



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“PERFIL DE BIOMARCADORES DE INFLAMACIÓN EN EL MODELO DE
INFECCIÓN DE MALARIA *PLASMODIUM-AOTUS SP.*”**

POR:

LARIZA MENDOZA

8-922-1939

Trabajo de graduación presentado como
requisito para optar por el título de
Licenciada en Biología con orientación en
Genética y Biología Molecular

República de Panamá, 2022



TRIBUNAL EXAMINADOR

Título:

“PERFIL DE BIOMARCADORES DE INFLAMACIÓN EN EL MODELO DE INFECCIÓN DE MALARIA *PLASMODIUM-AOTUS SP.*”

Elaborado Por:

Lariza Mendoza

8-922-1939

Trabajo de Graduación presentado a consideración de la Escuela de Biología, como requisito para optar por el título de Licenciatura en Biología con Orientación en Genética y Biología Molecular.

PROF. ARIEL MAGALLÓN
Tutor (preside)

PROF. DORA QUIRÓS
Jurado

PROF. DANIEL EMMEN
Jurado

DEDICATORIA

Este trabajo de grado va dedicado con mucho cariño a mi madre, mujer comprensiva y paciente, quien me ha brindado su apoyo incondicional durante toda mi vida, confiando en mí y alentándome a seguir con mi preparación académica.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios primeramente por cada día de vida que me regala, por todas las oportunidades que me ha brindado, por iluminarme cada día y ser mi fuente de fortaleza en los momentos difíciles.

A mi familia, principalmente mis padres por educarme y enseñarme valores que he puesto en práctica en el transcurso de mi vida, gracias por su amor y comprensión, por apoyarme durante toda mi carrera e incentivar me a crecer personal y profesionalmente.

A mis co-asesores el Dr. Daniel Emmen y especialmente la Dra. Dora Quirós, mujer noble y muy empática, gracias por ser comprensiva y apoyarme en los momentos amargos de mi 2021, por dedicarme su tiempo, por sus consejos tanto a nivel personal como académicos, por preocuparse y estar pendiente en mi preparación académica durante mi trabajo de grado. Para mí es un ejemplo a seguir.

A mi asesor principal el Dr. Ariel Magallón, a quién admiro y estimo mucho, gracias por su paciencia al transmitirme sus conocimientos, por aceptarme como estudiante de tesis y darme la oportunidad de realizar una pasantía en el Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES). Le agradezco también por dedicarme muchas horas de su valioso tiempo durante mi trabajo de grado para mi formación académica y profesional.

ÍNDICE GENERAL

Contenido

DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
ÍNDICE GENERAL.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ÍNDICE DE CUADROS.....	VIII
ANEXOS.....	IX
RESUMEN.....	X
ABSTRACT.....	XI
INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS.....	3
OBJETIVOS.....	4
Objetivo General.....	4
Objetivos Específicos.....	4
CAPÍTULO I:.....	5
MARCO TEÓRICO.....	5
1. Malaria.....	6
1.1 Generalidades.....	6
1.2 Malaria en el Mundo.....	6
1.3 Malaria en Panamá.....	7
2. Taxonomía.....	9
3. Clasificación de <i>Plasmodium sp.</i>	10
4. Evolución de <i>Plasmodium falciparum</i> y <i>P. vivax</i>	10
5. Ciclo de Vida.....	11
4. Patogénesis.....	13
7. Inmunidad.....	14
7.1 Inmunidad Innata.....	14
7.2 Inmunidad Adaptativa.....	18
8. Mecanismo de acción de las citocinas y quimiocinas en la infección por <i>Plasmodium sp.</i>	21

