, Pabón A, Lopes SC, Costa FT, Blair S. Adherence to human lung microvascular endothelial cells (HMVEC-L) of *Plasmodium vivax* isolates from Colombia. *Malar J*. 2013;12:347.
264. Chotivanich K, Udomsangpetch R, Suwanarusk R, Pukrittayakamee S, Wilairatana P, Beeson JG, et al. *Plasmodium vivax* adherence to placental glycosaminoglycans. *PLoS One*. 2012;7(4):e34509.
265. Bernabeu M, Lopez FJ, Ferrer M, Martin-Jaular L, Razaname A, Corradin G, et al. Functional analysis of *Plasmodium vivax* VIR proteins reveals different subcellular localizations and cytoadherence to the ICAM-1 endothelial receptor. *Cell Microbiol*. 2012;14(3):386-400.
266. Mockenhaupt FP, Rong B, Till H, Eggelte TA, Beck S, Gyasi-Sarpong C, et al. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* infections in pregnancy in Ghana. *Trop Med Int Health*. 2000;5(3):167-73.
267. Rantala AM, Taylor SM, Trottman PA, Luntamo M, Mbewe B, Maleta K, et al. Comparison of real-time PCR and microscopy for malaria parasite detection in Malawian pregnant women. *Malar J*. 2010;9:269.
268. Singh N, Bharti PK, Singh MP, Singh R, Yeboah-Antwi K, Desai M, et al. What is the burden of submicroscopic malaria in pregnancy in central India? *Pathog Glob Health*. 2015;109(1):30-8.
269. Agudelo García OM. Malaria placentaria submicroscópica por *Plasmodium vivax* o *Plasmodium falciparum*: histopatología, células inmunitarias y expresión de genes asociados a hipoxia, apoptosis e inflamación. Corporación de ciencias básicas biomédicas. 2018; Tesis de doctorado:p. 159.
270. Cottrell G, Moussiliou A, Luty AJ, Cot M, Fievet N, Massougbdji A, et al. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* Infections Are Associated With Maternal Anemia, Premature Births, and Low Birth Weight. *Clin Infect Dis*. 2015;60(10):1481-8.
271. Mohammed AH, Salih MM, Elhassan EM, Mohmmmed AA, Elzaki SE, El-Sayed BB, et al. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* malaria and low birth weight in an area of unstable malaria transmission in Central Sudan. *Malar J*. 2013;12:172.
272. Carmona-Fonseca J, Maestre A. Incidencia de las malarías gestacional, congénita y placentaria en Urabá (Antioquia, Colombia), 2005-2007. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 2009;60(1):19-33.
273. Carmona-Fonseca, Jaime. La Región “Urabá Antioqueño-Cuencas altas de los ríos Sinú y San Jorge-Bajo Cauca Antioqueño: “guarda” del paludismo colombiano. *Rev Univ Ind Santander*. 2017;49(4):12.
274. Piñeros-Jiménez JG, Álvarez G, Tobón A, Arboleda M, Carrero S, Blair S. Congenital malaria in Urabá, Colombia. *Malar J*. 2011;10:239.
275. Agudelo O, Arango E, Maestre A, Carmona-Fonseca J. Prevalence of gestational, placental and congenital malaria in north-west Colombia. *Malar J*. 2013;12:341.
276. Campos IM, Uribe ML, Cuesta C, Franco-Gallego A, Carmona-Fonseca J, Maestre A. Diagnosis of gestational, congenital, and placental malaria in Colombia: comparison of the efficacy of microscopy, nested polymerase chain reaction, and histopathology. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2011;84(6):929-35.
277. Agudelo-García OM, Arango-Flórez EM, Carmona-Fonseca J. Submicroscopic and Asymptomatic Congenital Infection by. *J Trop Med*. 2017;2017:3680758.
278. Ismaili J, van der Sande M, Holland MJ, Sambou I, Keita S, Allsopp C, et al. *Plasmodium falciparum* infection of the placenta affects newborn immune responses. *Clin Exp Immunol*. 2003;133(3):414-21.
279. Le Port A, Watier L, Cottrell G, Ouédraogo S, Dechavanne C, Pierrat C, et al. Infections in infants during the first 12 months of life: role of placental malaria and environmental factors. *PLoS One*. 2011;6(11):e27516.
280. Malhotra I, Dent A, Mungai P, Wamachi A, Ouma JH, Narum DL, et al. Can prenatal malaria exposure produce an immune tolerant phenotype? A prospective birth cohort study in Kenya. *PLoS Med*. 2009;6(7):e1000116.

281. Dietz V, Galazka A, van Loon F, Cochi S. Factors affecting the immunogenicity and potency of tetanus toxoid: implications for the elimination of neonatal and non-neonatal tetanus as public health problems. *Bull World Health Organ.* 1997;75(1):81-93.
282. Labeaud AD, Malhotra I, King MJ, King CL, King CH. Do antenatal parasite infections devalue childhood vaccination? *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3(5):e442.
283. Gyhrs A, Pedersen BK, Bygbjerg I, Henrichsen J, Heron I, Petersen I, et al. The effect of prophylaxis with chloroquine and proguanil on delayed-type hypersensitivity and antibody production following vaccination with diphtheria, tetanus, polio, and pneumococcal vaccines. *Am J Trop Med Hyg.* 1991;45(5):613-8.
284. Usen S, Milligan P, Ethevenaux C, Greenwood B, Mulholland K. Effect of fever on the serum antibody response of Gambian children to *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J.* 2000;19(5):444-9.
285. Walther B, Miles DJ, Waight P, Palmero MS, Ojuola O, Touray ES, et al. Placental malaria is associated with attenuated CD4 T-cell responses to tuberculin PPD 12 months after BCG vaccination. *BMC Infect Dis.* 2012;12:6.
286. Cumberland P, Shulman CE, Maple PA, Bulmer JN, Dorman EK, Kawuondo K, et al. Maternal HIV infection and placental malaria reduce transplacental antibody transfer and tetanus antibody levels in newborns in Kenya. *J Infect Dis.* 2007;196(4):550-7.
287. Álvarez-Larrotta C, Agudelo OM, Duque Y, Gavina K, Yanow SK, Maestre A, et al. Submicroscopic *Plasmodium* infection during pregnancy is associated with reduced antibody levels to tetanus toxoid. *Clin Exp Immunol.* 2019;195(1):96-108.
288. Frosch AE, John CC. Immunomodulation in *Plasmodium falciparum* malaria: experiments in nature and their conflicting implications for potential therapeutic agents. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012;10(11):1343-56.
289. Mantel PY, Schmidt-Weber CB. Transforming growth factor-beta: recent advances on its role in immune tolerance. *Methods Mol Biol.* 2011;677:303-38.
290. Pombo D, Maloy WL, Berzofsky JA, Good MF. Neonatal exposure to immunogenic peptides. Differential susceptibility to tolerance induction of helper T cells and B cells reactive to malarial circumsporozoite peptide epitopes. *J Immunol.* 1988;140(10):3594-8.
291. Harte PG, Playfair JH. Failure of malaria vaccination in mice born to immune mothers. II. Induction of specific suppressor cells by maternal IgG. *Clin Exp Immunol.* 1983;51(1):157-64.
292. Ibitokou S, Oesterholt M, Brutus L, Borgella S, Agbowai C, Ezinmègnon S, et al. Peripheral blood cell signatures of *Plasmodium falciparum* infection during pregnancy. *PLoS One.* 2012;7(12):e49621.
293. Le Hesran JY, Cot M, Personne P, Fievet N, Dubois B, Beyemé M, et al. Maternal placental infection with *Plasmodium falciparum* and malaria morbidity during the first 2 years of life. *Am J Epidemiol.* 1997;146(10):826-31.
294. Mutabingwa TK, Bolla MC, Li JL, Domingo GJ, Li X, Fried M, et al. Maternal malaria and gravidity interact to modify infant susceptibility to malaria. *PLoS Med.* 2005;2(12):e407.
295. Cairns M, Gosling R, Chandramohan D. Placental malaria increases malaria risk in the first 30 months of life: not causal. *Clin Infect Dis.* 2009;48(4):497-8; author reply 8-9.
296. Schwarz NG, Adegnikaa AA, Breitling LP, Gabor J, Agnandji ST, Newman RD, et al. Placental malaria increases malaria risk in the first 30 months of life. *Clin Infect Dis.* 2008;47(8):1017-25.
297. Chronic infection and regulation in the immune system. In: Blackwell Publishing Ltd editor, *Immunology* 2003. 110. (1) 26-33.
298. Kho S, Marfurt J, Handayani I, Pava Z, Noviyanti R, Kusuma A, et al. Characterization of blood dendritic and regulatory T cells in asymptomatic adults with sub-microscopic *Plasmodium falciparum* or *Plasmodium vivax* infection. *Malar J.* 2016;15:328.
299. de Araújo FF, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Antas PR, Assis Silva Gomes J, Sathler-Avelar R, et al. Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(5):e992.
300. Schietinger A, Greenberg PD. Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction. *Trends Immunol.* 2014;35(2):51-60.

301. Rodrigues V, Cordeiro-da-Silva A, Laforge M, Ouaisi A, Akharid K, Silvestre R, et al. Impairment of T cell function in parasitic infections. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(2):e2567.
302. van Crevel R, Ottenhoff TH, van der Meer JW. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(2):294-309.
303. Greenwood BM, Bradley-Moore AM, Bryceson AD, Palit A. Immunosuppression in children with malaria. *Lancet*. 1972;1(7743):169-72.
304. González-Fernández A, Faro J, Fernández C. Immune responses to polysaccharides: lessons from humans and mice. *Vaccine*. 2008;26(3):292-300.
305. Kelly DF, Thorson S, Maskey M, Mahat S, Shrestha U, Hamaluba M, et al. The burden of vaccine-preventable invasive bacterial infections and pneumonia in children admitted to hospital in urban Nepal. *International Journal of Infectious Diseases*. 2011;15(1):e17-e23.
306. Corrigan RJ. Asymptomatic malaria parasitaemia and the antibody response to tetanus toxoid vaccination. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1988;82(4):540-1.
307. van Riet E, Adegnika AA, Retra K, Vieira R, Tielens AG, Lell B, et al. Cellular and humoral responses to influenza in gabonese children living in rural and semi-urban areas. *J Infect Dis*. 2007;196(11):1671-8.
308. Malhotra I, McKibben M, Mungai P, McKibben E, Wang X, Sutherland LJ, et al. Effect of antenatal parasitic infections on anti-vaccine IgG levels in children: a prospective birth cohort study in Kenya. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(1):e0003466.
309. Lule SA, Mawa PA, Nkurunungi G, Nampijja M, Kizito D, Akello F, et al. Factors associated with tuberculosis infection, and with anti-mycobacterial immune responses, among five year olds BCG-immunised at birth in Entebbe, Uganda. *Vaccine*. 2015;33(6):796-804.
310. Williamson WA, Greenwood BM. Impairment of the immune response to vaccination after acute malaria. *Lancet*. 1978;1(8078):1328-9.
311. Greenwood BM, Bradley AK, Blakebrough IS, Whittle HC, Marshall TF, Gilles HM. The immune response to a meningococcal polysaccharide vaccine in an African village. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1980;74(3):340-6.
312. Simondon F, Preziosi MP, Pinchinat S, Yam A, Chabirand L, Wassilak S, et al. Randomised study of the possible adjuvant effect of BCG vaccine on the immunogenicity of diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine in Senegalese infants. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1999;18(1):23-9.

2 Capítulo 2:

Inmunomodulación en MAE y su efecto en la respuesta materna contra el toxoide tetánico

2.1 Planteamiento del problema

2.1.1 Infección plasmodial en la gestación

La infección con *P. falciparum* o *P. vivax* en el embarazo puede causar efectos adversos en la madre y su hijo tales como anemia materna, bajo peso al nacer y bajo tamaño para la edad gestacional, que son consecuencias asociadas tanto a infecciones plasmodiales microscópicas como a submicroscópicas en el embarazo (1-4). Otros efectos adversos en los neonatos de la MAE incluyen tolerancia inmune (5), aumento de la susceptibilidad para adquirir malaria y otras infecciones (5-8), y alteración de la respuesta inmune a la vacunación (9-13). Estos efectos sobre la respuesta inmune solo han sido estudiados en infecciones de magnitud microscópica causadas por *P. falciparum*.

Las infecciones submicroscópicas por *P. falciparum* son comunes en mujeres embarazadas (14, 15). Estas infecciones pueden ser consideradas crónicas y usualmente no son tratadas por falta de diagnóstico, pero se ha demostrado que el tratamiento intermitente preventivo durante la gestación puede controlarlas (16, 17). La carencia de tratamiento permite la persistencia de la estimulación antigénica y este estímulo causa cambios en los perfiles transcripcionales, ambientes de interleuquinas y distribución de tipos de células en sangre periférica y placentaria materna (18, 19). Las infecciones crónicas con inflamación persistente son definidas por un perfil transcripcional alterado (20, 21). Un incremento estable de interleuquinas proinflamatorias como IFN- γ y TNF, así como de interleuquinas antiinflamatorias como TGF- β e IL-10, han sido asociados con infecciones plasmodiales submicroscópicas crónicas en el embarazo (18, 19). Estos cambios en el ambiente de

interleuquinas pueden explicar el aumento de células Treg FoxP3⁺ reportadas en infecciones plasmodiales periféricas y placentarias (22, 23).

El aumento de células Treg FoxP3⁺ se han asociado con dos importantes procesos en la fisiopatología de la malaria; por un lado, las células Treg se asocian con el crecimiento parasitario *in vivo* y el desarrollo de malaria grave, debido a su papel en la regulación negativa de la inflamación, lo que dificulta el control de la infección (24); mientras que, por otro lado, el aumento de células Treg protege al hospedero de la inflamación (25, 26) y favorece el desarrollo de infecciones no complicadas y asintomáticas.

El aumento de células Treg favorece la modulación negativa de la respuesta inmune y se asocia al desarrollo de infecciones crónicas y al agotamiento de células T, pérdida significativa de funciones efectoras y alteración en la diferenciación de células T de memoria (27). El agotamiento de células T se caracteriza por un aumento en la regulación y coexpresión de múltiples receptores inhibidores como PD-1, CTLA-4, LAG-3 y TIM-3, así como por falla en la adquisición de células T de memoria independiente del antígeno (28). Una vez activadas, las células Treg pueden suprimir respuestas inmunes no relacionadas de una manera no específica de antígeno, un mecanismo conocido como “supresión del espectador” (29).

2.1.2 Tétanos en el embarazo

El tétanos gestacional es el que sucede durante el embarazo o dentro de las 6 semanas posteriores al final del embarazo (nacimiento, aborto y mortinato). No existe un sistema de notificación formal para esta enfermedad, por lo que se desconoce su frecuencia; no obstante, se cree que su eliminación es proporcional a la eliminación del tétanos neonatal, que causó 34000 muertes en todo el mundo en el 2015 (30). Actualmente no se dispone de suficientes datos sobre la incidencia del tétanos gestacional, aunque se presume que su incidencia ha disminuido (31). La mayoría de los casos de tétanos neonatal reportados se encuentran en África subsahariana e India (32-35); regiones endémicas para la malaria. En América, la Organización Panamericana de la Salud declaró, en 2017, la eliminación del tétanos gestacional y neonatal por presentar menos de 1 caso por 1000 nacidos vivos (36). Sin

embargo, en Colombia, en los años 2017 y 2018, se notificaron 5 casos anuales de tétanos neonatal (37, 38). Cabe indicar que en zonas rurales es donde se espera que se presenten la mayoría de casos de tétanos materno y neonatal, tal y como ocurre en Asia y África (39, 40), pero es importante considerar el posible subregistro de casos, entre otros factores, por la falta de cobertura de los servicios de salud. A pesar de que la notificación de tétanos neonatal en Colombia es baja, es necesario resaltar que tan solo un caso, en cualquier sitio del país, corresponde a una falla del sistema de atención en salud (41).

2.1.3 MAE y respuesta materna a vacunas

La inmunomodulación negativa durante las infecciones crónicas submicroscópicas causadas por *Plasmodium* spp podrían alterar la respuesta inmune a la vacunación en las gestantes, quienes en Colombia, reciben una única dosis de toxoide tetánico (TT) después de la semana 26 de gestación, aunque muy probablemente también han recibido vacunación completa (tres dosis básicas y dos refuerzo) en la niñez. Cinco estudios han evaluado el desempeño de la vacuna TT en relación con la infección malárica (9, 10, 42-44); dos de estos trabajos estudiaron el efecto en gestantes y tres en niños, pero los resultados obtenidos son discordantes. En estos estudios se abordó el efecto de la malaria aguda, la malaria asintomática y la malaria placentaria por *P. falciparum*. Solo dos estudios mostraron disminución en los niveles de IgG antiTT en los grupos asociados a la infección plasmodial: gestantes con malaria placentaria (9) y niños de 6 meses a 6 años con malaria aguda (10). Otros trabajos evaluaron el efecto de la quimioprofilaxis contra la malaria en el desempeño de la vacuna TT; sin embargo, ninguno de estos mostró que la administración de la quimioprofilaxis cambiara la respuesta contra el TT (revisado en (45)).

Los efectos de la infección malárica podrían reflejarse en una disminución de los niveles séricos de IgG contra la vacuna TT administrada a gestantes durante la atención prenatal. La respuesta inmune contra TT se caracteriza por una fuerte diferenciación de las células T y una alta producción de IFN- γ , después de la vacunación (46). Se determinó *in vitro* que la secreción de IFN- γ específica de TT estaba mediada exclusivamente por células T CD4⁺ (respuesta Th1) (47). Una amplificación adecuada de la respuesta inmune de células T y una

potente producción de IFN- γ , son fundamentales para la diferenciación de las células B y la producción adecuada de IgG antiTT (48).

En Suramérica no hay informes de tétanos materno ni de niveles de IgG antiTT. En la región noroccidental de Colombia, *P. falciparum* y *P. vivax* son endémicos y se ha notificado una frecuencia de infecciones plasmodiales submicroscópicas asociadas al embarazo en sangre periférica entre 23 y 49% y en sangre placentaria entre 4,9 y 57% (49, 50). Poco se sabe sobre los efectos de esas infecciones sobre la inmunidad de madres y neonatos. Sin embargo, en un estudio piloto con un bajo número de muestras, producto de esta tesis, se logró observar disminución en los niveles de IgG antiTT en las gestantes con historia de infección plasmodial submicroscópica durante el embarazo (51).

Con base en estos antecedentes, esta parte del trabajo tuvo como objetivo general, evaluar el efecto inmunomodulador de la MAE y su asociación con la respuesta inmune generada frente a la vacuna TT en gestantes.

2.2 Objetivos específicos

En mujeres con y sin infección plasmodial submicroscópica en el momento del parto y con y sin historia de infección gestacional durante el embarazo (cualquier momento antes del parto):

1. Comparar los niveles de anticuerpos contra TT en sangre periférica materna en el momento del parto.
2. Comparar los niveles de anticuerpos contra TT en gestantes de acuerdo con la especie parasitaria infectante.
3. Comparar los niveles en sangre periférica materna de expresión de moléculas proinflamatorias, antiinflamatorias, coestimuladoras y reguladoras de la respuesta inmune.

2.3 Metodología

2.3.1 Lugar del estudio

Esta investigación se hizo en los municipios de Puerto Libertador y Tierralta, en Córdoba, y Quibdó, en Chocó.

Actualmente en Colombia hay tres grandes zonas/áreas/regiones de transmisión de malaria: 1) Urabá antioqueño-Cuencas altas de los ríos Sinú y San Jorge en Córdoba-Bajo Cauca antioqueño; 2) Costa Pacífica y 3) Amazonia-Orinoquia.

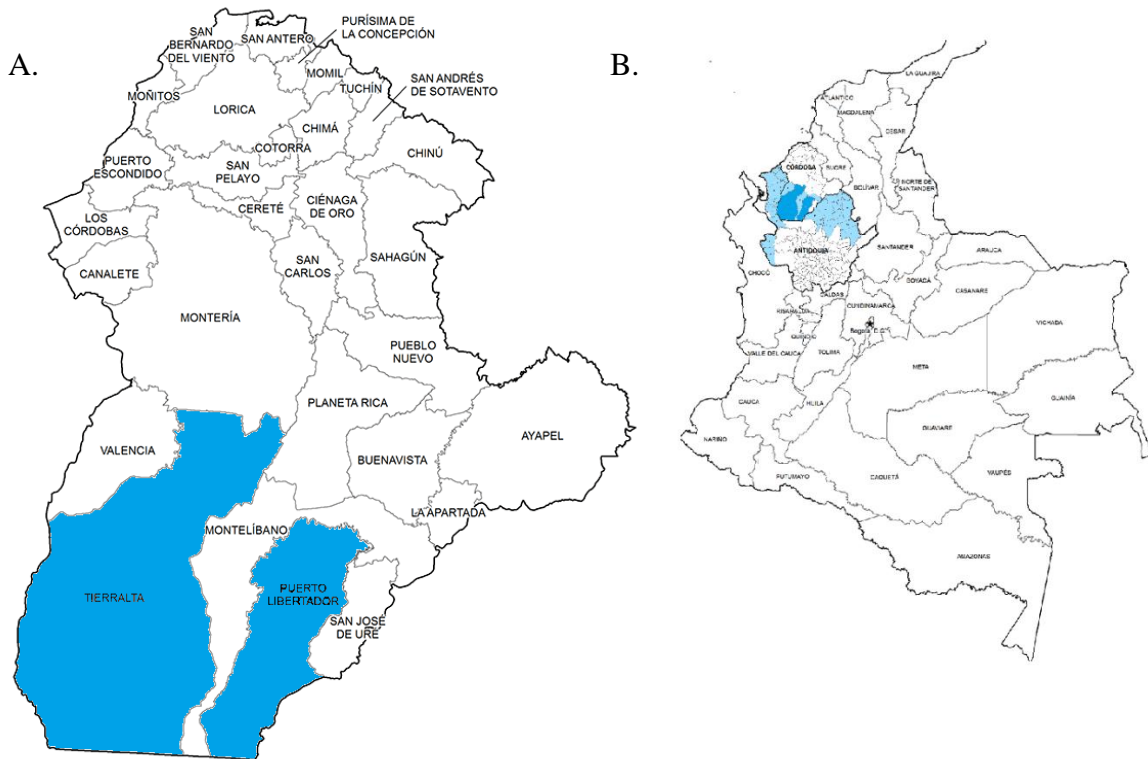
La primera región está conformada por 25 municipios de los departamentos de Antioquia y Córdoba, 21 y 4 municipios respectivamente (**Anexo 1**) e históricamente ha aportado 60% de los casos de malaria en Colombia (52). Este estudio incluyó dos municipios de dicha región, Tierralta y Puerto Libertador, que se encuentran al suroeste del departamento de Córdoba. En términos ecoepidemiológicos, dicha región es considerada con transmisión estable y de alta incidencia palúdica (**Figura 2.1**), donde cocirculan *P. falciparum* y *P. vivax*, pero la especie predominante es *P. vivax* (52).

Además de las características ecoepidemiológicas y de transmisión de la región, otro criterio para seleccionar los dos municipios de Córdoba (Tierralta y Puerto Libertador) donde se hizo esta investigación, fue la alta frecuencia de MAE (49%) que se detectó previamente con PCR cuantitativa (qPCR) en esos municipios (49). Es importante indicar que en marzo de 2014 finalizó el Proyecto Malaria Colombia (2010 -2014), que se llevó a cabo en 44 municipios con alta transmisión de malaria, incluidos los dos seleccionados en este estudio. El Proyecto Malaria Colombia mejoró el acceso al diagnóstico y tratamiento y ejecutó intervenciones para la prevención y control de la malaria en zonas críticas para el paludismo en Antioquia, Córdoba, Chocó y Nariño, con lo que logró una disminución de 48,3% de los casos de malaria en los municipios intervenidos, que generaban 80% del paludismo en el país (53). Sin embargo, cuando el programa dejó de operar, el número de casos aumentó a partir del año 2015 (**Tabla 2.1**). En este mismo año, en el Chocó se presentó un brote de malaria (**Tabla**

2.2). A partir de 2017 se inició recolección de muestras en el municipio de Quibdó, Chocó, para la presente investigación.

En cuanto a la Costa Pacífica, está conformada por cuatro departamentos ubicados al occidente de Colombia: Chocó, Valle del Cauca, Cauca y Nariño. La Costa Pacífica tiene mayor transmisión de malaria por *P. falciparum*. Esta región históricamente ha aportado el mayor porcentaje de mortalidad por esta enfermedad. El municipio incluido en este estudio es Quibdó, perteneciente al departamento del Chocó (**Figura 2.2**).

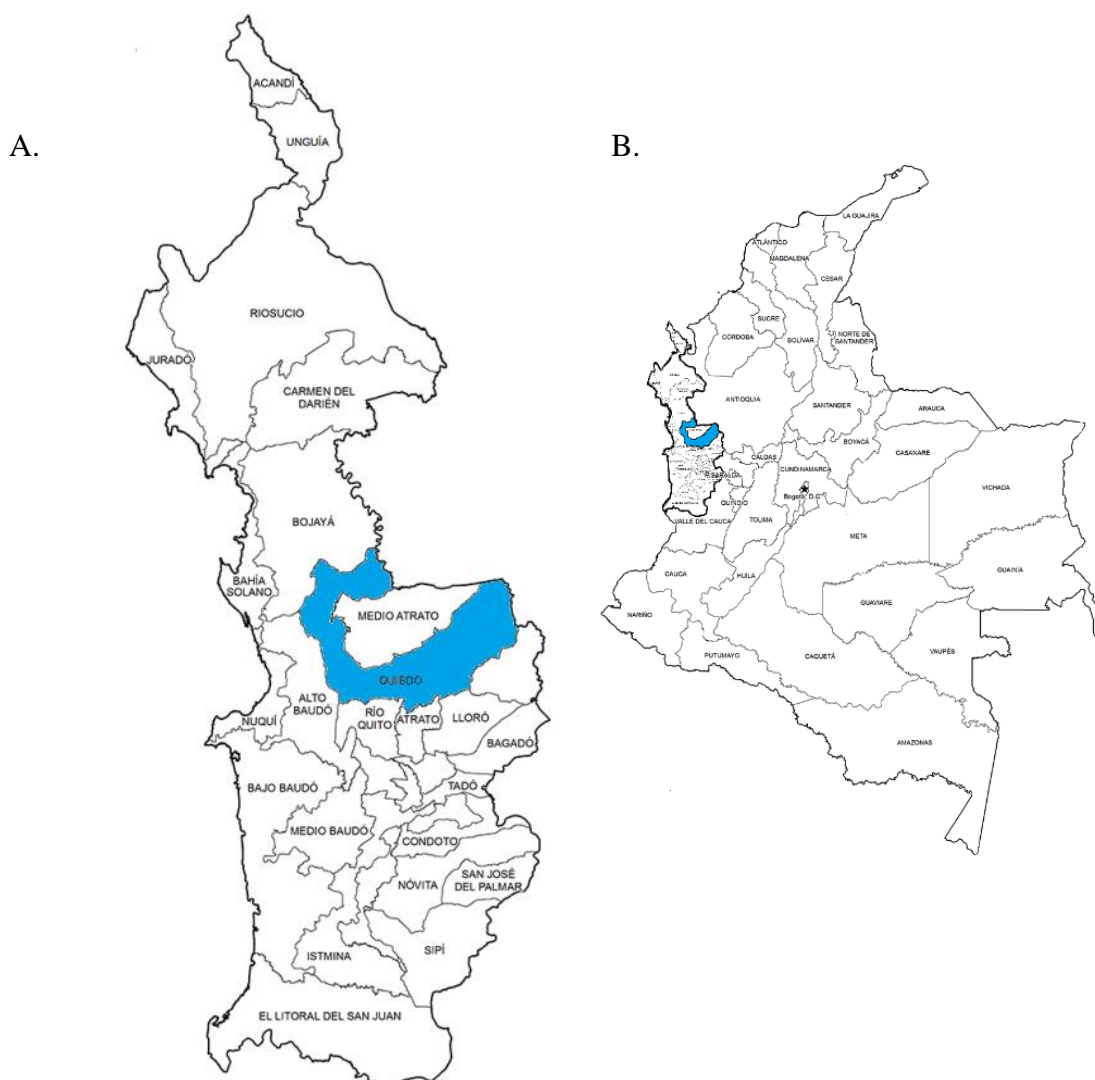
Figura 2.1. Mapa ubicación geográfica del lugar de estudio en Córdoba



A. Municipios del departamento de Córdoba, en azul los municipios de Tierralta y Puerto Libertador.

B. Ubicación geográfica del departamento de Córdoba en Colombia. En azul la región del Urabá antioqueño-Cuencas altas de los ríos Sinú y San Jorge en Córdoba-Bajo Cauca antioqueño.

Figura 2.2. Mapa ubicación geográfica del lugar de estudio en Chocó



A. Municipios del departamento del Chocó, en azul el municipio de Quibdó.

B. Ubicación geográfica del departamento del Chocó en Colombia.

Tabla 2.1. Número de casos e índices de malaria en Tierralta y Puerto Libertador, Córdoba entre los años 2008 y primer semestre de 2018

Año	Tierralta				Puerto Libertador			
	Casos	IPA	IFA	IVA	Casos	IPA	IFA	IVA
2008	5040	59,6	19,7	39,4	4856	127,5	42,1	84,1
2009	4414	51,0	13,2	37,3	4120	103,0	17,2	85,4
2010	6255	70,6	23,3	46,6	7177	176,8	58,3	116,7
2011	3162	34,8	11,5	22,9	2416	57,6	19,0	38,0
2012	1791	19,2	1,7	17,4	1408	32,5	4,6	27,9
2013	974	10,2	0,4	9,7	1218	27,2	5,6	21,3
2014	737	7,5	0,5	7,1	180	3,9	0,4	3,4
2015	712	7,1	1,0	6,0	186	3,0	0,0	2,8
2016	804	7,8	2,6	5,2	392	7,9	2,6	5,2
2017	2047	19,5	6,4	12,9	706	13,9	4,6	9,2
2018-I	2433	26,2	8,4	17,5	1235	23,6	7,7	15,6

Las barras azules corresponden a una representación gráfica entre número de casos, (índice parasitario anual) IPA, (índice falciparum anual) IFA e (índice vivax anual) IVA por año. Los datos fueron suministrados por las secretarías de salud de cada municipio y el programa de control de vectores del departamento de Córdoba.

Tabla 2.2. Número de casos e índices de malaria en Quibdó, Chocó entre los años 2016 y primer semestre de 2018

Año	Quibdó			
	Casos	IPA	IFA	IVA
2016	13256	114,4	77,0	32,0
2017	5356	46,1	26,9	17,3
2018-I	3000	25,8	18,0	7,1

Las barras azules corresponden a una representación gráfica entre número de casos (índice parasitario anual) IPA, (índice falciparum anual IFA) e (índice vivax anual IVA) por año. Los datos fueron suministrados por la secretaria departamental del Chocó.

2.3.2 Población de estudio y diseño

El grupo “Salud y Comunidad-César Uribe Piedrahíta” lleva 10 años trabajando en los municipios de Tierralta y Puerto Libertador, Córdoba; durante este tiempo (2008-2018) se han incluido 610 gestantes en los diferentes estudios realizados. Y a partir del 2016 se inició trabajo en el municipio de Quibdó, Chocó, donde se logró incluir 84 gestantes. En general las condiciones socioeconómicas de las gestantes y sus familias residentes en los municipios de estudio son similares. En los tres municipios se encuentran fundamentales condiciones de inequidad y desigualdad sociales (54, 55). Para evaluar el efecto inmunomodulador de la MAE y su asociación con la respuesta inmune generada frente a la vacuna TT en gestantes, se conformaron a conveniencia los siguientes grupos de estudio:

- **Grupo ISP-P:** mujeres con **infección submicroscópica plasmodial** (detectada solo por qPCR) en sangre periférica materna y/o en la placenta, en el momento del **parto** (n=48).
- **Grupo IP-E:** mujeres con **infección plasmodial** microscópica (detectada por gota gruesa) o submicroscópica (detectada solo por qPCR) durante el **embarazo**, pero negativas en el parto, tanto en placenta como en sangre periférica (n=50).
- **Grupo control:** mujeres sin infección plasmodial microscópica (negativas por gota gruesa) durante el embarazo y sin infección plasmodial microscópica y submicroscópica en el momento del parto (negativas por gota gruesa y qPCR) (n=75).

Las mujeres incluidas en los grupos de estudio ISP e IP-E fueron seleccionadas de acuerdo con la condición de infección. Para la selección del grupo de mujeres control (n=75) se tuvo en cuenta: 1) negatividad en la condición de infección: microscópica desde el control prenatal y microscópica y submicroscópica en el momento del parto, y 2) calidad y cantidad de muestras sanguíneas periféricas de la madre. Además, para todas las mujeres incluidas en los tres grupos de estudio se verificó la aplicación de la vacuna TT con el carné de control prenatal.

2.3.2.1 Distribución de la infección en los grupos de estudio

En el grupo de mujeres con ISP-P, 42% estaban infectadas con *P. falciparum* (n=20), 48% con *P. vivax* (n=23) y 10% tenían infección mixta (n=5). En el grupo de mujeres con IP-E, 24% de las mujeres fueron infectadas con *P. falciparum* (n=24), 74% con *P. vivax* (n=37) y solo 2% tuvieron infección mixta (n=1). Como se describió en la metodología, las mujeres del grupo de negativas no contaban con historia de malaria microscópica durante el embarazo y fueron negativas para infección gestacional y placentaria microscópica y submicroscópica en el momento del parto.

2.3.3 Criterios de inclusión y exclusión

- Ser residente permanente del municipio de estudio.
- Estar en el programa de control prenatal del hospital local.
- No presentar nivel de riesgo obstétrico igual o mayor a 2.
- No tener ninguna enfermedad crónica renal, hepática, cardíaca, respiratoria, cáncer, autoinmune, infección por VIH o enfermedad neurológica o psiquiátrica.
- Estar de acuerdo en participar en el estudio y firmar del consentimiento informado.

2.3.4 Recolección de datos y muestras

A partir del formulario de inclusión de cada mujer, se recolectaron datos como edad, peso, talla, antecedentes obstétricos, número de episodios maláricos durante la actual gestación y tiempo de residencia en la zona. De la historia clínica se tomó de la edad gestacional, el nivel de hemoglobina materna durante el parto o en el último trimestre del embarazo y el peso al nacer del neonato.

La cuantificación de los niveles de anticuerpos IgG contra TT (antiTT) se hizo en la totalidad de las mujeres incluidas en el estudio (ISP-P n=48, IP-E n=50 y control n=75). Las demás mediciones se hicieron teniendo en cuenta la disponibilidad de la muestra. Los niveles de IgG antiTT fueron medidos en el primer trimestre de gestación en un subgrupo de estudio: en 11 mujeres de los dos grupos asociados a infección, ISP-P e IP-E, y en 19 mujeres del grupo control. Además, la medición de la expresión de mediadores inmunes también se hizo

en un subgrupo, así: 13 mujeres del grupo ISP-P, 23 mujeres del grupo IP-E y 68 mujeres del grupo control.

En cada control prenatal se tomó una muestra de sangre periférica materna en papel de filtro Whatman® No. 3, dos láminas de gota gruesa y un extendido de sangre periférica para el diagnóstico microscópico y submicroscópico de infección plasmodial. En el momento del parto, se tomó muestra de sangre de cordón umbilical en un tubo seco inmediatamente después de seccionar el cordón y ligar el muñón en el neonato, para realizar la cuantificación de anticuerpos. De la placenta se recolectaron muestras de sangre en papel de filtro Whatman® No. 3, dos láminas de gota gruesa y un extendido de sangre periférica para el diagnóstico microscópico y submicroscópico de infección plasmodial (49). Para esto, se hicieron cortes profundos en la cara materna de la placenta para formar pozos y tomar la muestra de sangre por aspiración con pipeta Pasteur. Para la cuantificación de la expresión de mediadores inmunes en tejido placentario se tomó un fragmento de la parte central de 1cm² de todo el espesor de la placenta, para ser conservado en RNALater® (Qiagen) (18). Además, durante el trabajo de parto o máximo 8 horas después del parto se tomaron muestras de sangre periférica materna por punción venosa en tubo seco para la cuantificación de anticuerpos, tubo con EDTA para separar la capa de blancos y almacenarla en Trizol® (18) y en papel de filtro Whatman® No. 3, dos láminas de gota gruesa y un extendido delgado para el diagnóstico microscópico y submicroscópico de infección plasmodial (49).

2.3.5 Diagnóstico de la infección plasmodial

2.3.5.1 Diagnóstico microscópico de la infección plasmodial

Las gotas gruesas fueron teñidas con la coloración de Field y leídas por un microscopista experimentado en cada hospital local. La elaboración, coloración y lectura de gotas gruesas se hizo de acuerdo al procedimiento recomendado por la OMS (56). La parasitemia se calculó en un total de 200 leucocitos y se tuvo en cuenta la constante de 8000 leucocitos/ μ L, para hallar el número de parásitos/ μ L de sangre. Una gota gruesa se consideró negativa cuando no se observó ninguna forma parasitaria en un mínimo de 200 campos microscópicos.

2.3.5.2 Diagnóstico molecular de la infección plasmodial

EL ADN parasitario fue extraído con el método Saponina-Chelex (57), a partir de las muestras de sangre en papel de filtro. Para esto se usó un círculo de 6 mm de diámetro (~25 μ L de sangre) y el ADN obtenido fue resuspendido en 50 μ L de agua destilada estéril.

Para el diagnóstico molecular de la infección plasmodial se usó el protocolo de PCR cuantitativa Taqman en tiempo real (qPCR) estandarizado por nuestros colaboradores en Alberta, Canadá (58). Para las reacciones se usó un equipo ABI 7500 FAST con las condiciones universales de ciclaje (95 °C por 15 seg, 60 °C por 1 min). El volumen final de reacción fue de 25 μ L, con 12,5 μ L de master mix universal Taqman (Applied Biosystems) y 5 μ L de ADN molde. La lista de cebadores y sondas con sus respectivas concentraciones finales se presenta en la **Tabla 2.3**.

Este ensayo cuenta con dos reacciones, una para la determinación del género *Plasmodium* y la cuantificación usando los cebadores Plasm1-Plasm2 y la sonda Plasprobe. Luego, en las muestras con un Ct <45, se determinó la especie en una segunda reacción multiplex que combina el cebador Plasm2 con los cebadores Viv y Fal y las sondas Vivprobe y Falprobe, específicos de *P. vivax* y *P. falciparum*, respectivamente. Las muestras fueron consideradas positivas para infección con Ct <40. Solo se consideraron positivas aquellas muestras que resultaron positivas tanto en la reacción de género como en la de especie. Cada reacción de PCR incluyó al menos tres controles negativos en los que se usó agua y un control positivo para *vivax* (ADN de la cepa Salvador I) y otro para *falciparum* (ADN de la 3D7).

Tabla 2.3. Cebadores y sondas para el diagnóstico molecular de la infección plasmodial

Especie	Nombre	Tipo	nM	Secuencia 5' – 3'
<i>Plasmodium spp</i>	Plasmo1	F	200	GTTAAGGGAGTGAAGACGATCAGA
<i>Plasmodium spp</i>	Plasmo2	R	200	AACCCAAAGACTTTGATTTTCATAA
<i>Plasmodium spp</i>	Plasprobe	S	50	FAM-ACCGTCGTAATCTTAACCATAAACTATGCCGACTAG-TAMRA
<i>P. falciparum</i>	Fal	F	200	CCGACTAGGTGTTGGATGAAAGTGTTAA
<i>P. falciparum</i>	Falciprobe	S	80	Quasar670-AGCAATCTAAAAGTCACCTCGAAAGATGACT-BHQ2
<i>P. vivax</i>	Viv	F	50	CCGACTAGGCTTTGGATGAAAGATTTTA
<i>P. vivax</i>	Vivprobe	S	80	TAMRA-AGCAATCTAAGAATAAACTCCGAAGAGAAAATTCT-BHQ2

Secuencia de cebadores y sondas empleadas para el diagnóstico molecular de la infección plasmodial (Shokoples et al., 2009). **nM** concentración en nanomolar usada en la reacción. **F**: cebador sentido, **R**: cebador antisentido, **S**: sonda

2.3.6 Cuantificación relativa de la expresión de mediadores inmunes en sangre periférica

La capa leucocitos homogenizada con Trizol (Invitrogen) fue utilizada para la extracción de ARN total, siguiendo las instrucciones del fabricante. La qPCR para la cuantificación relativa con un ensayo Taqman se hizo con el juego de reactivos EXPRESS One-Step Superscript™ (Invitrogen) a partir de ARN. Para todas las reacciones de PCR se usó un equipo StepOnePlus™ Real-Time PCR System de Applied Biosystems™ con las condiciones de ciclaje sugeridas por el fabricante (50 °C por 20 minutos (síntesis de ADNc), 95 °C por 2 minutos y 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos y 60 °C por 1 minuto). El volumen final de reacción fue de 20 µL, con 10 µL de mezcla EXPRESS One-Step Superscript™ y 2 µL de ARN.

Por cada reacción se incluyeron dos controles negativos (agua libre de ARNasas), una muestra de referencia (mezcla ARN de la capa leucocitaria de 10 mujeres sanas residentes de la zona) y el gen constitutivo (β actina), que fue cuantificado tanto en la muestras problema, como en la muestra de referencia. Todas las reacciones fueron realizadas por triplicado. Las reacciones de qPCR para cada molécula fueron estandarizadas con una curva estándar, teniendo en cuenta la eficiencia y la pendiente obtenida en la curva; el estándar

empleado para hacer la curva fue mononucleares de sangre periférica estimulados con PHA o extracto de cultivo de esquizontes al 5% de *P. falciparum*. Fueron validados los ensayos que obtuvieran una eficiencia entre 90 y 110 % y una pendiente entre -2,98 y -3,65 (Broeders et al., 2014), además de que la linealidad del ensayo fuera igual o mayor a 0,98. Para la cuantificación relativa se aplicó el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Pfaffl, 2001), en éste, se determinan los cambios en los niveles de expresión de los mediadores inmunes en relación con los niveles de expresión del gen constitutivo y de la muestra de referencia. La lista de cebadores y sondas, que fueron diseñados en este estudio, se presentan en la **Tabla 2.4**.

2.3.7 Cuantificación de los niveles de IgG contra TT

Los niveles de IgG antiTT fueron cuantificados mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) en suero de sangre periférica de mujeres en el momento del parto. Los anticuerpos fueron cuantificados con el estuche comercial Tetanus IgG ELISA (VIRCELL, S.L. Parque tecnológico de la Salud. c/Avicena 8, 18016 Granada, España), siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada muestra fue evaluada por duplicado. Los platos fueron leídos en el lector de ELISA Labsystems Multiskan microplate reader (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) a 450 y 620 nm. De acuerdo a los estándares incluidos en el estuche (rango 0,1 UI/mL- 5,0 UI/mL) los cálculos y los análisis de regresión fueron realizados manualmente en Microsoft Excel 2013. El punto de corte de seropositividad según las indicaciones del fabricante se estableció a partir de 0,13 UI/mL.

2.3.8 Análisis estadístico

La mayoría de los datos obtenidos no se distribuyeron de manera normal/gaussiana basados en las pruebas Kolmogorov–Smirnov; por tal razón, la prueba no paramétrica Kruskal–Wallis fue empleada para evaluar las diferencias entre los grupos. El programa estadístico IBM SPSS Statistics (versión 24) fue usado para realizar los análisis. Un valor de significación estadística $p < 0,05$ fue aceptado para todos los análisis. Para comparar los niveles de anticuerpos antes y después de la vacunación con TT durante el embarazo se utilizó la prueba no paramétrica para muestras relacionadas de Wilcoxon. Para los análisis con resultados con

significación estadística por la prueba de Kruskal–Wallis, se realizó la corrección para comparaciones múltiples con la prueba de Dunn.

Tabla 2.4. Cebadores y sondas empleadas para la cuantificación relativa de mediadores inmunes

Gen	Cebador F (5'- 3')	Cebador R (5'- 3')	Sonda (5'- 3')	Producto (pb)
<i>IL-10</i>	CCTGGAGGAGGTGATGCCCA	CAGCGCCGTAGCCTCAGCC	CAAGGCGCATGTGAACTCCCTG	131
<i>IL-13</i>	GGAGCTGGTCAACATCACCC	CGTTGATCAGGGATTCCAGG	GGAGCATCAACCTGACAGCTGGC	116
<i>TGF-β</i>	TCAGAGCTCCGAGAAGCGGTA	GTTGCTGTATTCTGGTACAT	CCGGGCAGAGCTGCGTCTGCTGA	92
<i>IFN-γ</i>	GAAGAATTGGAAAGAGGAGAGTGA	TGGACATTCAGTCAGTTACCG	TTCCTTGATGGTCTCCACACTCTTTGG	218
<i>TNF</i>	GCCCAGGCAGTCAGATCA	GCTTGAGGGTTGCTACAACA	CCCGAGTGACAAGCCTGTAGCCC	74
<i>FOXP3</i>	GAGAAGCTGAGTGCCATGCA	GGAGCCCTTGTCGGATGAT	CCACCTGGCTGGGAAAATGGCAC	87
<i>CTLA4</i>	GCTCAGCTGAACCTGGCTAC	CGTGCATTGCTTTGCAGAAGAC	CCTGCACTCTCCTGTTTTTTC	88
<i>PD-L1</i>	CTGTGAAAGTCAATGCCCATAC	CAGTTCATGTTCCAGAGGTACTG	CCAAAGAATTTTGGTTGTGGAT	80
<i>TNFR1I</i>	CTGCCATGGTGTGTCCCTC	GGCAGGTCACAGAGAGTCAG	CATGGACGTTCCGGGCATGCT	88
<i>IL-8</i>	CAGCTCTGTGTGAAGGTGC	GGTGAAAGGTTGGAGTATGTC	AGTTTTGCCAAGGAGTGCTAAAGAACT	87
<i>CD-86</i>	GTCAGTGCTTGCTAACTTCAGTC	CTCATCTTCTTAGGTTCTGGGTAAC	CAGAAAATGTGTACATAAATTTGACC	120
<i>CD-40</i>	TCTCACCTCGCTATGGTTCGT	GATGGACAGCGGTCAGCAA	TGCCTCTGCAGTGCGTCTCTGG	70
<i>CD-163</i>	GATCACATGTGACAACAAGATAAGAC	GGAACCTCCATGCCAGATCT	GGACCCACTTCTGTTCTGGACG	83
<i>CD-54</i>	GCAGACAGTGACCATCTACAGCTT	CTTCTGAGACCTCTGGCTTCGT	CCGGCGCCCAACGTGATTCT	68
<i>β-actin</i>	CGAGCGCGGCTACAGCTT	CCTTAATGTCACGCACGATT	ACCACCACGGCCGAGCGG	58

Cebador F: cebador sentido, **cebador R:** cebador antisentido. **Producto (pb):** producto en pares de bases

2.4 Resultados

2.4.1 Características generales de las gestantes

Las características generales de las mujeres de estudio se muestran en la tabla 2.5. Algunos datos no pudieron ser recuperados de la historia clínica. El 53% del total de mujeres incluidas al estudio tuvo más de un parto y cuando se hizo la comparación por los tres grupos de estudio

se encontró que las mujeres con ISP-P tenían mayor paridad que las mujeres del grupo control ($p < 0,05$). En cuanto a los niveles de hemoglobina, no hubo diferencia entre los grupos evaluados, pero en los grupos asociados a infección se observó mayor frecuencia de anemia (hemoglobina ≤ 10 g/dL) (ISP-P=44% e IP-E=29%) que en el grupo de mujeres negativas (control=14%).