CAPÍTULO II:.....	29
METODOLOGÍA.....	29
1. Consideraciones éticas.....	30
2. Inoculación de parásitos y administración de medicamentos antipalúdicos	30
3. Colecta de sangre y obtención de plasma.....	31
4. Extracción del ADN genómico de <i>P. falciparum</i> y <i>P. vivax</i>	31
5. PCR convencional y purificación del producto de PCR.....	32
6. Estandarización de cebadores	33
7. Análisis cuantitativo de la carga parasitaria por qPCR	33
8. Preparación de muestras de plasma	34
9. Ensayo inmunoenzimático, Luminex - Cuantificación de biomarcadores en plasma	35
10. Análisis Estadístico	36
CAPÍTULO III:	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
Análisis cuantitativo de la carga parasitaria	38
Cuantificación de biomarcadores de inflamación en plasma durante el periodo de malaria	39
CAPÍTULO IV:	55
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	55
CONCLUSIONES	56
RECOMENDACIONES	57
BIBLIOGRAFÍA	58
ANEXOS	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Casos de infección por especies de <i>Plasmodium sp.</i> en Panamá entre el año 1957 y 2019.	8
Figura 2. Mapa de las regiones con casos acumulados de malaria por <i>P. falciparum</i> y <i>P. vivax</i> en la República de Panamá entre 2000 y 2019.....	9
Figura 3. Ciclo sexual de Plasmodium sp.	12
Figura 4. Vinculación de la inmunidad innata y adaptativa con la malaria en etapa..... sanguínea.....	20
Figura 5. Inducción y producción de IFN- γ en defensa del huésped contra el parásito de la malaria	28
Figura 6. Densidad de parásitos Plasmodium detectado por qPCR.	46
Figura 7. Análisis sanguíneos que muestra los valores de algunos leucocitos (monocitos, neutrófilos y linfocitos).	47
Figura 8. Análisis sanguíneos que muestra los valores de plaquetas, hematocrito y hemoglobina.	47
Figura 9. Niveles (pg/mL) del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF).....	50
Figura 10. Niveles (pg/mL) del Interferón gamma (IFN- γ).....	50
Figura 11. Niveles (pg/mL) de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).	49
Figura 12. Niveles (pg/mL) de Interleucina-2 (IL-2).....	51
Figura 13 Niveles (pg/mL) de Interleucina-5 (IL-5).....	52
Figura 14 Niveles (pg/mL) de Interleucina-8 (IL-8).....	52
Figura 15 Niveles (pg/mL) de Interleucina-10 (IL-10).....	53
Figura 16 Niveles (pg/mL) de interleucina-17A (IL-17A).....	53
Figura. 17. Niveles (pg/mL) de proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP1).....	52
Figura. 18. Niveles (pg/mL) de proteína inflamatoria de macrófagos 1-alfa (MIP-1 α)	52
Figura 19 Niveles (pg/mL) de proteína quimiotáctica de eosinófilos (Eotaxina-1).....	55
Figura 20 Niveles (pg/mL) de monocina inducida por interferón gamma (MIG).....	55
Figura 21 Niveles (pg/mL) de proteína 10 inducida por interferón gamma (IP-10).....	56
Figura 22. Niveles (pg/mL) de factor 1 derivado de células estromales (SDF-1).....	54

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Mecanismo de acción de las citocinas y quimiocinas en la infección por <i>Plasmodium</i> <i>sp.</i>	27
Cuadro 2. Colecta de sangre y administración de medicamentos antipalúdicos	32

ANEXOS

Figura 23. Extracción de ADN.....	68
Figura 24. Estandarización de cebadores en el Sistema Real-Time PCR QuantStudio 5 de Applied Biosystems.....	68
Figura 25. Preparación de plasma	69
Figura 26. Sistema Luminex™ 100/200, Magpix™,.....	69

RESUMEN

La malaria es una de las enfermedades parasitarias más relevantes a nivel mundial ya que provoca una alta mortalidad y morbilidad. Es causada principalmente por dos especies, *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*. *P. falciparum* es responsable de la mayoría de las muertes y *P. vivax* es la especie más extendida geográficamente. En el 2021 hubo 247 millones de casos y 619,000 muertes por malaria en todo el mundo. Mientras que en el 2021 Panamá reportó 3,660 casos, la mayoría de estos datos son de regiones endémicas. La malaria puede manifestarse como parasitemia asintomática, paludismo no complicado, paludismo grave y muerte. El sistema inmunitario ejerce función para proteger al huésped de la infección por el parásito e impedir las manifestaciones mencionadas. En estos procesos inmunitarios se producen citocinas, que son pequeñas proteínas que actúan mediando interacciones complejas, regulando la función de las células que las producen y de otras células. El mecanismo de acción de estas moléculas se basa en interactuar con receptores específicos en la membrana de la célula diana, de esta manera producen una respuesta inflamatoria. El modelo *Aotus sp.* ha sido aprobado por la Organización Mundial de la Salud para estudios sobre los mecanismos de invasión del parásito *Plasmodium*, generación de vacunas y para probar drogas antimaláricas. En el presente estudio se comparó el perfil de citocinas y quimiocinas en episodios controlados de malaria causados por *P. falciparum* y *P. vivax* en el modelo de infección monos *Aotus*. Para esto se inocularon diez primates no humanos de la especie *Aotus lemurinus lemurinus*, y se incluyeron dos controles no infectados. Se inocularon cuatro ejemplares *Aotus sp.* con la cepa *P. falciparum* - FVO, tres con la cepa *P. vivax* - AMRU-1 y otros tres con la cepa *P. vivax* - SAL-1. Durante esta fase experimental se realizó vigilancia clínica constante de los especímenes en estudio. Se colectaron muestras de sangre del día 5 al día 21 post-inoculación. Se realizó extracción de ADN genómico de *P. falciparum* y *P. vivax* y posteriormente se cuantificó la carga parasitaria mediante qPCR. Se colectó muestra de plasma en tres periodos, pre-inoculación a los 6-8 días y a los 11-15 post-inoculación. Se realizó cuantificación de los niveles de citocinas y quimiocinas en plasma expresados durante los episodios de malaria. Los resultados mostraron que *P. falciparum* registró una carga parasitaria mayor en comparación con *P. vivax*. Las dos cepas de *P. vivax* (AMRU-1 y SAL-1) mostraron una densidad parasitaria similar. La expresión de las distintas citocinas analizadas mostró patrones en algunos casos comparables y en otros casos diferentes entre los tres grupos de *Aotus* infectados con las tres cepas de *Plasmodium*. Los altos niveles de algunas citocinas inflamatorias están relacionados con la malaria aguda, y otras asociadas a la gravedad de la enfermedad.