Tabla 2. 5. Características generales de gestantes de acuerdo a su estado de infección

Variable	Grupo ISP-P			Grupo IP-E			Control			p(KW)
	n	Me	RIC	n	Me	RIC	n	Me	RIC	
Edad (años)	35	22	19-27	33	21	16-30,5	47	22	19-26	0,981
Peso (Kg)	10	57	50-66	8	59	53-61	38	58	51-63	0,995
Talla (cm)	10	153	150-160	8	159	157-161	38	158	158-162	0,486
Número de partos	48	2	1-4	47	2	1-3	70	1	0,8-3	0,020
Edad gestacional (semanas)	43	39	38,39,5	45	39	38-39	72	39	38-40	0,094
Hemoglobina (g/dL)	27	10,8	10,2-12	17	11,3	10,4-12,2	21	11,9	10,9-12,1	0,255

Me, mediana. RIC, rango intercuartilico 25-75%. g/dL, gramos/decilitro.

2.4.2 Niveles de IgG antiTT sangre periférica materna

Para conocer si las infecciones submicroscópicas en gestantes y la historia de malaria durante el embarazo afectan la respuesta a la vacunación contra TT en gestantes colombianas, se cuantificaron los niveles de IgG antiTT en sangre periférica materna en el momento del parto. Adicionalmente, en una submuestra de los grupos de gestantes asociadas a infección (ISP-P e IP-E) (n=11) y control (n=19), se cuantificaron los niveles de anticuerpos en el primer trimestre de gestación (entre las semanas 4 y 12 de gestación); esto con el fin de verificar que los resultados obtenidos no se debieran a los niveles de antiTT previos a la vacunación. No se observaron diferencias significativas en los niveles de antiTT entre los grupos evaluados en el primer trimestre de gestación (**Tabla 2.6, Figura 2.3 A**). Al comparar los niveles de anticuerpos antiTT de las gestantes en los tres grupos de estudio, en el momento del parto, se observaron diferencias estadísticamente significativas con la prueba Kruskal-Wallis ($p < 0,001$) (**Tabla 2.6, Figura 2.3 A**). Al hacer el ajuste para pruebas múltiples se observó

que los grupos de mujeres con ISP-P ($p < 0,001$) e IP-E ($p < 0,001$) contaban con niveles de IgG antiTT significativamente menores que el grupo de mujeres control (**Figura 2.3 A**). Además, se observaron diferencias significativas en los niveles de antiTT en el grupo de mujeres control entre el primer trimestre y el momento del parto ($p < 0,0001$), lo que indica que hay aumento de anticuerpos tras la vacunación durante la gestación, pero no hubo diferencias en los niveles de antiTT en los grupos asociados a infección entre esos dos momentos (**Figura 2.3 A**).

Tabla 2.6. Niveles de antiTT en sangre materna según el estado de infección plasmodial y el momento de la gestación

Primer trimestre	Grupos ISP-P e IP-E		Control		p(M-W)		
	Me	RIC	Me	RIC			
IgG antiTT UI/mL	3,1	1-3,7	2,9	1-3,8	0,890		
Parto	Grupo ISP-P		Grupo IP-E		p(K-W)		
	Me	RIC	Me	RIC		Me	RIC
IgG antiTT UI/mL	3,7	2,9-4,6	3,6	2,8-4,5	4,4	4-4,9	<0,0001

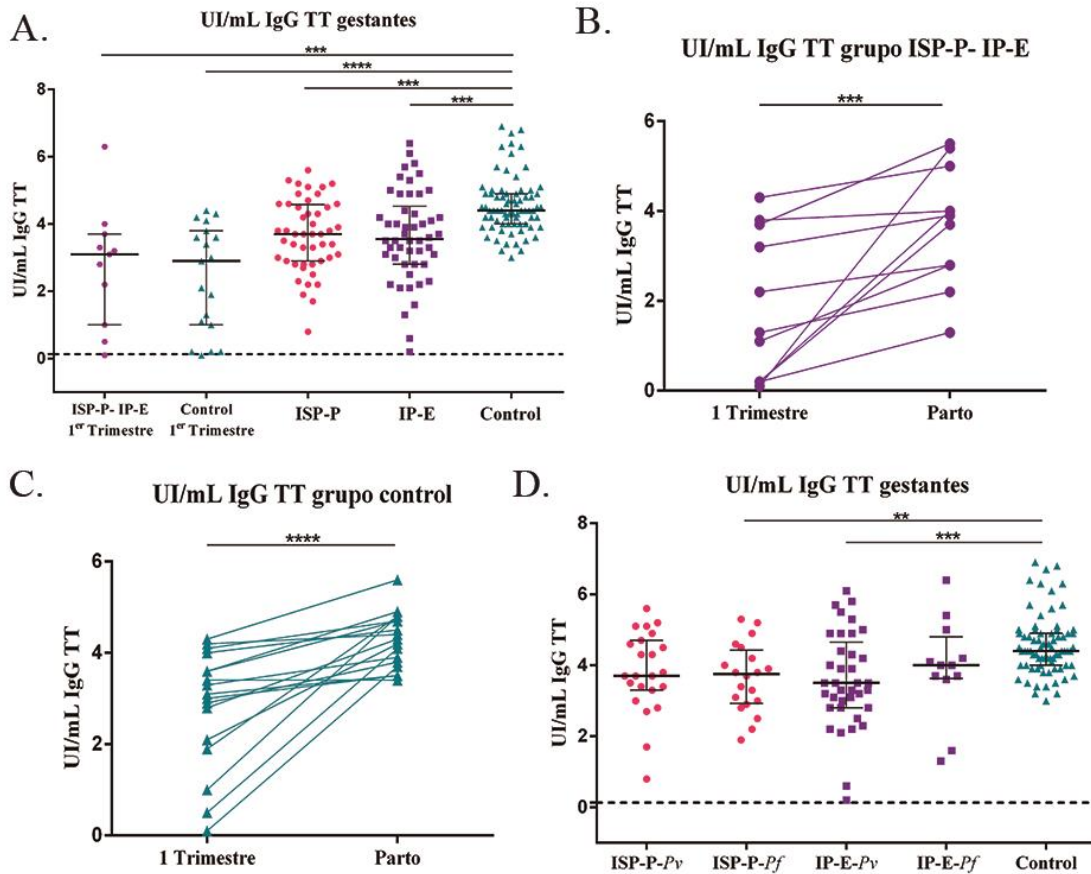
Me, mediana. RIC, rango intercuartílico 25-75%. UI/mL: unidades internacionales por mililitro. MW: Mann-Whitney. K-W: Kruskal-Wallis

Para ver el impacto de la aplicación de la vacuna TT en las gestantes de nuestros grupos de estudio (ISP-P e IP-E ($n=11$) y control ($n=19$)), se compararon las diferencias entre los niveles de antiTT en el primer trimestre de gestación y el momento del parto, después de la aplicación de la vacuna. Aplicando la prueba de rangos de Wilcoxon encontramos diferencias con significación estadística entre los niveles de IgG antiTT en el primer trimestre y después de la vacunación, tanto para el grupo ISP-P e IP-E ($p=0,0010$), como para el grupo control ($p < 0,0001$) (**Figura 2.3 B, C**).

Cuando los niveles de IgG antiTT se compararon entre los grupos, teniendo en cuenta la especie causal de la infección (ISP-P-*Pf* versus ISP-P-*Pv*, e IP-E-*Pf*, versus IP-E-*Pv*), no se encontraron diferencias significativas con la prueba de Mann-Whitney (**Tabla complementaria 2.1**). Cuando se hizo la comparación entre todos los grupos teniendo en cuenta la especie causal de la infección (ISP-P-*Pf*, ISP-P-*Pv*, IP-E-*Pf*, IP-E-*Pv* y control), se

encontraron diferencias significativas con la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0,0001$) (**Figura 2.3 D**) y la prueba de Dunn halló menores niveles de IgG antiTT en los grupos de mujeres con ISP-P-*Pf* ($p < 0,01$) e IP-E-*Pv* ($p < 0,001$), comparados con el grupo de mujeres control (**Figura 2.3 D**).

Figura 2.3. Niveles de IgG antiTT sangre periférica materna, según el grupo de estudio



Niveles de IgG antiTT cuantificados mediante ELISA. Mediana y rango intercuartilico 25-75%, **UI/mL**: unidades internacionales por mililitro.

A. Niveles de IgG antiTT entre el primer trimestre de gestación y en el parto en los grupos evaluados. Valor de p significativo basado en la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0,0001$).

B-C. Niveles de IgG antiTT entre el primer trimestre de gestación y en el parto en los grupos evaluados. Valor de p significativo basado en la prueba de Wilcoxon.

D. Niveles de IgG antiTT entre los grupos por especie parasitaria infectante. Valor de p significativo basado en la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0,0001$).

En las gráficas A y D la línea punteada indica el punto de corte para seropositividad (0,13 UI/mL).

Los asteriscos corresponden al valor de significación estadística de acuerdo a la corrección con la prueba de Dunn ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$.

2.4.3 Efecto de MAE sobre la expresión de mediadores inmunes en sangre periférica materna

Al observar una disminución significativa en los niveles de antiTT en las gestantes con infección plasmodial y al encontrar estudios que han mostrado cambios transcripcionales en diferentes interleuquinas durante infecciones submicroscópicas plasmodiales (18, 19), se procedió a determinar los cambios transcripcionales en mediadores inmunes inflamatorios, antiinflamatorios, reguladores y coestimuladores en sangre periférica materna, para ver la inmunomodulación resultante de la infección plasmodial que podría explicar la alteración en la respuesta contra el TT en las mujeres asociadas a infección.

En la expresión de las moléculas IFN- γ , TNF, CD-54 e IL-8 asociadas a inflamación, se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los grupos evaluados para IFN- γ ($p=0,014$) y TNF ($p=0,0001$) (**Tabla complementaria 2.2**); la prueba de Dunn, mostró mayor expresión en las mujeres con ISP-P que en las mujeres control, tanto para IFN- γ ($p<0,05$) como para TNF ($p<0,0001$) (**Figura 2.4 A, B**).

Al evaluar la expresión de los mediadores antiinflamatorios IL-10, IL-13 y TGF- β , se observó diferencia en la expresión de IL-10 ($p=0,0022$) e IL-13 ($p=0,049$) entre los grupos de estudio (**Tabla complementaria 2.2**). Con el ajuste, el grupo de mujeres con ISP-P tenía mayor expresión de IL-10 que el grupo de mujeres sin infección ($p<0,01$) (**Figura 2.4 C-D**).

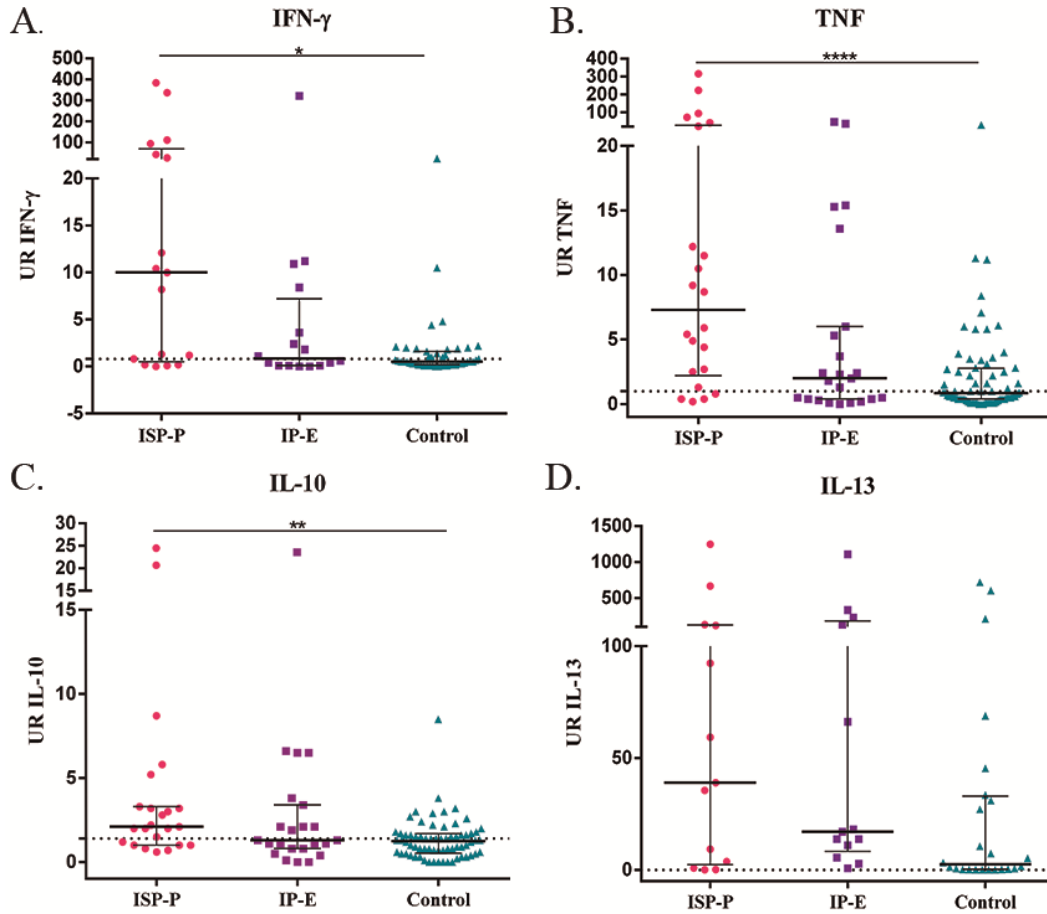
Teniendo en cuenta que diferentes estudios asocian la infección plasmodial con la diferenciación de células Treg FoxP3⁺ (61-63) y su posible rol en la limitación de la respuesta inmune efectora, nosotros quisimos explorar la expresión de FoxP3 y otros mediadores asociados a la regulación de la respuesta inmune en células Treg (CTLA-4 y TNF-RII) y en células presentadoras de antígeno (PD-L1 y CD-163). De acuerdo a la prueba Kruskal-Wallis, hubo diferencias entre los grupos de estudio en los mediadores FoxP3 ($p=0,0013$), CTLA-4 ($p=0,0057$) y TNF-RII ($p<0,0001$) (**Tabla complementaria 2.2**). Al hacer el ajuste con la prueba de Dunn, se encontró que en el grupo de mujeres con ISP-P había mayor expresión de las moléculas asociadas a regulación de la respuesta inmune en células Treg FoxP3 ($p<0,01$), CTLA-4 ($p<0,01$) y TNF-RII ($p<0,0001$), en comparación con el grupo de

mujeres sin infección (**Figura 2.5 A-C**). Además, el mediador TNF-RII se expresó más en el grupo de mujeres con IP-E ($p < 0,01$) que en el grupo de las mujeres control (**Figura 2.5 C**). En síntesis se observa un aumento en la expresión de moléculas de regulación de la respuesta inmune efectora en los grupos de mujeres con infección plasmoidal, en comparación con el grupo de mujeres control.

Las células Treg, a través de CTLA-4, regulan negativamente la expresión de las moléculas coestimuladoras CD-80 y CD-86 en células dendríticas (64, 65). Teniendo en cuenta el aumento en la expresión del factor de transcripción FoxP3 y el receptor CTLA-4 en las mujeres infectadas, quisimos cuantificar la expresión de las moléculas coestimuladoras CD-86 y CD-40 en los tres grupos de estudio. No se encontró diferencias en la expresión de la molécula coestimuladora CD-86 entre los grupos evaluados; pero sí se encontró diferencia en la expresión de CD-40, según la prueba de Kruskal-Wallis ($p = 0,0244$) (**Tabla complementaria 2.2**) y al hacer la corrección con la prueba de Dunn, se observó que en el grupo de mujeres con ISP-P hay menor expresión de CD-40, que en el grupo de mujeres control (**Figura 2.5. D**).

No fue posible hacer las comparaciones de los mediadores inmunes entre cada uno de los grupos, de acuerdo con la especie parasitaria infectante, porque el número de muestras en cada grupo fue muy escaso ($n < 10$).

Figura 2.4. Cuantificación relativa de la expresión de mediadores inmunes de inflamación e antiinflamación en los grupos de estudio



Niveles de expresión de citoquinas en sangre periférica materna. En todas las variables la medida es **la mediana y rango intercuartílico 25-75%** de las unidades relativas (UR) de expresión en la que la expresión basal del gen constitutivo se comparó con la expresión de cada citoquina según el valor de CT.

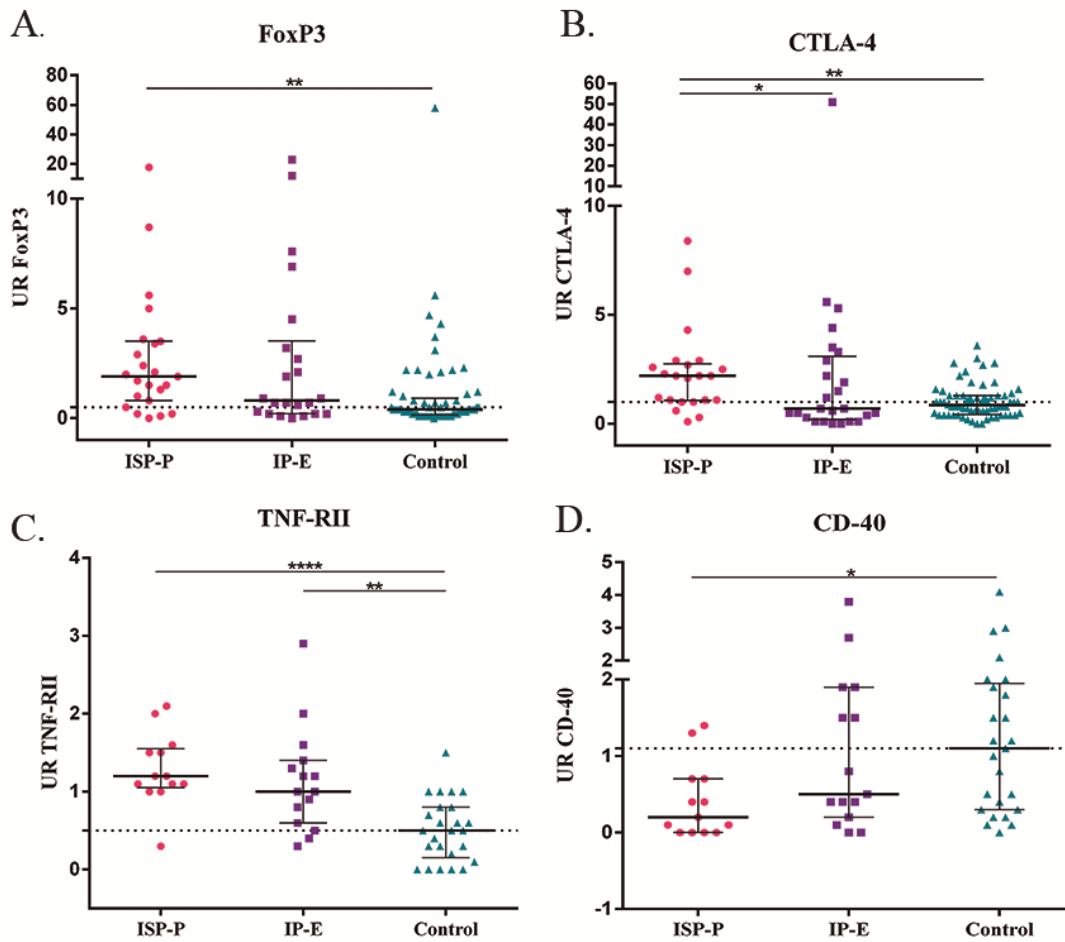
Valor de p significativo de acuerdo a la prueba de ajuste para comparaciones múltiples de Dunn. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$

La línea punteada corresponde a la expresión de cada mediador inmune en la muestra de referencia.

A-B. UR de expresión de citoquinas proinflamatorias (A) IFN- γ y (B) TNF, en ambas hay mayor expresión en el grupo ISP-P que en el control e IP-E.

C-D UR de expresión de citoquinas antiinflamatorias (C) IL-10 y (D) IL-13, solo en IL-10 hay mayor expresión en el grupo ISP-P que en el control e IP-E

Figura 2.5. Cuantificación relativa de la expresión de mediadores inmunes de regulación y coestimulación en los grupos de estudio



Niveles de expresión de citoquinas en sangre periférica materna. En todas las variables la medida es **la mediana y rango intercuartílico 25-75%** de las unidades relativas (UR) de expresión en la que la expresión basal del gen constitutivo se comparó con la expresión de cada citoquina según el valor de CT.

Valor de p significativo de acuerdo a la prueba de ajuste para comparaciones múltiples de Dunn. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$

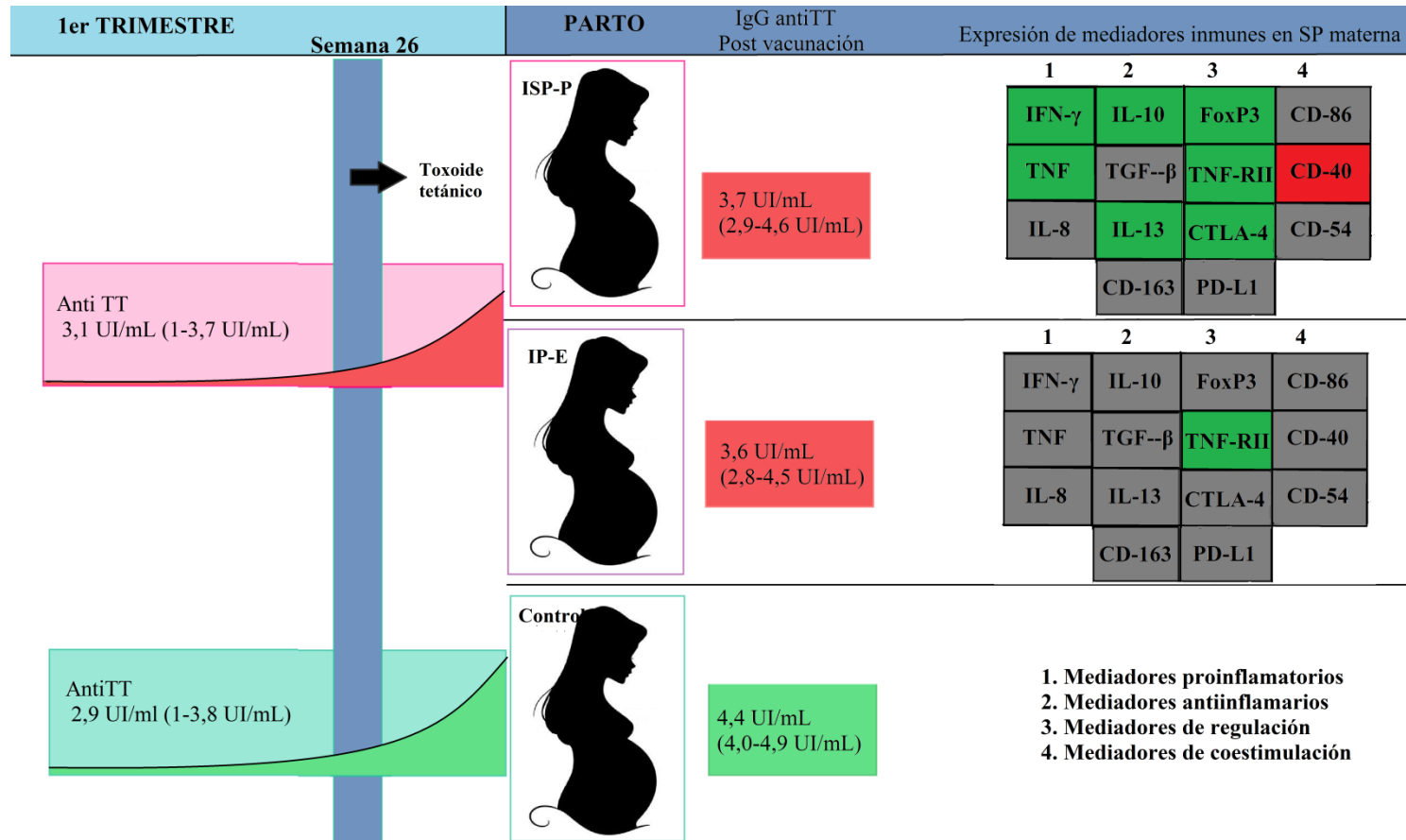
La línea punteada corresponde a la expresión de cada mediador inmune en la muestra de referencia.

A-C UR de expresión mediadores de regulación **(A)** Foxp3, **(B)** CTLA4 y **(C)** TNFRII, en todos hay mayor expresión en el grupo ISP-P que en el control e IP-E.y solo en IP-E hay mayor expresión de TNFRII que en el control.

D. UR del mediador coestimulador CD-40 se observa menor expresión en el grupo ISP-P con respecto al control.

2.4.4 Resumen de resultados

Figura 2.6. Resumen gráfico de resultados del capítulo 2



Los valores de antiTT corresponden a la mediana (rango intercuartílico) SP: Sangre periférica. En la expresión de mediadores inmunes el **color verde** indica sobreexpresión, el **rojo** baja expresión y el **gris** expresión similar con respecto a las unidades relativas de expresión obtenidas en el grupo control para cada mediador.

2.5 Discusión

2.5.1 Disminución en los niveles de IgG antiTT

Los niveles de IgG antiTT tuvieron una marcada disminución en mujeres colombianas con infección plasmodial submicroscópica en el momento del parto y con historia de MAE (**Figura 2.3 A**). Lo anterior concuerda con lo reportado por Cumberland et al. en Kenia, donde los niveles de anticuerpos IgG antiTT fueron entre 36% y 41% más bajos en mujeres con malaria placentaria (activa, crónica o pasada), detectada por histopatología, que en las mujeres sin malaria placentaria (9). Si bien las mujeres evaluadas por nosotros tenían infección submicroscópica en el momento del parto, mientras que las estudiadas por Cumberland et al. tenían infección microscópica (hemozoína y/o parásitos en el tejido placentario detectada por histopatología), en ambos estudios las mujeres padecían infecciones gestacionales crónicas, de tiempo desconocido, que se asociaron con una respuesta inmune alterada frente a la vacunación contra TT. En contraste, otro estudio indica que la infección por *P. falciparum* no modifica la frecuencia de células B de memoria específicas para TT, en una cohorte de mujeres primigrávidas en el momento del parto (66); sin embargo, es importante resaltar que la frecuencia de células B de memoria no refleja necesariamente la magnitud de la respuesta de anticuerpos (67).

No hay estudios previos que evalúen el efecto de la historia de MAE en la respuesta materna frente al TT; en este estudio, en las mujeres del grupo con IP-E también se encontró alteración de la respuesta inmune contra la vacuna. En cuanto a las características particulares de este grupo (IP-E), la mayoría de las mujeres fueron infectadas por *P. vivax* (74%) y 44% de esas infecciones fueron microscópicas y 56% fueron submicroscópicas, lo que sugiere que 44% de las mujeres de este grupo pudieron tener recaídas, es decir, uno o más cuadros maláricos en la misma gestación; puesto que la infección microscópica por *P. vivax* en gestantes recibe tratamiento incompleto únicamente con cloroquina, ya que, la primaquina el tratamiento hipnozoitocida esta contraindicado en la gestación por el riesgo de anemia hemolítica. Datos no publicados obtenidos en nuestro grupo muestran que en la misma zona endémica evaluada en este trabajo la frecuencia de recurrencias en gestantes con *P. vivax* es mayor que en un

grupo de individuos no embarazados. Además, el 26% de las infecciones de este grupo (IP-E) fueron causadas por *P. falciparum* y de estas 68% fueron submicroscópicas. Hay que recordar que las infecciones submicroscópicas tanto por *P. vivax*, como por *P. falciparum* son crónicas y no reciben tratamiento. Con base en lo anterior, tanto la condición de cronicidad, como el aumento en la cantidad de episodios de malaria durante el embarazo pudieron influir en la respuesta a la vacunación antitetánica en el grupo de mujeres con IP-E.

No hay títulos de anticuerpos que determinen la protección contra el tétanos, la cantidad de anticuerpos que asegura la inmunidad es específica de ensayo (68). El ensayo de ELISA que se usó en este estudio indica que individuos con un nivel de IgG antiTT <0,13 UI/mL son seronegativos. Ninguna mujer tuvo menos de 0,13 UI/mL de antiTT en el momento del parto y para todas las mujeres estudiadas se pudo constatar, con su carné de vacunación, que recibieron la dosis única de TT después de la semana 26 de gestación, de acuerdo al PAI colombiano. Por otro lado, del total de mujeres de primer trimestre (n=30) a las que se les cuantificaron los niveles de IgG antiTT, 17% tuvieron niveles de IgG antiTT muy cercanos a 0,13 UI/mL (**Figura 2.3 A**), lo que sugiere que en la zona de estudio hay un porcentaje significativo de mujeres con bajos antecedentes de vacunación contra TT antes de la gestación, y la determinación para usar dosis única de TT durante la gestación, es la historia de vacunación en mujeres en edad fértil (de 10 a 49 años) de acuerdo al esquema de vacunación incluido en el PAI colombiano que contempla 5 dosis de la vacuna Td, más refuerzos cada 10 años (**tabla 1.1**). En este grupo de estudio varias mujeres parecen tener escasa historia de vacunación, dados los niveles de IgG encontrados en las gestantes de primer trimestre; sin embargo, la vacunación durante el embarazo indujo un alza significativa de antiTT (**Figura 2.3 B, C**).

En el norte de la India hay datos que sugieren que 16% de las muertes neonatales (78 632 casos por año) pueden atribuirse a la falta de dos dosis de TT durante la gestación (69). Hay que mencionar que la OMS recomienda como mínimo dos dosis de la vacuna TT durante la gestación para asegurar la protección contra el tétanos materno y neonatal (70). Además, teniendo en cuenta el porcentaje de mujeres con niveles de antiTT cercanos a la

seronegatividad en el primer trimestre de gestación y la significativa disminución en los niveles de antiTT en los grupos de mujeres con infección, parece importante evaluar la efectividad de la inmunidad pasiva neonatal por vía transplacentaria en neonatos de mujeres con infección plasmodial.

2.5.2 Disminución en los niveles de IgG antiTT según la especie plasmodial causante de la infección gestacional.

El único estudio existente que evaluó el efecto de la infección malárica durante la gestación sobre la respuesta inmune contra TT fue desarrollado en África y solo abordó infecciones por *P. falciparum*. En este estudio se incluyeron mujeres infectadas con *P. vivax* en el momento del parto y con historia de infección por *P. vivax* durante el embarazo. Al comparar el efecto de cada especie parasitaria en la respuesta materna contra el TT, los grupos difirieron entre sí, y como se había reportado previamente (9), en este estudio la infección por *P. falciparum* en el momento del parto también redujo la respuesta materna frente al TT (**Figura 2.3 D**). De manera interesante, la historia de malaria por *P. vivax* durante el embarazo también causó esta reducción (**Figura 2.3 D**); probablemente por las posibles recaídas de la infección debido a la contraindicación de tratamiento hipnozoitocida contra esta especie parasitaria durante la gestación. Este hallazgo corrobora una publicación hecha previamente producto de esta tesis, en donde, en menor número de muestras, se encontró que la historia de infección por *P. vivax* durante el tercer trimestre de gestación se asoció con disminución en los niveles de IgG antiTT en gestantes colombianas (51).

2.5.3 Cambios transcripcionales en sangre periférica materna de mujeres con infección plasmodial

La infección submicroscópica por *Plasmodium* spp durante la gestación ya se había asociado con alteraciones transcripcionales en sangre periférica materna, encontrando un aumento en la expresión de las interleuquinas proinflamatorias IFN- γ y TNF (18, 19). Este estudio confirma estos hallazgos, puesto que también se encontró aumento en la expresión de IFN- γ y TNF en el grupo de mujeres con ISP-P, en comparación con las mujeres de los grupos con

IP-E y sin infección (**Figura 2.4 A, B**). Considerando que las infecciones submicroscópicas no son detectadas por los métodos de diagnóstico convencionales y, por eso, en general no son tratadas, se establecen como infecciones crónicas que generan una respuesta inflamatoria mantenida en el tiempo. En infecciones crónicas, la inflamación persistente es clave para el control del patógeno, pero su exceso conduce a daños tisulares; para el mantenimiento del equilibrio en la respuesta inmune es primordial la producción de interleuquinas antiinflamatorias. En este estudio la IL-10 también se observó aumentada en el grupo de mujeres con ISP-P (**Figura 2.4 C**); esta interleuquina inmunosupresora ha sido ampliamente estudiada en el contexto de la homeostasis del tejido y durante infecciones, y se ha demostrado que desempeña un papel clave en la supresión de muchos aspectos de una respuesta inmunitaria (71, 72).

Otras funciones de IL-10 en el mantenimiento del balance inmunológico son su contribución en la diferenciación a células T CD4⁺ reguladoras Tr1 y potenciar el efecto del TGF- β para la diferenciación a células Treg FoxP3⁺ (73). En infecciones microscópicas sintomáticas y asintomáticas, así como en ensayos *in vitro*, *Plasmodium* spp se ha asociado con el aumento en la diferenciación de células Treg (24, 62, 74, 75); además, infecciones placentarias crónicas también inducen la expansión de FoxP3 (22). Todo esto concuerda con los hallazgos de este estudio que muestra que en sangre periférica de mujeres con ISP-P hay aumento en la expresión de FoxP3, en comparación con los otros grupos de estudio (IP-E y control) (**Figura 2.5 A**).

De manera interesante, cuando evaluamos la expresión de los receptores CTLA-4 y TNF-RII, efectores de la respuesta reguladora de células Treg, observamos un aumento significativo en la expresión de ambos en el grupo de mujeres con ISP-P (**Figura 2.5 B, C**). La evidencia indica que la unión de TNF con TNF-RII promueve la activación y expansión de células Treg (76) y la expresión de TNF-RII es un marcador de máxima actividad supresora y replicativa de células Treg, en modelos murinos (77, 78), y ayuda a identificar células Treg funcionales en mononucleares de sangre periférica humanos (79). En relación con la infección plasmoidal, se ha reportado aumento del receptor TNF-RII en infecciones asintomáticas por *P. falciparum*, pero este disminuyó después de la administración del

tratamiento antimalárico (75). En contraste con lo anterior, en nuestro estudio la expresión del receptor TNF-RII también se encontró aumentada en el grupo de mujeres con IP-E (**Figura 2.5 C**); es importante recordar que en este grupo hay mujeres con infección submicroscópica durante la gestación, pero también, mujeres con historia de malaria microscópica durante la gestación, que fueron tratadas.

Apoyando nuestros resultados obtenidos con el receptor CTLA-4, otros estudios observaron un aumento en su expresión en linfocitos T activados, en infecciones agudas por *P. berghei* ANKA y por *P. falciparum* (63, 80). Además, en células mononucleares aisladas de sangre de cordón umbilical de casos de malaria placentaria por *P. falciparum*, también se observó un aumento en la frecuencia de células Treg CD4⁺CD25⁺CTLA-4⁺ con características supresoras (81). Esto demuestra el rol activo de CTLA-4 en el mantenimiento del equilibrio inmunológico contra *Plasmodium* spp como un regulador negativo de la activación de células T efectoras.

Un estudio *in vitro* mostró que glóbulos rojos parasitados con *P. falciparum* se adhieren a las células dendríticas, inhiben su maduración y posteriormente reducen su capacidad para estimular las células T (82). Estudios más recientes asociaron la infección plasmoidal con la alteración del funcionamiento de células presentadoras de antígenos y uno de los principales efectos encontrados es la disminución en la expresión de moléculas coestimuladoras; en Indonesia, en pacientes infectados por *P. vivax* o *P. falciparum*, se encontró reducción en la expresión de CD-86 (83), y en Brasil, 30% de los pacientes infectados con *P. vivax* mostraron baja expresión de CD-86 (84). Nosotros evaluamos la expresión de las moléculas coestimuladoras CD-86 y CD-40, pero solo observamos una disminución significativa en la expresión de CD-40, en el grupo de mujeres con ISP-P (**Figura 2.5 D**). Previamente se había descrito que la hemozoína podía inhibir la expresión del CMH-II y de moléculas coestimuladoras de superficie, que normalmente se regulan positivamente durante la diferenciación y maduración de las células dendríticas, entre ellas CD-83, CD-80, CD-54, CD-40 y CD-1a (85). Una reducción en la expresión de CD-40 puede ocasionar alteración en la producción de interleuquinas, inhibición de la maduración y migración de células dendríticas (86-88); adicionalmente, este receptor es esencial en la mediación del cambio de

isotipo de inmunoglobulina en respuesta a antígenos T dependientes, en el desarrollo de células B de memoria y en la formación de centros germinales (89).

Los resultados obtenidos en este estudio sobre los cambios transcripcionales maternos generados por la infección plasmodial y el aumento en la expresión de moléculas y receptores asociados a regulación, concuerdan con investigaciones que reportan disminución en la producción de IFN- γ , baja respuesta de células T a algunos mitógenos y aumento de células Treg en sangre de cordón de neonatos nacidos de mujeres con malaria placentaria (90-94). Dicha modulación negativa de la respuesta inmune del hospedero asociada con malaria por *P. falciparum* resulta en aumento de la susceptibilidad a bacteriemia en niños (95, 96) y alteración en la respuesta a la vacunación (9, 13, 97).

Por otra parte, el establecimiento de infecciones crónicas tiene un fuerte impacto en la capacidad funcional de las células T efectoras, induciendo una pérdida gradual de su función; fenómeno conocido como agotamiento de células T (27). La carga parasitaria y la duración de la exposición al antígeno, influyen de manera importante en la intensidad del agotamiento de las células T (98). En infecciones con baja carga parasitaria y constante exposición a *Plasmodium* spp, se encontró aumento en la expresión de los receptores reguladores PD-1 y LAG-3 (99, 100), un sello de agotamiento de la función de células T en infecciones parasitarias (101). Es importante discutir que un mecanismo de rescate en casos de agotamiento de células T CD8⁺, es la administración de anticuerpos anti PD-L1, y además, la administración de un agonista de CD-40 mejora el rescate funcional de dicha población celular (102). Con base en lo anterior y de acuerdo a nuestros resultados, la disminución en la expresión de CD-40 podría interferir de manera importante en la respuesta inmune de las gestantes, ocasionando la disminución en los niveles de IgG antiTT encontrado en las mujeres con infección incluidas en este estudio.

En resumen, este estudio demostró que las infecciones plasmodiales submicroscópicas y la historia de MAE, se asocian con disminución en la producción de IgG contra la vacuna TT, administrada en dosis única durante la gestación en mujeres colombianas. No conocemos si la disminución en los niveles de antiTT en esta población compromete la protección contra el tétanos materno y neonatal. Por otra parte, es posible que el impacto de esta disminución

sea mayor en infecciones microscópicas placentarias y gestacionales en comparación con infecciones submicroscópicas. Además, el perfil transcripcional encontrado en las mujeres con infección submicroscópica en el momento del parto, que muestra aumento en la expresión de las moléculas IL-10, FoxP3, CTLA-4 y TNF-RII, se puede asociar con los perfiles de agotamiento de células T encontrado previamente en infecciones crónicas. Así mismo, en Colombia las condiciones sociales existentes en zonas endémicas de malaria facilitan las coinfecciones parasitarias, las cuales, podrían potenciar las alteraciones en la respuesta inmunes efectora.

2.6 Referencias

1. Arango E, Maestre A, Carmona-Fonseca J. Efecto de la infección submicroscópica o policlonal de *Plasmodium falciparum* sobre la madre y el producto de la gestación. Revisión sistemática. Revista Brasileira de Epidemiologia. 2010;13(3):373-86.
2. Arango EM, Samuel R, Agudelo OM, Carmona-Fonseca J, Maestre A, Yanow SK. Genotype comparison of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* clones from pregnant and non-pregnant populations in North-west Colombia. Malar J. 2012;11:392.
3. Cottrell G, Moussiliou A, Luty AJ, Cot M, Fievet N, Massougbodji A, et al. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* Infections Are Associated With Maternal Anemia, Premature Births, and Low Birth Weight. Clin Infect Dis. 2015;60(10):1481-8.
4. Rijken MJ, De Livera AM, Lee SJ, Boel ME, Rungwilailaekhiri S, Wiladphaingern J, et al. Quantifying low birth weight, preterm birth and small-for-gestational-age effects of malaria in pregnancy: a population cohort study. PLoS One. 2014;9(7):e100247.
5. Malhotra I, Dent A, Mungai P, Wamachi A, Ouma JH, Narum DL, et al. Can prenatal malaria exposure produce an immune tolerant phenotype? A prospective birth cohort study in Kenya. PLoS Med. 2009;6(7):e1000116.
6. Dauby N, Goetghebuer T, Kollmann TR, Levy J, Marchant A. Uninfected but not unaffected: chronic maternal infections during pregnancy, fetal immunity, and susceptibility to postnatal infections. Lancet Infect Dis. 2012;12(4):330-40.
7. De Beaudrap P, Turyakira E, Nabasumba C, Tumwebaze B, Piola P, Boum Ii Y, et al. Timing of malaria in pregnancy and impact on infant growth and morbidity: a cohort study in Uganda. Malar J. 2016;15:92.
8. Moya-Alvarez V, Abellana R, Cot M. Pregnancy-associated malaria and malaria in infants: an old problem with present consequences. Malar J. 2014;13:271.
9. Cumberland P, Shulman CE, Maple PA, Bulmer JN, Dorman EK, Kawuondo K, et al. Maternal HIV infection and placental malaria reduce transplacental antibody transfer and tetanus antibody levels in newborns in Kenya. J Infect Dis. 2007;196(4):550-7.
10. Greenwood BM, Bradley-Moore AM, Bryceson AD, Palit A. Immunosuppression in children with malaria. Lancet. 1972;1(7743):169-72.
11. Gyhrs A, Pedersen BK, Bygbjerg I, Henrichsen J, Heron I, Petersen I, et al. The effect of prophylaxis with chloroquine and proguanil on delayed-type hypersensitivity and antibody production following vaccination with diphtheria, tetanus, polio, and pneumococcal vaccines. Am J Trop Med Hyg. 1991;45(5):613-8.
12. Labeaud AD, Malhotra I, King MJ, King CL, King CH. Do antenatal parasite infections devalue childhood vaccination? PLoS Negl Trop Dis. 2009;3(5):e442.
13. Walther B, Miles DJ, Waight P, Palmero MS, Ojuola O, Touray ES, et al. Placental malaria is associated with attenuated CD4 T-cell responses to tuberculin PPD 12 months after BCG vaccination. BMC Infect Dis. 2012;12:6.
14. Khan WA, Galagan SR, Prue CS, Khyang J, Ahmed S, Ram M, et al. Asymptomatic *Plasmodium falciparum* malaria in pregnant women in the Chittagong Hill Districts of Bangladesh. PLoS One. 2014;9(5):e98442.
15. Carmona-Fonseca J, Arango EM. Asymptomatic plasmodial infection in pregnant women: A global scenario. J Vector Borne Dis. 2017;54(3):201-6.
16. Desai M, Hill J, Fernandes S, Walker P, Pell C, Gutman J, et al. Prevention of malaria in pregnancy. Lancet Infect Dis. 2018;18(4):e119-e32.
17. Igboeli NU, Adibe MO, Ukwe CV, Aguwa NC. Prevalence of Low Birth Weight before and after Policy Change to IPTp-SP in Two Selected Hospitals in Southern Nigeria: Eleven-Year Retrospective Analyses. BioMed research international. 2018; 2018-2023

18. Agudelo OM, Aristizabal BH, Yanow SK, Arango E, Carmona-Fonseca J, Maestre A. Submicroscopic infection of placenta by *Plasmodium* produces Th1/Th2 cytokine imbalance, inflammation and hypoxia in women from north-west Colombia. *Malar J.* 2014;13:122.
19. Ibitokou SA, Boström S, Brutus L, Tuikue Ndam N, Vianou B, Agbowai C, et al. Submicroscopic infections with *Plasmodium falciparum* during pregnancy and their association with circulating cytokine, chemokine, and cellular profiles. *Clin Vaccine Immunol.* 2014;21(6):859-66.
20. Maizels RM. Infections and allergy - helminths, hygiene and host immune regulation. *Curr Opin Immunol.* 2005;17(6):656-61.
21. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(8):486-99.
22. Flanagan KL, Halliday A, Burl S, Landgraf K, Jagne YJ, Noho-Konteh F, et al. The effect of placental malaria infection on cord blood and maternal immunoregulatory responses at birth. *Eur J Immunol.* 2010;40(4):1062-72.
23. Walther M, Tongren JE, Andrews L, Korbel D, King E, Fletcher H, et al. Upregulation of TGF-beta, FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. *Immunity.* 2005;23(3):287-96.
24. Minigo G, Woodberry T, Piera KA, Salwati E, Tjitra E, Kenangalem E, et al. Parasite-dependent expansion of TNF receptor II-positive regulatory T cells with enhanced suppressive activity in adults with severe malaria. *PLoS Pathog.* 2009;5(4):e1000402.
25. González JL, Duque V, Velásquez-Lopera M. FOXP3: Controlador maestro de la generación y función de las células reguladoras naturales. *Inmunología.* 2010;29(2):10.
26. Walther M, Jeffries D, Finney OC, Njie M, Ebonyi A, Deininger S, et al. Distinct roles for FOXP3 and FOXP3 CD4 T cells in regulating cellular immunity to uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS Pathog.* 2009;5(4):e1000364.
27. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol.* 2011;12(6):492-9.
28. Schietinger A, Greenberg PD. Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction. *Trends Immunol.* 2014;35(2):51-60.
29. Belkaid Y. Role of Foxp3-positive regulatory T cells during infection. *Eur J Immunol.* 2008;38(4):918-21.
30. Liu L, Oza S, Hogan D, Chu Y, Perin J, Zhu J, et al. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000-15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. *Lancet.* 2016;388(10063):3027-35.
31. Thwaites CL, Loan HT. Eradication of tetanus. *Br Med Bull.* 2015;116:69-77.
32. Adekanle O, Ayodeji O, Olatunde L. Tetanus in a rural setting of South-Western Nigeria: a ten-year retrospective study. *Libyan J Med.* 2009;4(2):78-80.
33. Chalya PL, Mabula JB, Dass RM, Mbelenge N, Mshana SE, Gilyoma JM. Ten-year experiences with Tetanus at a Tertiary hospital in Northwestern Tanzania: A retrospective review of 102 cases. *World J Emerg Surg.* 2011;6:20.
34. Feroz A, Rahman H. A Ten-year Retrospective Study of Tetanus at a Teaching Hospital in Bangladesh. *Journal of Bangladesh College of Physicians and Surgeons.* 2007;25:62-9.
35. Marulappa VG, Manjunath R, Mahesh Babu N, Maligegowda L. A Ten Year Retrospective Study on Adult Tetanus at the Epidemic Disease (ED) Hospital, Mysore in Southern India: A Review of 512 Cases. *J Clin Diagn Res.* 2012;6(8):1377-80.
36. OPS/UNICEF. La región de las Américas elimina el tétanos materno y neonatal Washington, D.C.2017 [Available from: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=13696:americas-eliminates-maternal-neonatal-tetanus&Itemid=1926]=es.

37. INS. Informe de evento tétanos neonatal. Colombia 2017. p. 2- 8.
38. INS. Informe de evento tétanos neonatal. Colombia 2018. p. 2- 7.
39. Roper MH, Vandelaer JH, Gasse FL. Maternal and neonatal tetanus. *The Lancet*. 2007;370(9603):1947-59.
40. Kyu HH, Mumford JE, Stanaway JD, Barber RM, Hancock JR, Vos T, et al. Mortality from tetanus between 1990 and 2015: findings from the global burden of disease study 2015. *BMC public health*. 2017;(1):179-196
41. Morón-Duarte LS, Castillo-Pabón JO. Proceso de eliminación del Tétanos neonatal en Colombia 1989-2005. *Revista de Salud Pública*; Vol 16, Núm 5 (2014)DO - 1015446/rsapv16n551678. 2014.
42. Corrigall RJ. Asymptomatic malaria parasitaemia and the antibody response to tetanus toxoid vaccination. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1988;82(4):540-1.
43. Malhotra I, McKibben M, Mungai P, McKibben E, Wang X, Sutherland LJ, et al. Effect of antenatal parasitic infections on anti-vaccine IgG levels in children: a prospective birth cohort study in Kenya. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(1):e0003466.
44. van Riet E, Adegnikaa AA, Retra K, Vieira R, Tielens AG, Lell B, et al. Cellular and humoral responses to influenza in gabonese children living in rural and semi-urban areas. *J Infect Dis*. 2007;196(11):1671-8.
45. Álvarez-Larrotta C, Arango E, Carmona-Fonseca J. Negative immunomodulation by parasitic infections in the human response to vaccines. *J Infect Dev Ctries*. 2018;12:812-23
46. Mayer S, Laumer M, Mackensen A, Andreesen R, Krause SW. Analysis of the immune response against tetanus toxoid: enumeration of specific T helper cells by the Elispot assay. *Immunobiology*. 2002;205(3):282-9.
47. Piersma SJ, Leenaars MP, Guzylack-Piriou L, Summerfield A, Hendriksen CF, McCullough KC. An in vitro immune response model to determine tetanus toxoid antigen (vaccine) specific immunogenicity: Selection of sensitive assay criteria. *Vaccine*. 2006;24(16):3076-83.
48. Jurado A, Carballido J, Griffel H, Hochkeppel HK, Wetzel GD. The immunomodulatory effects of interferon-gamma on mature B-lymphocyte responses. *Experientia*. 1989;45(6):521-6.
49. Arango EM, Samuel R, Agudelo OM, Carmona-Fonseca J, Maestre A, Yanow SK. Molecular detection of malaria at delivery reveals a high frequency of submicroscopic infections and associated placental damage in pregnant women from northwest Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;89(1):178-83.
50. Gavina K, Gnidehou S, Arango E, Hamel-Martineau C, Mitran C, Agudelo O, et al. Clinical Outcomes of Submicroscopic Infections and Correlates of Protection of VAR2CSA Antibodies in a Longitudinal Study of Pregnant Women in Colombia. *Infect Immun*. 2018;86(4) 1-14.
51. Álvarez-Larrotta C, Agudelo OM, Duque Y, Gavina K, Yanow SK, Maestre A, et al. Submicroscopic Plasmodium infection during pregnancy is associated with reduced antibody levels to tetanus toxoid. *Clin Exp Immunol*. 2019;195(1):96-108.
52. Carmona-Fonseca, Jaime. La Región “Urabá Antioqueño-Cuencas altas de los ríos Sinú y San Jorge-Bajo Cauca Antioqueño”: “guardia” del paludismo colombiano. *Rev Univ Ind Santander*. 2017;49(4):12.
53. Arango Bautista C, Florez Gonzalez L, Restrepo BL, Sáenz Gómez R, Soto Avellaneda E. Resultados de la Evaluación de Medio Término del Proyecto Malaria Colombia. Uso de la inteligencia epidemiológica con participación social para fortalecer la gestión del programa, mejorar el acceso al diagnóstico y tratamiento y ejecutar intervenciones eficaces para la prevención y control de la malaria, Colombia, 2010-2015. 1 ed 2018. 62 p.
54. Carmona-Fonseca J, Arias MM, Correa Botero A, Lemos M. Malaria gestacional y condiciones de vida. *Medicina Social*. 2011;6. 97-107
55. Cortés DV, JF. Inequidad Regional en Colombia. Universidad del Rosario; 2012. p. 82.
56. López-Antuñano, Schmunis G F. Diagnóstico microscópico de los parásitos de la malaria en la sangre. *Diagnóstico de malaria Washington: OPSOMS*; 1988.39-50.

57. Plowe CV, Djimde A, Bouare M, Doumbo O, Wellem TE. Pyrimethamine and proguanil resistance-conferring mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase: polymerase chain reaction methods for surveillance in Africa. *Am J Trop Med Hyg.* 1995;52(6):565-8.
58. Shokoples SE, Ndao M, Kowalewska-Grochowska K, Yanow SK. Multiplexed real-time PCR assay for discrimination of *Plasmodium* species with improved sensitivity for mixed infections. *J Clin Microbiol.* 2009;47(4):975-80.
59. Broeders S, Huber I, Grohmann L, Berben G, Taverniers I, Mazzara M, et al. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends in Food Science & Technology.* 2014;37(2):115-26.
60. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):e45.
61. Bueno LL, Morais CG, Araújo FF, Gomes JA, Corrêa-Oliveira R, Soares IS, et al. *Plasmodium vivax*: induction of CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells during infection are directly associated with level of circulating parasites. *PLoS One.* 2010;5(3):e9623.
62. Finney OC, Lawrence E, Gray AP, Njie M, Riley EM, Walther M. Freeze-thaw lysates of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells induce differentiation of functionally competent regulatory T cells from memory T cells. *Eur J Immunol.* 2012;42(7):1767-77.
63. Mackroth MS, Abel A, Steeg C, Schulze Zur Wiesch J, Jacobs T. Acute Malaria Induces PD1+CTLA4+ Effector T Cells with Cell-Extrinsic Suppressor Function. *PLoS Pathog.* 2016;12(11):e1005909.
64. Cederbom L, Hall H, Ivars F. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol.* 2000;30(6):1538-43.
65. Oderup C, Cederbom L, Makowska A, Cilio CM, Ivars F. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology.* 2006;118(2):240-9.
66. Gbédandé K, Fievet N, Viwami F, Ezinmegnon S, Issifou S, Chippaux JP, et al. Clinical development of a VAR2CSA-based placental malaria vaccine PAMVAC: Quantifying vaccine antigen-specific memory B & T cell activity in Beninese primigravidae. *Vaccine.* 2017;35(27):3474-81.
67. Pinna D, Corti D, Jarrossay D, Sallusto F, Lanzavecchia A. Clonal dissection of the human memory B-cell repertoire following infection and vaccination. *European journal of immunology.* 2009;39(5):1260-70.
68. The immunological basis for immunization series: module 3: tetanus. Geneva: World Health Organization; 2018 1-71.
69. Singh A, Pallikadavath S, Ogollah R, Stones W. Maternal tetanus toxoid vaccination and neonatal mortality in rural north India. *PLoS One.* 2012;7(11):e48891.
70. Blencowe H, Lawn J, Vandelaer J, Roper M, Cousens S. Tetanus toxoid immunization to reduce mortality from neonatal tetanus. *Int J Epidemiol.* 2010;39 Suppl 1:i102-9.
71. Couper KN, Blount DG, Wilson MS, Hafalla JC, Belkaid Y, Kamanaka M, et al. IL-10 from CD4CD25Foxp3CD127 adaptive regulatory T cells modulates parasite clearance and pathology during malaria infection. *PLoS Pathog.* 2008;4(2):e1000004.
72. Estaquier J, Marguerite M, Sahuc F, Bessis N, Auriault C, Ameisen JC. Interleukin-10-mediated T cell apoptosis during the T helper type 2 cytokine response in murine *Schistosoma mansoni* parasite infection. *Eur Cytokine Netw.* 1997;8(2):153-60.
73. Hsu P, Santner-Nanan B, Hu M, Skarratt K, Lee CH, Stormon M, et al. IL-10 Potentiates Differentiation of Human Induced Regulatory T Cells via STAT3 and Foxo1. *J Immunol.* 2015;195(8):3665-74.
74. Jangpatarapongsa K, Chootong P, Sattabongkot J, Chotivanich K, Sirichaisinthop J, Tungpradabkul S, et al. *Plasmodium vivax* parasites alter the balance of myeloid and plasmacytoid dendritic cells and the induction of regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 2008;38(10):2697-705.

75. Wammes LJ, Wiria AE, Toenhake CG, Hamid F, Liu KY, Suryani H, et al. Asymptomatic plasmodial infection is associated with increased tumor necrosis factor receptor II-expressing regulatory T cells and suppressed type 2 immune responses. *J Infect Dis.* 2013;207(10):1590-9.
76. Chen X, Bäümel M, Männel DN, Howard OM, Oppenheim JJ. Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol.* 2007;179(1):154-61.
77. Chen X, Subleski JJ, Kopf H, Howard OM, Männel DN, Oppenheim JJ. Cutting edge: expression of TNFR2 defines a maximally suppressive subset of mouse CD4+CD25+FoxP3+ T regulatory cells: applicability to tumor-infiltrating T regulatory cells. *J Immunol.* 2008;180(10):6467-71.
78. Chen X, Oppenheim JJ. TNF-alpha: an activator of CD4+FoxP3+TNFR2+ regulatory T cells. *Curr Dir Autoimmun.* 2010;11:119-34.
79. Chen X, Subleski JJ, Hamano R, Howard OM, Wiltrout RH, Oppenheim JJ. Co-expression of TNFR2 and CD25 identifies more of the functional CD4+FOXP3+ regulatory T cells in human peripheral blood. *Eur J Immunol.* 2010;40(4):1099-106.
80. Hafalla JC, Claser C, Couper KN, Grau GE, Renia L, de Souza JB, et al. The CTLA-4 and PD-1/PD-L1 inhibitory pathways independently regulate host resistance to Plasmodium-induced acute immune pathology. *PLoS Pathog.* 2012;8(2):e1002504.
81. Brustoski K, Moller U, Kramer M, Hartgers FC, Kremsner PG, Krzych U, et al. Reduced cord blood immune effector-cell responsiveness mediated by CD4+ cells induced in utero as a consequence of placental Plasmodium falciparum infection. *J Infect Dis.* 2006;193(1):146-54.
82. Urban BC, Ferguson DJP, Pain A, Willcox N, Plebanski M, Austyn JM, et al. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. *Nature.* 1999;400:73.
83. Pinzon-Charry A, Woodberry T, Kienzle V, McPhun V, Minigo G, Lampah DA, et al. Apoptosis and dysfunction of blood dendritic cells in patients with falciparum and vivax malaria. *J Exp Med.* 2013;210(8):1635-46.
84. Gonçaves RM, Salmazi KC, Santos BAN, Bastos MS, Rocha SC, Boscardin SB, et al. CD4+CD25+Foxp3+Regulatory T Cells, Dendritic Cells, and Circulating Cytokines in Uncomplicated Malaria: Do Different Parasite Species Elicit Similar Host Responses? *Infection and Immunity.* 2010;78(11):4763.
85. Skorokhod OA, Alessio M, Mordmüller B, Arese P, Schwarzer E. Hemozoin (malarial pigment) inhibits differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells: a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated effect. *J Immunol.* 2004;173(6):4066-74.
86. Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol.* 1997;9(1):10-6.
87. Moodycliffe AM, Shreedhar V, Ullrich SE, Walterscheid J, Bucana C, Kripke ML, et al. CD40-CD40 ligand interactions in vivo regulate migration of antigen-bearing dendritic cells from the skin to draining lymph nodes. *J Exp Med.* 2000;191(11):2011-20.
88. O'Sullivan B, Thomas R. CD40 and dendritic cell function. *Crit Rev Immunol.* 2003;23(1-2):83-107.
89. Grewal IS, Flavell RA. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:111-35.
90. Adegnika AA, Köhler C, Agnandji ST, Chai SK, Labuda L, Breitling LP, et al. Pregnancy-associated malaria affects toll-like receptor ligand-induced cytokine responses in cord blood. *J Infect Dis.* 2008;198(6):928-36.
91. Bisseye C, van der Sande M, Morgan WD, Holder AA, Pinder M, Ismaili J. Plasmodium falciparum infection of the placenta impacts on the T helper type 1 (Th1)/Th2 balance of neonatal T cells through CD4(+)/CD25(+) forkhead box P3(+) regulatory T cells and interleukin-10. *Clin Exp Immunol.* 2009;158(3):287-93.

92. Fievet N, Ringwald P, Bickii J, Dubois B, Maubert B, Le Hesran JY, et al. Malaria cellular immune responses in neonates from Cameroon. *Parasite Immunol.* 1996;18(10):483-90.
93. Ismaili J, van der Sande M, Holland MJ, Sambou I, Keita S, Allsopp C, et al. *Plasmodium falciparum* infection of the placenta affects newborn immune responses. *Clin Exp Immunol.* 2003;133(3):414-21.
94. Nouatin O, Gbédandé K, Ibitokou S, Vianou B, Houngbegnon P, Ezinmegnon S, et al. Infants' Peripheral Blood Lymphocyte Composition Reflects Both Maternal and Post-Natal Infection with *Plasmodium falciparum*. *PLoS One.* 2015;10(11):e0139606.
95. Davenport GC, Hittner JB, Otieno V, Karim Z, Mukundan H, Fenimore PW, et al. Reduced Parasite Burden in Children with *Falciparum* Malaria and Bacteremia Coinfections: Role of Mediators of Inflammation. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:4286576.
96. Takem EN, Roca A, Cunnington A. The association between malaria and non-typhoid *Salmonella* bacteraemia in children in sub-Saharan Africa: a literature review. *Malar J.* 2014;13:400.
97. Lule SA, Mawa PA, Nkurunungi G, Nampijja M, Kizito D, Akello F, et al. Factors associated with tuberculosis infection, and with anti-mycobacterial immune responses, among five year olds BCG-immunised at birth in Entebbe, Uganda. *Vaccine.* 2015;33(6):796-804.
98. Gigley JP, Bhadra R, Moretto MM, Khan IA. T cell exhaustion in protozoan disease. *Trends Parasitol.* 2012;28(9):377-84.
99. Butler NS, Moebius J, Pewe LL, Traore B, Doumbo OK, Tygrett LT, et al. Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clears established blood-stage *Plasmodium* infection. *Nat Immunol.* 2011;13(2):188-95.
100. Illingworth J, Butler NS, Roetynck S, Mwacharo J, Pierce SK, Bejon P, et al. Chronic exposure to *Plasmodium falciparum* is associated with phenotypic evidence of B and T cell exhaustion. *J Immunol.* 2013;190(3):1038-47.
101. Rodrigues V, Cordeiro-da-Silva A, Laforge M, Ouaisi A, Akharid K, Silvestre R, et al. Impairment of T cell function in parasitic infections. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(2):e2567.
102. Bhadra R, Gigley JP, Khan IA. Cutting edge: CD40-CD40 ligand pathway plays a critical CD8-intrinsic and -extrinsic role during rescue of exhausted CD8 T cells. *J Immunol.* 2011;187(9):4421-5.

3 Capítulo 3:

Efecto de la MAE sobre la inmunización pasiva neonatal contra toxoide tetánico y rotavirus

3.1 Planteamiento del problema

3.1.1 Importancia de la inmunidad pasiva neonatal transplacentaria

Los neonatos se enfrentan a gran cantidad de organismos patógenos y cuentan con un sistema inmune con perfil tolerogénico y sin experiencia, lo que los hace vulnerables a las infecciones (1, 2). Por tanto, la inmunidad pasiva neonatal adquirida por vía transplacentaria es fundamental para proporcionar inmunidad frente a las infecciones en la vida temprana (3). La vacunación en el embarazo es una estrategia que tiene como objetivo proteger tanto a la madre como al bebé, al aumentar la concentración de IgG maternas específicas, que son pasadas al producto gestacional por vía transplacentaria mediante transporte activo (4). La presencia de anticuerpos maternos protege al lactante durante los primeros meses de vida y a través de la lactancia materna se transmiten al neonato elementos que complementan la respuesta inmunitaria y, principalmente, anticuerpos tipo IgA secretores (IgAs), que actúan protegiendo al neonato frente a las enfermedades que tienen su vía de entrada a través de las mucosas (5).

Diferentes factores asociados a la madre, al neonato y al tipo de IgG, influyen en el paso de anticuerpos maternos por vía transplacentaria:

a. Factores asociados a la madre: incluyen hipergammaglobulinemia (6, 7), la malnutrición (8), la diabetes mellitus (9) y las infecciones crónicas (6, 7, 10-15), en las cuales el VIH y la malaria placentaria microscópica por *P. falciparum* son las más estudiadas. La edad gestacional es otro factor materno que determina la cantidad de anticuerpos que pasan

a través de la placenta. Durante el primer trimestre de la gestación, la transferencia de anticuerpos es mínima (16), pero a partir del segundo trimestre, la cantidad de anticuerpos que se transfiere, aumenta a medida que aumentan las semanas gestacionales: entre las semanas 17 a la 22 pasa alrededor de 10% de la concentración materna de anticuerpos; entre las semanas 23 a la 27 pasa aproximadamente el 30%; entre las semanas 28 a la 32 pasa alrededor del 50%; entre las semanas 33 a la 36 pasa cerca del 100% de la concentración materna de anticuerpos (17). Al término del embarazo los niveles de anticuerpos fetales varían, pero, generalmente exceden en 20 a 30% la concentración de anticuerpos maternos (17-19).

b. Factores asociados al neonato: incluyen el parto prematuro y el bajo peso al nacer (20). La respuesta inmune en niños prematuros (<37 semanas) (21) es reducida y su capacidad de responder adecuadamente a infecciones puede ser deficiente, ya que, hay una limitada producción de factores solubles como péptidos e inmunoglobulinas, por lo que depende de la disponibilidad materna. IgG específica es transferida a través de la placenta de la circulación materna en grandes cantidades después de 32 semanas de gestación (2). La transferencia aumenta con la edad fetal, por lo que los bebés prematuros tienen niveles bajos de IgG materna circulante (2, 22). Los niveles bajos de IgG resultan en una falta de opsonización, lo que conduce a deficiencias en la fagocitosis (23) aumentando el riesgo de infección neonatal.

c. Factores asociados al tipo de IgG: se conoce que las subclases IgG1, IgG4 e IgG3 son transferidas de manera más efectiva que la IgG2 (24); por lo tanto, en la inmunidad pasiva neonatal predominan anticuerpos contra antígenos proteicos solubles y asociados a membrana, sobre anticuerpos específicos de polisacáridos bacterianos. Los anticuerpos frente al estreptococo son de tipo IgG2 y son transferidos de forma menos eficiente que los anticuerpos antitetánicos de la subclase IgG1. Por último, son los anticuerpos con mayor actividad (avidez) los que se transfieren al neonato (5).

3.1.2 MAE e inmunidad pasiva neonatal transplacentaria

Diferentes estudios han explorado el efecto de la malaria placentaria microscópica por *P. falciparum* en la transferencia transplacentaria de anticuerpos maternos. Aunque algunos resultados son discordantes, la mayoría de los estudios ha encontrado una asociación entre la malaria placentaria microscópica y la disminución del paso de anticuerpos maternos vía cordón umbilical. Estudios en África indican que la malaria placentaria se asocia con reducción de 81% (13) y de 72% (7) en el paso de anticuerpos maternos contra el virus del sarampión. Además, la malaria placentaria también se asoció con reducción de 69%, 58% y 55% en el paso de anticuerpos maternos contra el Virus Herpes Simple-1, Virus Sincitial Respiratorio y Virus Varicela Zoster, respectivamente (6). Otros estudios no encontraron disminución en el paso de anticuerpos maternos por vía del cordón umbilical contra sarampión (15) y Virus Sincitial Respiratorio (10).

Hay estudios que encontraron asociación entre la infección plasmodial placentaria y la disminución de 82% en el paso de anticuerpos contra polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* (13) y una disminución en el paso de anticuerpos maternos contra TT (11, 12). No obstante, otros autores no encontraron disminución en el paso de anticuerpos maternos contra TT en casos de malaria placentaria (7, 13). Además, en infecciones crónicas por *P. falciparum* se reporta hipergammaglobulinemia, que también se asocia con alteración en la inmunidad pasiva neonatal (6, 7, 10). El mecanismo por el cual se disminuye el paso de anticuerpos cuando hay malaria placentaria es poco entendido y los estudios realizados no han explorado las alteraciones que causa la infección en la placenta y que puedan asociarse con la reducción en la transferencia de anticuerpos.

Otro efecto de la MAE que disminuye la cantidad de anticuerpos transferidos por vía transplacentaria, es la alteración de la respuesta inmune materna frente a la vacuna del TT (25). Dos estudios realizados en África (12, 26) y uno en Colombia (27), muestran una reducción significativa en los niveles de anticuerpos contra el TT en gestantes con infección plasmodial microscópica o submicroscópica, tras la vacunación, lo que hace que menor cantidad de anticuerpos sea transferida al feto.

Las infecciones submicroscópicas por *P. falciparum* son comunes en mujeres embarazadas (28). En Colombia, en la región de Urabá antioqueño-Cuencas altas de los ríos Sinú y San Jorge en Córdoba-Bajo Cauca antioqueño, se observó una alta frecuencia de MAE (45%) y 79% de estas infecciones fueron submicroscópicas (29). Es importante resaltar que en esta región cocirculan *P. falciparum* y *P. vivax* y se encuentran infecciones gestacionales y placentarias tanto microscópicas como submicroscópicas por las dos especies (30-33). Las infecciones submicroscópicas son consideradas crónicas, ya que no son tratadas; por tanto, hay un constante estímulo antigénico que causa cambios en los perfiles transcripcionales debidos a la inflamación persistente (34, 35). Se cree que la inflamación que causa la malaria placentaria (36, 37) se asocia con la disminución en la inmunidad pasiva neonatal por esta vía; sin embargo, ningún estudio previo ha evaluado aspectos de la placenta que explicaran esta disminución. Diferentes estudios muestran alteraciones en la estructura placentaria en infecciones plasmodiales placentarias tanto microscópicas, como submicroscópicas (36, 38, 39). La alteración en los perfiles transcripcionales placentarios de mediadores inmunes de inflamación y antiinflamación ya descritos (40, 41) puede alterar el equilibrio molecular de la interfase materno-fetal y procesos como la inmunidad pasiva neonatal. Es importante evaluar los cambios placentarios causados por la infección plasmodial que puedan explicar la reducción en la inmunidad pasiva transplacentaria informada por otros estudios.

3.1.3 Importancia de la inmunidad pasiva neonatal antitetánica

El TT es un antígeno proteico que induce anticuerpos IgG1, que corresponde a la subclase de IgG más producida y que se transporta de manera más eficiente a través de la placenta (42). La vacuna del TT es administrada durante la gestación hacia el último trimestre, cuando aumenta el paso materno de anticuerpos por vía transplacentaria. La vacunación materna oportuna y de calidad previene el tétanos materno y neonatal, ya que el aumento de anticuerpos por la vacunación mejora la cantidad de anticuerpos transferidos al feto, alcanzando niveles protectores tanto en la madre como en el neonato a término; y esta protección aumenta con dos o más dosis de la vacuna durante la gestación (43).

La enfermedad tetánica se debe a la contaminación de las heridas con esporas de la bacteria *Clostridium tetani* en individuos sin anticuerpos protectores circulantes. En el tétanos

materno la infección ocurre después de abortos o prácticas de parto poco higiénicas; mientras que la infección neonatal por tétanos generalmente ocurre a través del muñón umbilical después del parto. La falta de vacunación materna y la mala higiene perinatal contribuyen a la aparición de la enfermedad. La mortalidad por tétanos materno y neonatal es alta; en Asia y África se reportan tasas de mortalidad en adultos de hasta 52% (44-47). La mortalidad neonatal es aún mayor, puede llegar hasta 88% en estas mismas regiones (48-51).

3.1.4 Inmunidad pasiva neonatal frente a rotavirus

Por otra parte, en la inmunidad pasiva neonatal también se facilita el paso de anticuerpos IgG contra diferentes antígenos a los que madre ha sido expuesta de manera natural. La diarrea es la segunda causa de muerte en niños alrededor del mundo y el rotavirus es el patógeno más frecuentemente asociado con diarrea grave (52). Más de 90% de las muertes causadas por rotavirus ocurren en países de medianos y bajos ingresos (53); en América Latina solo la diarrea por rotavirus causó más de 70 mil hospitalizaciones anuales y 15 mil muertes entre 1990 y 2009 (54).

Es importante resaltar que existe un periodo de susceptibilidad neonatal a adquirir la infección por rotavirus en los dos primeros meses de vida, considerando que la primera dosis de esta vacuna está indicada en el segundo mes de vida. En este periodo de tiempo de susceptibilidad, los neonatos pueden tener IgG específica contra rotavirus adquirida por vía transplacentaria e IgAs en mucosas específica contra rotavirus adquirida por lactancia materna, que disminuyen el impacto de infecciones graves por rotavirus antes de la vacunación; no obstante, tanto la IgG, como la IgAs contra rotavirus adquiridas de la madre se ha demostrado que interfieren con la respuesta inmune frente a vacunas orales contra rotavirus (55-57).

En 2006, dos vacunas contra rotavirus fueron licenciadas, la vacuna rotavirus serotipo 1 (RV1) y la vacuna rotavirus con 5 serotipos (RV5) que son vacunas vivas atenuadas, y al menos una de estas fue incluida en los programas de inmunización neonatal de 16 países de América Latina. La efectividad de la vacuna varía entre países, sin embargo, desde la implementación de estas vacunas se notificó una reducción de aproximadamente 70% de los

casos graves de diarrea por rotavirus, hospitalizaciones y consultas ambulatorias por diarrea en estudios realizados en Brasil, México y Panamá (58-63).

En Colombia, la vacuna RV1 fue incluida en el PAI en 2009, con la primera dosis en el segundo mes de vida y la segunda dosis en el cuarto mes. Para el año 2010 la cobertura de vacunación en nuestro país era de 87,3% (64). La eficacia vacunal en Colombia determinada en estudios de casos y controles fue de 55,8%, aplicada a la edad recomendada y en dosis completa (65), y la efectividad de la vacuna en la reducción de hospitalizaciones fue de 84% (66).

A pesar de la vacunación, la enfermedad diarreica aguda en Colombia aún es causa importante de mortalidad y hospitalizaciones infantiles. En un estudio centinela realizado por el Instituto Nacional de Salud, en el año 2016 se observó que 12,6% de los casos de enfermedad diarreica aguda que consultaron en centros hospitalarios, fueron debidos a rotavirus; además, 81% de estos casos tuvo historia de vacunación contra rotavirus (67).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, la importancia de la inmunidad pasiva por vía transplacentaria para la protección neonatal durante los primeros meses de vida y el siguiente grupo de hallazgos importantes, resumidos así: 1) el reporte de la OMS que describe que del total de muertes de niños menores de 5 años, 37% son muertes neonatales (antes de los 28 días de vida) (53); 2) las tres primeras causas de muerte en menores de 5 años son la neumonía (19%), la diarrea (17%) y la malaria (8%) (53); 3) dentro de las causas de muerte neonatal, el tétanos aporta 7% y la diarrea 3% (53); 4) la malaria por *P. falciparum* y *P. vivax* en el embarazo aumenta 2,55 y 1,98 veces, respectivamente, el riesgo de muerte neonatal (68); 5) la malaria recurrente durante el embarazo se asocia con mayor riesgo de infección respiratoria aguda y diarrea durante la infancia (69), en esta parte del estudio se tuvo como objetivo general evaluar la influencia de la MAE sobre la transferencia de anticuerpos IgG maternos contra TT y rotavirus al neonato, en gestantes residentes habituales en zonas colombianas endémicas de paludismo.

3.2 Objetivos específicos

En el momento del parto de mujeres con y sin infección plasmodial submicroscópica en el parto y con y sin historia de infección gestacional durante el embarazo (cualquier momento antes del parto):

1. Comparar los niveles de IgG contra TT y rotavirus en sangre periférica materna y en sangre de cordón umbilical (niveles maternos vs. niveles del cordón).
2. Comparar el paso de anticuerpos maternos contra TT y rotavirus vía cordón umbilical, de acuerdo con la especie plasmodial.
3. Comparar los niveles de expresión en el tejido placentario de moléculas proinflamatorias, antiinflamatorias, coestimuladoras y reguladoras de la respuesta inmune.

3.3 Metodología

3.3.1 Lugar de estudio

El lugar de estudio corresponde a los municipios de Tierralta y Puerto Libertador, Córdoba. La descripción del lugar fue hecha en el capítulo 2 (página 79).

3.3.2 Población de estudio y diseño

Para evaluar el papel de la MAE sobre la transferencia de anticuerpos IgG maternos contra TT y rotavirus al neonato, se conformaron por conveniencia los grupos de estudio previamente descritos en el **capítulo 2** (página 83) con los siguientes n por grupo **ISP-P** n=50, **IP-E** n=50 y **grupo control** n=25.

Para la selección del grupo control se tuvo en cuenta: 1) negatividad en la condición de infección microscópica y submicroscópica desde el control prenatal del primer trimestre hasta el parto inclusive; y 2) calidad y cantidad de muestras sanguíneas disponibles de madre, cordón y tejido placentario. Para ninguna de estas gestantes incluidas en los grupos de estudio

se tuvo en cuenta la vacunación contra TT previa ni en el embarazo actual, por tanto son grupos independientes de los grupos de estudio del capítulo 2.

3.3.2.1 Infección plasmodial en los grupos de estudio

Los grupos de estudio se escogieron de acuerdo con la condición de infección. El grupo de infección submicroscópica en el parto ISP-P se seleccionaron con base en los resultados obtenidos en la qPCR diagnóstica. Este grupo cuenta con 25 mujeres con infección gestacional en el momento del parto y 25 mujeres con infección placentaria. En cuanto a las especies causantes de la infección, 40% de las mujeres presentaron infección por *P. falciparum*, 54% por *P. vivax* y 6% presentaron infección mixta. Con relación a las 50 mujeres del grupo con historia de infección durante el embarazo (IP-E), se incluyeron mujeres con infección microscópica, determinada por gota gruesa, o submicroscópica, determinada por qPCR en uno o más controles prenatales en cualquier trimestre de la gestación. En este grupo, 50% de las mujeres tuvieron infección submicroscópica y 50% microscópica. En cuanto a la distribución de las especies causales en este grupo, 66% fueron *P. vivax*, 32% *P. falciparum* y 2% infección mixta. Para la selección del grupo control se verificó que las pruebas diagnósticas, tanto microscópica como molecular, fueran negativas en todos los controles prenatales hasta el parto inclusive.

3.3.3 Criterios de inclusión, recolección de datos y muestras y diagnóstico de la infección plasmodial.

Los criterios de inclusión y la recolección de muestras fueron descritos en el capítulo 2 y pueden ser consultados en la página 84. La infección plasmodial fue determinada como se describe en el capítulo 2 en la página 85.

3.3.4 Cuantificación relativa de la expresión de mediadores inmunes en tejido placentario.

Se realizó la extracción de ARN de tejido placentario con el estuche comercial QIAamp RNA Blood Mini® (Qiagen), a partir del tejido almacenado a 4°C en RNALater® (Qiagen), teniendo en cuenta las instrucciones del fabricante. La PCR para la cuantificación relativa

con un ensayo Taqman, se hizo con el juego de reactivos EXPRESS One-Step Superscript™ (Invitrogen), a partir de ARN. Para todas las reacciones de PCR se usó un equipo StepOnePlus™ Real-Time PCR System de Applied Biosystems™, con las condiciones de ciclaje sugeridas por el fabricante (50°C por 20 minutos (síntesis de ADNc), 95°C por 2 minutos y 40 ciclos de 95°C por 15 segundos y 60°C por 1 minuto). El volumen final de reacción fue de 20 µL, con 10µL de mezcla EXPRESS One-Step Superscript™ y 2 µL de ARN.

Por cada reacción se incluyeron dos controles negativos (agua libre de ARNasas), una muestra de referencia (mezcla ARN de 10 placentas de mujeres sanas residentes de la zona) y el gen constitutivo (β actina), que fue cuantificado tanto en las muestras problema, como en la muestra de referencia. Todas las reacciones fueron montadas por triplicado. Las reacciones de PCR para cada molécula fueron estandarizadas con una curva estándar, teniendo en cuenta la eficiencia y la pendiente obtenida en la curva. El estándar empleado para hacer la curva fue ARN de la línea celular de trofoblasto placentario BeWo. Fueron validados los ensayos que obtuvieran una eficiencia entre 90 y 110%, una pendiente entre -2,98 y -3,65 (Broeders et al., 2014) y una linealidad igual o mayor a 0,98. Para la cuantificación relativa se aplicó el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de Pfaffl (70), con el cual se determinan los cambios en los niveles de expresión de los mediadores inmunes en relación con los niveles de expresión del gen constitutivo y de la muestra de referencia. La lista de cebadores y sondas, que fueron diseñados en este estudio, se presenta en la **Tabla 2.4** del capítulo 2.

3.3.5 Cuantificación de los niveles de IgG contra TT

El método para la cuantificación de los niveles de IgG antiTT fue descrito en el capítulo 2 y puede ser consultado en la página 88.

3.3.6 Cuantificación de los niveles de IgG contra rotavirus

Los niveles de IgG antirrotavirus (antiRV) fueron cuantificados mediante ELISA de acuerdo con el protocolo de Rojas et al 2008 (71), con modificaciones menores. Platos de 96 pozos Immulon® 2HB fueron cubiertos con sobrenadante de células MA104 infectadas con la cepa

de Rotavirus 89-12 (donación del Dr. Manuel Antonio Franco, Instituto de Genética Humana, Pontificia Universidad Javeriana) o con sobrenadante de cultivo MA104 no infectado como control negativo (control mock), e incubados toda la noche a 4°C. Después de bloquear sitios de unión inespecífica, las muestras fueron diluidas 1:400 en PBS1x con Tween 20 al 0,01% y BSA 0,1% y 70 µL fueron adicionados en los pozos; los platos se incubaron durante 2 horas a 37°C. Luego de la incubación los platos se lavaron 3 veces y se adicionaron 70 µL de antiIgG humana marcada con peroxidasa (A0170 Sigma), diluida 1:6000 en PBS1x con Tween 20 al 0,01% y BSA 0,1%. Posteriormente, los platos fueron lavados 3 veces y para revelar la reacción se utilizaron 100 µL de sustrato TMB (T0440 Sigma). La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 1M y los platos fueron leídos en el lector de ELISA Labsystems Multiskan microplate reader (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) a 450 nm. Diluciones seriales de una mezcla de sueros de niños con anticuerpos IgG antirrotavirus fueron usados como control positivo, y el suero de un niño sin evidencia de infección previa por rotavirus o de transferencia placentaria de anticuerpos IgG maternos antiRV, se utilizó como control negativo (seronegativo para IgG e IgA contra rotavirus).

Para el análisis de los datos, los valores de absorbancia fueron convertidos a unidades arbitrarias (UA) usando la siguiente formula: $UA = \frac{[densidad\ óptica\ (DO)\ suero\ problema - DO\ control\ mock]}{(DO\ mezcla\ control\ positivo - DO\ control\ mock)} \times 100$ (Gnidehou et al., 2018). El punto de corte de seropositividad se estableció teniendo en cuenta el suero control no expuesto; en este suero el valor de UA obtenidas fue de 11,3; por tanto, los valores de UA por debajo de 11,3 fueron considerados seronegativos para IgG antiRV. Los ensayos fueron validados teniendo en cuenta que la mezcla de sueros control positivo no varió significativamente de plato a plato. Cada muestra de suero de sangre periférica materna y de sangre de cordón umbilical fue evaluada por duplicado.

3.3.7 Análisis estadístico

La mayoría de las variables analizadas no presentaron distribución normal, según la prueba de Kolmogorov–Smirnov y Shapiro–Wilk aplicadas según correspondió de acuerdo al número de muestras por grupo; por tal razón, las pruebas no paramétricas Kruskal–Wallis y Mann-Whitney fueron empleadas para evaluar las diferencias entre los grupos. El análisis

estadístico fue realizado con el programa IBM SPSS Statistics, versión 24. El nivel de significación estadística se estableció con $p < 0,05$. Cuando se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con la prueba de Kruskal–Wallis, se hicieron comparaciones múltiples con la prueba de Dunn. Para comparar los niveles de anticuerpos en madre y cordón umbilical en cada uno de los grupos, se utilizó la prueba no paramétrica para muestras relacionadas de Wilcoxon. El coeficiente de correlación no paramétrico rho de Spearman fue usado para medir la correlación entre las variables, con su correspondiente prueba estadística t de Student.

3.4 Resultados

3.4.1 Características generales de las mujeres y los neonatos

Las características generales de las mujeres del estudio se muestran en la **tabla 3.1**. La edad de las madres y la edad gestacional al parir fueron similares en grupos evaluados (ISP-P; IP-E; Control). Sin embargo, al evaluar el número de partos, se observó una diferencia significativa entre los grupos ($p=0,049$) y al hacer la corrección para comparaciones múltiples con la prueba de Dunn se observó que las mujeres con ISP-P tienen mayor paridad que el grupo con IP-E, pero estos dos grupos no fueron diferentes del grupo control. Alrededor del 48% de las mujeres de los grupos ISP-P e IP-E tenían anemia en el momento del parto (hemoglobina < 11 g/dL), mientras que en el grupo control ninguna mujer presentó anemia; además, se observó una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de hemoglobina entre los grupos evaluados ($p=0,001$) y cuando se realizó la corrección para comparaciones múltiples se observó que los grupos con infección tenían menores niveles de hemoglobina que el grupo de las mujeres negativas ($p < 0,001$).

Cuando se analizó el peso de los neonatos no se observó diferencias significativas entre los grupos evaluados; solo 3% (4/123) de los recién nacidos presentaron bajo peso al nacer (< 2500 g) y estos casos solo se presentaron en los grupos con infección plasmodial (2 en ISP-P y 2 en IP-E).

Tabla 3. 1. Características generales de gestantes y neonatos según estado de infección

Variable	Grupo ISP-P			Grupo IP-E			Control			p(K-W)
	N	Me	RIC	N	Me	RIC	N	Me	RIC	
Edad de gestante (años)	50	22,5	19-27	49	20	16-26	25	22	18-28	0,312
Número de partos	50	2	1-4	49	1	1-3	25	2	1-4	0,049
Edad gestacional (semanas)	50	39	37,8-39	49	39	38-39	25	38	38-39,5	0,313
Nivel hemoglobina (g/dL)	46	10,8	10,2-11,9	29	11	10-11,5	25	11,9	11,2-12,4	0,001
Peso del neonato (g)	50	3000	2675-3300	48	3100	2900-3475	25	3100	2975-3500	0,139

Me, mediana. RIC, rango intercuartílico 25-75%. g/dL, gramos/ decilitro. g, gramos. KW: Kruskal-Wallis

3.4.2 Niveles de IgG antiTT y antiRV en sangre periférica materna y de cordón umbilical

Los niveles de IgG antiTT y antiRV en sangre periférica materna fueron similares en los tres grupos (**Tabla 3.2**), pero en sangre de cordón umbilical se halló diferencia en los niveles de anticuerpos antiTT ($p=0,0014$) (**Tabla 3.2**), pero no en los niveles de antiRV (**Tabla 3.2**). La prueba de Dunn mostró menores niveles de antiTT en cordón umbilical en los grupos con infección, es decir ISP-P ($p<0,001$) e IP-E ($p<0,05$), con respecto al grupo control (sin infección).

Tabla 3.2 Niveles de IgG antiTT y antiRV en sangre periférica materna y cordón umbilical

IgG antiTT UI/mL	ISP-P		IP-E		Control		p (K-W)
	Me	RIC	Me	RIC	Me	RIC	
Sangre materna	4,5	3,5-5,2	4,2	3,8-5	4,9	4,3-5,4	0,0659
Cordón	4,5	3,1-4,9	4,7	3,5-5,2	5,2	4,8-5,4	0,0014
UA antiRV	ISP-P		IP-E		Control		p(K-W)
	Me	RIC	Me	RIC	Me	RIC	
Sangre materna	52	27-71	54	26-77	42	30-61	0,2907
Cordón	64	35-90	57	25-83	51	29-84	0,6814

Me, mediana. RIC, rango intercuartílico 25-75%. UI/mL: unidades internacionales por mililitro. UA: unidades arbitrarias. KW: Kruskal-Wallis

Para evaluar la transferencia pasiva de anticuerpos maternos al cordón umbilical, se comparó el nivel de anticuerpos en sangre materna con el nivel de anticuerpos en cordón umbilical, en cada grupo de estudio, con la prueba de Wilcoxon. En el grupo ISP-P hubo diferencias significativas entre los niveles de IgG madre versus cordón de antiRV ($p=0,0054$) (**Figura 3.1 A**) y de antiTT ($p=0,0002$) (**Figura 3.1 B**), con mayor cantidad de antiTT en la madre que en el cordón y mayor cantidad de antiRV en el cordón que en la madre. En el grupo IP-E no hubo diferencias en nivel de ninguno de los dos tipos de anticuerpos entre madre y cordón (**Figura 3.1 A, B**). El grupo control mostró diferencia en antiTT ($p=0,0079$), con mayor cantidad de antiTT en el cordón que en la madre (**Figura 3.1 B**).

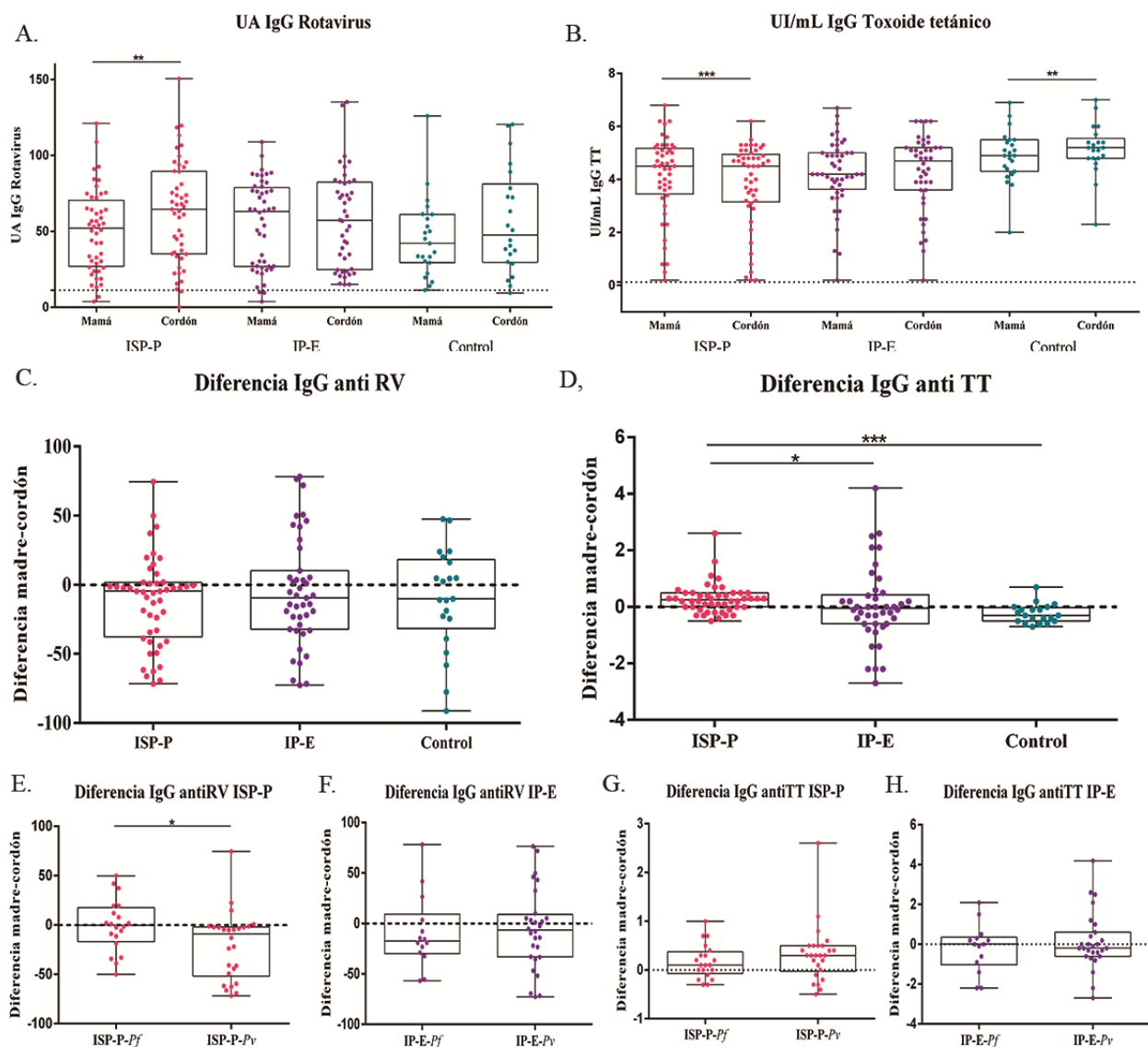
Se graficaron las diferencias pareadas entre el nivel de anticuerpos maternos menos el nivel de anticuerpos en cordón umbilical, por cada grupo de estudio. Las diferencias con valores negativos indican mayores niveles de anticuerpos en sangre de cordón umbilical y las diferencias con valores positivos indican menor cantidad de anticuerpos específicos en sangre de cordón. Adicionalmente, los valores de las diferencias hallados en las muestras pareadas entre IgG de la madre menos el IgG del cordón fueron usadas para comparar los grupos de estudio con la prueba Kruskal-Wallis. Solo los valores de diferencias en los niveles de antiTT difirieron entre los grupos ($p=0,0007$) y la prueba de Dunn mostró que el grupo ISP-P fue disímil de los grupos IP-E ($p<0,05$) y control ($p<0,001$), lo que indica que en el grupo ISP-P los niveles de anticuerpos que pasaron al cordón fueron significativamente menores que en los grupos IP-E y control (**Figura 3.1C, D**).