ABSTRACT

Malaria is one of the most relevant parasitic diseases worldwide as it causes high mortality and morbidity. It is mainly caused by two species, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *P. falciparum* is responsible for most deaths and *P. vivax* is the most geographically widespread species. In 2021 there were 247 million cases and 619,000 deaths from malaria worldwide. While in 2021, Panama reported 3,660 cases, most of these data are from endemic regions. Malaria can manifest as asymptomatic parasitemia, uncomplicated malaria, severe malaria, and death. The immune system functions to protect the host from infection by the parasite and prevent the clinical manifestations. In these immunological processes, small proteins called cytokines are produced. These molecules act by mediating complex interactions between different cell types or regulating the function of the cells that produce them. The mechanism of action of these molecules is based on interacting with specific receptors in the target cell plasmatic membrane, thus producing an inflammatory response. The *Aotus* sp. has been approved by the World Health Organization for studies on the invasion mechanisms of the *Plasmodium* parasite, for the generation of vaccines and for testing antimalarial drugs. In the present study, we compared the cytokine and chemokine profiles of *Aotus* monkeys infected by malaria parasites, *P. falciparum* and *P. vivax* in controlled episodes of malaria. Ten *Aotus lemurinus lemurinus* non-human primates were inoculated with malaria parasites, and two uninfected controls were included. Four specimens of *Aotus* sp. Were infected by *P. falciparum*-FVO strain, three with the *P. vivax* - AMRU-1 strain and three with the *P. vivax*-SAL-1 strain. During this experimental phase, constant clinical check was carried out over the experimental individuals. Blood samples (10 μ L) were collected from day 5 to day 21 post-inoculation. *P. falciparum* and *P. vivax* genomic DNA extraction from blood spotted filter papers was performed and the parasite load was quantified by qPCR. Plasma sample was collected in three periods, pre-inoculation, at 6-8 days post-inoculation and 11-15 days post-inoculation. Quantification of plasma cytokine and chemokine levels during malaria episodes was performed. The results showed that *P. falciparum* carried a higher parasite load compared to *P. vivax*. The two strains of *P. vivax* (AMRU-1 and SAL-1) showed a similar parasite density. Cytokines, chemokines, and growth factors analyzed showed patterns in some cases comparable and in other cases different among the three groups of *Aotus* infected with different *Plasmodium* strains. High levels of some inflammatory cytokines are associated with acute malaria, and others associated with disease severity.

INTRODUCCIÓN

La malaria es una de las enfermedades parasitarias más relevantes del mundo, causada por el parásito *Plasmodium*, el cual es transmitido por mosquitos del género *Anopheles sp.* Las especies *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum* son las más comunes, esta última es responsable de la malaria más peligrosa (Organización Panamericana de la Salud (OPS), 2021)

Reportes realizados por la OMS, indican que en el 2021 hubo 247 millones de casos y 619,000 muertes por malaria en todo el mundo. El 95 % de los casos y el 96 % de la mortalidad provienen de la Región Africana, siendo *P. falciparum* el responsable en su mayoría. En la Región de las Américas se reporta 597,000 casos y 334,000 muertes de las cuales *P. vivax* ha sido el causante de la mayoría de los casos. Panamá es uno de los países que ha experimentado un aumento de reportes de malaria en el 2021 (World Health Organization (WHO), 2022, 2021; Ministerio de Salud, 2018).

Para la investigación de la Malaria la Organización Mundial de la Salud ha aprobado utilizar Primates no humanos (*NHP*) como modelos experimentales ya que son los animales más fiables por las semejanzas que tienen con los humanos ya sea fisiológicas, reproductivas, en el sistema nervioso y en las interacciones sociales entre ellos (Moreno-Pérez, et al., 2017; Gardner & Luciw, 2008; WHO, 1988). Durante la última década estos *NHP*, han permitido el progreso de tratamientos médicos y muchos avances científicos desempeñando un papel clave. Para las investigaciones de enfermedades causadas por agentes infecciosos se escoge un modelo de *NHP* (Duan, et al., 2022). En el estudio de malaria los más comunes son los géneros *Aotus sp.* y *Saimiri sp.* (WHO, 1988; Riccio, et al., 2015), ya que son las únicas especies de animales aptos para estudiar parásitos que perjudican a las poblaciones humanas, debido a la parasitemia altamente reproducible que desarrollan después de infectarlos con cepas adaptadas de *P. falciparum* y *P. vivax* (Serrano-Medina & Suarez-Ferro, 2019).

El parásito *Plasmodium* desarrolla un complejo ciclo de vida. Además, el estudio de las respuestas inmunitarias contra dicho parásito es complicado, la falta de técnicas genómicas y proteómicas apropiadas, son razones por las cuales hasta la fecha ha sido difícil el desarrollo de una vacuna esperanzadora contra la malaria (Dvorin & Goldberg, 2022; Matuschewski, 2017).

Investigaciones recientes han demostrado que un subconjunto específico de células T, ejercen un papel doble en la infección por *Plasmodium*. Estas células presentan una función protectora

en la inmunidad estéril completa y un papel patogénico en la malaria grave. Es esencial comprender las interacciones entre las respuestas inmunitarias del huésped y los mecanismos de virulencia del parásito en la malaria grave para la elaboración de terapias inmunológicas eficientes (Pamplona & Silva-Santos, 2021).

Las citocinas son pequeñas proteínas secretadas por células del sistema inmunitario que actúan en interacciones complejas regulando las respuestas inflamatorias (Ioannidis, Nie, & Hansen, 2014; Filellaa, Molinaa, & Ballestaa, 2002). Durante la infección por *Plasmodium*, juegan un papel importante (Mandala, et al., 2017). Controlando la multiplicación del parásito (Mbani-Mpega, et al., 2021; Stevenson, Ing, Berretta, & Miu, 2011). Además, pueden actuar como biomarcadores que determinen el diagnóstico y la progresión a las formas graves de la malaria. (Stevenson, Ing, Berretta, & Miu, 2011).

Las citocinas proinflamatorias se elevan en infectados por *Plasmodium* (Mbani-Mpega, et al., 2021; Mandala, et al., 2017). Estas moléculas son prominentes en la malaria por *P. vivax*, se mantienen por la activación endotelial y son reguladas con la producción de citocinas antiinflamatorias de tipo IL-10 (Ribeiro, et al., 2016; Antonelli, et al., 2020). *P. falciparum* exhibe una multiplicación acelerada la cual se puede controlar con estas respuestas inflamatorias que previenen la hiperparasitemia. Sin embargo, al mismo tiempo pueden incitar el desarrollo de enfermedades graves, como anemia severa y malaria cerebral (Gonçalves, Lima, & Ferreira, 2014). No se han dilucidado los mecanismos de acción que mantienen el equilibrio de las respuestas inflamatorias en la malaria humana y experimental (Stevenson, Ing, Berretta, & Miu, 2011). Es por esto que es importante el campo de investigación de las citocinas durante la infección por *Plasmodium*.

En este estudio se cuantificaron los niveles de biomarcadores de inflamación que se expresan como respuesta del sistema inmunitario durante la malaria por *P. falciparum* y *P. vivax*. Utilizamos el modelo experimental de malaria en primates no humanos de la especie *Aotus lemurinus lemurinus*. Se indujo infección por *Plasmodium* en primates utilizando la cepa *P. falciparum* FVO y dos cepas de *P. vivax* (AMRUI y SAL-1). El análisis de los niveles de citocinas aporta información de la interacción entre las respuestas inmunitarias del huésped y los mecanismos de virulencia que ocurren durante la infección por los parásitos más comunes de la malaria.

HIPÓTESIS

En la malaria se expresa una red de citocinas con actividad pro y antiinflamatoria para regular los mecanismos efectores en la respuesta inmunitaria, ya que los niveles excesivos de las citocinas inflamatorias están asociadas a la gravedad de la enfermedad. *Plasmodium falciparum* produce una patología distinta de *Plasmodium vivax*, por lo que el perfil de citocinas expresadas será distinto.

OBJETIVOS

Objetivo General

Comparar el perfil de biomarcadores de inflamación en episodios controlados de malaria en el modelo de infección *Plasmodium-Aotus*.

Objetivos Específicos

- 1- Inducir episodios de malaria utilizando las especies de parásitos *P. falciparum* y *P. vivax* en primates no humanos *Aotus lemurinus lemurinus*
- 2- Cuantificar la carga parasitaria de *Plasmodium* en monos *Aotus lemurinus lemurinus* durante el periodo de infección.
- 3- Evaluar los niveles de citocinas expresadas en la respuesta inmune celular de monos *Aotus* infectados con malaria.
- 4- Evaluar los niveles de quimiocinas y factores de crecimientos involucrados en la respuesta inmune hacia *Plasmodium* durante el periodo de infección en mono *Aotus*.

CAPÍTULO I:

MARCO TEÓRICO

1. Malaria

1.1 Generalidades

La malaria o paludismo sigue siendo una de las enfermedades más importantes, y es causada por el protozoo unicelular del género *Plasmodium*, el cual es transmitido al huésped por un mosquito hembra del género *Anopheles sp.* infectado que actúa como vector. Se conocen cinco especies que causan infección en humanos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*. (Varo, Chaccour, & Bassat, 2020; Milner, 2018; Rossati, et al., 2016). Estas dos últimas especies mencionadas pueden causar malaria no complicada y su prevalencia es baja. *P. knowlesi* es transmitido por los macacos a humanos y está restringido solo en una pequeña región de Malasia (Varo, Chaccour, & Bassat, 2020). Por el contrario *P. falciparum* es la especie más peligrosa de malaria y a la cual se le atribuye la mayoría de casos y muertes (WHO, 2021; Varo, Chaccour, & Bassat, 2020). Se ha reportado que *P. vivax* puede causar paludismo grave y en los últimos años ha sido responsable del 8 % de la mortalidad (Carmona-Fonseca, Sánchez, & Yasnot, 2015; Naing, Whittaker, Nyunt Wai, & Mak, 2014). Además, presenta un considerable problema en las regiones tropicales de las Américas y en el Sudeste Asiático (Ashley, Pyae, & Woodrow, 2018). El paludismo puede ser asintomático o mostrar síntomas leves, o severos como la anemia grave, el paludismo cerebral, la esplenomegalia, la trombocitopenia grave, entre otras manifestaciones. Los niños menores de cinco años pueden tener severas complicaciones a nivel neurológico y respiratorio, en cambio los adultos pueden presentar una manifestación hepática (Carmona-Fonseca, Sánchez, & Yasnot, 2015).