Interpretando los datos en porcentajes, en el grupo ISP-P, la concentración de antiRV fue 24% mayor en cordón que en la madre, mientras que la concentración de antiTT en cordón fue 6% menor que en la madre. En el grupo IP-E la concentración de antiRV y antiTT en cordón fue solo 5% y 1% mayor, respectivamente, que en sangre materna. Por su parte, en las mujeres sin infección, la concentración de antiRV y antiTT en sangre de cordón fue 24% y 5% mayor, respectivamente, que en sangre materna.

En el grupo de ISP-P hubo 27 infecciones por *P. vivax* y 20 infecciones por *P. falciparum*. En las mujeres infectadas por *P. vivax* hubo diferencias con la prueba Wilcoxon entre los niveles de IgG de cordón y mamá tanto de antiRV ($p=0,0012$) (**Tabla complementaria 3.1**),

como de antiTT ($p=0,0035$) (**Tabla complementaria 3.1**), mientras que en las mujeres infectadas por *P. falciparum* los niveles de ambos anticuerpos en madre y cordón fueron similares ($p=0,956$ para antiRV y $p=0,0692$ para antiTT) (**Tabla complementaria 3.1**). En el grupo de IP-E los niveles de antiTT y antiRV fueron similares en sangre materna y de cordón, en las dos especies (**Tabla complementaria 3.1**). La prueba Mann-Whitney mostró que los valores de diferencias entre los niveles de IgG antiTT y antiRV entre madre-cordón fueron similares entre las dos especies en el grupo IP-E (**Figura 3.1 F, H**), al igual que los valores de diferencias entre madre-cordón de antiTT en el grupo ISP-P (**Figura 3.1 G**), pero los valores de diferencia entre madre-cordón de IgG antiRV si difirieron entre *P. vivax* y *P. falciparum* en el grupo ISP-P, siendo mayor la cantidad de IgG antiRV en el cordón de mujeres infectadas con *P. vivax* ($p=0,022$) (**Figura 3.1 E**).

Figura 3.1. Niveles de IgG antiTT y antiRV en sangre periférica materna y de cordón umbilical



A. Mediana y rango intercuartílico 25-75% de los niveles de antiRV en unidades arbitrarias (UA), en sangre periférica materna y sangre de cordón umbilical, en cada uno de los grupos. El valor de $**p=0,0054$ corresponde a la diferencia entre las muestras pareadas mamá y cordón con la prueba de Wilcoxon. Línea punteada indica el punto de corte para seropositividad (11,3 UA).

B. Mediana y rango intercuartílico 25-75% de niveles de antiTT en unidades internacionales por mililitro (UI/mL), en sangre periférica materna y sangre de cordón umbilical, en cada uno de los grupos. El valor de $***p=0,0002$ y $**p=0,0079$ corresponde a la diferencia entre las muestras pareadas mamá y cordón con la prueba de Wilcoxon. Línea punteada indica el punto de corte para seropositividad (0,13 UI/mL).

C-D. Mediana y rango intercuartílico 25-75% de la diferencia entre los niveles de IgG antiRV y antiTT madre-cordón en los grupos evaluados. Valor de p significativo basado en la prueba Dunn. Valor de $*p<0,05$ y $***p<0,001$.

E-H. Mediana y rango intercuartílico 25-75% de la diferencia entre los niveles de IgG antiRV y antiTT madre-cordón en los grupos de ISP-P e IP-E de acuerdo a la especie. Valor de p significativo basado en la prueba Mann-Whitney.

3.4.3 Efecto de la MAE sobre la expresión de mediadores inmunes en tejido placentario

Para determinar los cambios transcripcionales resultantes de la infección plasmodial crónica y su asociación con el paso de anticuerpos maternos vía transplacentaria, se midió la expresión de diferentes mediadores de la respuesta inmune en tejido placentario en los tres grupos de estudio.

Expresión de interleuquinas proinflamatorias $IFN-\gamma$ y TNF : ambas mostraron diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ($p < 0,001$ para ambas); cuando se realizó la corrección con la prueba de Dunn, $IFN-\gamma$ tuvo diferencia entre todos los grupos entre sí, pero TNF solo entre los grupos con infección y el grupo control (sin infección) (**Figura 3.2 A, B, Tabla complementaria 3.2**). En general, hubo aumento en la expresión de interleuquinas proinflamatorias en los grupos de mujeres con infección con respecto al grupo control negativo, siendo mayor la expresión en el grupo ISP-P. Además, la quimioquina IL-8 no mostró diferencias entre los grupos (**Figura 3.2 C, Tabla complementaria 3.2**).

Expresión de moléculas asociadas a antiinflamación ($IL-10$ y $TGF-\beta$) y regulación de la respuesta inmune ($FoxP3$, $CTLA-4$, $PD-L1$, $TNF-RII$ y $CD-163$): en los grupos de estudio se hallaron diferencias estadísticamente significativas para todos los mediadores inmunes: $IL-10$ ($p < 0,001$), $TGF-\beta$ ($p = 0,001$) (**Figuras 3.2 D, E Tabla complementaria 3.2**), $FoxP3$ ($p = 0,021$), $CTLA-4$ ($p = 0,001$), $PD-L1$ ($p = 0,042$), $TNF-RII$ ($p = 0,047$) y $CD-163$ ($p = 0,026$) (**Figuras 3.3 A- E, Tabla complementaria 3.2**). Según la prueba de Dunn, se conservó la diferencia estadística en $IL-10$ entre ISP-P e IP-E ($p < 0,0001$) y entre ISP-P y el grupo control ($p < 0,05$) (**Figura 3.2 D**); en $TGF-\beta$ entre los grupos ISP-P e IP-E ($p < 0,01$) y entre ISP-P y el control ($p < 0,05$) (**Figura 3.2 E**); en síntesis, se observó aumento en la expresión de interleuquinas antiinflamatorias en el grupo con ISP-P con respecto a los grupos IP-E y el control negativo .

La corrección con la prueba de Dunn para los mediadores de regulación inmune encontró mayor expresión de $FoxP3$ en el grupo IP-E, en comparación con el grupo control ($p < 0,05$)

(Figura 3.3 A); en CTLA-4 se vio mayor expresión en el grupo ISP-P, con respecto a los grupos con IP-E ($p < 0,01$) y control ($p < 0,05$) (Figura 3.3 B).

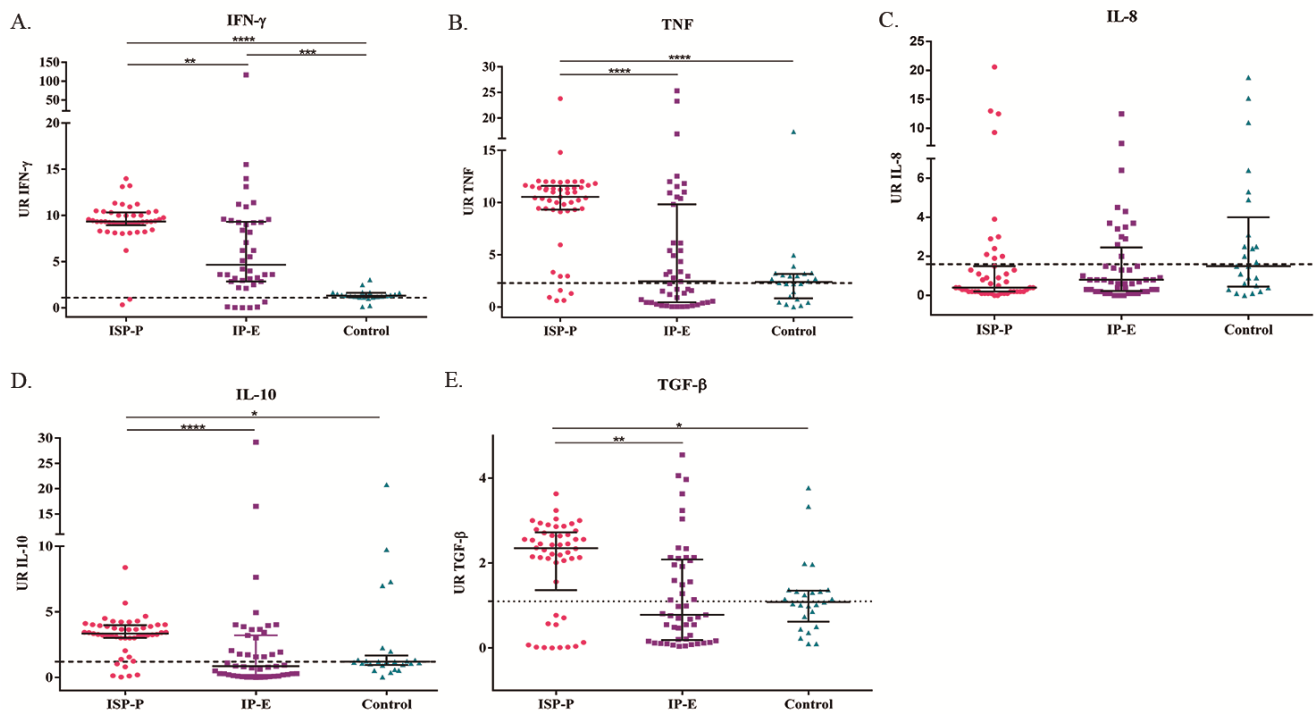
Adicionalmente, se analizó la expresión de las moléculas coestimuladoras CD-86 y CD-40, la molécula de adhesión ICAM (CD-54), pero el estadístico Kruskal-Wallis no mostró ninguna diferencia entre los grupos, en ninguna de las moléculas mencionadas (Figura 3.4 A-C, Tabla complementaria 3.2).

3.4.4 Efecto de la especie plasmodial sobre el cambio del perfil transcripcional placentario

Para conocer este efecto, se comparó cada grupo discriminado por la especie plasmodial ISP-P (ISP-P-*Pv* e ISP-P-*Pf*) y IP-E (IP-E-*Pv* e IP-E-*Pf*). Este análisis mostró diferencias en la expresión de IFN- γ ($p = 0,0009$) y TNF ($p = 0,0442$) entre *P. vivax* y *P. falciparum* en el grupo ISP-P, con la prueba Mann-Whitney (Figura 3.5 A-B, Tabla complementaria 3.3). También se observó diferencia significativa en la expresión de CD-86 ($p = 0,0151$) entre *P. vivax* y *P. falciparum* en los grupos IP-E con la prueba Mann-Whitney (Figura 3.5 C, Tabla complementaria 3.3).

En síntesis, en infecciones submicroscópicas por *P. falciparum* en el momento del parto, hay mayor expresión de IFN- γ , que en infecciones por *P. vivax* (Figura 3.5 A, Tabla complementaria 3.3); en contraste, en infecciones por *P. vivax* hay mayor expresión de TNF que en infecciones por *P. falciparum* (Figura 3.5 B, Tabla complementaria 3.3). Además, la historia de malaria gestacional por *P. vivax* generó mayor expresión de la molécula coestimuladora CD-86 medida en el momento del parto, que la historia de malaria por *P. falciparum* (Figura 3.5 A-B, Tabla complementaria 3.3).

Figura 3.2. Cuantificación relativa de la expresión de mediadores inmunes proinflamatorios y antiinflamatorios en los grupos de estudio



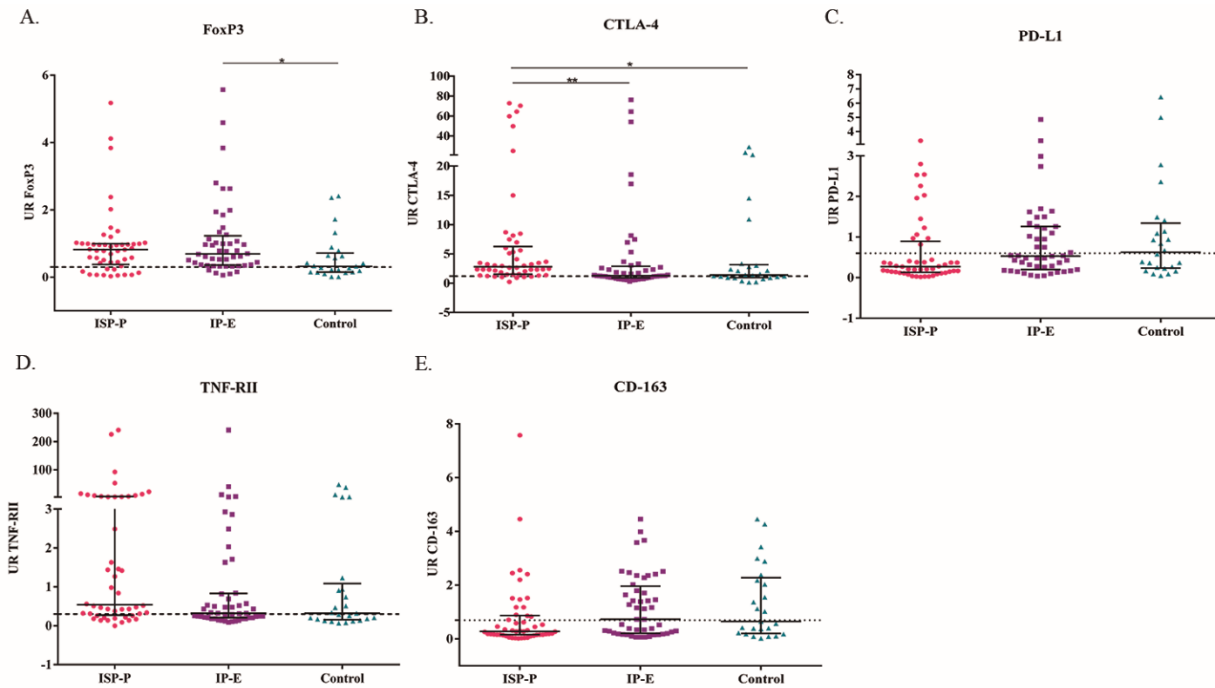
A-C. Mediana y rango intercuartílico 25-75% de la cuantificación de unidades relativas (UR) de la expresión de mediadores inmunes de proinflamación en tejido placentario, en diferentes condiciones de infección plasmodial.

D, E. Mediana y rango intercuartílico 25-75% de la cuantificación de unidades relativas (UR) de la expresión de mediadores inmunes de antiinflamación en tejido placentario, en diferentes condiciones de infección plasmodial.

Valor de p significativo de acuerdo a la prueba de ajuste para comparaciones múltiples de Dunn. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$.

La línea punteada corresponde a la mediana de expresión de cada mediador inmune en el grupo control de mujeres negativas.

Figura 3.3. Cuantificación relativa de la expresión de mediadores inmunes de regulación inmune en los grupos de estudio

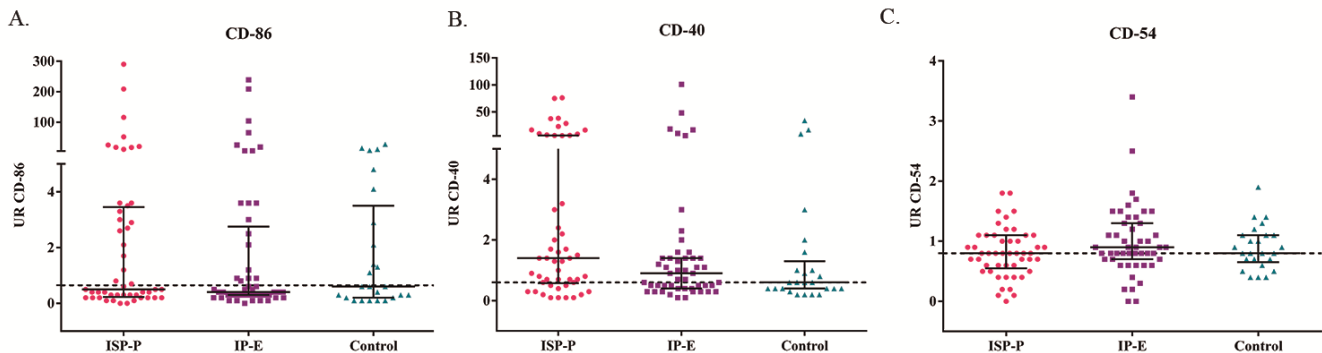


A-E. Mediana y rango intercuartílico 25-75% de la cuantificación de unidades relativas (UR) de la expresión de mediadores inmunes de regulación en tejido placentario, en diferentes condiciones de infección plasmodial.

Valor de p significativo de acuerdo a la prueba de ajuste para comparaciones múltiples de Dunn. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$.

La línea punteada corresponde a la mediana de expresión de cada mediador inmune en el grupo control de mujeres negativas.

Figura 3.4. Cuantificación relativa de la expresión de mediadores inmunes de coestimulación en los grupos de estudio

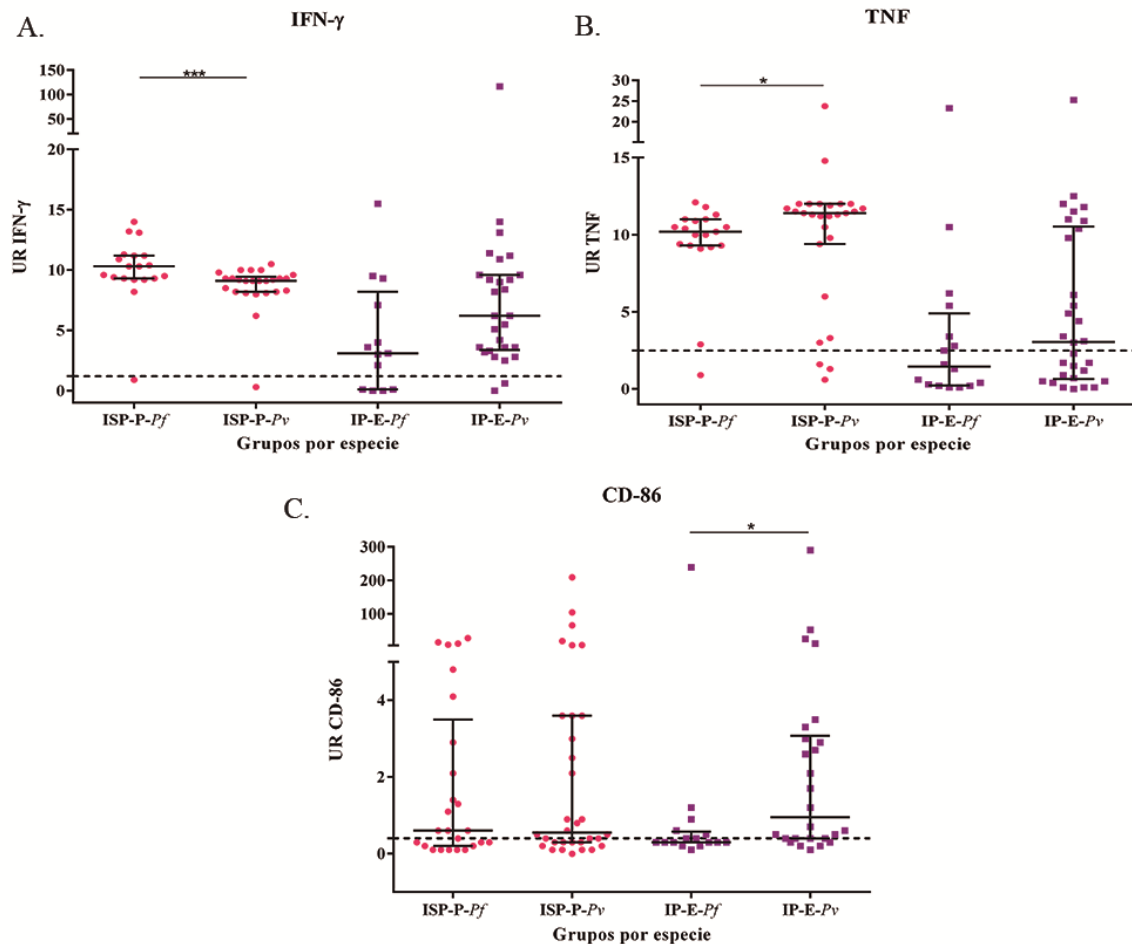


A-C. Mediana y rango intercuartílico 25-75% de la cuantificación de unidades relativas (UR) de la expresión de mediadores inmunes de coestimulación en tejido placentario, en diferentes condiciones de infección plasmodial.

Valor de p significativo de acuerdo a la prueba de ajuste para comparaciones múltiples de Dunn. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$.

La línea punteada corresponde a la mediana de expresión de cada mediador inmune en el grupo control de mujeres negativas.

Figura 3.5. Cuantificación relativa de la expresión de mediadores inmunes en los grupos de estudio, de acuerdo a la especie infectante



Mediana y rango intercuartílico 25-75% de la cuantificación de unidades relativas (UR) de la expresión de mediadores inmunes de inflamación (A, B) y coestimulación (C) en tejido placentario en los grupos de acuerdo a la especie parasitaria infectante.

Valor de p significativo de acuerdo a la prueba de ajuste para comparaciones múltiples de Dunn: * $p < 0, 05$; *** $p < 0,001$. La línea punteada corresponde a la mediana de expresión de cada mediador inmune en el grupo control de mujeres control.

A. IFN- γ se observa aumentada en el grupo ISP-P-Pf en relación con ISP-P-Pv.

B. TNF se observa aumentada en el grupo ISP-P-Pv en relación con ISP-P-Pf.

C. UR del mediador coestimulador CD-86 se observa menor expresión en el grupo IP-E-Pf con respecto grupo IP-E-Pv.

3.4.5 Correlaciones significativas entre la expresión de mediadores inmunes en tejido placentario y los niveles de antiRV y antiTT en cordón umbilical

Teniendo como hipótesis que la infección submicroscópica en el momento del parto y la historia de malaria durante el embarazo alteran el perfil transcripcional placentario, reducen el peso del recién nacido y generan parto prematuro, y que esto, a su vez, induce disminución en el paso de anticuerpos maternos vía transplacentaria, procedimos a evaluar las correlaciones y regresiones entre niveles de anticuerpos en cordón umbilical, con otras variables estudiadas en cada grupo de estudio.

Niveles de antiTT

-*Grupo Control*: los niveles de antiTT en sangre de cordón se correlacionaron fuerte y positivamente con los niveles maternos de antiTT (ρ : 0,840, $p=0,0001$) (**Figura 3.6 A**, **Figura 3.7 C**), pero no hubo ninguna correlación significativa entre los niveles de antiTT en cordón umbilical con la expresión de mediadores inmunes en placenta.

-*Grupo ISP-P*: se mantuvo la correlación positiva y fuerte entre niveles de antiTT en madre y cordón umbilical (ρ : 0,881, $p<0,0001$) (**Figura 3.6 B**, **Figura 3.7 A**), pero, además, apareció correlación débil y negativa entre niveles de antiTT y edad materna (ρ : -0,363, $p=0,010$) (**Figura 3.6 D**, **Figura 3.7 A**), paridad (ρ : -0,352, $p=0,013$) (**Figura 3.6 F**, **Figura 3.7 A**) y expresión de IFN- γ en tejido placentario (ρ : -0,330, $p=0,024$) (**Figura 3.6 G**, **Figura 3.7 A**).

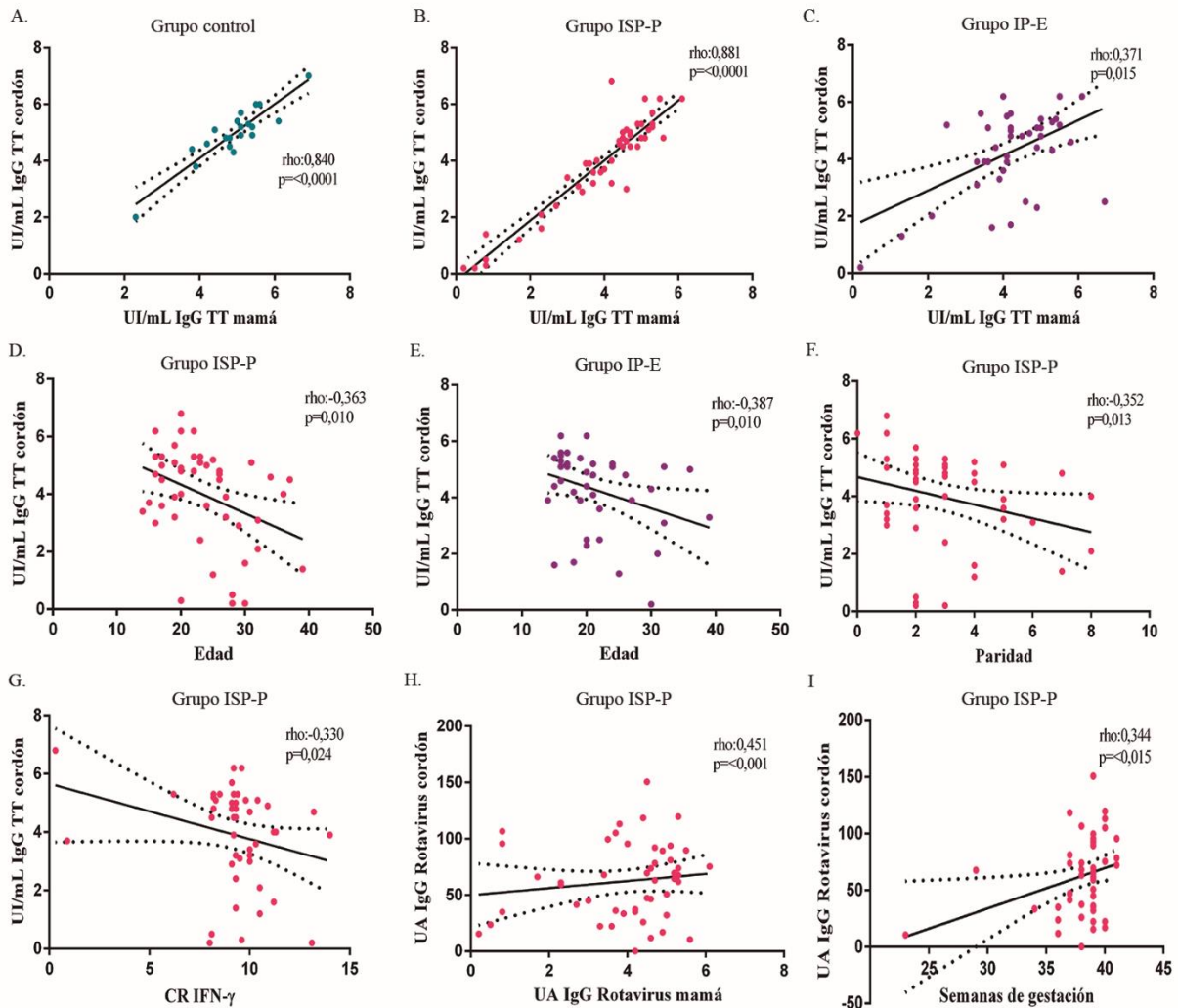
-*Grupo IP-E*: los niveles de antiTT en cordón se correlacionaron débil y positivamente con los niveles de antiTT maternos (ρ : 0,371, $p=0,015$) (**Figura 3.6 C**, **Figura 3.7 B**) y débil y negativamente con edad de la madre (ρ : -0,387, $p=0,010$) (**Figura 3.6 E**, **Figura 3.7 B**).

Niveles de antiRV

Las correlaciones significativas entre los niveles de antiRV en sangre de cordón y los mediadores inmunes y las variables maternas, en los diferentes grupos, fueron muy pocas.

Únicamente se encontraron dos correlaciones, que fueron débiles y positivas, así: entre niveles de antiRV en cordón y las semanas de gestación en el momento del parto ($\rho: 0,344$, $p=0,015$) (**Figura 3.6 H, Figura 3.7 D**) y la concentración materna de antiRV ($\rho: 0,451$, $p=0,0013$) (**Figura 3.6 I, Figura 3.7 D**), en el grupo ISP-P. No se observó correlación entre los niveles de antiTT o de antiRV en cordón con el peso neonatal, en los diferentes grupos de estudio.

Figura 3.6. Correlaciones significativas entre mediadores inmunes placentarios y antiRV o antiTT en cordón



Correlaciones significativas $p<0,05$ basadas en la prueba rho de Spearman.

A-C. Correlación positiva entre los niveles de antiTT en cordón con los niveles de antiTT maternos, en los tres grupos de estudio.

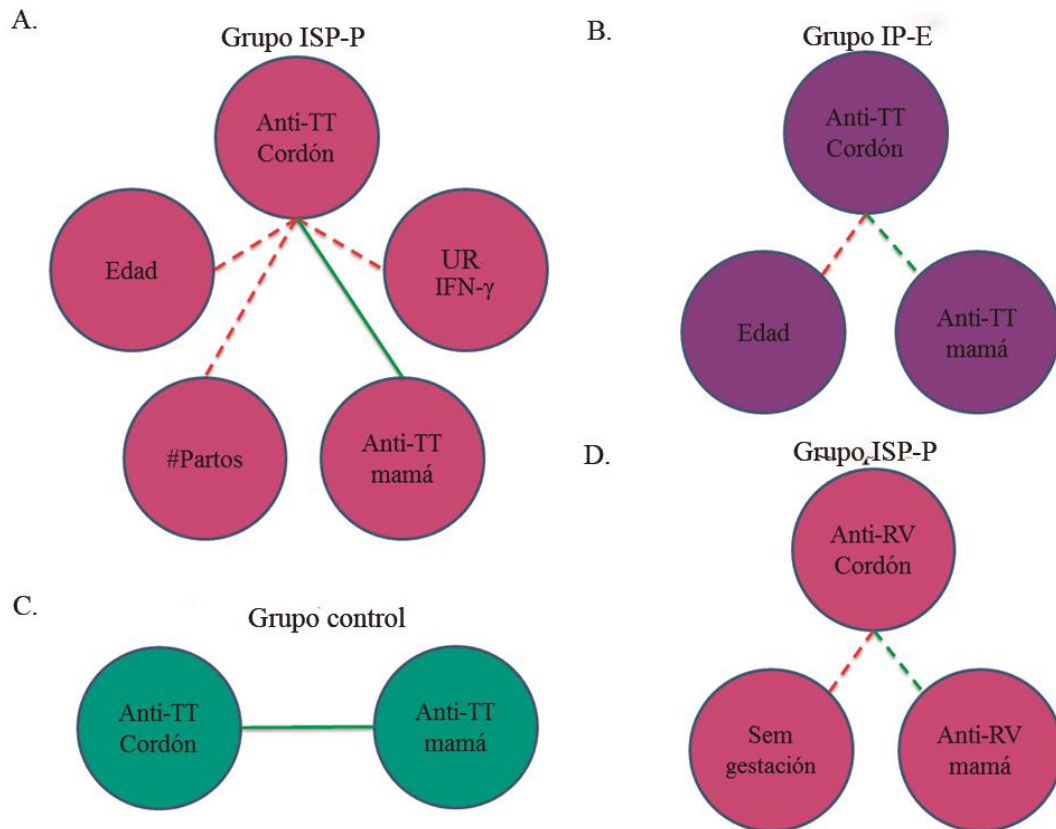
D-E. Correlación negativa entre los niveles de antiTT en cordón y la edad de la gestante, en los grupos ISP-P e IP-E.

F. Correlación negativa entre los niveles de antiTT en cordón y la paridad de la gestante.

G. Correlación negativa entre los niveles de antiTT en cordón y la expresión de IFN- γ .

H-I. Correlación positiva entre los niveles de antiRV en cordón y los niveles de antiTT maternos y las semanas de gestación en el parto.




Figura 3.7. Resumen correlaciones obtenidas entre los niveles de antiTT y antiRV en cordón y las demás variables evaluadas



A-D. Correlaciones obtenidas en el grupo ISP-P entre los niveles de antiTT y antiRV en cordón y otras variables evaluadas. Las líneas rojas indican correlación negativa y las verdes correlación positiva. Las líneas punteadas indican $p < 0,05$ y las líneas continuas indican $p < 0,01$.

3.4.6 Resumen de Resultados

Figura 3.8 Resumen gráfico de resultados del capítulo 3

PARTO	SP materna	Sangre cordón	Expresión de mediadores inmunes en placenta			
			1	2	3	4
ISP-P 	AntiTT 4,5 UI/mL (3,5-5,2 UI/mL)	AntiTT 4,5 UI/mL (3,1-4,9 UI/mL)	IFN- γ	IL-10	FoxP3	CD-86
	AntiRV 52 UA (27-71 UA)	AntiRV 64 UA (35-90 UA)	TNF	TGF- β	TNF-RII	CD-40
IP-E 	AntiTT 4,2 UI/mL (3,8-5 UI/mL)	AntiTT 4,7 UI/mL (3,5-5,2 UI/mL)	IL-8	IL-13	CTLA-4	CD-54
	AntiRV 54 UA (26-77 UA)	AntiRV 57 UA (25-83 UA)		CD-163	PD-L1	
Control 	AntiTT 4,9 UI/mL (4,3-5,4 UI/mL)	AntiTT 5,2 UI/mL (4,8-5,4 UI/mL)				
	AntiRV 42 UA (30-61 UA)	AntiRV 51 UA (29-84 UA)				

<ol style="list-style-type: none"> 1. Mediadores proinflamatorios 2. Mediadores antiinflamatorios 3. Mediadores de regulación 4. Mediadores de coestimulación

Los valores de antiTT y antiRV corresponden a la mediana (rango intercuartílico) **SP**: Sangre periférica. Los signos de > y < en rojo muestran los grupos menor cantidad de anticuerpos maternos en sangre de cordón con respecto al grupo control. Los niveles de anticuerpos en cordón en cuadro verde muestran mayores cantidades por la prueba de Wilcoxon con respecto a la madre, en contraste el cuadro rojo indica menores cantidades de IgG en cordón con respecto a la madre por la prueba de Wilcoxon. En la expresión de mediadores inmunes el **color verde** indica sobreexpresión y el **gris** expresión similar, con respecto a las unidades relativas de expresión obtenidas en el grupo control para cada mediador.

3.5 Discusión

En este capítulo se evaluó el efecto de la infección plasmodial exclusivamente durante el embarazo (grupo IP-E) y de la infección submicroscópica en el momento del parto (grupo ISP-P) en el referido paso placentario de anticuerpos maternos al cordón umbilical. Para evaluar el paso de anticuerpos maternos al feto se tuvieron en cuenta los valores de diferencias entre niveles de IgG en las muestras pareadas de cordón menos madre. Además, estos valores de diferencias fueron comparados entre los grupos de estudio.

3.5.1 Niveles de IgG antiTT y antiRV en sangre periférica materna y de cordón umbilical

ISP-P: hubo diferencias significativas en la cantidad de ambos anticuerpos entre madre y cordón (**Figura 3.1 A-B**) y corresponden a que los niveles de antiTT fueron 6,2% menores en sangre de cordón y, en contraste, los niveles de antiRV fueron 24% mayores en el cordón. Sobre estos hallazgos cabe anotar que trabajos previos demostraron disminución del paso de anticuerpos IgG contra TT en casos de malaria placentaria microscópica por *P. falciparum* (11, 12). Y en el presente trabajo además se encontró que aún las infecciones submicroscópicas se asocian con disminución de los anticuerpos antiTT en sangre de cordón. No conocemos trabajos previos que aborden este asunto asociado a *P. vivax* y aquí mostramos que tal infección submicroscópica presente en el parto, también se asoció con disminución en los niveles de antiTT de cordón en comparación con respecto a la concentración materna (**Tabla complementaria 3.1**).

IP-E: no hubo diferencias significativas en los niveles de antiTT y antiRV maternos y umbilicales en ninguno de los tres grupos (**Figura 3.1 A, B**). Sin embargo, cabe resaltar que en el grupo control (mujeres sin infección) se observó 5% mayor concentración de antiTT en sangre de cordón en comparación con la sangre materna, y en el grupo IP-E, solo 1% más de antiTT fue encontrado en cordón con respecto a la madre, lo que nos permite ver una leve reducción (4%) en los anticuerpos en cordón contra TT en el grupo IP-E con respecto al grupo control. Del mismo modo, en el grupo control se observó 24% más de antiRV en sangre de cordón que en sangre materna, mientras que en el grupo IP-E se observó solo 5% más de

antiRV en sangre de cordón con respecto a sangre materna. En este caso, en la IP-E se encontró 19% menor cantidad de antiRV en el cordón.

Cabe destacar que los niveles de antiTT en sangre de cordón fueron significativamente menores en los dos grupos con infección (ISP-P e IP-E), comparado con el grupo control (**Tabla 3.2**), pero los niveles maternos de IgG antiTT no se mostraron diferencias intergrupos, probablemente por la heterogeneidad en la historia de vacunación en el embarazo en curso de las mujeres incluidas, ya que esta no pudo ser verificada.

En Colombia, el PAI incluye una dosis única de TT durante el embarazo, sin tener en cuenta el historial de vacunación de la mujer antes del embarazo; esta decisión es apoyada por los datos de cobertura de vacunación con TT reportada (92% en 2017) (72). Es importante resaltar que en las mujeres incluidas en nuestro estudio no fue posible verificar los antecedentes de vacunación contra TT, ni previos ni durante la gestación. Sin embargo, de las 125 gestantes evaluadas, dos tenían niveles de IgG antiTT muy cercanos al límite de seronegatividad (1,6%) (niveles de antiTT $<0,13$ UI/mL) y estuvieron en los grupos con infección plasmodial; además, 4 neonatos de madres pertenecientes a los grupos asociados a infección también tuvieron niveles de IgG antiTT muy cercanos al límite de seronegatividad en sangre de cordón umbilical (**Figura 3.1 B**). No hay un valor de concentración de anticuerpos que determine la protección contra el tétanos, pues es específica del ensayo (73). De acuerdo con el método usado en nuestro estudio para cuantificar los anticuerpos, el punto de corte establecido indicó que las muestras por debajo de 0,13 UI/mL son seronegativas. Según lo anterior, sería necesario acatar la recomendación de la OMS que sugiere como mínimo dos dosis de la vacuna antitetánica para garantizar la protección contra el tétanos materno y neonatal (74). No hay notificación formal del tétanos materno en Colombia y la tasa de notificación del neonatal es tan baja, que no se sabe si la cobertura de vacunación es suficiente o si la notificación es insuficiente.

Este es el primer estudio en Colombia que evalúa los niveles de anticuerpos contra rotavirus en gestantes y la inmunidad pasiva neonatal transplacentaria contra rotavirus. Considerando que en las gestantes los niveles de IgG antiRV fueron adquiridos de manera natural por la infección con el virus, se observó un alto porcentaje de seropositividad (94%), según el punto

de corte establecido en este estudio con base en el control no expuesto (niveles de IgG >11,3 UA). Los niveles de anticuerpos fueron muy variables, sin embargo, ni los niveles de antiRV maternos, ni los de cordón difirieron entre los grupos de estudio (**Figura 3.1 A**).

Dada la alta variabilidad en la eficacia de la vacuna RV1 en diferentes países, se ha sugerido que las diferencias en la eficiencia y las tasas de seroconversión en muchos ensayos de vacunas contra el rotavirus en lactantes humanos, pueden asociarse con los anticuerpos preexistentes, probablemente de origen materno en niños menores de 6 meses de edad (75, 76). En Colombia, dos estudios que evaluaron la efectividad de la vacuna RV1, mostraron que entre 81% (65) y 90% (66) de los niños que presentaron infección por rotavirus durante el estudio, habían sido vacunados previamente con RV1.

Cabe aclarar que el antígeno usado en el presente estudio para la detección de IgG en las diferentes muestras evaluadas es la cepa de rotavirus humano 89-12 (G1P[8]), que es la causa predominante de diarrea por rotavirus, y a partir de esta, fue derivada la vacuna monovalente RV1. La respuesta inmune para esta cepa resulta en protección homotípica contra el serotipo de rotavirus G1P[8] y protección heterotípica contra los serotipos G2P[4], G3P[8], G4P[8] y G9P[8]; además, también demostró protección frente a los serotipos poco comunes como G8P[4], asociado a gastroenteritis grave, y G12P[8], asociado a cualquier forma de gastroenteritis (75). Es decir, que el antígeno usado en este estudio para la detección de los anticuerpos permite captar anticuerpos contra diferentes serotipos de rotavirus.

Es importante anotar que en la respuesta inmune humoral tanto para TT (77), como para rotavirus (78, 79), predomina la producción de anticuerpos IgG1, que corresponde a la subclase de inmunoglobulina que se transfiere de forma más eficiente a través de la placenta (24). Sin embargo, como se pudo ver en nuestro estudio, la malaria placentaria altera el paso de unos anticuerpos específicos IgG1 y de otros no, por una razón no entendida. Otros autores han reportado resultados similares en los que se ve afectado el paso de anticuerpos contra Virus Herpes Simple-I, Virus Sincitial Respiratorio y Virus Varicela Zoster, pero no contra toxoide diftérico (6).

La poca similitud obtenida en los resultados entre el paso de antiTT y antiRV maternos al cordón, en particular en el grupo de ISP-P, puede corresponder a la variabilidad en los niveles de antiRV encontrados en las gestantes. Los niveles de antiRV en este grupo de mujeres son adquiridos en infecciones naturales por rotavirus en el transcurso de la vida, lo que hace que varíen de individuo a individuo; mientras que para TT los niveles de anticuerpos son más homogéneos porque provienen principalmente de la historia de vacunación previa y durante la gestación.

La mayoría de estudios realizados acerca del tema han sido desarrollados en África, donde predomina la infección por *P. falciparum*, mientras que en Colombia cocirculan *P. falciparum* y *P. vivax* y ambas especies se han detectado causando alta frecuencia infecciones gestacionales y placentarias, tanto microscópicas como submicroscópicas (29). Diversos estudios confirman que el impacto de la infección por *P. vivax* es comparable con el de *P. falciparum* y también puede generar efectos adversos en el embarazo (27, 36, 40, 80, 81) y malaria grave (82, 83). En este estudio, además se encontró que la infección por *P. vivax* también causa disminución en los niveles de antiTT en el cordón umbilical (**Tabla complementaria 3.1**); por tanto, hay que reevaluar la concepción de que la infección por *P. vivax* es benigna e investigar más acerca de su impacto en las poblaciones afectadas, incluso cuando se encuentra en niveles submicroscópicos.

3.5.2 Efecto de la MAE sobre la expresión de mediadores inmunes en tejido placentario

Otros estudios que han evaluado el efecto de la infección plasmodial en la inmunidad pasiva neonatal transplacentaria (6, 7, 10-13, 15), no han tenido en cuenta los cambios placentarios producidos por la infección y su asociación con el paso de anticuerpos maternos. En el presente estudio se evaluaron los cambios transcripcionales causados por la infección malarica durante la gestación; para esto se realizó la cuantificación relativa de la expresión, en tejido placentario, de diferentes mediadores inmunes asociados a inflamación, antiinflamación, regulación y coestimulación de la respuesta inmune. Teniendo en cuenta el valor de significación estadística con la prueba Kruskal-Wallis, se observaron diferencias en

la expresión de IFN- γ , TNF, IL-10, TGF- β , FoxP3, CTLA-4, TNF-RII, PD-L1 y CD-163, entre los tres grupos de estudio (ISP-P, IP-E, control negativo), pero no hubo diferencias en la expresión de las moléculas CD-86, CD-40, CD-54 e IL-8 (**Tabla complementaria 3.2**).

Con la prueba de corrección para comparaciones múltiples de Dunn se pudo discriminar para cada mediador inmune cuáles grupos eran diferentes; era de esperarse que en el grupo de mujeres con ISP-P se observaran la mayor cantidad de cambios transcripcionales, puesto que la infección plasmoidal de estas mujeres se detectó en el momento del parto. En este grupo, comparado con el grupo control sin infección, se observó aumento de interleuquinas proinflamatorias (IFN- γ y TNF) (**Figura 3.2 A, B**) y antiinflamatorias (IL-10 y TGF- β) (**Figura 3.2 D, E**). Estos datos coinciden con estudios previos que muestran que las infecciones submicroscópicas placentarias causan aumento en la expresión de interleuquinas proinflamatorias (40, 41). Por otra parte, diferentes trabajos resaltan el papel de IL-10 en la regulación de la respuesta inflamatoria causada por *Plasmodium* spp (41, 84, 85); y específicamente en el tejido placentario, su aumento permite el mantenimiento del embarazo a término en procesos inflamatorios crónicos (86). De igual manera, el TGF- β está asociado con la regulación de la respuesta inflamatoria, con la diferenciación de células Treg y con la tolerancia fetal (87). No obstante, el aumento de IL-10 también ha sido asociado con el establecimiento de infecciones asintomáticas crónicas (88).