1.2 Malaria en el Mundo

En el 2021 se estimaron 247 millones de casos autóctonos de malaria en el mundo. La mayoría de estos casos son procedentes de la región africana aproximadamente el 95%, seguida por el Sudeste Asiático y la Región del Mediterráneo Oriental. La mortalidad por malaria ha disminuido desde el año 2000 hasta el 2019, registrándose en esa fecha 558,000 muertes. Sin embargo, estos datos se han incrementado desde el 2019 al 2021 en casi el 10% estimándose 61,000 muertes, y reportándose 619,000 defunciones hasta el 2021 (WHO, 2021). La mayoría de las muertes por malaria se han representado en niños menores de cinco años (Pradines &

Robert, 2019). Aunque no se ha probado la inmunidad esterilizada, aquellos niños de áreas endémicas que sobreviven a la malaria grave y aquellas personas con repetidas infecciones palúdicas pueden adquirir inmunidad clínica. Esto puede reducir la gravedad de la enfermedad. Por el contrario en zonas donde la transmisión es menor, pueden verse afectadas personas de todas las edades debido a la falta de desarrollo de inmunidad clínica (Varo, Chaccour, & Bassat, 2020).

1.3 Malaria en Panamá

En Panamá los casos de malaria reportados desde 1884 a la actualidad han sido muy variables aumentando y disminuyendo frecuentemente. Desde inicios de la construcción del canal de Panamá por los Estados Unidos en 1904 se logró una disminución significativa en la mortalidad y morbilidad por malaria, gracias a la estrategia liderada por el comandante y médico Williams Gorgas. Sin embargo, los casos seguían siendo considerables. (El Canal de Panamá, 2020). En 1957 se reportó una alta incidencia de malaria, arriba de 5,000 casos principalmente por *P. vivax*, una década después la prevalencia fue por *P. falciparum* hasta 1972. Durante ese período hasta 1985 hubo un control de casos de malaria. Y desde 1986 los datos se elevaron nuevamente siendo *P. vivax* el responsable del paludismo. En el 2002 se presentó un rebrote, y en el 2004 llegó a alcanzar hasta 4,000 casos. Además, la enfermedad se propagó significativamente por todo el país. Años posteriores la malaria disminuyó alcanzando 354 casos en el 2010. De 2013 a 2019 la cantidad de casos anuales de malaria se mantuvo por encima de 500, alcanzando un pico de más de 1,400 casos en el 2019. (Figura 1) (Hurtado, et al., 2020).

En el 2021 el (Ministerio de Salud (MINSa)) de Panamá reportó 3,660 casos de malaria. La mayor parte del país está libre de la enfermedad. Sin embargo, la mayoría de estos casos son provenientes de regiones con escasos recursos económicos como las comarcas indígenas Ngäbe-Buglé y Guna Yala, seguido por otras áreas endémicas como Panamá Este y Darién. Aproximadamente el 94 % de estos casos corresponden a *P. vivax* (Figura 2) (Ministerio de Salud (MINSa), 2022, 2018; Hurtado, et al., 2020)

La malaria por *P. vivax* ha sido difícil de erradicar, debido a la biología del parásito, la presencia de hipnozoítos de *P. vivax* pueden reactivarse semanas o meses después de la infección primaria, las reinfecciones en las comarcas ocurren probablemente por costumbres o ignorancia cultural

ante los medicamentos (Hurtado, et al., 2020). Muchos de los casos por *P. falciparum* en la provincia de Darién son importados de Colombia, cada año se realiza la captación de casos importados por migración ilegal (MINSa, 2018).

En el transcurso de la historia de la malaria en Panamá se implementaron fármacos antimaláricos y medidas de control de mosquitos como el DDT (Dicloro-Difenil Tricloetano), entre otros. No obstante, estos insecticidas se han ido reemplazando por diversas razones como económicas, logísticas, efectos nocivos para la salud, y por la resistencia de los vectores (Obaldia 3rd, et al., 2015).

Actualmente se está implementando medidas de control, con la iniciativa para la Eliminación de la Malaria en Mesoamérica. Además, gracias al Programa Nacional de Eliminación de la Malaria (PNEM) emitido desde el 2016-2020 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en conjunto con la Organización Panamericana de la Salud (OPS), se ha observado un control en el número de casos hasta la fecha (MINSa, 2018).

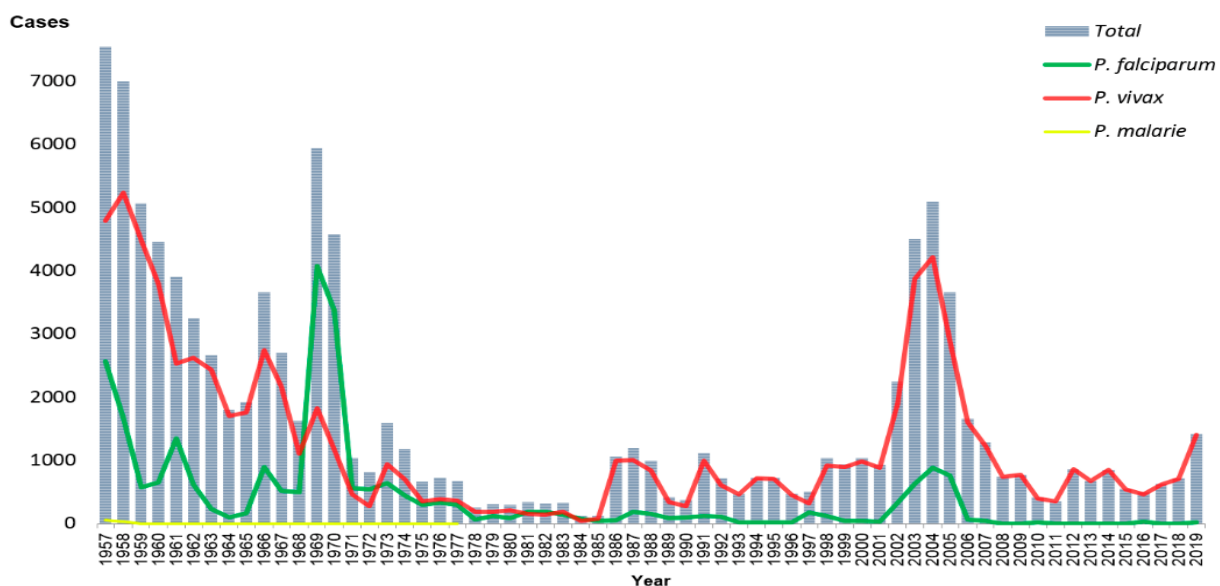


Figura 1: Casos de infección por especies de *Plasmodium sp.* en Panamá entre el año 1957 y 2019. Prevalencia de la infección por *P. vivax*, desde el año 1957 hasta la actualidad hubo un control de los casos de malaria seguido por un rebrote, los casos por *P. falciparum* se incrementaron desde el año 1968 a 1971, y posteriormente se volvió a controlar (Hurtado, et al., 2020).

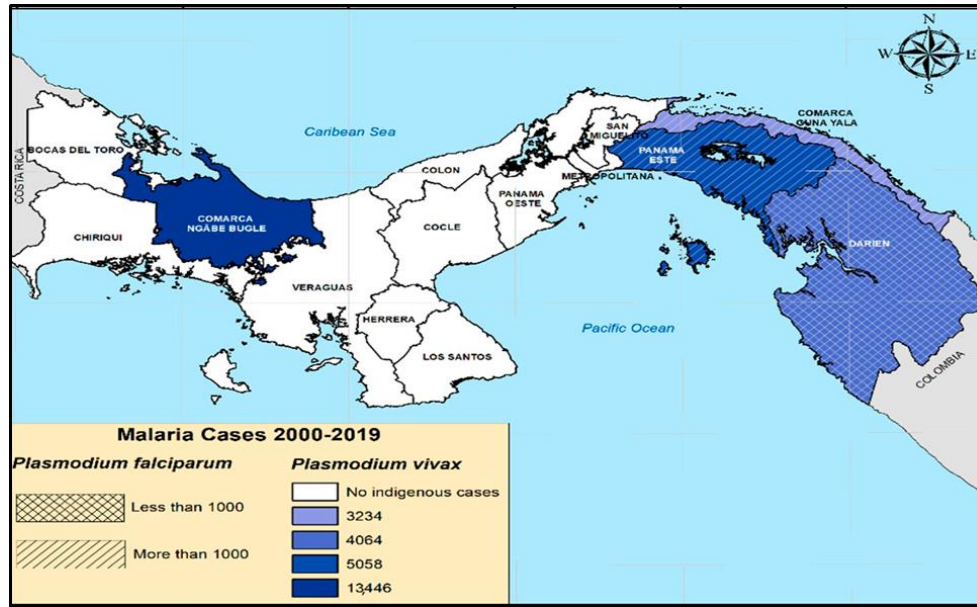


Figura 2: Mapa de las regiones con casos acumulados de malaria por *P. falciparum* y *P. vivax* en la República de Panamá entre 2000 y 2019 (Santamaría, et al., 2020).

2. Taxonomía

El filo Apicomplexa es el grupo de protistas más grandes y complejos, abarca aproximadamente 5,000 especies descritas. Son denominados así por presentar una estructura llamada complejo apical. Todos los miembros de este filo se consideran parásitos y muchas especies tienen importancia económica y médica, uno de los más importantes es el género palúdico *Plasmodium*, responsable de una elevada tasa de mortalidad en el mundo (Escalante & Ayala, 1995). Su taxonomía y filogenia ha sido un tema muy controvertido especialmente por su origen evolutivo (Escalante & Ayala, 1995; Garnham, 1966; Mattingly, 1965).