Ningún estudio previo evaluó la expresión de moléculas reguladoras en placenta y, por eso, consideramos importantes las diferencias obtenidas según la prueba Kruskal-Wallis para los tres grupos. Encontramos aumento en la expresión de moléculas asociadas a regulación de la respuesta inmune en células Treg (FoxP3, CTLA-4 y TNF-RII) (**Figura 3.3 A, B, D, Tabla complementaria 3.2**) y, en contraste, disminución en la expresión de moléculas asociadas a regulación en células presentadoras de antígeno (PD-L1 y CD-163) (**Tabla complementaria 3.2**). Otros trabajos asocian las infecciones plasmodiales asintomáticas con el aumento de TNF-RII (89) y el papel de CTLA-4 y PD-L1 en el bloqueo de la respuesta efectora y el curso de infecciones crónicas (90-93). En este estudio, el aumento en la expresión de moléculas asociadas a la regulación inmune por células Treg puede explicarse por la activación de

mecanismos de amortiguación del proceso inflamatorio, para contrarrestar los efectos de la infección en la interfase materno-fetal (94).

En el grupo de mujeres con IP-E se observaron pocos cambios transcripcionales placentarios; únicamente se observó un aumento en la expresión de IFN- γ y FoxP3. A pesar de que se trata de mujeres negativas en el momento de la medición, la historia de infección malárica durante la gestación también alteró el perfil transcripcional placentario.

Dada la alteración del perfil transcripcional placentario en infecciones gestacionales y placentarias submicroscópicas por *Plasmodium* spp, es importante evaluar las implicaciones de estos cambios en el desarrollo neonatal. El aumento en el perfil regulador en la interfase materno-fetal, puede aumentar el estado tolerogénico del recién nacido y alterar su competitividad en la resolución de retos inmunológicos (95-97).

En este estudio no se evaluó la histopatología placentaria, pero un estudio previo mostró alteraciones histopatológicas como disminución en la cantidad de capilares por vellosidad placentaria y aumento en la infiltración de células inmunes durante infecciones plasmodiales submicroscópicas (98). Los cambios histológicos encontrados en infecciones submicroscópicas se podrían asociar con la alteración en la inmunidad pasiva neonatal transplacentaria, lo cual constituye un tema interesante para ser estudiado.

Por otra parte, como se mostró en la **figura 3.5**, se encontraron pocas diferencias en la expresión de los mediadores inmunes entre los grupos de mujeres infectadas por *P. vivax* y por *P. falciparum*, lo que sugiere que ambas especies tienen un impacto similar en el cambio del perfil transcripcional placentario y refuerza la idea de que ambas especies tienen consecuencias comparables durante la gestación (99). Sin embargo, las diferencias encontradas en la expresión de interleuquinas como TNF e INF- γ en las infecciones por *P. vivax* se pueden explicar por los distintos mecanismos fisiopatológicos de la malaria por estas dos especies. El aumento de TNF encontrado en *P. vivax*, en comparación con *P. falciparum*, se asocia principalmente con los paroxismos febriles en la malaria *vivax* (100). El aumento en la expresión IFN- γ en infecciones por *P. falciparum*, en comparación con *P. vivax*, se asocia con la mayor frecuencia de malaria grave reportada en la malaria *falciparum* (101,

102). En cuanto al aumento encontrado en la expresión de CD-86 en el grupo de mujeres con historia de malaria *vivax* (IP-E) no hay información previa al respecto, pero, es probable que se deba a las posibles recaídas sufridas durante la gestación.

3.5.3 Correlaciones significativas entre la expresión de mediadores inmunes en tejido placentario y los niveles de antiRV y antiTT en cordón umbilical

Cuando se correlacionaron los niveles de IgG antiTT y antiRV en sangre de cordón, con las diferentes variables y los mediadores inmunes, pocas correlaciones fueron encontradas. En todos los grupos los niveles de antiTT en cordón se correlacionaron positivamente con los niveles de antiTT en mamá (**Figura 3.6 A-C**). Esto concuerda con la idea de que la vacunación materna contra TT es una herramienta eficaz para reducir los casos de mortalidad materna y neonatal por tétanos, puesto que los niveles de anticuerpos maternos son proporcionales a la cantidad de anticuerpos que pasan a cordón en embarazos sanos (74). Otros estudios encontraron correlación entre los niveles de anticuerpos maternos y de cordón para antígenos bacterianos y TT (103). Vale la pena resaltar que a pesar de que no se observó diferencia significativa en los niveles de antiTT entre cordón y sangre materna en el grupo IP-E (**Figura 3.1 B**), sí se observó una disminución en los niveles de anticuerpos en sangre de cordón, y además, en este grupo la correlación entre los niveles de antiTT en cordón y sangre materna fue débil ($\rho: 0,371$ $p=0,015$), en comparación con los grupos ISP-P y negativas (**Figura 3.6 A-C**). En el grupo de mujeres con IP-E hubo 25 mujeres con historia de malaria microscópica durante el embarazo; probablemente el efecto de la modulación de la respuesta inmune frente al TT y el desarrollo placentario en estas mujeres con mayor carga parasitaria impactan en el paso los niveles de anticuerpos en el cordón.

Por otra parte, en los grupos con infección (ISP-P y IP-E), la edad de la gestante se correlacionó negativamente con los niveles de antiTT en cordón (**Figura 3.6 D-E**), lo que contrasta con otros informes que no hallaron correlación entre la inmunidad pasiva transplacentaria contra rubeola y *Bordetella pertusis* y la edad de la gestante (104-106). Sin embargo, en el presente estudio la edad de la gestante se correlacionó positivamente con la

paridad (ISP-P: rho: 0,689 p<0,001; IP-E: rho: 0,689 p<0,001; negativas rho: 0,716 p<0,001). La paridad se asocia a cambios histológicos placentarios como aumento en depósitos de fibrina en el tallo de las vellosidades y aumento en depósitos de calcio en la región septal de la placenta (107). Sumados los cambios histológicos placentarios secundarios a número de partos de la gestante y la infección plasmodial, todos juntos pueden tener un mayor impacto en la efectividad de la inmunidad pasiva neonatal (38, 39, 108). Acorde con lo anterior, en el grupo de mujeres con infección submicroscópica en el momento del parto (ISP-P) los niveles de antiTT en cordón se correlacionaron negativamente con la paridad (**Figura 3.6 F**).

En un estudio con cultivos de células epiteliales, de macrófagos THP-1 y de mononucleares de sangre periférica frescos aislados de humanos, la exposición a IFN- γ resultó en una disminución significativa de la expresión del receptor FcRn, encargado del paso de IgG a través de la placenta al cordón umbilical (109). De manera interesante en el grupo de mujeres con ISP-P se observó una correlación negativa entre los niveles de antiTT y la cuantificación relativa de IFN- γ en tejido placentario (**Figura 3.6 G**). Así que, el aumento de IFN- γ durante la infección plasmodial submicroscópica podría inducir la disminución en el receptor FcRn, causando la alteración de la inmunidad pasiva neonatal transplacentaria; sin embargo esto debe ser evaluado.

Es conocido que el paso de anticuerpos maternos al cordón va aumentando a medida que avanza la gestación y que es más eficiente en las últimas semanas (17). En el grupo de mujeres con ISP-P, los niveles de antiRV maternos se correlacionaron positivamente con las semanas de gestación en el momento del parto (**Figura 3.6 I**). En el grupo de mujeres con ISP-P, a diferencia de los otros grupos de estudio (IP-E y control negativo) hubo gestantes con parto desde la semana 23, hasta la 41; dado este amplio rango de edades gestacionales en el momento del parto, es posible evidenciar esta correlación ya previamente descrita (17). Este hallazgo puede indicar que probablemente en el grupo ISP-P la integridad de la placenta para el transporte de los anticuepos al feto esté conservada, que a pesar de la inflamación la función del receptor FcRn no se altera o que hay otro mecanismo implicado en la reducción de anticuerpos antiTT en el cordón. Una hipótesis podría ser la presencia de hipergammaglobulinemia presente en infecciones por *Plasmodium* spp (110, 111), ya que la

saturación del receptor FcRn encargado del transporte de IgG al feto disminuye la cantidad que atraviesa la placenta (10, 112, 113, 114).

Otro asunto importante para discutir es que, en niños nacidos de mujeres con malaria microscópica durante la gestación, el riesgo de infecciones en los primeros meses de vida se debe, de un 40 a 50%, a la disminución del tamaño para la edad gestacional y al parto prematuro (68). En este estudio, 5% de los niños nacieron pretérmino (6/124) y solo 3% nacieron con bajo peso al nacer (4/123). Lo que indica que en nuestros grupos de estudio la frecuencia de estas alteraciones gestacionales es baja, además, en Colombia no se ha estudiado el efecto directo de la MAE en la susceptibilidad neonatal a infecciones o la alteración en la respuesta inmune neonatal. Sin embargo, teniendo en cuenta el porcentaje restante de riesgo a infecciones no atribuido al peso al nacer y al tamaño para la edad gestacional, otras consecuencias generadas por la infección parecen estar involucradas la inmunidad neonatal.

En resumen, la ISP-P disminuyó significativamente el paso de antiTT materno al cordón umbilical y la IP-E redujo el paso materno tanto de antiTT y antiRV, con respecto al grupo de mujeres sin infección. En el grupo de mujeres con ISP-P se observaron cambios en la transcripción de todos los mediadores inmunes asociados a inflamación, antiinflamación y regulación de la respuesta inmune evaluados; mientras que en el grupo de mujeres con IP-E solo se observaron cambios en la expresión de IFN- γ y FoxP3. En relación con las variables que afectan los niveles de anticuerpos en sangre de cordón umbilical, se correlacionaron los niveles de anticuerpos maternos, la edad materna, la edad gestacional en el momento del parto, el número de partos de las gestantes y la expresión de IFN- γ en tejido placentario.

3.6 Referencias

1. Swamy GK, Garcia-Putnam R. Vaccine-preventable diseases in pregnancy. *Am J Perinatol.* 2013;30(2):89-97.
2. van den Berg JP, Westerbeek EA, van der Klis FR, Berbers GA, van Elburg RM. Transplacental transport of IgG antibodies to preterm infants: a review of the literature. *Early Hum Dev.* 2011;87(2):67-72.
3. Basha S, Surendran N, Pichichero M. Immune responses in neonates. *Expert Rev Clin Immunol.* 2014;10(9):1171-84.
4. Faucette AN, Pawlitz MD, Pei B, Yao F, Chen K. Immunization of pregnant women: Future of early infant protection. *Hum Vaccin Immunother.* 2015;11(11):2549-55.
5. Puig-Barberà J. Vacunas y embarazo (y II): la protección del recién nacido mediante la vacunación de la embarazada. *Atención Primaria.* 2004;33(3):154-60.
6. Okoko BJ, Wesumperuma LH, Ota MO, Pinder M, Banya W, Gomez SF, et al. The influence of placental malaria infection and maternal hypergammaglobulinemia on transplacental transfer of antibodies and IgG subclasses in a rural West African population. *J Infect Dis.* 2001;184(5):627-32.
7. Okoko BJ, Wesuperuma LH, Ota MO, Banya WA, Pinder M, Gomez FS, et al. Influence of placental malaria infection and maternal hypergammaglobulinaemia on materno-foetal transfer of measles and tetanus antibodies in a rural west African population. *J Health Popul Nutr.* 2001;19(2):59-65.
8. Cavalcante RS, Kopelman BI, Costa-Carvalho BT. Placental transfer of Haemophilus influenzae type b antibodies in malnourished pregnant women. *Braz J Infect Dis.* 2008;12(1):47-51.
9. de Souza EG, Hara CC, Fagundes DL, de Queiroz AA, Morceli G, Calderon IM, et al. Maternal-Foetal Diabetes Modifies Neonatal Fc Receptor Expression on Human Leucocytes. *Scand J Immunol.* 2016;84(4):237-44.
10. Atwell JE, Thumar B, Robinson LJ, Toby R, Yambo P, Ome-Kaius M, et al. Impact of Placental Malaria and Hypergammaglobulinemia on Transplacental Transfer of Respiratory Syncytial Virus Antibody in Papua New Guinea. *J Infect Dis.* 2016;213(3):423-31.
11. Brair ME, Brabin BJ, Milligan P, Maxwell S, Hart CA. Reduced transfer of tetanus antibodies with placental malaria. *Lancet.* 1994;343(8891):208-9.
12. Cumberland P, Shulman CE, Maple PA, Bulmer JN, Dorman EK, Kawuondo K, et al. Maternal HIV infection and placental malaria reduce transplacental antibody transfer and tetanus antibody levels in newborns in Kenya. *J Infect Dis.* 2007;196(4):550-7.
13. de Moraes-Pinto MI, Verhoeff F, Chimsuku L, Milligan PJ, Wesumperuma L, Broadhead RL, et al. Placental antibody transfer: influence of maternal HIV infection and placental malaria. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1998;79(3):F202-5.
14. Fu C, Lu L, Wu H, Shaman J, Cao Y, Fang F, et al. Placental antibody transfer efficiency and maternal levels: specific for measles, coxsackievirus A16, enterovirus 71, poliomyelitis I-III and HIV-1 antibodies. *Sci Rep.* 2016;6:38874.
15. Scott S, Cumberland P, Shulman CE, Cousens S, Cohen BJ, Brown DW, et al. Neonatal measles immunity in rural Kenya: the influence of HIV and placental malaria infections on placental transfer of antibodies and levels of antibody in maternal and cord serum samples. *J Infect Dis.* 2005;191(11):1854-60.
16. Jauniaux E, Jurkovic D, Gulbis B, Liesnard C, Lees C, Campbell S. Materno-fetal immunoglobulin transfer and passive immunity during the first trimester of human pregnancy. *Hum Reprod.* 1995;10(12):3297-300.
17. Malek A, Sager R, Kuhn P, Nicolaidis KH, Schneider H. Evolution of maternofetal transport of immunoglobulins during human pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 1996;36(5):248-55.
18. Kohler PF, Farr RS. Elevation of cord over maternal IgG immunoglobulin: evidence for an active placental IgG transport. *Nature.* 1966;210(5040):1070-1.
19. Simister NE. Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine.* 2003;21(24):3365-9.

20. Okoko JB, Wesumperuma HL, Hart CA. The influence of prematurity and low birthweight on transplacental antibody transfer in a rural West African population. *Trop Med Int Health*. 2001;6(7):529-34.
21. Beck S, Wojdyla D, Say L, Betran AP, Merialdi M, Requejo JH, et al. The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. *Bulletin of the World Health Organization*. 2010;88(1):31-8.
22. Heininger U, Riffelmann M, Leineweber B, Wirsing von Koenig CH. Maternally derived antibodies against Bordetella pertussis antigens pertussis toxin and filamentous hemagglutinin in preterm and full term newborns. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28(5):443-5.
23. Källman J, Schollin J, Schalèn C, Erlandsson A, Kihlström E. Impaired phagocytosis and opsonisation towards group B streptococci in preterm neonates. *Archives of disease in childhood Fetal and neonatal edition*. 1998;78(1):F46-F50.
24. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol*. 2014;5:520.
25. Álvarez-Larrotta C, Arango E, Carmona-Fonseca J. Negative immunomodulation by parasitic infections in the human response to vaccines. *J Infect Dev Ctries*. 2018;12:812-23
26. Greenwood BM, Bradley-Moore AM, Bryceson AD, Palit A. Immunosuppression in children with malaria. *Lancet*. 1972;1(7743):169-72.
27. Álvarez-Larrotta C, Agudelo OM, Duque Y, Gavina K, Yanow SK, Maestre A, et al. Submicroscopic Plasmodium infection during pregnancy is associated with reduced antibody levels to tetanus toxoid. *Clin Exp Immunol*. 2019;195(1):96-108.
28. Khan WA, Galagan SR, Prue CS, Khyang J, Ahmed S, Ram M, et al. Asymptomatic Plasmodium falciparum malaria in pregnant women in the Chittagong Hill Districts of Bangladesh. *PLoS One*. 2014;9(5):e98442.
29. Arango EM, Samuel R, Agudelo OM, Carmona-Fonseca J, Maestre A, Yanow SK. Molecular detection of malaria at delivery reveals a high frequency of submicroscopic infections and associated placental damage in pregnant women from northwest Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;89(1):178-83.
30. Carmona-Fonseca J. La malaria en Colombia, Antioquia y las zonas de Urabá y Bajo Cauca: panorama para interpretar la falla terapéutica antimalárica. Parte 1. *Iatreia*. 2003;16:299-318.
31. Carmona Fonseca J. La malaria en Colombia, Antioquia y las zonas de Urabá y Bajo Cauca: panorama para interpretar la falla terapéutica antimalárica. Parte 2. *Iatreia* 2003; 16, (4), 299-318.
32. Carmona-Fonseca, Jaime. La Región “Urabá Antioqueño-Cuencas altas de los ríos Sinú y San Jorge-Bajo Cauca Antioqueño: “guarida” del paludismo colombiano. *Rev Univ Ind Santander*. 2017;49(4):12.
33. Rodríguez JCP, Uribe GÁ, Araújo RM, Narváez PC, Valencia SH. Epidemiology and control of malaria in Colombia. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2011;106 Suppl 1(Suppl 1):114-22.
34. Maizels RM. Infections and allergy - helminths, hygiene and host immune regulation. *Curr Opin Immunol*. 2005;17(6):656-61.
35. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(8):486-99.
36. Carmona-Fonseca J, Arango E, Maestre A. Placental malaria in Colombia: histopathologic findings in Plasmodium vivax and P. falciparum infections. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;88(6):1093-101.
37. Muehlenbachs A, Fried M, McGready R, Harrington WE, Mutabingwa TK, Nosten F, et al. A novel histological grading scheme for placental malaria applied in areas of high and low malaria transmission. *J Infect Dis*. 2010;202(10):1608-16.
38. Souza RM, Ataíde R, Dombrowski JG, Ippólito V, Aitken EH, Valle SN, et al. Placental histopathological changes associated with Plasmodium vivax infection during pregnancy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(2):e2071.

39. Chaikitgosiyakul S, Rijken MJ, Muehlenbachs A, Lee SJ, Chaisri U, Viriyavejakul P, et al. A morphometric and histological study of placental malaria shows significant changes to villous architecture in both *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infection. *Malaria Journal*. 2014;13(1):4.
40. Agudelo OM, Aristizabal BH, Yanow SK, Arango E, Carmona-Fonseca J, Maestre A. Submicroscopic infection of placenta by *Plasmodium* produces Th1/Th2 cytokine imbalance, inflammation and hypoxia in women from north-west Colombia. *Malar J*. 2014;13:122.
41. Ibitokou SA, Boström S, Brutus L, Tuikue Ndam N, Vianou B, Agbowai C, et al. Submicroscopic infections with *Plasmodium falciparum* during pregnancy and their association with circulating cytokine, chemokine, and cellular profiles. *Clin Vaccine Immunol*. 2014;21(6):859-66.
42. Aboud S, Matre R, Lyamuya EF, Kristoffersen EK. Antibodies to tetanus toxoid in women of childbearing age in Dar es Salaam and Bagamoyo, Tanzania. *Trop Med Int Health*. 2001;6(2):119-25.
43. Schofield FD, Tucker VM, Westbrook GR. Neonatal tetanus in New Guinea. Effect of active immunization in pregnancy. *Br Med J*. 1961;2(5255):785-9.
44. Adekanle O, Ayodeji O, Olatunde L. Tetanus in a rural setting of South-Western Nigeria: a ten-year retrospective study. *Libyan J Med*. 2009;4(2):78-80.
45. Chalya PL, Mabula JB, Dass RM, Mbelenge N, Mshana SE, Gilyoma JM. Ten-year experiences with Tetanus at a Tertiary hospital in Northwestern Tanzania: A retrospective review of 102 cases. *World J Emerg Surg*. 2011;6:20.
46. Feroz A, Rahman H. A Ten-year Retrospective Study of Tetanus at a Teaching Hospital in Bangladesh. *J Bangladesh Coll Phys Surg*. 2007;(25): 62-69.
47. Marulappa VG, Manjunath R, Mahesh Babu N, Maligegowda L. A Ten Year Retrospective Study on Adult Tetanus at the Epidemic Disease (ED) Hospital, Mysore in Southern India: A Review of 512 Cases. *J Clin Diagn Res*. 2012;6(8):1377-80.
48. Basu S, Paul DK, Ganguly S, Chandra PK. Risk factors for mortality from neonatal tetanus: 7 years experience in North Bengal, India. *Ann Trop Paediatr*. 2006;26(3):233-9.
49. Ertem M, Cakmak A, Saka G, Ceylan A. Neonatal tetanus in the South-Eastern region of Turkey: changes in prognostic aspects by better health care. *J Trop Pediatr*. 2004;50(5):297-300.
50. Fetuga BM, Ogunlesi TA, Adekanmbi FA. Risk factors for mortality in neonatal tetanus: a 15-year experience in Sagamu, Nigeria. *World J Pediatr*. 2010;6(1):71-5.
51. Mwaniki MK, Gatakaa HW, Mturi FN, Chesaro CR, Chuma JM, Peshu NM, et al. An increase in the burden of neonatal admissions to a rural district hospital in Kenya over 19 years. *BMC Public Health*. 2010;10:591.
52. Lanata CF, Fischer-Walker CL, Olascoaga AC, Torres CX, Aryee MJ, Black RE, et al. Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. *PLoS One*. 2013;8(9):e72788.
53. Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE, Group WCHER. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet*. 2005;365(9465):1147-52.
54. Linhares AC, Stupka JA, Ciapponi A, Bardach AE, Glujovsky D, Aruj PK, et al. Burden and typing of rotavirus group A in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol*. 2011;21(2):89-109.
55. Appaiahgari MB, Glass R, Singh S, Taneja S, Rongsen-Chandola T, Bhandari N, et al. Transplacental rotavirus IgG interferes with immune response to live oral rotavirus vaccine ORV-116E in Indian infants. *Vaccine*. 2014;32(6):651-6.
56. Becker-Dreps S, Vilchez S, Velasquez D, Moon S-S, Hudgens MG, Zambrana LE, et al. Rotavirus-specific IgG antibodies from mothers' serum may inhibit infant immune responses to the pentavalent rotavirus vaccine. *The Pediatric infectious disease journal*. 2015;34(1):115-6.
57. Rongsen-Chandola T, Strand TA, Goyal N, Flem E, Rathore SS, Arya A, et al. Effect of withholding breastfeeding on the immune response to a live oral rotavirus vaccine in North Indian infants. *Vaccine*. 2014;32:A134-A9.

58. Bayard V, DeAntonio R, Contreras R, Tinajero O, Castrejon MM, Ortega-Barría E, et al. Impact of rotavirus vaccination on childhood gastroenteritis-related mortality and hospital discharges in Panama. *Int J Infect Dis.* 2012;16(2):e94-8.
59. do Carmo GM, Yen C, Cortes J, Siqueira AA, de Oliveira WK, Cortez-Escalante JJ, et al. Decline in diarrhea mortality and admissions after routine childhood rotavirus immunization in Brazil: a time-series analysis. *PLoS Med.* 2011;8(4):e1001024.
60. Gastañaduy PA, Sánchez-Uribe E, Esparza-Aguilar M, Desai R, Parashar UD, Patel M, et al. Effect of rotavirus vaccine on diarrhea mortality in different socioeconomic regions of Mexico. *Pediatrics.* 2013;131(4):e1115-20.
61. Gurgel RQ, Ilozue C, Correia JB, Centenari C, Oliveira SM, Cuevas LE. Impact of rotavirus vaccination on diarrhoea mortality and hospital admissions in Brazil. *Trop Med Int Health.* 2011;16(9):1180-4.
62. Lanzieri TM, Linhares AC, Costa I, Kolhe DA, Cunha MH, Ortega-Barria E, et al. Impact of rotavirus vaccination on childhood deaths from diarrhea in Brazil. *Int J Infect Dis.* 2011;15(3):e206-10.
63. Richardson V, Hernandez-Pichardo J, Quintanar-Solares M, Esparza-Aguilar M, Johnson B, Gomez-Altamirano CM, et al. Effect of rotavirus vaccination on death from childhood diarrhea in Mexico. *N Engl J Med.* 2010;362(4):299-305.
64. Cotes K, Alvis-Guzmán N, Rico A, Porras A, Cediél N, Chocontá Piraquive L, et al. Evaluación del impacto de la vacuna contra rotavirus en Colombia usando métodos rápidos de evaluación. *Revista Panamericana de Salud Pública.* 2013;34:220- 6.
65. Paternina Caicedo A. Efectividad de la vacuna antirotavírica en Colombia. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2013.
66. Cotes-Cantillo K, Paternina-Caicedo A, Coronell-Rodríguez W, Alvis-Guzmán N, Parashar UD, Patel M, et al. Effectiveness of the monovalent rotavirus vaccine in Colombia: a case-control study. *Vaccine.* 2014;32(25):3035-40.
67. INS. Informe de la vigilancia centinela de enfermedad diarreica aguda causada por Rotavirus. Colombia2016. p. 17.
68. Moore KA, Simpson JA, Scoullar MJL, McGready R, Fowkes FJI. Quantification of the association between malaria in pregnancy and stillbirth: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health.* 2017;5(11):e1101-e12.
69. De Beaudrap P, Turyakira E, Nabasumba C, Tumwebaze B, Piola P, Boum Ii Y, et al. Timing of malaria in pregnancy and impact on infant growth and morbidity: a cohort study in Uganda. *Malar J.* 2016;15:92.
70. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):e45.
71. Rojas OL, Narváez CF, Greenberg HB, Angel J, Franco MA. Characterization of rotavirus specific B cells and their relation with serological memory. *Virology.* 2008;380(2):234-42.
72. OPS. Informe de País del PAI, Colombia 2017. Organización Panamericana de la Salud; 2018.
73. Borrow, R, P B, M.H R. The immunologic basis for immunization: module 3: tetanus.2007.
74. Blencowe H, Lawn J, Vandelaer J, Roper M, Cousens S. Tetanus toxoid immunization to reduce mortality from neonatal tetanus. *Int J Epidemiol.* 2010;39 Suppl 1:i102-9.
75. Dennehy PH. Rotavirus Vaccines: an Overview. *Clinical Microbiology Reviews.* 2008;21(1):198.
76. Rennels MB. Influence of breast-feeding and oral poliovirus vaccine on the immunogenicity and efficacy of rotavirus vaccines. *J Infect Dis.* 1996;174 Suppl 1:S107-11.
77. Schauer U, Stemberg F, Rieger CH, Büttner W, Borte M, Schubert S, et al. Levels of antibodies specific to tetanus toxoid, Haemophilus influenzae type b, and pneumococcal capsular polysaccharide in healthy children and adults. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003;10(2):202-7.
78. Azim T, Zaki MH, Podder G, Sultana N, Salam MA, Rahman SM, et al. Rotavirus-specific subclass antibody and cytokine responses in Bangladeshi children with rotavirus diarrhoea. *Journal of Medical Virology.* 2003;69(2):286-95.

79. Xu J, Dennehy P, Keyserling H, Westerman LE, Wang Y, Holman RC, et al. Serum antibody responses in children with rotavirus diarrhea can serve as proxy for protection. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005;12(2):273-9.
80. Bardají A, Martínez-Espinosa FE, Arévalo-Herrera M, Padilla N, Kochar S, Ome-Kaius M, et al. Burden and impact of *Plasmodium vivax* in pregnancy: A multi-centre prospective observational study. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 2017;11(6):e0005606.
81. Rijken MJ, Papageorghiou AT, Thiptharakun S, Kiricharoen S, Dwell SLM, Wiladphaingern J, et al. Ultrasound Evidence of Early Fetal Growth Restriction after Maternal Malaria Infection. *PLOS ONE.* 2012;7(2):e31411.
82. Demissie Y, Ketema T. Complicated malaria symptoms associated with *Plasmodium vivax* among patients visiting health facilities in Mendi town, Northwest Ethiopia. *BMC Infect Dis.* 2016;16(1):436.
83. Ketema T, Bacha K. *Plasmodium vivax* associated severe malaria complications among children in some malaria endemic areas of Ethiopia. *BMC Public Health.* 2013;13:637.
84. Chêne A, Briand V, Ibitokou S, Dechavanne S, Massougbdji A, Deloron P, et al. Placental cytokine and chemokine profiles reflect pregnancy outcomes in women exposed to *Plasmodium falciparum* infection. *Infect Immun.* 2014;82(9):3783-9.
85. Medina TS, Costa SP, Oliveira MD, Ventura AM, Souza JM, Gomes TF, et al. Increased interleukin-10 and interferon- γ levels in *Plasmodium vivax* malaria suggest a reciprocal regulation which is not altered by IL-10 gene promoter polymorphism. *Malar J.* 2011;10:264.
86. Gueneuc A, Deloron P, Bertin GI. Usefulness of a biomarker to identify placental dysfunction in the context of malaria. *Malar J.* 2017;16(1):11.
87. Jones RL, Stoikos C, Findlay JK, Salamonsen LA. TGF-beta superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. *Reproduction.* 2006;132(2):217-32.
88. Wilson NO, Bythwood T, Solomon W, Jolly P, Yatich N, Jiang Y, et al. Elevated levels of IL-10 and G-CSF associated with asymptomatic malaria in pregnant women. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2010;2010.
89. Wammes LJ, Wiria AE, Toenhake CG, Hamid F, Liu KY, Suryani H, et al. Asymptomatic plasmodial infection is associated with increased tumor necrosis factor receptor II-expressing regulatory T cells and suppressed type 2 immune responses. *J Infect Dis.* 2013;207(10):1590-9.
90. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature.* 2005;439:682.
91. Crawford A, Wherry EJ. The diversity of costimulatory and inhibitory receptor pathways and the regulation of antiviral T cell responses. *Current Opinion in Immunology.* 2009;21(2):179-86.
92. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature.* 2006;443:350.
93. Kurup SP, Obeng-Adjei N, Anthony SM, Traore B, Doumbo OK, Butler NS, et al. Regulatory T cells impede acute and long-term immunity to blood-stage malaria through CTLA-4. *Nat Med.* 2017;23(10):1220-5.
94. Boudova S, Divala T, Mungwira R, Mawindo P, Tomoka T, Sztejn M, et al. Altered Fetal Cytokine Profiles Are Associated With Placental Malaria. *Open Forum Infectious Diseases.* 2016;3(suppl_1):848-.
95. Khadilkar V, Tudehope D, Fraser S. A prospective study of nosocomial infection in a neonatal intensive care unit. *J Paediatr Child Health.* 1995;31(5):387-91.
96. Lewis DB, Gern JE, Hill HR, Friedlander SL, La Pine TR, Lemanske RF, et al. Newborn immunology: relevance to the clinician. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.* 2006;36(5):189-204.
97. Takahata Y, Nomura A, Takada H, Ohga S, Furuno K, Hikino S, et al. CD25+CD4+ T cells in human cord blood: an immunoregulatory subset with naive phenotype and specific expression of forkhead box p3 (Foxp3) gene. *Exp Hematol.* 2004;32(7):622-9.
98. Agudelo García OM. Malaria placentaria submicroscópica por *Plasmodium vivax* o *Plasmodium falciparum*: histopatología, células inmunitarias y expresión de genes asociados a hipoxia, apoptosis e inflamación. Medellín: Universidad de Antioquia; 2018.

99. Goyal JP, Makwana AM. Comparison of Clinical Profile between *P. vivax* and *P. falciparum* Malaria in Children: A Tertiary Care Centre Perspective from India. *Malar Res Treat*. 2014;2014:132672.
100. Karunaweera ND, Wijesekera SK, Wanasekera D, Mendis KN, Carter R. The paroxysm of *Plasmodium vivax* malaria. *Trends in Parasitology*. 2003;19(4):188-93.
101. King T, Lamb T. Interferon- γ : The Jekyll and Hyde of Malaria. *PLoS pathogens*. 2015;11(10):e1005118.
102. Rudin W, Favre N, Bordmann G, Ryffel B. Interferon- γ is essential for the development of cerebral malaria. *European Journal of Immunology*. 1997;27(4):810-5.
103. Palmeira P, Quinello C, Silveira-Lessa A, Zago C, Carneiro-Sampaio M. IgG Placental Transfer in Healthy and Pathological Pregnancies. *Clinical and Developmental Immunology*. 2012;2012:13.
104. Doroudchi M, Samsami Dehaghani A, Emad K, Ghaderi A. Placental transfer of rubella-specific IgG in fullterm and preterm newborns. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2003;81(2):157-62.
105. Ghotbizadeh F, Ali Rezaei Nayeh M, Fahimzad A, Karimi A. Seroprevalence of Pertussis Antibodies in Maternal and Cord Blood Sample of Their Newborns *Arch Pediatr Infect Dis*. 2018; 6(2):e13751.
106. Naidu MA, Muljadi R, Davies-Tuck ML, Wallace EM, Giles ML. The optimal gestation for pertussis vaccination during pregnancy: a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol*. 2016;215(2):237.e1-6.
107. Ara G, Bari MA, Siddiquey AK. Effects of age, parity and length of pregnancy on the morphology and histology of human placenta. *Bangladesh Med Res Counc Bull*. 1984;10(2):53-8.
108. Parekh FK, Davison BB, Gamboa D, Hernandez J, Branch OH. Placental histopathologic changes associated with subclinical malaria infection and its impact on the fetal environment. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;83(5):973-80.
109. Liu X, Ye L, Bai Y, Mojidi H, Simister NE, Zhu X. Activation of the JAK/STAT-1 signaling pathway by IFN- γ can down-regulate functional expression of the MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG. *J Immunol*. 2008;181(1):449-63.
110. Donati D, Zhang LP, Chen Q, Chêne A, Flick K, Nyström M, Wahlgren M, Bejarano MT. Infection and Immunity Aug 2004, 72 (9) 5412-5418.
111. Greenwood, B.M. Possible role of a B cell mitogen in hypergammaglobulinaemia in malaria and trypanosomiasis. *Lancet* 1974, 303, (7855) 435- 436.
112. Wilcox CR, Holder B, Jones CE. Factors Affecting the FcRn-Mediated Transplacental Transfer of Antibodies and Implications for Vaccination in Pregnancy. *Front Immunol*. 2017, (8), 1294, 1-13.
113. de Moraes-Pinto MI, Almeida AC, Kenj G, Filgueiras TE, Tobias W, Santos, Carneiro-Sampaio M, et al. Placental Transfer and Maternally Acquired Neonatal IgG Immunity in Human Immunodeficiency Virus Infection, *J Infect Dis*. 1996 May;173(5):1077-1084.
114. Abu-Raya B, Smolen KK, Willems F, Kollmann TR, Marchant A. Transfer of maternal antimicrobial immunity to HIV-exposed uninfected newborns. *Front Immunol* 2016, 338, (7), 1-10.

4 Capítulo 4:

Efecto de la MAE sobre la respuesta inmune de lactantes a algunas vacunas

4.1 Planteamiento del problema

4.1.1 Características de la inmunidad neonatal

Los recién nacidos muestran diferencias cuantitativas y cualitativas, con respecto a individuos adultos, en casi todos los aspectos de la inmunidad (1-9). Estas diferencias se explican por los diferentes mecanismos inmunosupresores maternos involucrados en el mantenimiento de la tolerancia fetal, que condicionan al neonato a un perfil Th2 en el momento del nacimiento (10). Mediadores placentarios como la progesterona y las prostaglandinas promueven la respuesta de tipo Th2 durante las etapas fetales que se extienden hasta la edad perinatal (comienza en la vigésimoctava semana de gestación y culmina siete días después del parto) (11-13). Además, la frecuencia de células Treg aumenta durante el embarazo porque tienen un papel clave en la tolerancia materno-fetal (14, 15). Dichas células abarcan de 5 a 10% de la población de células T CD4⁺ de los adultos no gestantes y se caracterizan por la expresión del marcador de superficie CD-25 (IL-2R α o subunidad α del receptor para la interleuquina-2) y el factor de transcripción FoxP3, además de la expresión de múltiples receptores de regulación inmune como TNFR2, CTLA-4, PD-1, TIM-3, LAG-3.

Adicionalmente, se ha observado que en los neonatos la frecuencia de células Treg en cordón umbilical, sangre periférica y nódulos linfáticos, es mayor con respecto a individuos adultos, lo que puede afectar su capacidad inmune (7, 16-18). Asimismo, el nivel de IL-10 y TGF β neonatal es de 10 a 30 veces mayor que el de los adultos (19); estas interleuquinas facilitan

la diferenciación de células T CD4⁺ vírgenes fetales a células Treg inducidas en tejidos periféricos (7, 20, 21). Las células Treg neonatales ejercen su función de supresión y tienen una expresión relativamente estable de FoxP3; aunque la capacidad de generación de células Treg en los neonatos disminuye gradualmente dentro de las dos primeras semanas de vida (22). Otro aspecto que muestra alteración de la efectividad inmune neonatal es que las células presentadoras de antígenos tienen baja expresión de moléculas como CMH-II y de moléculas coestimuladoras como CD-80, CD-86 y CD-40 (1, 5, 6, 9).

Todo lo anterior limita la activación de respuestas inmunes efectoras de células T CD4⁺ y CD8⁺, así como la activación de células B responsables de la respuesta inmune humoral (23, 24). Varios estudios sugieren que la condicionada respuesta Th2 y la inmadurez inmunológica neonatal, pueden ser las responsables de la carencia de funciones inflamatorias de los leucocitos neonatales, lo que produce inmunotolerancia, mayor susceptibilidad a infecciones y limitado control de estas (1, 4, 6).

4.1.2 Estrategias de protección neonatal

Las infecciones juegan un papel importante en la mortalidad infantil, dada la mayor susceptibilidad neonatal antes descrita. Por esta razón, hay estrategias claves durante las etapas prenatal y postnatal temprana, para mejorar la resistencia de los neonatos a las infecciones específicas, a través de respuestas homólogas y heterólogas protectoras. Las intervenciones como la inmunización prenatal y la vacunación en la primera infancia, contribuyen de manera significativa a la prevención de las muertes infantiles (25). Específicamente las estrategias de protección neonatal incluyen:

- 1) La inmunización materna, que aumenta la transferencia de anticuerpos IgG maternos específicos y de alta afinidad, a través de la placenta, para proteger al feto y al recién nacido contra agentes patógenos específicos (26).
- 2) La lactancia materna, que proporciona IgAs e IgG que reflejan especificidades de la microbiota materna; además, suministra factores solubles que incluyen interleuquinas, lípidos y ácidos grasos, que mejoran ampliamente la resistencia de la mucosa a la infección (26, 27).

3) A pesar de la “inmadurez” del sistema inmune neonatal, la respuesta inmune generada frente a la inmunización temprana ayuda a reducir el riesgo de infecciones por patógenos específicos (28, 29), y además, las vacunas vivas atenuadas como la BCG, proporcionan una amplia protección heteróloga mediante un mecanismo llamado “inmunidad entrenada”, en el que la infección (vacuna) realiza una reprogramación epigenética de las células presentadoras de antígeno, mejorando posteriormente la efectividad de la respuesta inmune innata neonatal (30).

4.1.3 Microbiota y respuesta inmune

Además de las estrategias ya mencionadas, otro factor importante en el desarrollo de la competencia inmune neonatal es el establecimiento de la microbiota. Por esta se entiende el ecosistema de microorganismos procariontes y eucariontes del cuerpo humano, que explica directa e indirectamente la salud de las personas. Se ha descrito que la maduración del sistema inmunológico se logra mediante interacciones bidireccionales en las que la microbiota intestinal dirige el desarrollo del sistema inmunitario, mientras que el sistema inmunitario del hospedero determina el establecimiento de la microbiota intestinal (31, 32). Los microorganismos son requeridos para la maduración del sistema inmune, que aprende a diferenciar entre bacterias comensales (antígenos tolerados) y patógenas (33). El mantenimiento en la tolerancia inmunológica posterior al nacimiento, es fundamental para facilitar la colonización de los microorganismos comensales (34).

Estudios recientes han evaluado la influencia de la microbiota en la inmunidad: se demostró que la microbiota del tracto gastrointestinal modula la migración y función de los neutrófilos e interfiere en la diferenciación de las células T a los distintos tipos de poblaciones celulares: Th1, Th2, Th17 o Treg (32). Asimismo, distintas especies bacterianas se han asociado con mayor efectividad de la respuesta frente a vacunas. Un aumento en la abundancia relativa de *Streptococcus gallolyticus* y *Enterobacteria-Bacteroides* se encontró en niños que respondieron a la vacuna oral contra rotavirus (>20 IU/mL de IgA), en comparación con niños que no respondieron (35). Un aumento en la abundancia relativa del filo *Actinobacteria* se asoció con mayor cantidad de células T específicas y niveles de IgG contra poliovirus, BCG y TT (36).

4.1.4 Tipos de vacunas y receptores sensores en células dendríticas

La naturaleza del antígeno y la vía de administración de la vacuna determinan el tipo de receptor de reconocimiento de patrones (*pattern recognition receptor* PRR) que detecta el antígeno y el tipo de célula dendrítica (por un lado, células dendríticas mieloides convencionales 1 y 2 o, por otra parte, células dendríticas plasmocitoides) más indicada, de acuerdo con su repertorio de receptores PRR, para activar la respuesta inmune (37). La señalización que resulta del estímulo de los receptores PRR es la activación de factores de transcripción como NF- κ B (del inglés: *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) e IRF (1 al 9) (del inglés: *interferon regulatory factor*), que proveen un contexto inflamatorio para la rápida activación de la respuesta del hospedero. NF- κ B controla la expresión de interleuquinas proinflamatorias como IL-1 β y TNF, mientras que IRF3 y 7 conducen a la producción del interferón tipo I antiviral (IFN- α e IFN- β) (38).

Las células dendríticas inmaduras están ubicadas en diferentes sitios anatómicos en el cuerpo, lo que permite una respuesta rápida frente a una invasión patógena; ellas detectan señales microbianas potencialmente patógenas a través de los PRR lo que favorece la maduración y migración a órganos linfoides para activar células T. Cada tipo de célula dendrítica cuenta con diferentes características que incluyen el repertorio de expresión de PRR como los TLR (37, 38). La activación de diferentes células dendríticas tiene el potencial de inducir cualitativamente distintos tipos de respuesta inmune, por ejemplo, las células dendríticas mieloides convencionales tipo 1 se asocian con alta producción de IL-12 y activación de respuestas tipo Th1, mientras que las mieloides convencionales tipo 2 se asocian con respuestas Th1, Th2, Th17 y Treg; por su parte las células dendríticas plasmocitoides se asocian con la producción de altos niveles de IFN tipo 1 y dependiendo del estímulo puede favorecer repuestas tanto inmunogénicas como tolerogénicas (37, 39).

De acuerdo con lo anterior, la inmunidad innata condiciona el desarrollo subsecuente de la respuesta inmune adaptativa específica. Además, según sea el tipo de vacuna, sea viva atenuada replicativa bacteriana (BCG) o viral (rotavirus), de toxoide (TT), de proteínas recombinantes (AgsHB) o de polisacáridos bacterianos conjugados (neumococo) (**Tabla 1,2, Figura 1,3 A-E**), se activan diferentes PRR y por tanto, diferentes vías en las células

dendríticas. Asimismo, la vía de administración de la vacuna sea oral o intradérmica, subcutánea o intramuscular, influye en la activación de las células dendríticas, puesto que dependerá del tipo de células predominantes en el sitio de aplicación de la vacuna.

4.1.5 Inmunomodulación por *Plasmodium* spp en la vida temprana y la respuesta a vacunas

La respuesta inmune adaptativa presenta cuatro mecanismos básicos en su fase efectora: la respuesta humoral clásica (A), la respuesta humoral mediada por IgE (B), la respuesta celular citotóxica (C) y la respuesta celular tipo hipersensibilidad retardada (D). Los neonatos activan respuestas inmunes efectoras de menor intensidad y eficiencia, en comparación con individuos adultos; por esta razón, estrategias como la vacunación prenatal, la vacunación infantil y la lactancia materna, son fundamentales para la protección neonatal en los primeros meses de vida. Sin embargo, estas estrategias se pueden ver afectadas por algunos factores, lo que aumenta aún más la susceptibilidad a infecciones en los neonatos, incluso a infecciones inmunoprevenibles.

Varios estudios que evaluaron el efecto de las infecciones por *Plasmodium* spp sobre la modulación de la respuesta inmune, han descrito disminución de la expresión de CMH-II y de moléculas de adhesión y coestimulación en células presentadoras de antígenos (40), así como aumento de la diferenciación de células Treg (41, 42) y alta expresión de receptores reguladores de la respuesta inmune como TNF-RII (42). Además, en lactantes hijos de mujeres con malaria placentaria microscópica por *P. falciparum*, se han descrito cambios en la distribución de las poblaciones celulares, tales como alta frecuencia de células Treg y baja frecuencia de células T CD4⁺ y NKT, incluso hasta el primer año de vida (43).

En infecciones microscópicas por *P. falciparum* hay algunos reportes que muestran alteración de la respuesta inmune frente a vacunas como TT (44, 45), toxoide diftérico (46), BCG (47, 48) y polisacáridos bacterianos (46, 49-51); pero otros estudios muestran resultados discordantes, probablemente debido a que las poblaciones evaluadas son muy heterogéneas, que contemplan niños con edades que van 6 meses a 12 años y también adultos de todas las edades y gestantes (Revisado en (52)). Pocos estudios evalúan el efecto de las

vacunas en lactantes, quienes en la mayoría de casos, carecen de retos antigénicos previos a la vacunación.

En Colombia es alta la frecuencia de infección plasmoidal asociada al embarazo; la frecuencia de infección microscópica en sangre periférica materna y en sangre placentaria es de 13% y 9%, respectivamente (53), y la frecuencia de infección submicroscópica gestacional varía entre 23% y 49% y la placentaria varía entre 5% y 57% (54, 55). Estas infecciones submicroscópicas son consideradas crónicas, porque no son diagnosticadas por los métodos de rutina y generalmente son asintomáticas; sin embargo, estas infecciones se asocian con alteraciones histológicas del tejido placentario como deciduitis e invervillitis (54), con aumento de células preapoptóticas y apoptóticas en tejido placentario y con cambios transcripcionales en placenta y sangre periférica materna de mediadores inmunes proinflamatorios y antiinflamatorios (56, 57). Pero, a pesar de la evidencia de cambios histológicos y transcripcionales en infecciones plasmodiales submicroscópicas durante la gestación, aún no se conocen las consecuencias generadas por estas alteraciones en el desarrollo inmune neonatal.

En el presente trabajo se ha demostrado que las infecciones plasmodiales microscópicas y submicroscópicas durante el embarazo y en el momento de parto, se asocian con reducción en los niveles de IgG antiTT en gestantes que recibieron la respectiva dosis de la vacuna (Capítulo 2 y (58)) y también con cambios transcripcionales de moléculas inmunes en el tejido placentario (Capítulo 3). Estos hallazgos, junto con los antecedentes recientemente descritos sobre la aumentada susceptibilidad neonatal a las infecciones y la capacidad de modulación de la respuesta inmune por *Plasmodium* spp, permitieron plantear el objetivo general de esta parte del trabajo que corresponde a evaluar el efecto inmunomodulador de la MAE y su asociación con la respuesta inmune generada en lactantes frente a vacunas incluidas en el PAI colombiano.

4.2 Objetivos específicos

En mujeres con y sin malaria gestacional y placentaria submicroscópica y con y sin malaria gestacional microscópica y sus lactantes de 6 meses de edad:

1. Comparar los niveles séricos de anticuerpos IgG contra TT, neumococo, BCG, Rotavirus y AgsHB e IgA contra rotavirus en los lactantes de 6 meses de edad.
2. Comparar la respuesta inmune celular generada por la vacuna BCG, cuantificando la respuesta de INF γ en los lactantes de 6 meses.
3. Comparar los niveles de expresión de moléculas proinflamatorias, antiinflamatorias, coestimuladoras y reguladoras de la respuesta inmune en placenta y sangre periférica de las madres y sus lactantes.

4.3 Metodología

4.3.1 Lugar del estudio

En el capítulo 2 se describieron las características de los tres municipios en los que se hizo la captación de las gestantes y sus hijos: Tierralta y Puerto Libertador del departamento de Córdoba y Quibdó del departamento de Chocó (página 79).

4.3.2 Población de estudio y diseño

Para evaluar el efecto inmunomodulador de la MAE y su asociación con la respuesta inmune generada en lactantes de 6 meses, frente a vacunas incluidas en el PAI colombiano, se conformaron los siguientes grupos de estudio:

- **Grupo ISP-P:** mujeres que en el momento del parto tenían infección submicroscópica plasmodial (detectada solo por qPCR) en sangre periférica materna y/o en la placenta, en el momento del parto (n=15).

- **Grupo IP-E:** mujeres con infección plasmodial microscópica (detectada por gota gruesa) durante el embarazo, pero negativas en el parto, tanto en placenta como en sangre periférica (n=17).
- **Grupo negativas (control):** mujeres sin infección plasmodial microscópica (negativas por gota gruesa) durante el embarazo, y sin infección plasmodial microscópica y submicroscópica en el momento del parto (negativas por gota gruesa y qPCR) (n=25).

Las mujeres incluidas en los grupos de estudio ISP-P e IP-E fueron seleccionadas de acuerdo con la condición de infección, el cumplimiento del esquema de vacunación de gestantes y lactantes hasta el mes 4 de vida y el cumplimiento del seguimiento del lactante a los 6 meses de edad. Para la selección del grupo homogéneo de mujeres negativas (n=25) se tuvo en cuenta: la negatividad en la condición de infección microscópica desde el control prenatal y de infección plasmodial microscópica y submicroscópica en el momento del parto, el cumplimiento del esquema de vacunación de gestantes y lactantes hasta el mes 4 de vida y el cumplimiento del seguimiento del lactante a los 6 meses de edad. Algunas mujeres de los grupos de este capítulo fueron compartidas con el capítulo 2.

4.3.2.1 Distribución de la infección en los grupos de estudio

En el grupo de mujeres con ISP-P, 47% estaban infectadas con *P. falciparum* (n=7), 47% con *P. vivax* (n=7) y 6 % tenía infección mixta (n=1). En el grupo de mujeres con IP-E, 35% estaban infectadas con *P. falciparum* (n=6) y 65% con *P. vivax* (n=11). Como se describió en la metodología, las mujeres del grupo de negativas no contaban con historia de malaria microscópica durante el embarazo y fueron negativas para infección gestacional y placentaria microscópica y submicroscópica en el momento del parto.

4.3.3 Criterios de inclusión

Los criterios de inclusión fueron definidos en el capítulo dos y pueden ser consultados en la página 84.

4.3.4 Recolección de datos y muestras

Como se describió en el capítulo 2 (página 84), los datos clínicos y epidemiológicos de las gestantes se tomaron a partir de una encuesta que se diligenció en el momento del ingreso de la gestante, durante el trabajo de parto o justo después del parto. Para el seguimiento de los lactantes a los 6 meses de edad, se procedió a tomar de su historia clínica o carné de crecimiento y desarrollo, la información sobre sus antecedentes vacunales, peso, talla y perímetro cefálico.

El procedimiento de recolección de muestras de gestantes y placentas, se describió en el capítulo 2 (página 84). A los lactantes a los 6 meses se les tomó sangre periférica en tubo seco y con EDTA para la separación de suero, plasma y capa de blancos en Trizol® (56), como se hizo para las gestantes. Adicionalmente, a un subgrupo de 15 lactantes se les tomó muestras sangre periférica en EDTA para la separación de los mononucleares que se usaron para evaluar la respuesta inmune celular a BCG.

La cuantificación de los niveles de anticuerpos IgG contra TT, neumococo, BCG, rotavirus y AgsHB e IgA contra rotavirus, se hizo en la totalidad de los lactantes de 6 meses (ISP-P n=15, IP-E n=17 y negativas n=25). También en la totalidad de individuos se hizo la cuantificación relativa de la expresión de los mediadores inmunes en tejido placentario, sangre periférica materna y sangre periférica de los lactantes de 6 meses. La cuantificación de la respuesta inmune celular contra BCG se hizo en un subgrupo de lactantes distribuidos entre los grupos de estudio, así: ISP-P n=3, IP-E n=7 y grupo control n=5. Solo se pudo hacer esta medición en un subgrupo debido a lo difícil que resulta conseguir y procesar este tipo de muestras en las condiciones de campo.

4.3.5 Diagnóstico de infección plasmodial y cuantificación de mediadores inmunes

La infección plasmodial en sangres periférica y placentaria se diagnosticó por microscopía y qPCR, tal y como se describió en el capítulo 2 (página 85). La cuantificación relativa de la expresión de los mediadores inmunes en sangre periférica materna y tejido placentario se

hizo según lo descrito en los capítulos 2 (página 87) y 3 (página 118), respectivamente. Para la cuantificación de estos mediadores en sangre periférica de los lactantes, se usó como muestra de referencia una mezcla de ARN de 10 lactantes residentes de la zona (sin ninguna enfermedad referida por la madre), hijos de gestantes sanas (con controles prenatales dentro de los parámetros normales) y sin historia de malaria durante el embarazo.

4.3.6 Cuantificación de IgG contra TT y Rotavirus

Los niveles séricos de IgG contra TT en los lactantes a los 6 meses de edad se midieron según lo descrito en el capítulo 2 (página 88). Mientras que en el capítulo 3 se describió el procedimiento que se usó para medir los niveles séricos de IgG contra rotavirus (página 119).

4.3.7 Cuantificación de los niveles de IgA contra rotavirus

Los niveles de IgA antirrotavirus (antiRV) fueron cuantificados mediante ELISA de acuerdo al protocolo de Rojas et al 2008 (59), con modificaciones menores. En resumen, para sensibilizar los platos (platos de 96 pozos Immulon® 2HB) se agregaron 70 μ L por pozo de sobrenadante de células MA104 infectadas con la cepa Rotavirus 89-12 (donación del Dr. Manuel Antonio Franco, Instituto de Genética Humana, Pontificia Universidad Javeriana) o con sobrenadante de cultivo de células no infectadas (control negativo o control mock), se incubaron toda la noche a 4 °C y luego se bloquearon los sitios de unión inespecífica con PBS1x, Tween 20 1% y BSA 0,1%. Los sueros se diluyeron 1:70 con una solución de PBS1x, Tween 20 al 0,01% y BSA 0,1%, se agregaron 70 μ L/pozo de dicha dilución a los platos sensibilizados y se incubó por 2 horas a 37°C. Luego, se hicieron tres lavados con PBS1x Tween 0,05% y se procedió a adicionar 70 μ L/pozo de anti IgA humana marcada con peroxidasa (A0295 Sigma) diluida 1:50000 en PBS1x con Tween 20 al 0,01% y BSA 0,1%. Se hizo lavado tres veces, y para revelar la reacción, se agregaron 100 μ L/pozo de sustrato TMB (T0440 Sigma). La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 1M y se procedió a leer la absorbancia a 450 nm en lector de ELISA Labsystems Multiskan microplate reader (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Una mezcla suero de niños con IgA antiRV fue utilizada para hacer una curva de diluciones seriadas y verificar la relación proporcional entre la concentración de anticuerpos y las absorbancias. El suero de un niño sin evidencia de

infección previa por rotavirus o de transferencia de anticuerpos IgA maternos antiRV se utilizó como control negativo (seronegativo para IgG e IgA contra rotavirus). La selección de las muestras control positivo se hizo haciendo la técnica ELISA para detectar los anticuerpos IgA antiRV en 15 sueros de niños con síntomas de gastroenteritis; los sueros de niños con mayores absorbancias fueron seleccionados como positivos para la curva estándar. Sueros de lactantes mayores de un año, sin historia de gastroenteritis fueron probados con la técnica de ELISA, y los valores de absorbancia menores a dos veces la absorbancia del control mock, fueron usados como control negativo. Para el análisis de los datos los valores de absorbancia fueron convertidos a unidades arbitrarias (UA) aplicando la formula descrita en el capítulo 3. El punto de corte se estableció como el valor de UA obtenidas en el control no expuesto (control negativo), de esta manera, los valores superiores a 10 UA fueron considerados como seropositivos.

4.3.8 Respuesta inmune humoral contra BCG: cuantificación de los niveles de IgG contra PPD

La cuantificación sérica de anticuerpos IgG contra PPD (antiPPD) fueron medidos por ELISA, usando el protocolo descrito por Coppola et al., 2017 (61), con modificaciones menores. Brevemente, los platos de 96 pozos Immulon® 2HB, fueron sensibilizados durante 2 horas a 37°C con 0,5µg/mL de derivado proteínico purificado (PPD) (PD Tuberculina Mammalian, BB-NCIPD Ltda, Bulgaria) y luego se bloquearon los sitios de unión inespecífica con PBS1x, Tween 20 1% y BSA 0,1%. Las muestras fueron diluidas 1:50 con una solución de PBX1x, Tween 20 0,01% y BSA 0,1%, se agregaron 100µL/pozo de dicha dilución y se incubó toda la noche a 4 °C. Luego, se lavó 6 veces con PBS1x Tween 0,05% y se adicionaron 100 µL/pozo de anti IgG humana marcada con peroxidasa (A0170 Sigma) diluida 1:6000 en PBS1x con Tween 20 al 0,01% y BSA 0,1%. Se hizo lavado tres veces, y para revelar la reacción, se agregaron 100 µL/pozo de sustrato TMB (T0440 Sigma). La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 1M y se procedió a leer la absorbancia a 450 nm en lector de ELISA Labsystems Multiskan microplate reader (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Diluciones seriadas de suero de un individuo con diagnóstico confirmado de tuberculosis extrapulmonar fue usado como control positivo, con el cual además se hizo una

curva de diluciones seriadas para verificar la relación proporcional entre la concentración de anticuerpos y las absorbancias. Para el análisis de los datos los valores de absorbancia fueron convertidos a UA utilizando la fórmula ya descrita en el capítulo 3. Al carecer de un suero no reactivo frente a PPD, no se pudo establecer punto de corte de seronegatividad en las muestras evaluadas.

4.3.9 Cuantificación de los niveles de IgG contra polisacáridos capsulares de neumococo

Los niveles de anticuerpos IgG específicos contra los tres serotipos (1, 14 y 23F) de polisacáridos (PSC) de *S. pneumoniae* contenidos en la vacuna PCV10 (Synfloryx® GSK), se determinaron mediante un protocolo de ELISA, estandarizado por Leal-Esteban et al., 2012 (62) y ofrecido en el portafolio de servicios del grupo Inmunodeficiencias Primarias (IDP) de la Universidad de Antioquia. Este método incluye la doble absorción de los sueros usando polisacárido común (PS-C) (Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark) y PSC 22F (ATCC, Rockville, MD, USA) de neumococo, para lo cual se agregó secuencialmente cada uno de estos PSC, a una concentración final de 50 µg/mL, a las muestras de suero diluidas 1:10 con PBS1x con Tween 20 al 0,01% y BSA 0,1% y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Previamente, platos de 96 pozos (MaxiSorp, Nunc, Rochester, USA) habían sido sensibilizados con 10 µg/mL de los PSC 1, 14 y 23F (ATCC) de interés en PBS 1x (Gibco, Carlsbad, California, USA), incubados por 5 horas a 37°C y luego a 4°C toda la noche y lavados una vez con solución de PBS 1x 0,05% Tween-20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Los sueros absorbidos se diluyeron 1:50 con solución de PBS1x, Tween 20 al 0,01% y BSA 0,1% y se agregaron por duplicado 100 µL/pozo de cada suero absorbido y los controles de referencia en la fila A del plato. A partir del pozo A se hicieron tres diluciones dobles seriadas (1:100, 1:200 y 1:400) y luego los platos se incubaron 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se hizo lavado tres veces, se agregaron 50 µL/pozo de anticuerpo monoclonal antiFc humano conjugado con peroxidasa (Hybridoma Reagent Labs, Baltimore, USA) a una concentración de 0,25 µg/mL y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente. Luego se hizo lavado 4 veces y se incubó 5 minutos con TMB-Solución tampón fosfato/citrato (Sigma-Aldrich). La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 2,5 N y los platos

se leyeron a una densidad óptica de 450 nm en el lector de ELISA (BioTek Instruments, ELx808, Winooski, USA). La concentración de IgG se determinó a través de una curva de calibración de cada PSC (1, 14 y 23F), usando el suero de referencia. El suero control de referencia se preparó a partir de 6 individuos (3 hombres y 3 mujeres) sanos, un mes posterior a la vacunación con PCV23 (Pneumo23®, Sanofi Pasteur, Francia). Los valores superiores a 1,3 µg/mL son considerados como valores protectores.

4.3.10 Cuantificación de los niveles de IgG contra antígeno de superficie de Hepatitis B

Los niveles de IgG contra el antígeno de superficie de Hepatitis B (antiHB) fueron cuantificados mediante ELISA. Para la cuantificación de esos anticuerpos se usó el estuche comercial ETI-AB-AUK-3 (DiaSorin, Saluggia, Italia) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Cada muestra fue evaluada por duplicado. Los platos fueron leídos en el lector de ELISA Labsystems Multiskan microplate reader (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) a 450 y 620 nm. Los cálculos y los análisis de regresión fueron realizados manualmente en Microsoft Excel 2013. El punto de corte de seropositividad es de 10 UI/L, según las indicaciones del fabricante.

4.3.11 Respuesta inmune celular contra BCG: Cuantificación de niveles de interferón contra PPD en mononucleares de sangre periférica (MNSP)

Los MNSP de los lactantes a los 6 meses de edad fueron aislados a partir de 2 mL sangre total en EDTA, que se sometieron a centrifugación a 800 g por 30 minutos a temperatura ambiente, en un gradiente de densidad con Lymphoprep (Stemcell, Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway), para lo cual se usaron tubos SepMate de 15 mL (Stem cell Technologies). Los MNSP fueron criopreservados en suero fetal bovino (SFB) 10% Dimetilsulfoxido (DMSO) en CoolCell (BioCision, Mill Valley, USA) a -86°C en cámara de hielo seco por 4 horas y posteriormente transferidos a nitrógeno líquido para ser transportados a Medellín y mantenidos en esas condiciones hasta su posterior procesamiento, que consistió en descongelarlos rápidamente en baño serológico a 37°C, lavarlos con medio RPMI con 1

UI/mL de DNAsa I y cultivarlos en medio RPMI al 10% de SFB, a una concentración de 1 millón de células/mL en platos de 4 pozos (Thermo Scientific™ Nunc™) a 37°C y en ambiente de 5% de CO₂. El cultivo se dejó en reposo por dos horas y luego se procedió a adicionar los tratamientos, así: 1) un pozo con 500 µL de células (1 millón/mL) sin estímulo; 2) un pozo con 500 µL de células (1 millón/mL) con estímulo de PPD a una concentración final de 0,5 µg/mL; 3) un pozo con 500 µL de células (1 millón/mL) con estímulo de fitohemaglutinina (PHA) (Sigma L1668) a una concentración final de 10 µg/mL. Luego del tratamiento, se recolectaron los sobrenadantes del cultivo a las 24, 48 y 72 horas. En cada sobrenadante se cuantificaron los niveles de IFN-γ con el método de ELISA, usando el estuche comercial Human OptEIA™ (BD Biosciences, Inc., San Jose, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.3.12 Análisis estadístico

La mayoría de los datos obtenidos no se distribuyeron de manera normal/gaussiana basados en las pruebas Shapiro–Wilk; por tal razón, las pruebas no paramétricas Kruskal–Wallis y Mann-Whitney fueron empleadas para evaluar las diferencias entre los grupos. El programa estadístico IBM SPSS Statistics (versión 24) fue usado para realizar los análisis. Un valor de significación estadística $p < 0,05$ fue aceptada para todos los análisis. Para los análisis con resultados con significación estadística por la prueba de Kruskal–Wallis, se realizó la corrección para comparaciones múltiples con la prueba de Dunn. El coeficiente de correlación no paramétrico rho de Spearman fue usado para medir la correlación entre las variables, con su correspondiente prueba estadística t de Student. La prueba chi cuadrado (X^2) fue usada para asociar los índices antropométricos básicos de nutrición infantil con la condición de infección plasmodial.

4.4 Resultados

4.4.1 Características generales de la población de estudio

Las características clínicas de las gestantes, neonatos y lactantes son presentadas en la **tabla 4.1**. La paridad y la edad gestacional fue similar en los tres grupos de estudio; en general las

mujeres incluidas eran multíparas (mediana 2 partos, RIC 1-3) y tuvieron partos a término (mediana 39 semanas, RIC 38-40). En cuanto a las características clínicas de los neonatos, se encontró que la talla (mediana 50 cm, RIC 49-51), el perímetro cefálico (mediana 34 cm, RIC 32-34) y los puntajes Apgar al minuto (mediana 8, RIC 7-8) y a los cinco minutos (mediana 10, RIC 10-10) fueron similares en los tres grupos de estudio. Mientras que el peso del neonato mostró diferencias significativas entre los grupos, según la prueba de Kruskal-Wallis ($p=0,0179$), y con la prueba de Dunn, se encontró que los neonatos del grupo ISP-P tenían significativamente menor peso con respecto al grupo de neonatos de mujeres negativas ($p<0,05$).

La mediana de edad de los lactantes cuando se les hizo el seguimiento fue de 6 meses. Al comparar las características clínicas de los lactantes no se observaron diferencias significativas entre los grupos de estudio, ni en parámetros como el peso (media 7400 gr, RIC 6460- 8350), la talla (media 65 cm, RIC 61-68) o el perímetro cefálico (media 44 cm, RIC 42-47). Al analizar los índices antropométricos básicos (peso/edad, talla/edad, peso/talla y perímetro cefálico/edad) para evaluar el estado nutricional de los lactantes se encontró:

- a. Indicador de desnutrición global (peso/edad): 17% de los lactantes del grupo ISP-P, 34% del grupo IP-E y 58% del grupo control tenían riesgo de bajo peso para la edad, pues su indicador se ubicó en el área entre 1 y 2 desviaciones estándar (DS) por debajo del área de peso adecuado.
- b. Indicador de desnutrición aguda (peso/talla): 13% de los lactantes del grupo IP-E y 29% del grupo control tenían riesgo de bajo peso para la talla (entre 1 y 2 DS); mientras que en el grupo ISP-P, todos los lactantes estaban en el área de peso adecuado (+1DS y -1DS).
- c. Indicador de desnutrición crónica (talla/edad): 47% de los lactantes del grupo IP-E y 37,5% del grupo control tenían riesgo de baja talla para la edad (entre 1 y 2 DS), y de nuevo, todos los lactantes del grupo ISP-P se ubicaron en el área de talla adecuada (+1DS y -1DS).

De acuerdo a la prueba estadística chi cuadrado (X^2) no se observó asociación entre los índices antropométricos básicos de nutrición infantil (peso/edad ($p(X^2)=0,078$), talla/edad ($p(X^2)=0,416$), peso/talla ($p(X^2)=0,528$) y perímetro cefálico/edad ($p(X^2)=0,112$) en los lactantes de 6 meses y de los grupos con condición de infección plasmoidal materna.

Tabla 4.1 Características clínicas de gestantes, neonatos y lactantes

Grupo	Variable	Grupo ISP-P			Grupo IP-E			Control			p(KW)
		n	Me	RIC	n	Me	RIC	N	Me	RIC	
Gestante	Edad gestacional (semanas)	15	39	37-40	12	39	38-40	23	40	39-40	0,065
	Paridad	15	2	1-4	14	2	1-2	24	2,5	1-4	0,368
Neonato	Peso (g)	15	3000	2730-3100	15	3200	2800-3640	25	3400	3155-3700	0,017
	Talla (cm)	15	50	48-51	15	50	48-51	25	50	50-52	0,598
	Perímetro cefálico (cm)	15	33,5	32-34	15	34	32-34	25	34	33-34	0,531
	Apgar 1	14	8	7-8	15	8	7-8	24	7,5	7-8	0,831
	Apgar 5	8	10	10-10	13	10	9-10	21	10	10-10	0,280
Lactante	Peso (g)	12	7750	7075-8425	15	7000	6300-8600	23	7500	6000-8000	0,446
	Talla (cm)	12	65	61-67	15	65	62-68	23	65	62-69	0,524
	Perímetro cefálico (cm)	12	45	41-52	15	44	42-46	23	43	42-44	0,209

Me, mediana. RIC, rango intercuartílico 25-75%. KW: Kruskal-Wallis

4.4.2 Niveles de anticuerpos contra antígenos vacunales en lactantes de mujeres con MAE

Para evaluar el efecto de la MAE en la respuesta inmune a vacunas en lactantes, se compararon los niveles séricos de IgG antiTT, antiHB, antiPPD, antiRV y antiPSC1-PSC14-PSC23F y de IgA antiRV en lactantes de 6 meses de edad de los tres grupos de estudio (ISP-P, IP-E y control) (Tabla 4.2).

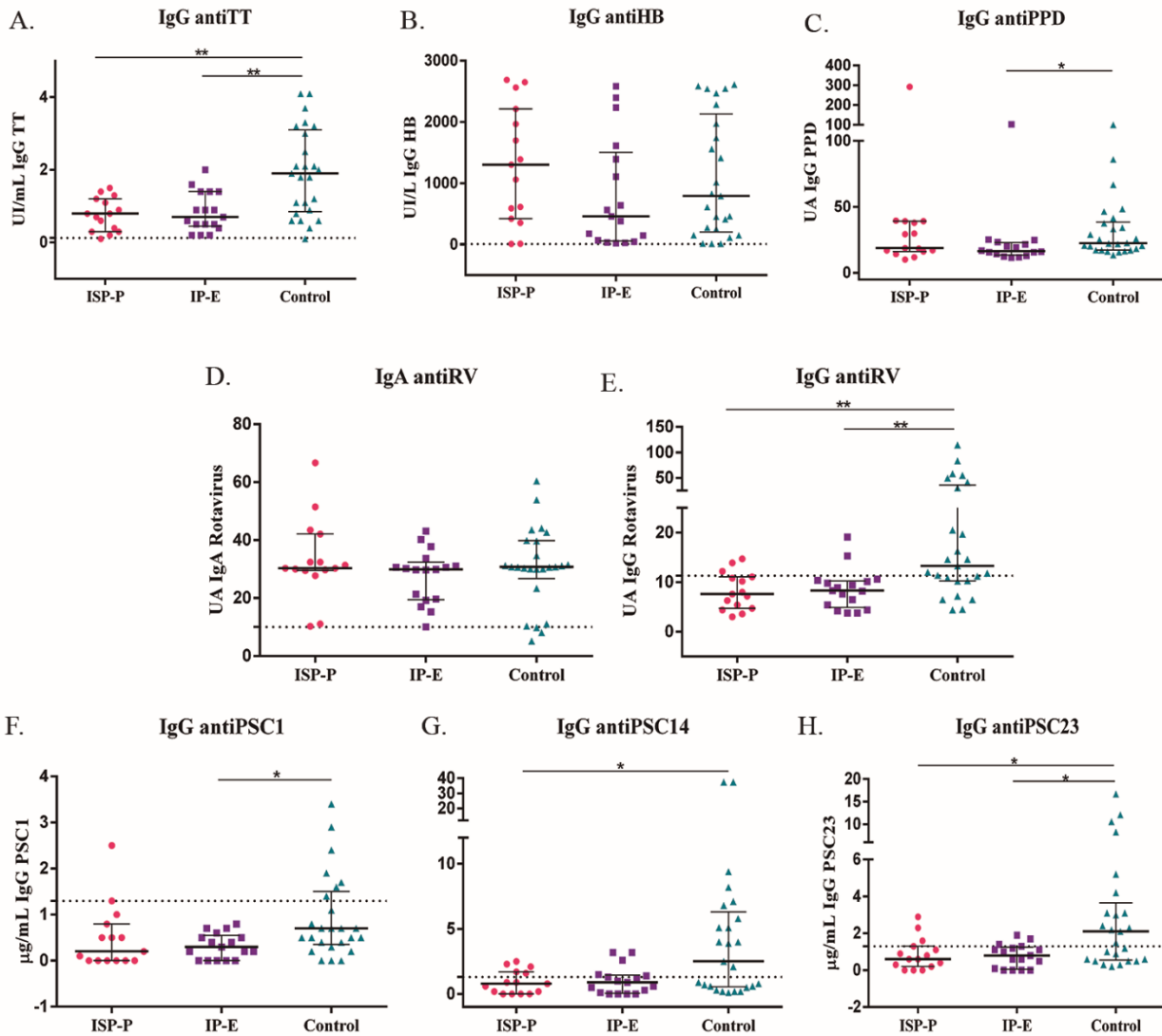
- Niveles de IgG antiTT: fueron estadísticamente diferentes entre los grupos según la prueba Kruskal-Wallis, y con la prueba de Dunn, se observó que los grupos ISP-P ($p<0,01$) e IP-E ($p<0,01$) tenían niveles de IgG antiTT significativamente menores, comparados con el grupo control (Tabla 4.2, Figura 4.1A).

- b. Niveles de IgG antiHB: fueron similares en los tres grupos de estudio (**Tabla 4.2, Figura 4.1B**).
- c. Niveles de IgG antiPPD, que dan cuenta de la respuesta humoral tras la vacunación con BCG: se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los grupos (**Tabla 4.2**), y al hacer el ajuste con la prueba de Dunn, se encontraron niveles significativamente menores en el grupo IP-E, en comparación con el grupo control ($p < 0,05$) (**Figura 4.1C**).
- d. Niveles de IgG antiRV: se encontraron diferencias significativas entre los grupos (**Tabla 4.2**), y la prueba de Dunn mostró que los grupos ISP-P ($p < 0,01$) e IP-E ($p < 0,01$) tenían niveles de IgG antiRV significativamente menores que el grupo control (**Figura 4.1D**).
- e. Niveles de IgA antiRV: entre los grupos de estudio no se encontraron diferencias significativas (**Tabla 4.2, Figura 4.1E**).
- f. Niveles de IgG contra los polisacáridos capsulares PSC1, PSC14 y PSC23F de la vacuna PCV10 de neumococo: hubo diferencias significativas en los tres polisacáridos, entre los grupos (**Tabla 4.2**), y al hacer el ajuste con la prueba de Dunn, se encontró que los niveles de IgG antiPSC1 fueron significativamente menores en el grupo IP-E, comparado con el grupo control ($p < 0,05$) (**Figura 4.1F**); los niveles de IgG antiPSC14 fueron significativamente menores en el grupo ISP-P, con respecto al control ($p < 0,05$) (**Figura 4.1G**), y los niveles de IgG antiPSC23F fueron significativamente menores en los grupos ISP-P ($p < 0,05$) e IP-E ($p < 0,05$), en comparación con el grupo control (**Figura 4.1H**).

Tabla 4.2. Niveles de anticuerpos contra antígenos vacunales en lactantes de 6 meses, según el grupo de estudio

Anticuerpos	ISP-P n=15		IP-E n=17		Control n=25		p(KW)
	Me	RIC	Me	RIC	Me	RIC	
IgG antiTT (UI/mL)	0,8	0,3-1,2	0,7	0,5-1,4	1,9	0,85-3,1	0,001
IgG antiHB (UI/L)	1303	422-2215	461	58-1504	794	206-2132	0,363
IgG antiPPD (UA)	19	16-39	17	13-23	23	17-39	0,029
IgG antiRV (UA)	8	5-11	8	5-10	13	10-39	0,001
IgA antiRV (UA)	30	30-42	30	19-32	31	27-40	0,429
IgG antiPSC1 (µg/mL)	0,2	0-0,8	0,3	0-0,6	0,7	0,4-1,5	0,028
IgG antiPSC14 (µg/mL)	0,8	0-1,7	0,9	0,1-1,5	2,5	0,6-6,3	0,016
IgG antiPSC23F (µg/mL)	0,6	0,2-1,3	0,8	0,1-1,3	2,1	0,6-3,7	0,010

Me, mediana. **RIC**, rango intercuartílico 25-75%. **UI/mL**: unidades internacionales por mililitro. **UI/L**: unidades internacionales por litro. **UA**: unidades arbitrarias. **µg/mL**: microgramos por mililitro. **KW**: Kruskal-Wallis

Figura 4.1. Niveles de anticuerpos contra antígenos vacunales en lactantes de 6 meses

Se representan la mediana y el rango intercuartílico de 25-75% de los niveles de Ig. La línea punteada representa el punto de corte de seropositividad

A. IgG antiTT: punto de corte >0,13 UI/mL.

B. IgG antiHB: punto de corte >10 UI/L.

C. IgG antiPPD en lactantes.

D. IgG antiRV punto de corte >11,3 UA.

E. IgA antiRV punto de corte >10 UA.

F. IgG antiPSC1, G. IgG antiPSC14, H. IgG antiPSC14 punto de corte: >1,3 µg/mL.

Valor de p significativo de acuerdo a la prueba de ajuste para comparaciones múltiples de Dunn. *p<0, 05; **p<0,01.

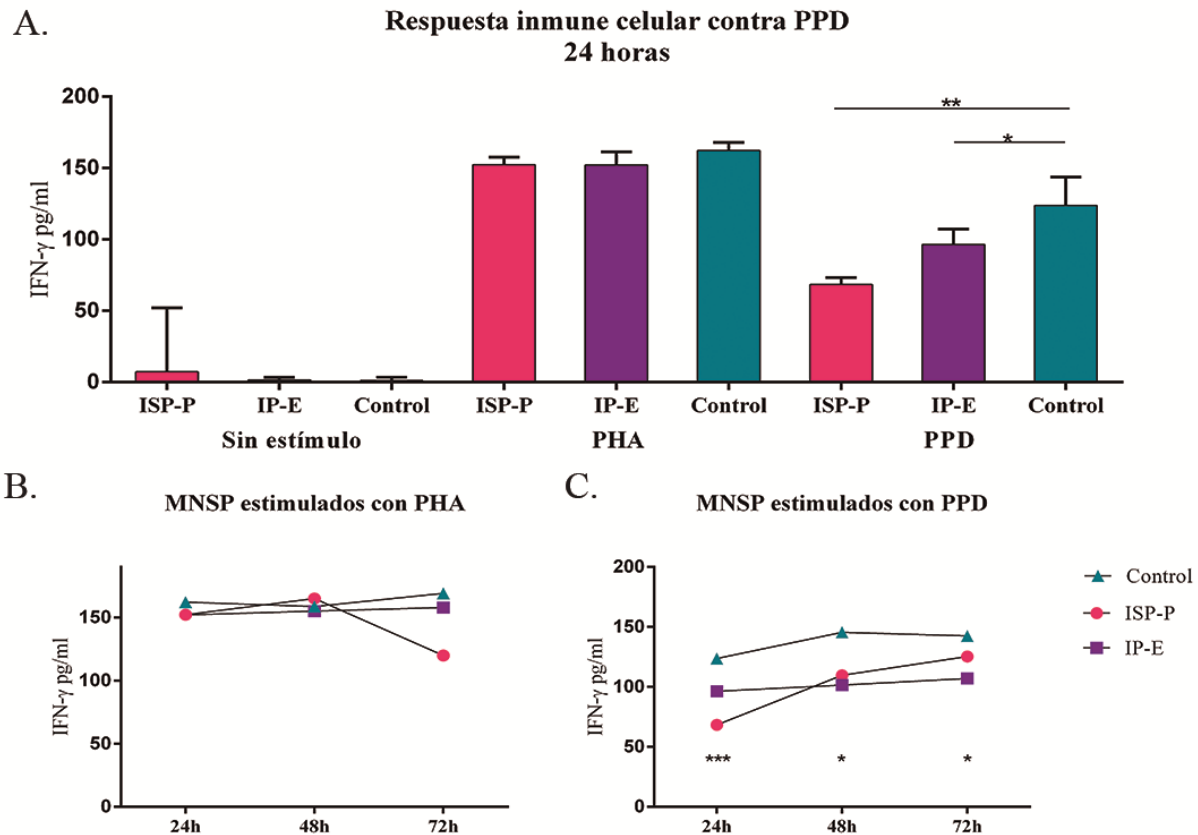
4.4.3 Efecto de la MAE sobre la respuesta inmune celular de los lactantes frente a PPD

Los ensayos de aislamiento, estimulación (con PPD o PHA), cultivo (por 24, 48 y 72 horas) de MNSP lactantes de 6 meses y cuantificación de los niveles de IFN- γ en los sobrenadantes de cultivo, se logró hacer en una submuestra de 15 lactantes, de los cuales 10 pertenecían a los grupos de estudio con infección plasmodial (ISP-P n=3 e IP-E n= 7) y 5 pertenecían al grupo control. En el proceso de aislamiento, previo a la congelación, fueron recuperadas en promedio 5,2 millones de células/mL, con una viabilidad de 98% para cada lactante. El porcentaje de supervivencia de los MNSP después del proceso de descongelación fue de 90% en promedio. En el sobrenadante de las 24 horas de cultivo se encontró una significativa disminución de los niveles de IFN- γ , tras el estímulo con PPD, en los grupos ISP-P e IP-E, comparados con el grupo control. También a las 48 y 72 horas de cultivo se observó menor cantidad de IFN- γ en el grupo IP-E en comparación con el grupo control (**Tabla 4.3 y Figura 4.2**). Por otro lado, los niveles de IFN- γ detectados a las 24, 48 y 72 horas de cultivo, tras el estímulo de PHA y en los pozos sin estímulo, fueron similares entre los grupos tres grupos de estudio (**Tabla 4.3**).

Tabla 4.3 Niveles de IFN- γ en MNSP de lactantes estimulados con PPD

IFN- γ (pg/mL)	Grupo ISP-P n=3		Grupo IP-E n=7		Control n=5		p(KW)
	Me	RIC	Me	RIC	Me	RIC	
24 horas							
Sin estímulo	7,2	0,3-52	1,5	0,7-3,5	1	0,3-3,4	0,526
PHA (10 μ g/ml)	152	140-157	152	139-161	162	150-168	0,366
PPD (0,5 μ g/ml)	68	7,1-73	96	64-107	124	118-143	0,004
48 horas							
Sin estímulo	4,3	2-41,1	1,4	0,6-2,9	0,3	0,2-3,8	0,212
PHA (10 μ g/ml)	165	150-163	155	142-164	159	155-166	0,700
PPD (0,5 μ g/ml)	110	23-123	102	82-111	146	130-150	0,010
72 horas							
Sin estímulo	3,1	0,8-47	3,2	1,3-3,9	0,7	0,3-6	0,420
PHA (10 μ g/ml)	120	114-209	158	153-167	169	162-184	0,228
PPD (0,5 μ g/ml)	125	19-130	107	84-114	143	130-157	0,011

Me, mediana. RIC, rango intercuartílico 25-75%. KW, Kruskal-Wallis.

Figura 4.2 Respuesta inmune celular frente a PPD en lactantes

A. Mediana y rango intercuartílico 25-75% de los niveles de IFN- γ en sobrenadante de 24 horas de MNSP de lactantes estimulados con 10 μ g/ml de PHA, 0,5 μ g/ml de PPD y sin estímulo. Valor de p significativo de acuerdo a la prueba de ajuste para comparaciones múltiples de Dunn. *p<0,05; **p<0,01;

B, C. Mediana de niveles de IFN- γ en sobrenadante de 24, 48 y 72 horas de MNSP estimulados con PHA (**B**) y PPD (**C**). Valor de p significativo de acuerdo a la prueba Kruskal-Wallis 24h: ***p=0,0003, 48h: *p=0,0102 y 72h: *p=0,0113.

4.4.4 Efecto de la MAE sobre la expresión de mediadores inmunes en sangre periférica materna, tejido placentario y sangre periférica de lactantes de 6 meses.

Para determinar los cambios transcripcionales resultantes de la MAE en la madre y el lactante y su asociación con la respuesta inmune del lactante frente a los antígenos vacunales, se midió la expresión relativa de mediadores de inflamación, antiinflamación, regulación y coestimulación de la respuesta inmune en sangre periférica materna, tejido placentario y sangre periférica de lactantes de 6 meses.

Mediadores de inflamación: los cuantificados fueron IFN- γ , TNF e IL-8 y su nivel de expresión en sangre periférica materna, tejido placentario y sangre periférica del lactante, fue similar en los tres grupos de estudio (**Tabla complementaria 4.1**).

Mediadores de antiinflamación: los evaluados fueron IL-10, IL-13, CD-163 y TGF- β .

La expresión de IL-10 en sangre periférica materna, placenta y sangre periférica del lactante mostró diferencias significativas en los tres grupos evaluados con la prueba de Kruskal-Wallis (**Tabla complementaria 4.1**), y al hacer el ajuste con la prueba de Dunn, se encontró que en sangre periférica materna los niveles eran similares en los tres grupos de estudio (**Figura 4.3A**), pero la expresión en placenta (**Figura 4.3B**) y en sangre periférica del lactante (**Figura 4.3C**) fue significativamente mayor en el grupo ISP-P, con respecto al grupo control.

La expresión de IL-13 mostró diferencias con la prueba Kruskal-Wallis y el análisis con la prueba de Dunn mostró que los niveles de expresión en sangre periférica materna eran similares en los tres grupos (**Figura 4.3 D**), mientras que en placenta (**Figura 4.3 E**) y en el lactante (**Figura 4.3 F**) había significativamente mayor expresión en el grupo de ISP-P que en grupo control.

La expresión del mediador CD-163 únicamente fue estadísticamente diferente en los lactantes según la prueba Kruskal-Wallis (**Tabla complementaria 4.1**) y el ajuste con la prueba de Dunn mostró que en el grupo ISP-P la expresión era significativamente mayor con respecto al control (**Figura 4.3 G**).

Finalmente, la expresión de TGF- β fue similar en todos los grupos de estudio y en todos los compartimentos (**Tabla complementaria 4.1**).

Mediadores de regulación: los evaluados fueron FoxP3, TNF-RII, CTLA-4 y PD-L1.

La expresión de FoxP3 mostró diferencias significativas en los tres compartimentos, en los tres grupos estudiados (**Tabla complementaria 4.1**), y al hacer la comparación con la prueba de Dunn, se encontró que en sangre periférica materna (**Figura 4.4 A**) y en sangre periférica del lactante (**Figura 4.4 C**), la expresión era significativamente mayor en el grupo ISP-P con respecto al control, mientras que en placenta la expresión fue similar en los tres grupos (**Figura 4.4 B**).

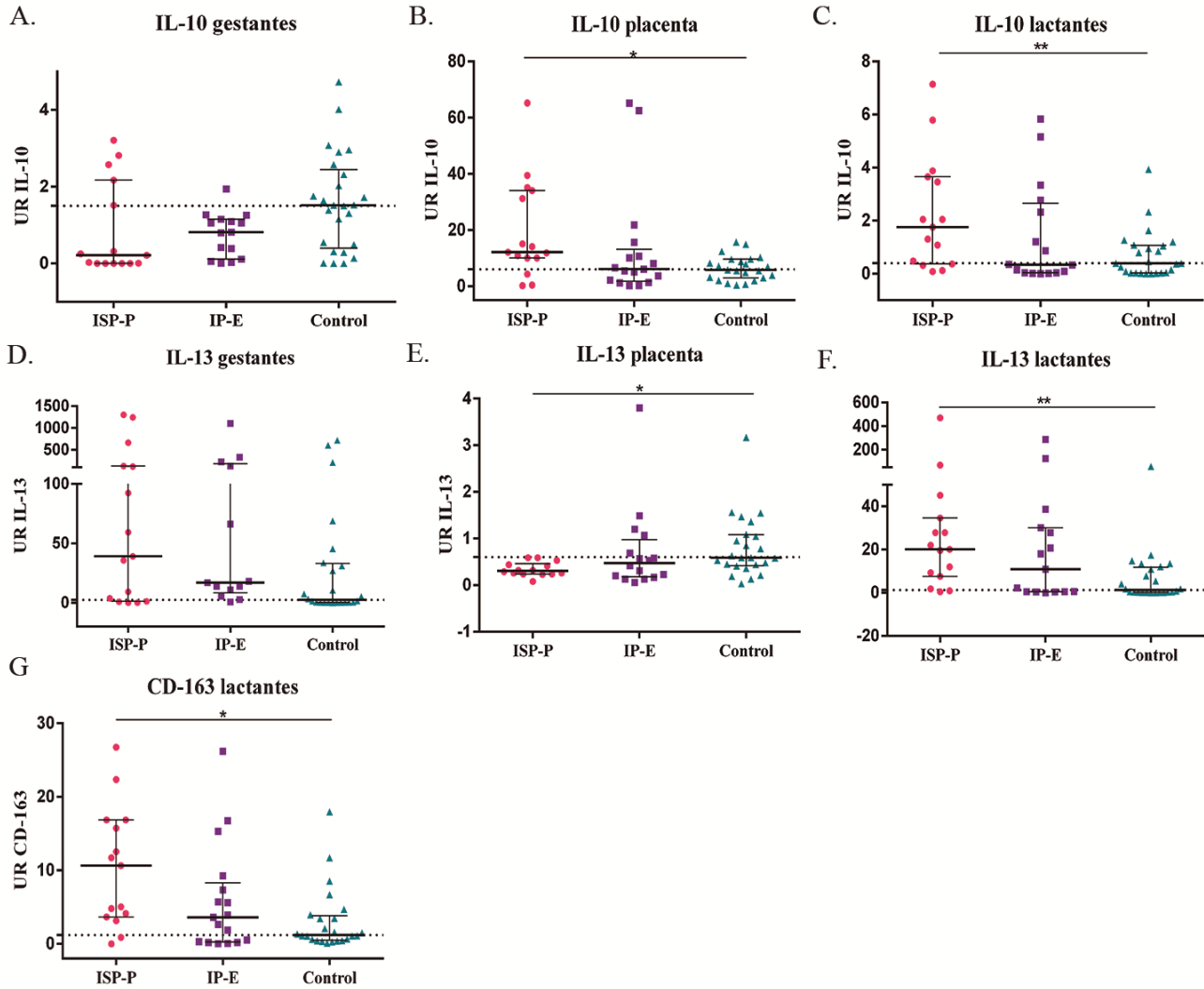
La expresión de TNF-RII mostró diferencias entre los grupos estudiados en tejido placentario y en sangre periférica de los lactantes (**Tabla complementaria 4.1**), pero el ajuste con la prueba de Dunn mostró que en la placenta la expresión era similar en los tres grupos (**Figura 4.4 D**), mientras que en el lactante había mayor expresión de TNF-RII en el grupo ISP-P, comparado con el grupo control (**Figura 4.4 E**).

La expresión CTLA-4 solo fue estadísticamente diferente en sangre periférica de lactantes, según la prueba de Kruskal-Wallis (**Tabla complementaria 4.1**), pero cuando se hizo la prueba de Dunn no se encontraron diferencias entre los grupos (**Figura 4.4 F**).

En cuanto a PD-L1, tampoco se evidenciaron diferencias en la expresión en ninguno de los compartimentos entre los tres grupos de estudio (**Tabla complementaria 4.1**).

Mediadores de coestimulación: los evaluados fueron CD-86 y CD-40 y como mediador de adhesión se evaluó CD-54. Solamente se encontraron diferencias entre los tres grupos de estudio en la expresión de CD-40 en tejido placentario y en sangre periférica de los lactantes (**Tabla complementaria 4.1**), y cuando se hizo el ajuste con la prueba de Dunn, se encontró que en placenta la expresión era significativamente menor en los grupos ISP-P e IP-E, en comparación con el grupo control (**Figura 4.4 G**), mientras que en sangre periférica de los lactantes la expresión de CD-40 fue menor solo en el grupo ISP-P, con respecto al grupo control ($p < 0,01$) (**Figura 4.4 H**).

Figura 4.3. Comparación de los niveles de expresión de mediadores inmunes de antiinflamación en gestantes y lactantes de los tres grupos de estudio



Niveles de expresión de citoquinas en tejido placentario, sangre de gestantes y lactantes en los grupos de acuerdo a la condición de infección. En todas las variables la medida es **la mediana y rango intercuartilico 25-75%** de las unidades relativas (UR) de expresión en la que la expresión basal del gen constitutivo se comparó con la expresión de cada citoquina según el valor de CT.

Valor de p significativo de acuerdo a la prueba de ajuste para comparaciones múltiples de Dunn. * $p < 0, 05$; ** $p < 0,01$.