El Género *Plasmodium* dentro de los Apicomplexa pertenece a la clase Aconoidasida, orden Haemosporida y Familia Plasmodiidae. Dentro de los Haemosporida es el parásito más estudiado principalmente debido a infecciones de malaria en humanos. (Fecchio, Chagas, Bell, & Kirchgatter, 2020; Schoch, et al., 2020). Sin embargo, se cree que 250 especies de este género también son parásitos de otros mamíferos, aves y reptiles (Rossati, et al., 2016). Cincuenta y cinco especies de *Plasmodium* han sido identificadas en huéspedes aviarios, y estos utilizan como vector al menos 9 géneros de mosquitos (Culicidae), *Aedes*, *Anopheles*, *Armigeres*, *Coquillettidia*, *Culex*, *Culiseta*, *Lutzia*, *Mansonia* y *Wyeomyia* (Fecchio, Chagas, Bell, & Kirchgatter, 2020). Este grupo es digenético, es decir lleva a cabo la maduración de los gametos,

la fecundación y la esporogonia en el vector de invertebrados hematófagos; la otra parte de su ciclo se desarrolla en la sangre de un vertebrado (Escalante & Ayala, 1995). El parásito se diferencia de otros géneros por la presencia de merogonia (repetidas reproducciones asexuales del merozoíto en sus estadios sanguíneos), la merogonia se produce en los glóbulos rojos y forma la hemozoína, también conocida como pigmento palúdico. Su ciclo de vida incluye otras formas como trofozoítos, merontes, macro y microgametocitos. (Valkiunas, 2005).

3. Clasificación de *Plasmodium sp.*

- Reino: Protista
- Subreino: Protozoa
- Filo: Apicomplexa
- Clase: Aconoidasida
- Orden: Haemosporida
- Familia: Plasmodiidae
- Género: Plasmodium (Marchiafava & Celli, 1885)

4. Evolución de *Plasmodium falciparum* y *P. vivax*

La evolución de *Plasmodium* es de interés debido a su importancia sanitaria. Las dos especies más relevantes son *P. falciparum* y *P. vivax*, ya que son responsables en su mayoría de los casos de malaria. (OPS, 2021;WHO, 2021). Desde el 2004 en el Sudeste de Asia, especialmente en el Borneo de Malasia se observó infecciones a humanos por varias especies de *Plasmodium* parásitos de simios como *P. cynomolgi*, *P. simiovale*, *P. brasilianum*, *P. schwetzi*, *P. inui* y *P. knowlesi* causando malaria humana (Antinori, Galimberti, Milazzo, & Corbellino, 2012).

Estudios realizados en simios africanos revelaron datos sobre la evolución de *P. falciparum*, mencionando que tiene similitud con una especie descubierta recientemente la cual infecta a los gorilas, identificada como *P. praefalciparum* y proponiendo la hipótesis que *P. falciparum* descendió de su contraparte gorila evolucionando después del cambio de huésped de gorila a humano hace unos 10 mil años (Zerka, Kaczmarek, & Jaśkiewicz, 2015). Por otra parte un análisis filogenético realizado por Mu, et al, (2005) menciona que *P. vivax* el parásito de la malaria humana más extendido geográficamente, está genéticamente cercano con *Plasmodium*

simium causante de la malaria de primates, probablemente *P. vivax* se convirtió en un parásito humano a través de un cambio de huésped de macacos asiáticos.

5. Ciclo de Vida

El ciclo de vida de todas las especies de *Plasmodium* causante de la malaria humana se caracteriza por dos fases, la primera es la fase sexual exógena (llamada esporogonia) en la que se produce la multiplicación en varias especies de mosquitos *Anopheles* (Antinori, Galimberti, Milazzo, & Corbellino, 2012; Escalante & Ayala, 1995), y la segunda es la fase asexual endógena (llamada esquizogonia) que se lleva a cabo en el huésped vertebrado (Antinori, Galimberti, Milazzo, & Corbellino, 2012). Dentro del mosquito vector, los parásitos pueden llevar el desarrollo de los ooquistes en las glándulas salivales, la maduración de los ooquistes puede variar de 7-30 días, el periodo varía dependiendo de la especie de *Anopheles* y también está influenciado por la temperatura ambiental. El mosquito *Anopheles sp.* incluye 465 especies formalmente reconocidas, de las cuales 70 tienen la capacidad de transmitir *Plasmodium sp.* a los humanos y 41 se consideran vectores dominantes capaces de transmitir la malaria (Rossati, et al., 2016).

La fase asexual endógena empieza cuando la hembra del mosquito *Anopheles* se alimenta de la sangre de humanos, al mismo tiempo inocula los esporozoítos que es la forma infectiva del parásito atravesando el endotelio de los capilares de la piel e ingresando a la sangre. Estos esporozoítos migran por el torrente sanguíneo y llegan al hígado, donde atraviesan las células de Kupffer, e invaden un pequeño número de células hepáticas (Varo, Chaccour, & Bassat, 2020; Crompton, et al., 2014). *P. vivax* y *P. ovale* tienen la capacidad de permanecer en esta etapa por semanas, meses e incluso años, estas dos especies de parásitos en particular pueden mantenerse latentes en el hígado como hipnozoítos, y luego reactivarse continuando con el ciclo de vida y desarrollando recidivas (nuevos casos clínicos) (Costa, et al., 2011). En los hepatocitos el parásito se transforma en esquizonte y dentro de estas células lleva a cabo la replicación asexual formando el merozoma que contiene merozoítos, esto se denomina etapa preeritrocítica. Hasta esta etapa del ciclo de vida del parásito, las personas no manifiestan síntomas clínicos. El merozoma se rompe y los merozoítos se liberan en el torrente sanguíneo nuevamente, (Figura 3) (Varo, Chaccour, & Bassat, 2020; Milner, 2018; Crompton, et al., 2014).