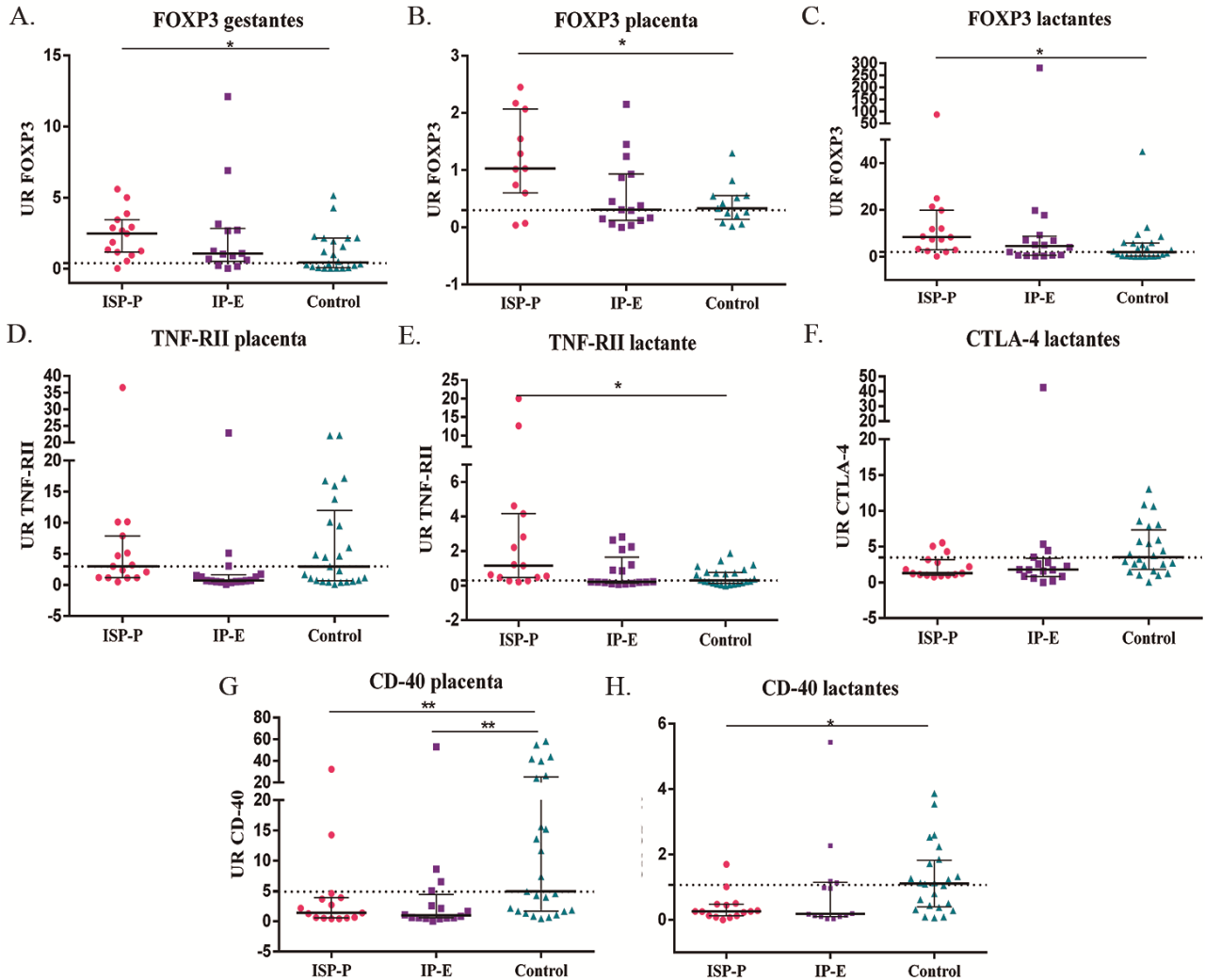
La línea punteada corresponde a la mediana de expresión de cada mediador inmune en el grupo control de mujeres control.

A-C. UR de expresión de la citoquina antiinflamatoria IL-10 **(A)** gestante, **(B)** placenta y **(C)** lactante.

D-F UR de expresión de la citoquina antiinflamatoria IL-13 **(D)** gestante, **(E)** placenta y **(F)** lactante.

G. UR de expresión del mediador antiinflamatorio CD-163 en lactantes.

Figura 4.4. Comparación de los niveles de expresión de mediadores inmunes de regulación y coestimulación en gestantes y lactantes de los tres grupos de estudio



Niveles de expresión de citoquinas en tejido placentario, sangre de gestantes y lactantes en los grupos de acuerdo a la condición de infección. En todas las variables la medida es **la mediana y rango intercuartilico 25-75%** de las unidades relativas (UR) de expresión en la que la expresión basal del gen constitutivo se comparó con la expresión de cada citoquina según el valor de CT.

Valor de p significativo de acuerdo a la prueba de ajuste para comparaciones múltiples de Dunn. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

La línea punteada corresponde a la mediana de expresión de cada mediador inmune en el grupo control de mujeres control.

A-C. UR de expresión del mediador de regulación Foxp3 (A) gestante, (B) placenta y (C) lactante.

D-E UR de expresión del mediador de regulación TNFR11 (D) placenta y (E) lactante. **F** UR de expresión del mediador de regulación CTLA4 en el lactante.

G-H. UR de expresión del mediador de coestimulación CD-40 en (G) placenta y (H) lactantes.

4.4.5 Correlaciones significativas entre los mediadores inmunes de lactantes de madres con y sin MAE

Para ver las diferencias entre las interacciones de los diferentes mediadores inmunes evaluados en los lactantes de los tres grupos de estudio de este trabajo, se hizo la prueba de correlación rho de Spearman. En general, en el grupo de lactantes hijos de las mujeres del grupo control se encontró una red compleja de correlaciones (Control= 44 correlaciones significativas) en comparación con los lactantes de grupos de mujeres con infección (ISP-P=18 correlaciones e IP-E=21 correlaciones) (**Figura 4.5**).

En los lactantes del grupo ISP-P la mayoría de las correlaciones encontradas se centraron en los mediadores antiinflamatorios y de regulación inmune (**Figura 4.5 A**). Los mediadores con mayor cantidad de correlaciones fueron las moléculas antiinflamatorias CD-163 (5 correlaciones) y TGF- β (4 correlaciones). Todas las correlaciones encontradas en CD-163 fueron negativas, es decir, cuando CD-163 aumentó, los mediadores de regulación CTLA-4, PD-L1, la interleuquina antiinflamatoria TGF- β y las interleuquinas proinflamatorias IFN- γ e IL-8 disminuyeron, o viceversa (**Figura 4.5 A**). La molécula antiinflamatoria TGF- β se correlacionó positivamente con el mediador de regulación PD-L1 y con las moléculas proinflamatorias TNF e IL-8, es decir, cuando estas aumentaron, TGF- β también o viceversa (**Figura 4.5 A**). Además, con un total de 3 correlaciones se encontraron las moléculas antiinflamatorias IL-10 e IL-13, la molécula reguladora PD-L1 y las moléculas proinflamatorias IFN- γ e IL-8. (**Figura 4.5 A**).

En el grupo IP-E, al igual que en el grupo ISP-P, la mayor cantidad de correlaciones se centraron en moléculas antiinflamatorias (TGF- β e IL-10), pero también en el mediador de regulación FoxP3. El mediador antiinflamatorio TGF- β fue el que presentó la mayor cantidad de correlaciones (7 correlaciones), que fueron positivas con los mediadores antiinflamatorios IL-13 y CD-163, con el mediador de regulación FoxP3 y con las interleuquinas proinflamatorias TNF, IFN- γ e IL-8; mientras que con la interleuquina antiinflamatoria IL-10 la correlación fue negativa (**Figura 4.5 B**). Luego, las moléculas antiinflamatorias IL-10 con

5 correlaciones e IL-13 con 4, fueron las que más se correlaciones significativas presentaron (**Figura 4.5 B**).

En contraste, en el grupo control, las correlaciones se centraron tanto en mediadores antiinflamatorios (TGF- β , IL-13 e IL-10), como en proinflamatorios (TNF, IL-8 e IFN- γ) y de regulación (PD-L1 y FoxP3); es decir, que la presencia de correlaciones fue homogénea entre todos los tipos de mediadores inmunes evaluados (**Figura 4.5 C**). Las interleuquinas TGF- β , IL-13 y TNF fueron las que aportaron la mayor cantidad de correlaciones (**Figura 4.5 C**). La expresión de TGF- β se correlacionó positivamente con la molécula antiinflamatoria IL-13, las interleuquinas proinflamatorias IFN- γ , TNF e IL-8, las moléculas de regulación FoxP3 y PD-L1 y la la molécula coestimuladora CD-86; mientras que se correlacionó negativamente con la molécula antiinflamatoria IL-10, la reguladora TNF-RII y la coestimuladora CD-40 (**Figura 4.5 C**).

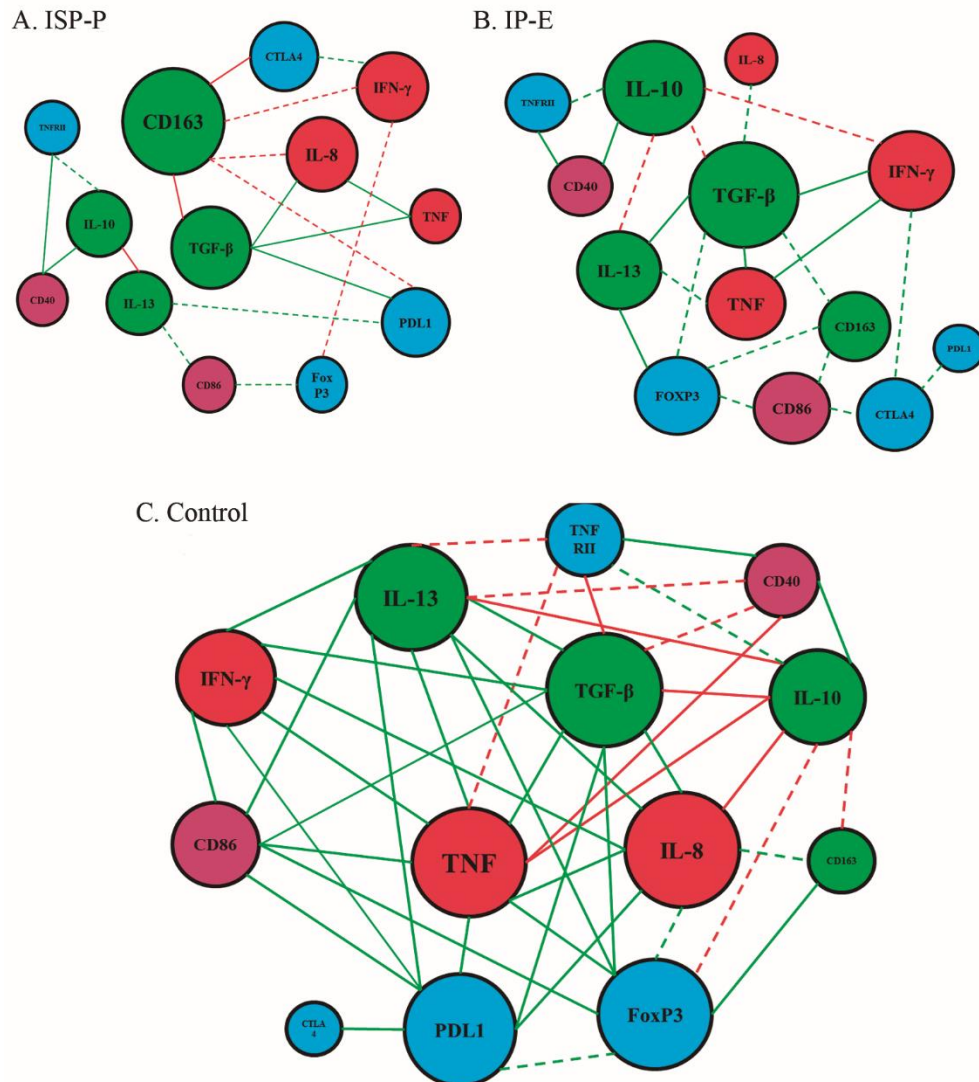
En el panel completo de correlaciones del grupo ISP-P, 50% de las correlaciones coincidieron con correlaciones encontradas en el grupo control, 17% estaban, pero de manera inversa (positiva en vez de negativa o viceversa) y 33% fueron correlaciones que solo se encontraron en este grupo (**Tabla 4.4**). En el panel completo de correlaciones del grupo IP-E, 76% de las correlaciones se compartieron con el grupo control y 24% solo se encontraron en este grupo (**Tabla 4.4**). Por último, 8 correlaciones coincidieron entre los grupos ISP-P e IP-E; de estas, solo una no correspondió a las compartidas con el grupo control.

Tabla 4.4 Correlaciones significativas entre mediadores inmunes de lactantes exclusivas de los grupos asociados a infección

Mediador 1	Mediador 2	r	P
ISP-P			
TGF- β	CD-163	-0,721	0,002
PD-L1	CD-163	-0,524	0,045
FoxP3	IFN- γ	-0,587	0,035
CD-163	IFN- γ	-0,598	0,031
CD-163	CTLA-4	-0,692	0,004
IFN- γ	CTLA-4	0,603	0,029
IP-E			
TGF- β	CD-163	0,498	0,042
IL-10	IFN- γ	-0,750	0,020
CD-86	CD-163	0,571	0,021
CD-86	CTLA-4	0,596	0,019
IFN- γ	CTLA-4	0,758	0,011

Correlaciones significativas basadas en la prueba rho de Spearman. Correlaciones significativas obtenidas entre la expresión de mediadores inmunes únicamente en los lactantes de los grupos asociados a infección.

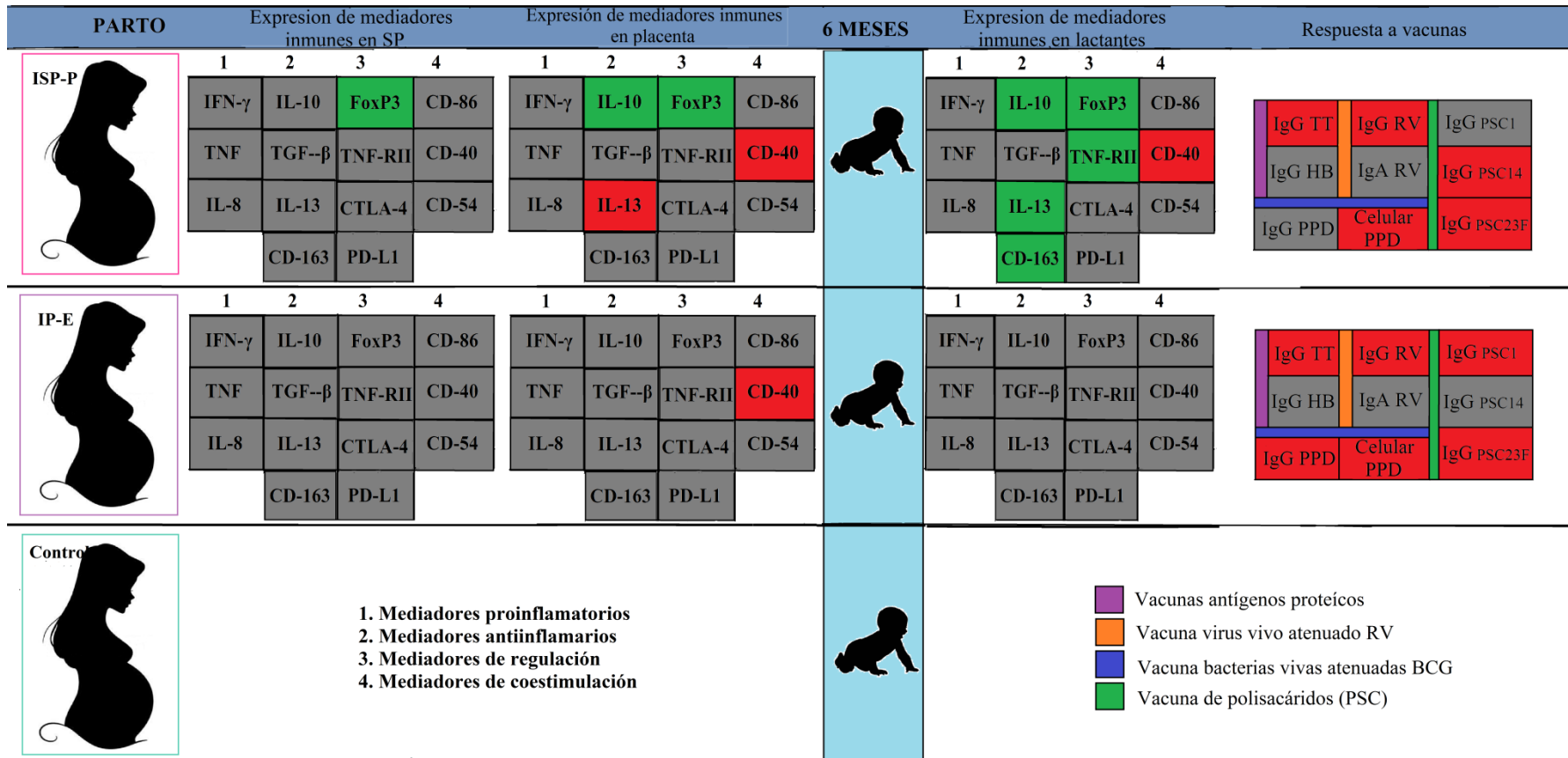
Figura 4.5 Mapa de correlaciones significativas entre mediadores inmunes de los lactantes, de acuerdo a la condición de infección materna



Correlaciones significativas basadas en la prueba rho de Spearman. Resumen de las correlaciones significativas obtenidas entre la expresión de mediadores inmunes de lactantes de los grupos ISP-P (A), IP-E (B) y control (C). Las líneas rojas indican correlación negativa y las verdes correlación positiva. Las líneas punteadas indican $p < 0,05$ y las líneas continuas indican $p < 0,01$. Los diferentes tipos de mediadores se clasificaron como proinflamatorios (círculos rojos), antiinflamatorios (círculos verdes), de regulación (círculos azules) y de coestimulación (círculos morados). El tamaño de estos círculos varía de acuerdo a la cantidad de correlaciones que tengan, de esta manera, los círculos más grandes tienen la mayor cantidad y los círculos pequeños tienen la menor cantidad de correlaciones.

4.4.6 Resumen de resultados

Figura 4.6 Resumen gráfico de resultados del capítulo 4



SP: Sangre periférica. En la expresión de mediadores inmunes el color verde indica sobreexpresión, el rojo baja expresión y el gris expresión similar con respecto a las unidades relativas de expresión obtenidas en el grupo control para cada mediador. En la respuesta a vacunas se muestran las comparaciones con respecto al grupo control, el color rojo indica una significativa reducción en los niveles de anticuerpos o respuesta celular, y el color gris muestra que no se observaron diferencias en las respuestas.

4.5 Discusión

Hasta donde conocemos, en Colombia no hay estudios previos que evalúen el efecto de la MAE, sobre la competencia inmune de lactantes. La vacunación es una estrategia fundamental en salud pública, que ayuda a reducir la morbimortalidad infantil por enfermedades infecciosas. Los hallazgos de este trabajo muestran que los niveles de IgG antiTT, antiRV y antiPSC14-PSC23F disminuyeron significativamente en los lactantes cuyas madres tuvieron infección plasmodial submicroscópica en el momento del parto, y también los niveles de IgG antiTT, antiPPD, antiRV y antiPSC1-PSC23F fueron significativamente menores en los lactantes cuyas madres presentaron historia de malaria durante la gestación, en comparación con los hijos de mujeres que no tuvieron infección plasmodial en el momento del parto, ni historia de malaria durante el embarazo. De manera interesante, esa disminución de la respuesta inmune humoral en los lactantes se encontró frente a diferentes tipos de vacunas: viva atenuada bacteriana (BCG) y viral (Rotavirus), de toxoide de naturaleza proteica (TT), de polisacáridos capsulares bacterianos (neumococo PCV10) y de la respuesta inmune celular a la vacuna viva atenuada BCG.

4.5.1 Efecto de la MAE en la respuesta inmune frente al TT

La vacuna antitetánica está compuesta de un toxoide cuyo mecanismo de acción se basa en la producción de IgG neutralizante de la toxina. El TT no es muy inmunogénico, por lo que requiere varias dosis para alcanzar el nivel de anticuerpos protector y para aumentar la cantidad de células T y B de memoria y de anticuerpos de alta afinidad. Este estudio incluyó grupos de lactantes con edad homogénea (6 meses) y con esquema de vacunación completo hasta el mes 4 de vida, de acuerdo al PAI colombiano, que nacieron de mujeres sanas, de mujeres con historia de malaria durante la gestación (IP-E) o mujeres con infección plasmodial submicroscópica en el parto (IPS-P). Al cuarto mes de vida, los lactantes tienen dos dosis de la vacuna DPT que incluye el TT. Los hallazgos de este trabajo muestran que las dos condiciones de infección plasmodial evaluadas (IPS-P e IP-E) se asocian con disminución en los niveles de IgG antiTT en los lactantes (**Figura 4.1A**). A pesar de que los niveles de antiTT obtenidos, incluso después de solo dos dosis de TT, alcanzan los niveles

protectores (63), nuestros resultados muestran que la MAE disminuye la respuesta inmune humoral de los lactantes. El impacto en la disminución de IgG antiTT en los lactantes es desconocido, sin embargo, hay estudios que indican que los niveles bajos de antiTT en el momento de aplicar una nueva dosis de TT, pueden conducir a una reducida respuesta frente al refuerzo (64, 65), lo que aumenta el riesgo de fallar en la adquisición de una respuesta inmune duradera.

Los trabajos previos que abordan el efecto de la infección malárica en la respuesta inmune contra TT involucran grupos de estudio que incluyen niños de edades muy variables que van desde 6 meses a 12 años; en dichos estudios se muestra que la malaria aguda por *P. falciparum*, la infección asintomática por *P. falciparum* y *P. vivax* y la exposición a *P. falciparum* en útero, no afectaron la respuesta inmune frente al TT (46, 66, 67). Únicamente un estudio que incluyó niños de 6 meses a 6 años con malaria aguda por *P. falciparum*, mostró menores niveles de IgG antiTT, en comparación con niños sin infección (45). No obstante, el único estudio encontrado que evalúa el efecto de la infección plasmodial materna en la respuesta inmune del lactante fue el realizado por Malhotra y colaboradores, quienes mostraron que la infección materna no cambió la respuesta inmune de los lactantes frente al TT, pero sí cambió la respuesta contra el toxoide diftérico a los 12 y 18 meses de vida del lactante (46).

4.5.2 Efecto de la MAE en la respuesta inmune frente al HB

La respuesta frente a HB se ha descrito como de alta variabilidad, un título de antiHB inferior a 10 mIU/mL se considera como seronegativo, en este trabajo, todos los lactantes tuvieron niveles de anticuerpos >10UI/mL, sin embargo, tal como reportan otros estudios realizados en adultos, el rango de variabilidad en los niveles de anticuerpos es amplio (68, 69). Los niveles entre 10 y 100 UI/mL se consideran como hiporrespuesta y más de 100 UI/mL se consideran un alto nivel de inmunidad después de la vacunación. (70). En este estudio, 13% de los lactantes del grupo ISP-P, 29% del grupo IP-E y 12% del grupo control se clasificaron como hiporespondedores frente a la vacuna HB luego de tres dosis. El porcentaje restante de los lactantes tuvieron una alta respuesta tras la vacunación con AgsHB. Debido a este amplio rango de variabilidad en la respuesta de IgG frente a HB encontrado en este estudio, es

posible que no se haya podido evidenciar el efecto de la infección sobre la respuesta inmune, sería necesario incluir un mayor número de muestras para poder concluir el efecto de la infección plasmodial sobre la generación de IgG contra este antígeno.

4.5.3 Efecto de la MAE en la respuesta inmune frente al PPD

La vacuna viva atenuada de *Mycobacterium bovis* (BCG) es administrada a los neonatos dentro de las primeras 24 horas de vida; *Mycobacterium* spp es un microorganismo intracelular, por lo tanto, genera una fuerte respuesta inmune celular Th1, y las células T secretoras de IFN γ representan la respuesta inmunitaria canónica a la vacunación con BCG (71). Además, la vacuna BCG es un fuerte inductor de inmunidad humoral, pero debido a la naturaleza intracelular de *Mycobacterium* spp, el potencial de los anticuerpos como contribuyentes significativos a la inmunidad protectora es ampliamente ignorado; sin embargo, han surgido nuevas pruebas que identifican un papel potencial para los anticuerpos y las células B en la respuesta inmune generada por la vacunación con BCG (72, 73).

Los resultados del presente trabajo indican que la MAE disminuye la respuesta celular de los lactantes a la vacuna BCG, puesto que los mononucleares aislados de los lactantes nacidos de mujeres con historia de malaria durante la gestación, así como los nacidos de mujeres con infección plasmodial submicroscópica en el momento del parto, produjeron significativamente menor cantidad de IFN- γ frente al estímulo con PPD, en comparación de los lactantes nacidos de mujeres sin infección malárica (**Figura 4.2 A**). Dos estudios realizados en África soportan nuestros resultados; uno de ellos encontró que la infección asintomática por *P. falciparum* en niños de 1 a 5 años se asoció con disminución en la producción de IFN- γ determinada a través del ensayo de liberación de interferón gamma (IGRA siglas en inglés), que utiliza los antígenos ESAT-6 y CFP-10 de *M. tuberculosis* (47). El otro trabajo mostró que la malaria placentaria por *P. falciparum* redujo la respuesta de IFN- γ a PPD en lactantes de 12 meses (48). En ambos estudios africanos la infección plasmodial fue detectada por microscopía, mientras que en el presente trabajo se evidencia que tanto la malaria microscópica como la submicroscópica se asocian con disminución de la respuesta de IFN- γ tras la vacunación con BCG.

Hasta donde conocemos, ningún estudio previo ha evaluado el efecto de la infección plasmodial sobre la respuesta de anticuerpos IgG frente a la vacuna BCG; sin embargo, recientemente se describió que dichos anticuerpos más allá de la neutralización específica de antígeno, también tienen efectos generales notables sobre la inflamación, tales como la activación del complemento, la señalización cruzada (“cross-linking”) del receptor Fcγ y la liberación de productos antimicrobianos (74), lo que contribuye a contrarrestar la infección por *Mycobacterium* spp. Nosotros encontramos una disminución en los niveles de IgG antiPPD en lactantes nacidos de mujeres con historia de malaria durante la gestación (**Figura 4.1C**), lo que representa una disminución en el arsenal inmunológico disponible como respuesta específica contra *Mycobacterium* spp, pero desconocemos si esta disminución genera algún tipo de susceptibilidad a la infección micobacteriana.

Adicionalmente, la vacunación con BCG se ha asociado con un fenómeno llamado “inmunidad entrenada” en el que ocurre una reprogramación epigenética de las células presentadoras de antígeno, que mejora la efectividad de la respuesta inmune innata neonatal (30). Diferentes estudios han mostrado que la inmunización con BCG aumenta la resistencia a diferentes infecciones; por ejemplo, se demostró que la administración de BCG en niños nacidos con bajo peso (<2500 g), mejoró significativamente su supervivencia durante el primer mes de vida debido al menor riesgo de infección (75). Estudios similares en India y África mostraron que los niños vacunados con BCG presentaron baja tasa de mortalidad hasta los 6 meses de vida (76-78). Además, la vacunación con BCG se asoció con disminución en el riesgo de hospitalización por infecciones heterólogas como sepsis e infecciones respiratorias (75, 79). Un metanálisis reciente sobre la inmunización infantil con BCG en 33 países sugirió que la vacunación con BCG podría reducir la incidencia de infección respiratoria aguda baja en un 17 a 37% (80). Todo esto indica que la vacunación con BCG es importante en el desarrollo de competencias inmunes neonatales, y por tanto resulta relevante investigar si las alteraciones en la respuesta inmune frente a BCG observadas en nuestro estudio, también interfieren con el entrenamiento de la inmunidad innata descrita para esta vacuna.

4.5.4 Efecto de la MAE en la respuesta inmune frente a rotavirus

La vacuna contra rotavirus es una vacuna oral de virus vivos atenuados integrada al PAI colombiano a partir del 2009. Su esquema es de dos dosis, la primera en el segundo mes de vida y la segunda en el cuarto mes, por consiguiente, nosotros cuantificamos el nivel de IgG e IgA antiRV frente al esquema completo de vacunación. Generalmente los estudios que evalúan la respuesta inmune protectora contra vacunas virales vivas de aplicación oral, se centran en la IgA secretora, sin embargo, también se tienen en cuenta las respuestas sistémicas con IgA e IgG séricas (81-84).

Previamente se describió que la efectividad de la vacuna varía entre países; la potencia de las vacunas orales vivas es menor en países de bajos ingresos que en los países de ingresos medios y altos (85). A pesar de esto, desde la inclusión en el PAI colombiano de la vacuna contra rotavirus (año 2009), se ha notificado una reducción de los casos graves y de la mortalidad por enfermedad diarreica aguda en países de bajos ingresos de América Latina, Asia y África (86-93).

Una de las hipótesis planteadas para explicar la reducción en la efectividad de las vacunas orales vivas en los países de bajos ingresos, es la alta incidencia de otras afecciones agudas y crónicas que pueden afectar la respuesta inmune a las vacunas, como la infección por VIH, malaria, diarrea y fiebre (85). Sin embargo, no encontramos estudios previos que relacionaran la respuesta inmune frente a la vacuna contra rotavirus y la infección plasmodial. Los hallazgos de este trabajo muestran que los niveles de IgA sérica antiRV en los lactantes no se afectaron por la infección plasmodial en las madres (**Figura 4.1E**); mientras que los niveles de IgG antiRV fueron menores en los lactantes nacidos de mujeres con MAE (**Figura 4.1D**).

4.5.5 Efecto de la MAE en la respuesta inmune frente a la vacuna PCV10.

La generación de memoria inmunológica duradera frente a polisacáridos capsulares bacterianos es un reto, ya que, estos antígenos son T independientes y requieren ser

conjugados con antígenos T dependientes para que puedan ser presentados dentro de centros germinales y se generen células T y B de memoria e IgG de larga vida (94). En Colombia, la vacuna contra neumococo incluida dentro del PAI es la PCV10 (Synflorix, GSK), que incluye polisacáridos de 10 serotipos de *Streptococcus pneumoniae* (1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F and 23F) y se administra en dos dosis básicas, una al mes dos y otra al mes cuatro, y luego se hace un refuerzo al año de vida. Nosotros cuantificamos los anticuerpos IgG contra los antígenos capsulares 1, 14 y 23F, que representan los serotipos que aportan el 40% de los aislamientos de *S. pneumoniae* invasivos en Colombia (95).

Interesantemente, encontramos una disminución significativa en los niveles de IgG contra PSC1 y PSC23F en los lactantes de mujeres con historia de malaria durante el embarazo (**Figura 4.1F, H**) y contra PSC14 y PSC23F en los lactantes de mujeres con infección plasmoidal submicroscópica en el momento del parto (**Figura 4.1G, H**). Lo que indica que la MAE altera la respuesta inmune frente a polisacáridos vacunales de neumococo. Vale la pena resaltar que el método de ELISA utilizado nos permitió determinar el nivel de anticuerpos seroprotectores (1,3µg/mL) y de acuerdo a esto, 84%, 58% y 67% de los lactantes no alcanzaron los niveles de anticuerpos protectores para PSC1, PSC14 y PSC23F, respectivamente, luego de las dos dosis de PCV10 contempladas en el PAI colombiano. Es importante aclarar, que los tres polisacáridos evaluados en este estudio están conjugados a la misma proteína.

Varios estudios realizados en África que evalúan el efecto de la infección por *P. falciparum* en la respuesta frente a polisacáridos bacterianos concuerdan con nuestros resultados: la malaria aguda en niños se asoció con bajos títulos de anticuerpos contra *Salmonella typhi*, polisacáridos de meningococo grupo C y *Haemophilus influenzae* tipo B (50, 51); la infección asintomática en individuos de todas las edades se asoció con baja respuesta de anticuerpos frente a meningococo del grupo C (49); además, la exposición en útero a *P. falciparum* se asoció con menores niveles de IgG contra *Haemophilus influenzae* tipo B en lactantes (46). Hasta donde conocemos, en todos los estudios que evalúan el efecto de la infección plasmoidal sobre la respuesta inmune frente antígenos de polisacáridos bacterianos, se encontró disminución en la generación de anticuerpos frente a estos antígenos (revisado

en (52)); por esta razón, consideramos que los estudios que evalúan la eficacia a vacunas deben ser desarrollados principalmente en países de bajos ingresos endémicos de malaria. Un estudio integrado por mujeres con parasitosis gestacionales como malaria, esquistosomiasis, filariasis y geohelmintiasis con al menos una dosis de sulfadoxina-pirimetamina como tratamiento preventivo intermitente contra la malaria y mebendazol evaluó la respuesta inmune frente a PCV10, *Haemophilus influenzae* tipo B y toxoide diftérico. En este estudio, no se observaron diferencias concretas en el efecto de las infecciones sobre la respuesta a estas vacunas, lo que contrasta con nuestros resultados. Los autores sugieren que el tratamiento preventivo materno puede moderar los efectos de estas infecciones sobre la respuesta a las vacunas (96), sin embargo, este es un tema que debe ser estudiado.

4.5.6 Cambios transcripcionales asociados a la infección plasmodial y su posible rol en la modulación de la respuesta inmune frente a vacunas del PAI colombiano en lactantes

Las infecciones plasmodiales se relacionan con cambios inmunológicos en los hospederos; dentro de estos, los más asociados a susceptibilidad inmune son el aumento en la expresión de IL-10 (97-99) y el aumento en la frecuencia de células Treg (100-102). Dicho perfil inmunitario puede tener un efecto adverso sobre la eficacia de las vacunas al limitar las respuestas tanto celular, como humoral, frente a los antígenos vacunales.

En infecciones parasitarias crónicas, el aumento en mediadores de regulación y de células reguladoras altera el equilibrio inmunológico entre las vías de tipo Th1 y Th2. En este trabajo encontramos que las infecciones submicroscópicas por *Plasmodium* spp en el momento del parto, aumentan la expresión de IL-10 en tejido placentario y en sangre periférica de los lactantes a los 6 meses de edad (**Figura 4.3 B, C**). El aumento en la expresión de IL-10 puede estar involucrado en la inhibición de la activación clásica de macrófagos que se requieren para la producción de interleuquinas y mediadores de inflamación necesarios para eliminar patógenos intracelulares (103). Además, la IL-10 suprime la producción de interleuquinas proinflamatorias por parte de células T, y la presentación antigénica de las células

presentadoras de antígenos (104). Por consiguiente, la IL-10 puede suprimir la respuesta inmune durante la infección por múltiples mecanismos. Incluso, en infecciones por protozoos se presume que la producción de IL-10 se asocia con la inhibición de mecanismos antimicrobianos en el hospedero que permiten el establecimiento de infecciones crónicas (105, 106).

Otro hallazgo interesante es la relación de la infección plasmodial submicroscópica en el momento del parto, con el aumento de la expresión de IL-13 en sangre periférica de los lactantes y con disminución de su expresión en tejido placentario (**Figura 4.3**). Pocos estudios han evaluado la IL-13 y su relación con la infección plasmodial, en los disponibles se afirma que la IL-13 no participa directamente en la respuesta inmune frente a *P. falciparum*, sin embargo, IL-4 otra interleuquina de perfil Th2, se asoció con supresión de la actividad anti-*Plasmodium* de macrófagos en estudios *in vitro* (107). En este trabajo, en el grupo de mujeres con ISP-P, tratándose de una infección crónica, es probable que la IL-13 juegue un papel importante en la amortiguación del daño, mediante la actividad de macrófagos M2 (108).

Consecuente con esto, encontramos un aumento en la expresión de CD-163 en lactantes nacidos de mujeres con infección submicroscópica en el momento del parto; CD-163 fue descrito como un marcador de macrófagos M2 activos y se puede sobreexpresar en tejidos con inflamación crónica (109). Además, CD-163 es un receptor *scavenger* de hemoglobina libre, que se expresa casi exclusivamente en la membrana de monocitos y macrófagos y participa en la modulación de las respuestas inflamatorias, liberándose tras el estímulo con TNF- α y convirtiéndose a la forma soluble con propiedades antiinflamatorias e inmunorreguladoras. Interleuquinas antiinflamatorias como IL-4, IL-13 y IL-10 se asocian con el aumento en la expresión de CD-163 (110), al igual, que el aumento de hemoglobina libre en procesos hemolíticos, induce el aumento de CD-163. Estas mismas interleuquinas se asocian con la diferenciación de macrófagos M2, que estimulan la diferenciación de células Treg (109). En malaria aguda con y sin anemia grave y en malaria grave se observó un aumento en los niveles del receptor CD-163 soluble, el cual fue asociado con altos niveles de hemoglobina libre y con un mecanismo de amortiguación de la inflamación (111).

Estudios previos describieron el aumento en la expresión de FoxP3 en infecciones plasmodiales (100-102); estos estudios soportan el aumento en la expresión de este factor de transcripción en sangre periférica materna, tejido placentario y sangre periférica de los lactantes a los 6 meses, encontrado en este trabajo. Este hallazgo puede ser importante al explicar la limitada respuesta inmune encontrada en los lactantes frente a diferentes vacunas. Además, evaluamos la expresión de TNFR2, un receptor asociado a la máxima actividad supresora de células Treg (112, 113) y este se evidenció sobre expresado, tanto en tejido placentario, como en el lactante a los 6 meses. Estos resultados indican que la infección plasmodial submicroscópica induce un aumento de células Treg con capacidad supresora de la respuesta inmune.

En contraste, la expresión de CTLA4 se encontró disminuida en sangre periférica de los lactantes. La función del receptor CTLA-4 es la supresión de la respuesta de células T (114) y se encuentra expresado en células T activadas. En un estudio en adultos con infección por *P. vivax* se observó una disminución en el número de linfocitos T activados, en comparación con sujetos sanos residentes de la misma zona endémica (115). Sería interesante investigar si este resultado se debió a una baja cantidad de linfocitos T activados en los neonatos de gestantes con infección plasmodial submicroscópica en el momento del parto. En estudios que evalúan la respuesta inmune en infecciones agudas por *P. falciparum* en humanos (116) y por *P. berghei* ANKA en ratones (117), se encontró un aumento en la expresión de CTLA-4 en linfocitos T activados. En mononucleares aislados de sangre de cordón umbilical de mujeres con malaria placentaria por *P. falciparum*, se observó un aumento en las células reguladoras específicas del antígeno CD4⁺ CD2⁺ CTLA-4⁺, con características supresoras (118). Esto demuestra el papel activo de CTLA-4 para mantener un equilibrio inmunológico contra *Plasmodium* spp, como un regulador negativo de la activación de las células T.

El aumento en la expresión de los mediadores de regulación FoxP3 y TNFR2, probablemente juega un papel fundamental en la disminución de los niveles de IgG frente a diferentes antígenos vacunales que se encontró en este estudio. Adicionalmente, encontramos una disminución significativa en la expresión de la molécula coestimuladora CD-40, primordial para la generación de una adecuada respuesta inmune humoral frente a cualquier reto

antigénico (119). Con estadios asexuales de *P. yoelii* y *P. falciparum* se observó una inhibición de la maduración de células dendríticas, con baja expresión del mediador coestimulador CD-40 y de los receptores TLR (120, 121). No obstante, en casos de mortalidad por malaria grave, la interacción entre CD-40 y CD-40L contribuyó a la ruptura de la barrera hematoencefálica y al secuestro de macrófagos (122). Probablemente, esta disminución de CD-40 indica alteraciones en la maduración de células dendríticas responsables de la activación de las respuestas inmunes adaptativas frente a cualquier antígeno.

4.5.7 Correlaciones entre los grupos de lactantes hijos de madres con MAE y el grupo control

Es necesario resaltar que solo dos de cinco correlaciones halladas con la molécula coestimuladora CD-40, fueron compartidas entre los lactantes de mujeres con MAE y los del grupo control, lo que sugiere que la infección altera el perfil de correlaciones de esta molécula que es fundamental para los procesos de activación de respuestas efectoras frente a cualquier reto antigénico (119).

En el grupo ISP-P, cuatro de seis correlaciones que fueron exclusivas de dicho grupo incluyeron a la molécula antiinflamatoria CD-163 y hay estudios que asocian a las interleuquinas antiinflamatorias IL-4, IL-13 y IL-10 con su aumento (110); no obstante, nosotros no encontramos correlaciones de esta molécula con las mencionadas interleuquinas en ningún grupo de estudio, pero si la encontramos correlacionada negativamente con TGF- β . Previamente, otro estudio demostró que el TGF- β reduce marcadamente la expresión de CD-163 en monocitos humanos (123). En contraste, en el grupo IP-E fue encontrada esta misma correlación (CD-163 y TGF- β), pero fue positiva.

La relación entre malaria y CD163 aún no es clara y ha sido poco estudiada; en niños con malaria no complicada se observó mayor cantidad de CD163 soluble, en comparación con niños con malaria grave (111). Además, CD-163 soluble se encontró aumentado en individuos con malaria vivax sintomática, en comparación con individuos con infección asintomática (124). En otro estudio que evaluó los niveles de CD-163 solub

e en placentas de mujeres con malaria placentaria, se encontró una débil correlación negativa entre los niveles placentarios de CD-163 solubles y el peso al nacer del neonato, con los niveles maternos y placentarios de hemoglobina (125). Interesantemente, a pesar de que la expresión de CD-163 no fue significativamente mayor en tejido placentario en el grupo ISP-P, si se observó una tendencia al aumento en placenta y un aumento significativo en sangre periférica de los lactantes a los 6 meses (**Tabla complementaria 4.1**), además en este grupo el peso de los recién nacidos fue significativamente menor que en los los grupos IP-E y control (**Tabla 4.1**).

Parece relevante explorar el rol de CD-163 en infecciones por *Plasmodium* spp, ya que CD-163, además de ser un receptor *scavenger* encargado de la depuración de complejos hemoglobina-haptoglobina, tiene propiedades antiinflamatorias importantes. En este sentido, en una infección submicroscópica por *Plasmodium* spp, compatible con una infección crónica, al tratarse de una infección intraeritrocitaria, es posible la expresión sostenida de CD-163 que puede modular la respuesta inflamatoria del hospedero. Por esta razón, es posible que veamos el papel protagónico de CD-163 en las correlaciones encontradas únicamente en nuestro grupo con infección en el momento del parto ISP-P (**Tabla 4.5**, **Figura 4.5 A**).

Por otro lado, en el grupo de lactantes hijos de mujeres con IP-E, se encontraron numerosas correlaciones con las moléculas antiinflamatorias TGF- β e IL-10. A pesar de que ningún mediador inmune se observó alterado en los lactantes de este grupo, en comparación con el grupo control (**Tabla complementaria 4.1**), si se encontró un patrón diferente de correlaciones entre las moléculas evaluadas (**Figura 4.5 B**). Estos dos mediadores proinflamatorios se correlacionan positivamente con la expresión de múltiples mediadores de antiinflamación (IL-13 y CD-163) y regulación inmune (Foxp3 y TNF-RII). Varias de estas correlaciones que involucraron a TGF- β , CD-163 e IL-10, solo fueron encontradas en este grupo (IP-E) (**Tabla 4.5**).

Desconocemos trabajos previos que apoyen nuestros resultados, sin embargo, hay estudios que muestran asociación de la infección plasmodial durante el embarazo con cambios en las poblaciones celulares de lactantes, incluso hasta los 12 meses de vida (43); dicho estudio

reportó aumento de células Treg y disminución de células de respuesta inmune innata y adaptativa T CD4⁺, T CD8⁺, NK y NKT (43). Estos cambios en las poblaciones celulares de los infantes de madres con infección plasmoidal, pueden explicar los resultados obtenidos en el presente trabajo sobre la respuesta a las vacunas en los lactantes del grupo IP-E.

Además, está descrito que el embarazo es un proceso inmunológico complejo en el que el equilibrio de mediadores inmunes, hormonas y células es fundamental para el adecuado desarrollo fetal, y cualquier alteración del proceso, puede causar repercusiones en el neonato. Alteraciones en los mediadores inmunes maternos y neonatales circulantes se han asociado con complicaciones del embarazo, así como con la susceptibilidad a enfermedades autoinmunes y del desarrollo neurológico en la vida posterior (126).

4.6 Referencias

1. De Wit D, Tonon S, Olislagers V, Goriely S, Boutriaux M, Goldman M, et al. Impaired responses to toll-like receptor 4 and toll-like receptor 3 ligands in human cord blood. *J Autoimmun.* 2003;21(3):277-81.
2. Erdman SH, Christensen RD, Bradley PP, Rothstein G. Supply and release of storage neutrophils. A developmental study. *Biol Neonate.* 1982;41(3-4):132-7.
3. Jones RL, Stoikos C, Findlay JK, Salamonsen LA. TGF-beta superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. *Reproduction.* 2006;132(2):217-32.
4. Khadilkar V, Tudehope D, Fraser S. A prospective study of nosocomial infection in a neonatal intensive care unit. *J Paediatr Child Health.* 1995;31(5):387-91.
5. Langrish CL, Buddle JC, Thrasher AJ, Goldblatt D. Neonatal dendritic cells are intrinsically biased against Th-1 immune responses. *Clin Exp Immunol.* 2002;128(1):118-23.
6. Levy O, Wynn JL. A prime time for trained immunity: innate immune memory in newborns and infants. *Neonatology.* 2014;105(2):136-41.
7. Mold JE, Michaëlsson J, Burt TD, Muench MO, Beckerman KP, Busch MP, et al. Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. *Science.* 2008;322(5907):1562-5.
8. Weinberger B, Laskin DL, Mariano TM, Sunil VR, DeCoste CJ, Heck DE, et al. Mechanisms underlying reduced responsiveness of neonatal neutrophils to distinct chemoattractants. *J Leukoc Biol.* 2001;70(6):969-76.
9. Willems F, Vollstedt S, Suter M. Phenotype and function of neonatal DC. *Eur J Immunol.* 2009;39(1):26-35.
10. Lewis DB, Gern JE, Hill HR, Friedlander SL, La Pine TR, Lemanske RF, et al. Newborn immunology: relevance to the clinician. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.* 2006;36(5):189-204.
11. Adkins B, Leclerc C, Marshall-Clarke S. Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(7):553-64.
12. Basha S, Surendran N, Pichichero M. Immune responses in neonates. *Expert Rev Clin Immunol.* 2014;10(9):1171-84.
13. Kollmann TR, Kampmann B, Mazmanian SK, Marchant A, Levy O. Protecting the Newborn and Young Infant from Infectious Diseases: Lessons from Immune Ontogeny. *Immunity.* 2017;46(3):350-63.
14. Saad K, Zahran AM, Elsayh KI, Abdelmoghny A, Aboul-Khair MD. Variation of Regulatory T Lymphocytes in the Peripheral Blood of Children with Allergic Rhinitis. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis.* 2018;66(4):307-13.
15. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature Immunology.* 2005;6:345.
16. Kinder Jeremy M, Jiang Tony T, Ertelt James M, Xin L, Strong Beverly S, Shaaban Aimen F, et al. Cross-Generational Reproductive Fitness Enforced by Microchimeric Maternal Cells. *Cell.* 2015;162(3):505-15.
17. Takahata Y, Nomura A, Takada H, Ohga S, Furuno K, Hikino S, et al. CD25+CD4+ T cells in human cord blood: an immunoregulatory subset with naive phenotype and specific expression of forkhead box p3 (Foxp3) gene. *Exp Hematol.* 2004;32(7):622-9.
18. Zahran AM, Zharan KM, Hetta HF. Significant correlation between regulatory T cells and vitamin D status in term and preterm labor. *Journal of Reproductive Immunology.* 2018;129:15-22.
19. Yu JC, Khodadadi H, Malik A, Davidson B, Salles ÉdSL, Bhatia J, et al. Innate Immunity of Neonates and Infants. *Frontiers in immunology.* 2018;9:1759
20. Boer MC, van Meijgaarden KE, Joosten SA, Ottenhoff THM. CD8+ Regulatory T Cells, and Not CD4+ T Cells, Dominate Suppressive Phenotype and Function after In Vitro Live Mycobacterium bovis-BCG Activation of Human Cells. *PLOS ONE.* 2014;9(4):e94192.
21. Mold JE, Venkatasubrahmanyam S, Burt TD, Michaëlsson J, Rivera JM, Galkina SA, et al. Fetal and adult hematopoietic stem cells give rise to distinct T cell lineages in humans. *Science (New York, NY).* 2010;330(6011):1695-9.
22. Wang G, Miyahara Y, Guo Z, Khattar M, Stepkowski SM, Chen W. "Default" generation of neonatal regulatory T cells. *J Immunol.* 2010;185(1):71-8.
23. McCarron MJ, Reen DJ. Neonatal CD8+ T-cell differentiation is dependent on interleukin-12. *Hum Immunol.* 2010;71(12):1172-9.

24. Tian C, Kron GK, Dischert KM, Higginbotham JN, Crowe JE. Low expression of the interleukin (IL)-4 receptor alpha chain and reduced signalling via the IL-4 receptor complex in human neonatal B cells. *Immunology*. 2006;119(1):54-62.
25. Koff WC, Burton DR, Johnson PR, Walker BD, King CR, Nabel GJ, et al. Accelerating next-generation vaccine development for global disease prevention. *Science (New York, NY)*. 2013;340(6136)
26. Cabinian A, Sinsimer D, Tang M, Zumba O, Mehta H, Toma A, et al. Transfer of Maternal Immune Cells by Breastfeeding: Maternal Cytotoxic T Lymphocytes Present in Breast Milk Localize in the Peyer's Patches of the Nursed Infant. *PLoS One*. 2016;11(6):e0156762.
27. Palmeira P, Carneiro-Sampaio M. Immunology of breast milk. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 2016;62:584-93.
28. Clemens JD. Dr. John D. Clemens' acceptance speech: 2010 Albert B. Sabin Gold Medal Award. *Human Vaccines*. 2010;6(9):763-6.
29. Levine MM. Immunogenicity and efficacy of oral vaccines in developing countries: lessons from a live cholera vaccine. *BMC biology*. 2010;8:129
30. Aaby P, Kollmann TR, Benn CS. Nonspecific effects of neonatal and infant vaccination: public-health, immunological and conceptual challenges. *Nature Immunology*. 2014;15:895.
31. Dzidic M, Boix-Amorós A, Selma-Royo M, Mira A, Collado MC. Gut Microbiota and Mucosal Immunity in the Neonate. *Medical sciences (Basel, Switzerland)*. 2018;6(3):56.
32. Francino MP. Early development of the gut microbiota and immune health. *Pathogens (Basel, Switzerland)*. 2014;3(3):769-90.
33. Thaïss CA, Zmora N, Levy M, Elinav E. The microbiome and innate immunity. *Nature*. 2016;535:65.
34. Kamada N, Chen GY, Inohara N, Núñez G. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nature immunology*. 2013;14(7):685-90.
35. Harris VC, Armah G, Fuentes S, Korpela KE, Parashar U, Victor JC, et al. Significant Correlation Between the Infant Gut Microbiome and Rotavirus Vaccine Response in Rural Ghana. *The Journal of infectious diseases*. 2017;215(1):34-41.
36. Huda MN, Lewis Z, Kalanetra KM, Rashid M, Ahmad SM, Raqib R, et al. Stool Microbiota and Vaccine Responses of Infants. *Pediatrics*. 2014;134(2):e362.
37. Collin M, Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology*. 2018;154(1):3-20.
38. Shortman K, Liu Y-J. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature Reviews Immunology*. 2002;2:151.
39. Pulendran B. Modulating vaccine responses with dendritic cells and Toll-like receptors. *Immunological Reviews*. 2004;199(1):227-50.
40. Good MF. Malaria. Tying the conductor's arms. *Nature*. 1999;400(6739):25-6.
41. Minigo G, Woodberry T, Piera KA, Salwati E, Tjitra E, Kenangalem E, et al. Parasite-dependent expansion of TNF receptor II-positive regulatory T cells with enhanced suppressive activity in adults with severe malaria. *PLoS Pathog*. 2009;5(4):e1000402.
42. Wammes LJ, Wiria AE, Toenhake CG, Hamid F, Liu KY, Suryani H, et al. Asymptomatic plasmodial infection is associated with increased tumor necrosis factor receptor II-expressing regulatory T cells and suppressed type 2 immune responses. *J Infect Dis*. 2013;207(10):1590-9.
43. Nouatin O, Gbédandé K, Ibitokou S, Vianou B, Houngbegnon P, Ezinmegnon S, et al. Infants' Peripheral Blood Lymphocyte Composition Reflects Both Maternal and Post-Natal Infection with *Plasmodium falciparum*. *PLoS One*. 2015;10(11):e0139606.
44. Cumberland P, Shulman CE, Maple PA, Bulmer JN, Dorman EK, Kawuondo K, et al. Maternal HIV infection and placental malaria reduce transplacental antibody transfer and tetanus antibody levels in newborns in Kenya. *J Infect Dis*. 2007;196(4):550-7.
45. Greenwood BM, Bradley-Moore AM, Bryceson AD, Palit A. Immunosuppression in children with malaria. *Lancet*. 1972;1(7743):169-72.
46. Malhotra I, McKibben M, Mungai P, McKibben E, Wang X, Sutherland LJ, et al. Effect of antenatal parasitic infections on anti-vaccine IgG levels in children: a prospective birth cohort study in Kenya. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(1):e0003466.
47. Lule SA, Mawa PA, Nkurunungi G, Nampijja M, Kizito D, Akello F, et al. Factors associated with tuberculosis infection, and with anti-mycobacterial immune responses, among five year olds BCG-immunised at birth in Entebbe, Uganda. *Vaccine*. 2015;33(6):796-804.

48. Walther B, Miles DJ, Waight P, Palmero MS, Ojuola O, Touray ES, et al. Placental malaria is associated with attenuated CD4 T-cell responses to tuberculin PPD 12 months after BCG vaccination. *BMC Infect Dis.* 2012;12:6.
49. Greenwood BM, Bradley AK, Blakebrough IS, Whittle HC, Marshall TF, Gilles HM. The immune response to a meningococcal polysaccharide vaccine in an African village. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1980;74(3):340-6.
50. Usen S, Milligan P, Ethevenaux C, Greenwood B, Mulholland K. Effect of fever on the serum antibody response of Gambian children to Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J.* 2000;19(5):444-9.
51. Williamson WA, Greenwood BM. Impairment of the immune response to vaccination after acute malaria. *Lancet.* 1978;1(8078):1328-9.
52. Álvarez-Larrotta C, Arango E, Carmona-Fonseca J. Negative immunomodulation by parasitic infections in the human response to vaccines. *J Infect Dev Ctries.* 2018;12:812-23
53. Carmona-Fonseca J, Maestre A. Incidencia de las malaria gestacional, congénita y placentaria en Urabá (Antioquia, Colombia), 2005-2007. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología.* 2009;60(1):19-33.
54. Arango EM, Samuel R, Agudelo OM, Carmona-Fonseca J, Maestre A, Yanow SK. Molecular detection of malaria at delivery reveals a high frequency of submicroscopic infections and associated placental damage in pregnant women from northwest Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2013;89(1):178-83.
55. Gavina K, Gnidehou S, Arango E, Hamel-Martineau C, Mitran C, Agudelo O, et al. Clinical Outcomes of Submicroscopic Infections and Correlates of Protection of VAR2CSA Antibodies in a Longitudinal Study of Pregnant Women in Colombia. *Infect Immun.* 2018;86(4).
56. Agudelo OM, Aristizabal BH, Yanow SK, Arango E, Carmona-Fonseca J, Maestre A. Submicroscopic infection of placenta by Plasmodium produces Th1/Th2 cytokine imbalance, inflammation and hypoxia in women from north-west Colombia. *Malar J.* 2014;13:122.
57. Ibitokou SA, Boström S, Brutus L, Tuikue Ndam N, Vianou B, Agbowai C, et al. Submicroscopic infections with Plasmodium falciparum during pregnancy and their association with circulating cytokine, chemokine, and cellular profiles. *Clin Vaccine Immunol.* 2014;21(6):859-66.
58. Álvarez-Larrotta C, Agudelo OM, Duque Y, Gavina K, Yanow SK, Maestre A, et al. Submicroscopic Plasmodium infection during pregnancy is associated with reduced antibody levels to tetanus toxoid. *Clin Exp Immunol.* 2019;195(1):96-108.
59. Rojas OL, Narváez CF, Greenberg HB, Angel J, Franco MA. Characterization of rotavirus specific B cells and their relation with serological memory. *Virology.* 2008;380(2):234-42.
60. Gnidehou S, Jin A, Mena A, Mitran CJ, Medawar E, Rajwani J, et al. Cross-Species Immune Recognition Between Plasmodium vivax Duffy Binding Protein Antibodies and the Plasmodium falciparum Surface Antigen VAR2CSA. *The Journal of Infectious Diseases.* 2018;219(1):110-20.
61. Coppola M, Arroyo L, van Meijgaarden KE, Franken KL, Geluk A, Barrera LF, et al. Differences in IgG responses against infection phase related Mycobacterium tuberculosis (Mtb) specific antigens in individuals exposed or not to Mtb correlate with control of TB infection and progression. *Tuberculosis (Edinb).* 2017;106:25-32.
62. Leal-Esteban LC, Rojas JL, Jaimes AL, Montoya JD, Montoya NE, Leiva L, et al. Estandarización en Colombia de una prueba ELISA para la evaluación de los niveles séricos de anticuerpos IgG contra diez serotipos de Streptococcus pneumoniae. *Biomédica.* 2012;32:92-102.
63. McQuillan GM, Kruszon-Moran D, Deforest A, Chu SY, Wharton M. Serologic Immunity to Diphtheria and Tetanus in the United States. *Annals of Internal Medicine.* 2002;136(9):660-6.
64. Trollfors B, Knutsson N, Taranger J, Mark A, Bergfors E, Sundh V, et al. Diphtheria, tetanus and pertussis antibodies in 10-year-old children before and after a booster dose of three toxoids: implications for the timing of a booster dose. *European Journal of Pediatrics.* 2006;165(1):14-8.
65. Wu C-J, Ko H-C, Lee H-C, Tsai W-C, Li M-G, Pao Y-Z, et al. Decline of Tetanus Antitoxin Level with Age in Taiwan. *Journal of the Formosan Medical Association.* 2009;108(5):395-401.
66. Corrigall RJ. Asymptomatic malaria parasitaemia and the antibody response to tetanus toxoid vaccination. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1988;82(4):540-1.
67. van Riet E, Adegnikaa AA, Retra K, Vieira R, Tielens AG, Lell B, et al. Cellular and humoral responses to influenza in gabonese children living in rural and semi-urban areas. *J Infect Dis.* 2007;196(11):1671-8.
68. Rao T V, Suseela I J, Sathiavathy K A. Estimation of antibodies to HBsAg in vaccinated health care workers. *Indian J Med Microbiol* 2008;26:93-469

69. Mahawal BS, Bhai N, Kataria VK, Gulati N, Chandola I, Estimation of Anti Hbs antibody titer in adults during 5–10 years period following three doses of vaccine IOSR J Pharm Biol Sci, 2013; 7(1):20–23.
70. Zuckerman JN, Sabin C, Craig FM, Williams A, Zuckerman AJ. Immune response to a new hepatitis B vaccine in healthcare workers who had not responded to standard vaccine: randomised double blind dose–response study. *BMJ* 1997;314:329–33.
71. Ravn P, Boesen H, Pedersen BK, Andersen P. Human T cell responses induced by vaccination with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *J Immunol.* 1997;158(4):1949-55.
72. Lund FE, Randall TD. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4+ T cell immunity. *Nature reviews Immunology.* 2010;10(4):236-47.
73. Maglione PJ, Chan J. How B cells shape the immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. *European journal of immunology.* 2009;39(3):676-86.
74. Casadevall A, Pirofski La. A Reappraisal of Humoral Immunity Based on Mechanisms of Antibody-Mediated Protection Against Intracellular Pathogens. *Advances in Immunology.* 91: Academic Press; 2006. p. 1-44.
75. Rodrigues A, Diness BR, Lausch KR, Lund N, Biering-Sørensen S, Aaby P, et al. Randomized Trial of BCG Vaccination at Birth to Low-Birth-Weight Children: Beneficial Nonspecific Effects in the Neonatal Period? *The Journal of Infectious Diseases.* 2011;204(2):245-52.
76. Aaby P, Vessari H, Nielsen J, Maleta K, Benn CS, Jensen H, et al. Sex Differential Effects of Routine Immunizations and Childhood Survival in Rural Malawi. *The Pediatric Infectious Disease Journal.* 2006;25(8).
77. Biering-Sørensen S, Aaby P, Napirna BM, Roth A, Ravn H, Rodrigues A, et al. Small Randomized Trial Among Low-birth-weight Children Receiving Bacillus Calmette-Guérin Vaccination at First Health Center Contact. *The Pediatric Infectious Disease Journal.* 2012;31(3).
78. Moulton LH, Rahmathullah L, Halsey NA, Thulasiraj RD, Katz J, Tielsch JM. Evaluation of non-specific effects of infant immunizations on early infant mortality in a southern Indian population. *Tropical Medicine & International Health.* 2005;10(10):947-55.
79. de Castro MJ, Martínón-Torres F, Pardo-Seco J. Nonspecific (Heterologous) Protection of Neonatal BCG Vaccination Against Hospitalization Due to Respiratory Infection and Sepsis. *Clinical Infectious Diseases.* 2015;60(11):1611-9.
80. Hollm-Delgado MG, Stuart EA, Black RE. Acute lower respiratory infection among Bacille Calmette-Guérin (BCG)-vaccinated children. *Pediatrics.* 2014;133(1):e73-81.
81. Matson DO. Protective immunity against group A rotavirus infection and illness in infants. *Arch Virol Suppl.* 1996;12:129-39
82. Chiba S, Nakata S, Urasawa T, Urasawa S, Yokoyama T, Morita Y, et al. Protective effect of naturally acquired homotypic and heterotypic rotavirus antibodies. *The Lancet.* 1986;328(8504):417-21.
83. Hjelt K, Paerregaard A, Nielsen OH, Krasilnikoff PA, Grauballe PC. Protective effect of preexisting rotavirus-specific immunoglobulin A against naturally acquired rotavirus infection in children. *Journal of Medical Virology.* 1987;21(1):39-47.
84. Velazquez FR, Calva JJ, Guerrero ML, Ruiz-Palacios GM, Morrow AL, Matson DO, et al. Serum Antibody as a Marker of Protection against Natural Rotavirus Infection and Disease. *The Journal of Infectious Diseases.* 2000;182(6):1602-9.
85. Patel M, Shane AL, Parashar UD, Jiang B, Gentsch JR, Glass RI. Oral rotavirus vaccines: how well will they work where they are needed most? *The Journal of infectious diseases.* 2009;200 Suppl 1(0 1):S39-S48.
86. Bayard V, DeAntonio R, Contreras R, Tinajero O, Castrejon MM, Ortega-Barría E, et al. Impact of rotavirus vaccination on childhood gastroenteritis-related mortality and hospital discharges in Panama. *Int J Infect Dis.* 2012;16(2):e94-8.
87. do Carmo GM, Yen C, Cortes J, Siqueira AA, de Oliveira WK, Cortez-Escalante JJ, et al. Decline in diarrhea mortality and admissions after routine childhood rotavirus immunization in Brazil: a time-series analysis. *PLoS Med.* 2011;8(4):e1001024.
88. Gastañaduy PA, Sánchez-Uribe E, Esparza-Aguilar M, Desai R, Parashar UD, Patel M, et al. Effect of rotavirus vaccine on diarrhea mortality in different socioeconomic regions of Mexico. *Pediatrics.* 2013;131(4):e1115-20.
89. Gurgel RQ, Ilozue C, Correia JB, Centenari C, Oliveira SM, Cuevas LE. Impact of rotavirus vaccination on diarrhoea mortality and hospital admissions in Brazil. *Trop Med Int Health.* 2011;16(9):1180-4.

90. Lanzieri TM, Linhares AC, Costa I, Kolhe DA, Cunha MH, Ortega-Barria E, et al. Impact of rotavirus vaccination on childhood deaths from diarrhea in Brazil. *Int J Infect Dis.* 2011;15(3):e206-10.
91. Richardson V, Hernandez-Pichardo J, Quintanar-Solares M, Esparza-Aguilar M, Johnson B, Gomez-Altamirano CM, et al. Effect of rotavirus vaccination on death from childhood diarrhea in Mexico. *N Engl J Med.* 2010;362(4):299-305.
92. WHO. World Health Organization meeting report: consensus workshop. Children's Vaccine Initiative. Rotavirus vaccines for immunization of children in developing countries. GlaxoSmithKline. 1997 17 marzo de 2019. Available from: <http://www.gsk-clinicalstudyregister.com/index.jsp>.
93. WHO. Rotavirus vaccines 2007; 82: 285-295.
94. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. Séptima edición. 2012.
95. Parra EL, Ramos V, Sanabria O, Moreno J. Serotype and genotype distribution among invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in Colombia, 2005-2010. *PloS one.* 2014;9(1):e84993
96. McKittrick ND, Malhotra IJ, Vu DM, et al. Parasitic infections during pregnancy need not affect infant antibody responses to early vaccination against *Streptococcus pneumoniae*, diphtheria, or *Haemophilus influenzae* type B. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13(2):e0007172.
97. Boyle MJ, Jagannathan P, Bowen K, McIntyre TI, Vance HM, Farrington LA, et al. The Development of *Plasmodium falciparum*-Specific IL10 CD4 T Cells and Protection from Malaria in Children in an Area of High Malaria Transmission. *Frontiers in immunology.* 2017;8:1329
98. Kumar R, Ng S, Engwerda C. The Role of IL-10 in Malaria: A Double Edged Sword. *Frontiers in Immunology.* 2019;10:229.
99. Peyron F, Burdin N, Ringwald P, Vuillez JP, Rousset F, Banchereau J. High levels of circulating IL-10 in human malaria. *Clinical and experimental immunology.* 1994;95(2):300-3.
100. Finney OC, Lawrence E, Gray AP, Njie M, Riley EM, Walther M. Freeze-thaw lysates of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells induce differentiation of functionally competent regulatory T cells from memory T cells. *Eur J Immunol.* 2012;42(7):1767-77.
101. Flanagan KL, Halliday A, Burl S, Landgraf K, Jagne YJ, Noho-Konteh F, et al. The effect of placental malaria infection on cord blood and maternal immunoregulatory responses at birth. *Eur J Immunol.* 2010;40(4):1062-72.
102. Nyirenda TS, Molyneux ME, Heyderman RS, Mandala WL, Walker LSK, Kenefeck R, et al. T - Regulatory Cells and Inflammatory and Inhibitory Cytokines in Malawian Children Residing in an Area of High and an Area of Low Malaria Transmission During Acute Uncomplicated Malaria and in Convalescence. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society.* 2015;4(3):232-41.
103. Sing A, Rost D, Tvardovskaia N, Roggenkamp A, Wiedemann A, Kirschning CJ, et al. *Yersinia V*-antigen exploits toll-like receptor 2 and CD14 for interleukin 10-mediated immunosuppression. *The Journal of Experimental Medicine.* 2002;196(8):1017-24.
104. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease. *Annual Review of Immunology.* 2011;29(1):71-109.
105. Belkaid Y, Hoffmann KF, Mendez S, Kamhawi S, Udey MC, Wynn TA, et al. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J Exp Med.* 2001;194(10):1497-506.
106. Plebanski M, Flanagan KL, Lee EAM, Reece WHH, Hart K, Gelder C, et al. Interleukin 10-Mediated Immunosuppression by a Variant CD4 T Cell Epitope of *Plasmodium falciparum*. *Immunity.* 1999;10(6):651-60.
107. Kumaratilake LM, Ferrante A. IL-4 inhibits macrophage-mediated killing of *Plasmodium falciparum* in vitro. A possible parasite-immune evasion mechanism. *The Journal of Immunology.* 1992;149(1):194.
108. Varin A, Mukhopadhyay S, Herbein G, Gordon S. Alternative activation of macrophages by IL-4 impairs phagocytosis of pathogens but potentiates microbial-induced signalling and cytokine secretion. *Blood.* 2010;115(2):353.
109. Verreck FAW, de Boer T, Langenberg DML, van der Zanden L, Ottenhoff THM. Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN- γ - and CD40L-mediated costimulation. *Journal of Leukocyte Biology.* 2006;79(2):285-93.
110. Schmieder A, Schledzewski K, Michel J, Schönhaar K, Morias Y, Bosschaerts T, et al. The CD20 homolog Ms4a8a integrates pro- and anti-inflammatory signals in novel M2-like macrophages and is expressed in parasite infection. *European Journal of Immunology.* 2012;42(11):2971-82.

111. Kusi KA, Gyan BA, Goka BQ, Dodoo D, Obeng-Adjei G, Troye-Blomberg M, et al. Levels of soluble CD163 and severity of malaria in children in Ghana. *Clinical and vaccine immunology*. 2008;15(9):1456-60.
112. Chen X, Oppenheim JJ. TNF-alpha: an activator of CD4+FoxP3+TNFR2+ regulatory T cells. *Curr Dir Autoimmun*. 2010;11:119-34.
113. Chen X, Subleski JJ, Hamano R, Howard OM, Wiltrot RH, Oppenheim JJ. Co-expression of TNFR2 and CD25 identifies more of the functional CD4+FOXP3+ regulatory T cells in human peripheral blood. *Eur J Immunol*. 2010;40(4):1099-106.
114. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of t cell costimulation. *Annual Review of Immunology*. 1996;14(1):233-58.
115. Chaves YO, da Costa AG, Pereira ML, de Lacerda MV, Coelho-Dos-Reis JG, Martins-Filho OA, et al. Immune response pattern in recurrent *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J*. 2016;15(1):445.
116. Mackroth MS, Abel A, Steeg C, Schulze Zur Wiesch J, Jacobs T. Acute Malaria Induces PD1+CTLA4+ Effector T Cells with Cell-Extrinsic Suppressor Function. *PLoS Pathog*. 2016;12(11):e1005909.
117. Hafalla JC, Claser C, Couper KN, Grau GE, Renia L, de Souza JB, et al. The CTLA-4 and PD-1/PD-L1 inhibitory pathways independently regulate host resistance to *Plasmodium*-induced acute immune pathology. *PLoS Pathog*. 2012;8(2):e1002504.
118. Brustoski K, Moller U, Kramer M, Hartgers FC, Kremsner PG, Krzych U, et al. Reduced cord blood immune effector-cell responsiveness mediated by CD4+ cells induced in utero as a consequence of placental *Plasmodium falciparum* infection. *J Infect Dis*. 2006;193(1):146-54.
119. Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunological reviews*. 2009;229(1):152-72.
120. Bettiol E, Carapau D, Galan-Rodriguez C, Ocaña-Morgner C, Rodriguez A. Dual effect of *Plasmodium*-infected erythrocytes on dendritic cell maturation. *Malaria Journal*. 2010;9(1):64.
121. Yap XZ, Lundie RJ, Feng G, Pooley J, Beeson JG, O'Keeffe M. Different Life Cycle Stages of *Plasmodium falciparum* Induce Contrasting Responses in Dendritic Cells. *Frontiers in Immunology*. 2019;10:32.
122. Piguet PF, Kan CD, Vesin C, Rochat A, Donati Y, Barazzone C. Role of CD40-CVD40L in mouse severe malaria. *The American journal of pathology*. 2001;159(2):733-42.
123. Pioli PA, Goonan KE, Wardwell K, Guyre PM. TGF- β regulation of human macrophage scavenger receptor CD163 is Smad3-dependent. *Journal of Leukocyte Biology*. 2004;76(2):500-8.
124. Mendonça VRR, Luz NF, Santos NJG, Borges VM, Gonçalves MS, Andrade BB, et al. Association between the haptoglobin and heme oxygenase 1 genetic profiles and soluble CD163 in susceptibility to and severity of human malaria. *Infection and immunity*. 2012;80(4):1445-54.
125. Chua CLL, Brown GV, Hamilton JA, Molyneux ME, Rogerson SJ, Boeuf P. Soluble CD163, a product of monocyte/macrophage activation, is inversely associated with haemoglobin levels in placental malaria. *PloS one*. 2013;8(5):e64127
126. Traglia M, Croen LA, Jones KL, Heuer LS, Yolken R, Kharrazi M, et al. Cross-genetic determination of maternal and neonatal immune mediators during pregnancy. *Genome Medicine*. 2018;10(1):67.

5 Discusión general

La MAE se describe como una infección frecuente a partir de la implementación de metodologías con mejor sensibilidad para la detección de *Plasmodium* spp. Los diferentes estudios han mostrado que las repercusiones de las infecciones plasmodiales microscópicas y submicroscópicas son comparables en todos los aspectos. En este estudio teníamos como objetivos evaluar el efecto inmunomodulador de la MAE y su efecto sobre: 1) la respuesta materna al TT, 2) la inmunidad pasiva neonatal frente a TT y RV 3) y la inmunidad del lactante y su desenlace en la respuesta inmune frente a vacunas del PAI colombiano. En general se observó que tanto la infección plasmodial submicroscópica en el momento del parto, como la historia de malaria durante la gestación, afectaron esos tres procesos.

Esto representa la importancia de la salud materna para el sustento de la gestación y la integridad y sano desarrollo del feto. En este trabajo queda claro que la infección submicroscópica que es detectada en el momento del parto, pero cuyo tiempo de duración desconocido (infección crónica), cambia los perfiles de expresión de mediadores inmunes en sangre periférica materna, en tejido placentario y en los lactantes de 6 meses. Sobre los referidos cambios es importante resaltar el aumento en la expresión del factor de transcripción de Treg FoxP3, así como del marcador de células Treg activas TNF-RII; el aumento, frecuentemente descrito en infecciones maláricas, de IL-10, y la nueva vinculación de la expresión aumentada de IL-13 y CD-163 principalmente en los lactantes del grupo de mujeres con infección submicroscópica en el momento del parto.

Este perfil descrito indica que el posible mecanismo de modulación de la respuesta inmune en el modelo de ISP-P, se basa en la modulación negativa de la respuesta inmune por la inclinación del perfil de transcripción hacia los mediadores antiinflamatorios y de regulación. Esta pérdida del equilibrio inmunológico dificulta la amplificación de respuestas inmunes inflamatorias, que son fundamentales en la generación de memoria inmunológica. Otro hallazgo importante y recurrente en nuestros grupos de estudio con ISP-P es la disminución en la expresión de CD-40; este evento puede relacionarse directamente con la disminución encontrada de los niveles de IgG frente a diferentes estímulos vacunales.

En el modelo de historia de malaria durante el embarazo también se observaron variaciones importantes en los tres procesos evaluados en este estudio. Sin embargo, el mecanismo que causó estos cambios en la respuesta a las vacunas parece no ser el mismo que para el modelo de infección submicroscópica en el parto. Esta afirmación es sustentada por la escasez de cambios transcripcionales encontrados en los grupos de estudio IP-E, en los tres momentos. Se observan algunos cambios como aumento en la expresión de FoxP3, TNF-RII y disminución de la expresión de CD-40, pero estos no se mantienen en los grupos correspondientes a los tres momentos evaluados; sin embargo, los cambios en la respuesta a las vacunas si son consistentes. En este caso, debe evaluarse si la modificación en la respuesta a las vacunas es consecuencia de las alteraciones inmunes de la madre en el proceso de infección durante el embarazo que afectan en el desarrollo inmune neonatal (variación en frecuencia y cantidad de diferentes tipos celulares).

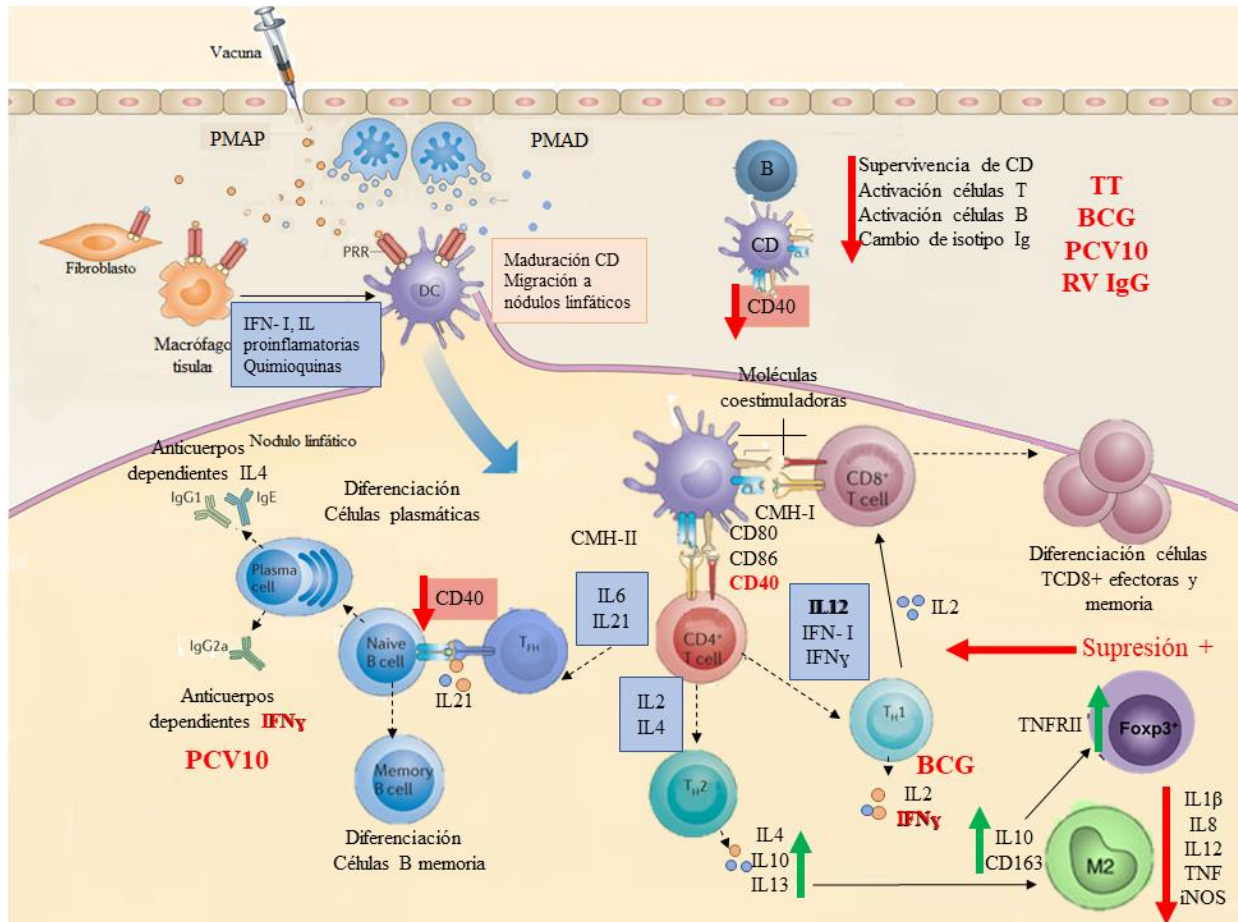
En relación a la inmunidad pasiva transplacentaria consideramos que el hallazgo más relevante compartido en los dos grupos de estudio con MAE es el aumento de la interleuquina proinflamatoria IFN- γ . A pesar de que la inflamación y los cambios histológicos placentarios encontrados en estas infecciones pueden explicar la disminución en el paso de anticuerpos maternos al cordón, es interesante estudiar el efecto de IFN- γ sobre el receptor FcRn, responsable del transporte de las IgG a través de la placenta.

A lo largo de este trabajo se refirió el agotamiento de células T como un posible mecanismo de alteración de la respuesta inmune frente a las vacunas, en especial en nuestro modelo de infección submicroscópica; con respecto a esto, no podemos afirmarlo, ya que, la expresión del único receptor considerado como marcador de agotamiento de células T medido por nosotros fue CTLA-4 y los resultados obtenidos no fueron consistentes. Además debemos resaltar que, en las zonas endémicas de malaria cohabitan otros parásitos asociados a agotamiento de células T que pueden estar causando coinfecciones en los individuos evaluados en este estudio.

Por último, a pesar de que encontramos disminución en la respuesta inmune humoral frente TT, RV, neumococo y BCG y celular frente a BCG, desconocemos el impacto de esta disminución frente a la protección contra la enfermedad. Consideramos un tema preocupante

que la mayoría de los lactantes no hubieran alcanzado los niveles protectores de IgG frente a los tres polisacáridos de neumococo evaluados luego del esquema completo de vacunación, teniendo en cuenta que el refuerzo es al año de vida.

Figura 5.1. Aproximación teórica del efecto de los mediadores inmunes alterados en ISP-P y su papel en los cambios encontrados en la respuesta a las vacunas.



Representación gráfica de la respuesta inmune general en la aplicación de vacunas intramusculares. En la imagen se muestran las principales células y mediadores que interfieren en el proceso de respuesta inmune frente a la vacunación. Las flechas ubicadas junto a los mediadores: verdes indican sobreexpresión y rojas disminución de la expresión de los mediadores evaluados en ISP-P en sangre periférica materna y del lactante de 6 meses. En las vacunas señaladas en rojo (PCV10, BCG, TT, RV IgG) se encontró disminución en la respuesta humoral, además, para BCG disminuyó la respuesta inmune celular. En rojo se resaltan los mediadores con cambios transcripcionales durante las ISP-P, que podrían influir directamente en la respuesta a las vacunas (IFN- γ y CD-40).

Conclusiones generales

- Los resultados de este trabajo indican que el problema de la MAE en Colombia tiene mayores efectos adversos de lo que se había anticipado y demuestran la necesidad de implementar métodos de prevención, de diagnóstico más sensible y de tratamientos precoces, oportunos y eficaces que permitan aminorar el impacto de estas infecciones en las poblaciones vulnerables.
- Este es el primer estudio que demuestra que la infección con *P. vivax* asocia con disminución en los niveles de IgG en gestantes colombianas y con disminución de la inmunidad pasiva neonatal transplacentaria frente a TT.
- Los resultados obtenidos en este estudio permiten llamar la atención de las autoridades de salud para que consideren aspectos de la salud materna en las zonas endémicas de malaria, con respecto al diseño y verificación de la eficacia de los planes de vacunación.
- Los resultados obtenidos permiten afirmar que es necesario realizar los estudios de eficacia de nuevas vacunas en zonas endémicas de malaria (zona tropical) y que los entes de salud deben basarse en estudios en poblaciones con características similares a las propias, para la selección de las vacunas para su plan de inmunización.
- Urge investigar en otras regiones y con muestras poblacionales adecuadas, según especie plasmodial, la magnitud del problema.
- Es necesario evaluar la posible utilidad del TPI en gestantes para atenuar efectos de la MAE sobre la respuesta inmune materna y neonatal.

6 Limitaciones del estudio

- La mayoría de los datos clínicos de las gestantes en el momento del parto, de los neonatos al nacimiento y de los lactantes a los 6 meses de edad, se tomaron a partir de las historias clínicas y del carné de crecimiento y desarrollo; en varias ocasiones el dato requerido no estaba registrado. Además, somos conscientes de que la información de los registros clínicos no tiene el grado de control deseable en una investigación.
- Desconocemos la frecuencia de infección con parásitos intestinales en la población evaluada; debido a la influencia de estas infecciones en la respuesta inmune, es importante considerarla en futuros estudios y resolver el impacto de esta en nuestros resultados obtenidos.
- Es claro que determinar la expresión de genes por un método de cuantificación relativa, no expresa resultados concretos de la modulación inmune que permitan asegurar los cambios en la respuesta. Es importante evaluar los niveles de cada mediador inmune como proteína en sangre, tanto para las citoquinas como para los diferentes receptores analizados en este trabajo.
- Solo se pudo utilizar estuche comercial cuantitativo para la determinación de anticuerpos antiTT y antiHB, y para neumococo, se logró hacer una ELISA validada y ofrecida por el grupo de investigación IDP de la Universidad de Antioquia, dentro de su portafolio de servicios. Para antiRV, antiPPD se hicieron ELISAs caseras que limitan la comparación e interpretación de los resultados.

7 Perspectivas

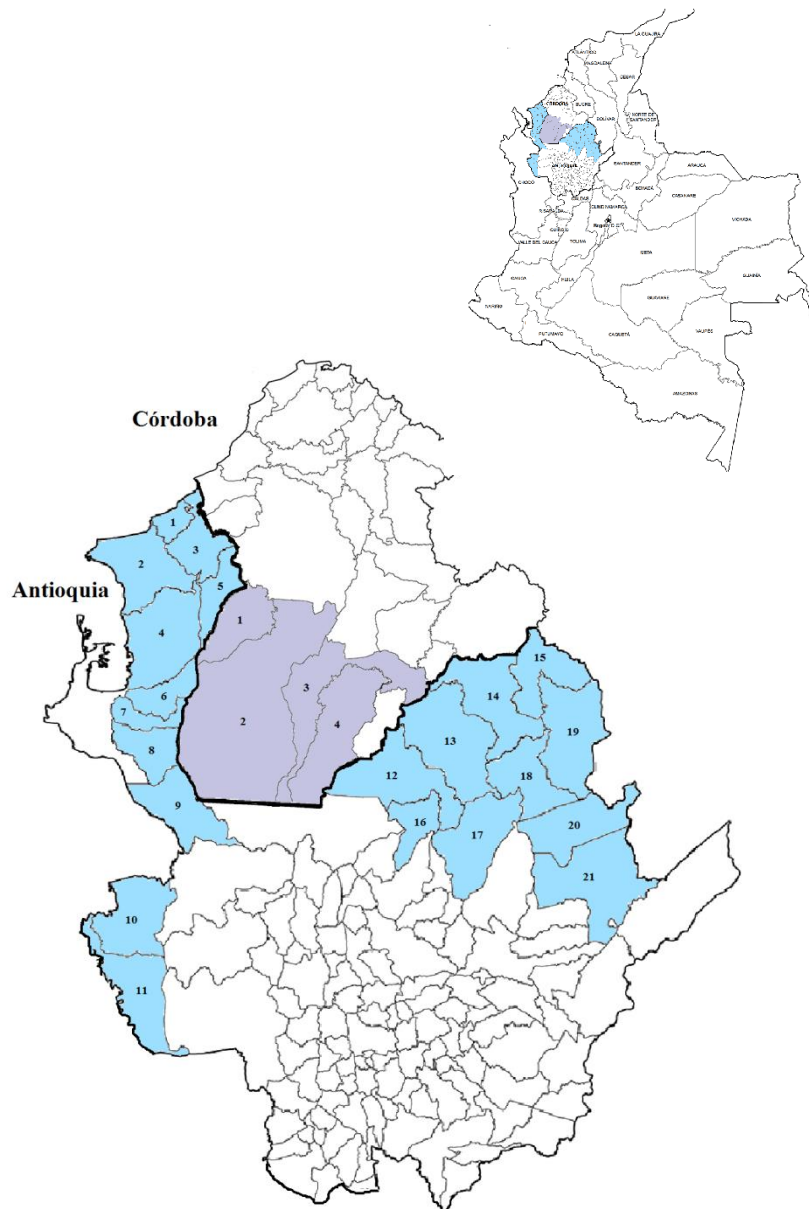
Con los resultados de este trabajo se han planteado otros proyectos de investigación en el Grupo “Salud y Comunidad-César Uribe Piedrahíta”, los cuales buscan avanzar en la comprensión del impacto de la MAE microscópica y submicroscópica sobre la madre y el producto de la gestación. Una lista de las preguntas que surgieron y se han planteado como propuestas de investigación, algunas de las cuales ya se están intentado responder:

- Teniendo en cuenta la alteración en la respuesta inmune frente a las vacunas en zonas endémicas de malaria (zonas tropicales y subtropicales), en donde cohabitan otros géneros parasitarios frecuentes y con impacto en la respuesta inmune, como son los geohelminths, ¿cuál es el papel de la coinfección geohelmintiasis/malaria en la modulación de la respuesta inmune frente a vacunas en zonas endémicas de malaria en Colombia?
- ¿Cuál es el impacto de la disminución en los niveles de IgG frente a TT, rotavirus, BCG y neumococo en las poblaciones estudiadas?
- ¿Esta disminución en los niveles de anticuerpos incrementa la carga de infecciones inmunoprevenibles en las zonas estudiadas?
- Con respecto a la evaluación de la inmunidad neonatal transplacentaria: ¿Los hallazgos histológicos placentarios ya descritos en infecciones plasmodiales submicroscópicas, se asocian con la disminución en el paso de anticuerpos maternos al cordón?
- ¿En la MAE, cuál es la concentración del receptor FcRn encargado del tránsito de anticuerpos IgG maternos al cordón, a través de la placenta?
- ¿Otros receptores asociados con el agotamiento de células T como TIM3, LAG y PD1, se alteran durante las infecciones plasmodiales submicroscópicas?

- ¿Cuál es el papel de la forma soluble de CD-163 en la modulación de la respuesta inmune en infecciones plasmodiales?
- Teniendo en cuenta que no fue posible determinar el mecanismo por el cual se observó alteración en la respuesta a las vacunas, en el grupo de mujeres y lactantes con historia de malaria durante la gestación: ¿Cambios en la distribución de frecuencia y cantidad de células inmunes en neonatos, se asocian con la variación en la respuesta a la vacunación encontrada en este estudio?
- ¿Qué impacto tiene la MAE en la generación de la “inmunidad entrenada” descrita para la vacuna BCG?
- ¿Es el tratamiento preventivo intermitente una alternativa preventiva eficaz para mejorar la eficacia de la vacunación en zonas endémicas de malaria en Colombia?

8 Anexos

Anexo 1. Municipios que conforman la región Urabá antioqueño-Cuencas altas de los ríos Sinú y San Jorge en Córdoba-Bajo Cauca antioqueño



Antioquia
<i>Urabá</i>
1. San Juan de Urabá
2. Necoclí
3. Arboletes
4. Turbo
5. San Pedro de Urabá
6. Apartadó
7. Carepa
8. Chigorodó
9. Mutatá
10. Murindó
11. Vigía del Fuerte
<i>Cauca</i>
12. Tarazá
13. Cáceres
14. Caucasia
15. Nechí
18. Zaragoza
19. El Bagre
<i>Nordeste</i>
17. Anorí
20. Segovia
21. Remedios
<i>Norte</i>
16. Valdivia
Córdoba
1. Valencia
2. Tierralta
3. Montelibano
4. Puerto Libertador

Anexo 2. Material complementario

Ver documento adjunto.

Tabla complementaria 2.1. Niveles de antiTT en sangre materna en los grupos infectados, según la especie plasmodial

Tabla complementaria 2.2. Cuantificación relativa de mediadores inmunes en sangre periférica materna en el momento del parto, en los tres grupos de estudio

Tabla complementaria 3.1 Niveles de IgG antiTT y antiRV en sangre periférica materna y cordón umbilical, de acuerdo a la especie parasitaria

Tabla complementaria 3.2. Cuantificación relativa de mediadores inmunes en tejido placentario, en cada grupo de estudio

Tabla complementaria 3.3 Cuantificación relativa de mediadores inmunes en tejido placentario, de acuerdo a la especie parasitaria infectante

Tabla complementaria 4.1 Comparación de la expresión de mediadores inmunes en gestantes y lactantes de los tres grupos de estudio

Anexo 3. Publicaciones

1. **Artículo de revisión derivado de la construcción del marco teórico del trabajo (capítulo 1):** Álvarez-Larrotta C, Arango E, Carmona-Fonseca J (2018) Negative immunomodulation by parasitic infections in the human response to vaccines. *J Infect Dev Ctries* 12:812-823. doi: <https://doi.org/10.3855/jidc.10337>
2. **Artículo de revisión derivado de la construcción del marco teórico del trabajo (capítulo 1):** Álvarez-Larrotta C, Carmona-Fonseca J (2019). Consecuencias de la infección malárica gestacional en la función inmune y en la inmunomodulación de la madre y el neonato. *Rev Chilena Infectol* 2019; 36 (3): 307-318
3. **Artículo original derivado del capítulo 2:** Álvarez-Larrotta, C. , Agudelo, O. , Duque, Y. , Gavina, K. , Yanow, S. , Maestre, A. , Carmona-Fonseca, J. and Arango, E. (2019), Submicroscopic Plasmodium infection during pregnancy is associated with reduced antibody levels to tetanus toxoid. *Clin Exp Immunol*, 195: 96-108. doi:10.1111/cei.13213

Artículos en proceso de construcción y pendientes de publicación

1. La malaria asociada al embarazo afecta la inmunización pasiva neonatal transplacentaria contra toxoide tetánico.
2. La malaria asociada al embarazo disminuye la respuesta inmune humoral frente a diferentes antígenos vacunales en lactantes colombianos.
3. La malaria asociada al embarazo afecta la respuesta inmune materna frente al toxoide tetánico en mujeres colombianas.