La etapa eritrocítica comienza cuando los merozoítos intentan invadir glóbulos rojos (RBC) y multiplicarse asexualmente, a esta forma se le conoce como esquizonte eritrocitario, esta etapa de invasión de glóbulos rojos, replicación y lisis de eritrocitos puede durar 48 h (en *P. falciparum* y *P. vivax*) (Varo, Chaccour, & Bassat, 2020). Los merozoítos maduran a trofozoítos y esquizontes que a su vez liberan nuevos merozoítos que pueden infectar a otros eritrocitos, perpetuando el ciclo eritrocitario, los otros parásitos se diferencian sexualmente en microgametocitos o macrogametocitos, los mosquitos al alimentarse de la sangre de humanos se infectan con la forma sexual del parásito, la fase sexual del parásito se desarrolla en el intestino del mosquito.(Figura 3) (Varo, Chaccour, & Bassat, 2020; Gowda & Wu, 2018; Crompton, et al., 2014).

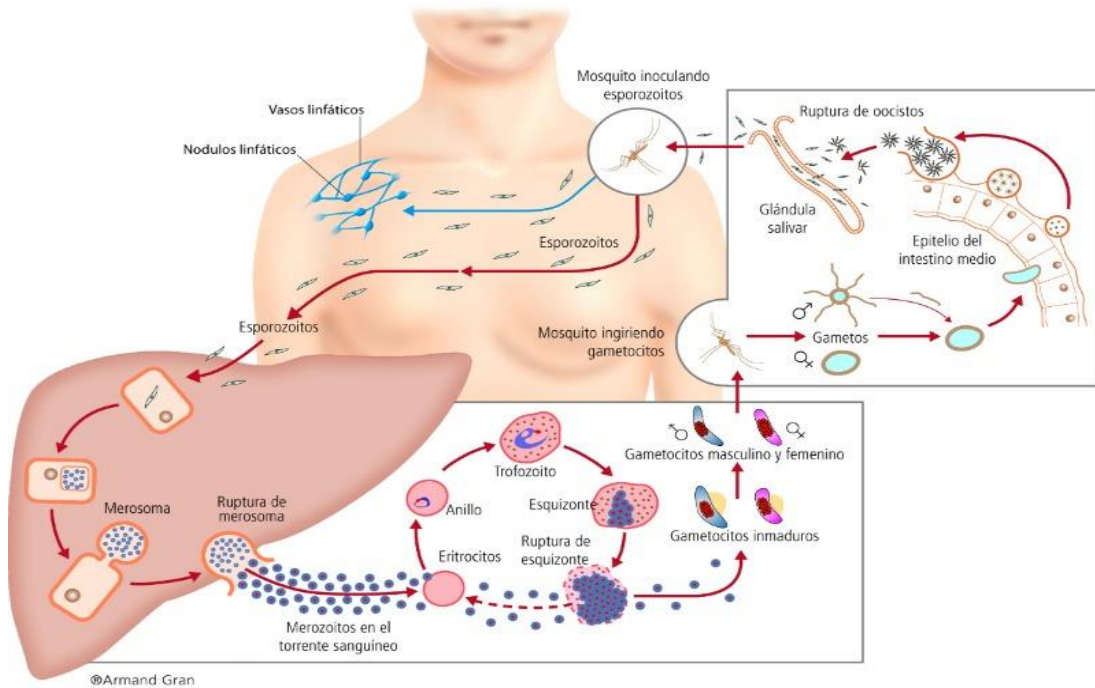


Figura 3. Ciclo sexual de Plasmodium sp. (AEP Asociación Española de Pediatría, 2022). El mosquito infectado con *Plasmodium* transmite el parásito mediante la picadura, los esporozoítos se dirigen a los hepatocitos (*P. vivax* tiene la capacidad de mantenerse latente en esta etapa como hipnozoíto durante mucho tiempo), el ciclo continúa para iniciar el proceso de infección en el hígado, donde se forman los merosomas que contienen los merozoítos, esto se denomina etapa pre-eritrocítica (aún no se presentan síntomas), los merozoítos se liberan en el torrente sanguíneo, donde infectan a los eritrocitos por parte de *P. falciparum*, y a los reticulocitos por parte de *P. vivax*. En estos glóbulos rojos el parásito se replica durante un período de 48 h, este proceso de infección en etapa sanguínea o etapa eritrocítica da lugar a los síntomas clínicos. En esta etapa sanguínea los parásitos pueden perpetuar el ciclo en el caso de *P. falciparum*, los otros parásitos se diferencian sexualmente en gametocitos masculinos o femeninos directamente, los mosquitos se infectan absorbiendo los parásitos y podrán completar la reproducción sexual en el intestino del vector, este ciclo termina con la migración de los esporozoítos a la glándula salival del mosquito (Varo, Chaccour, & Bassat, 2020; Gowda & Wu, 2018).

4. Patogénesis

La Malaria puede manifestarse como parasitemia asintomática, paludismo no complicado, paludismo grave y muerte (Milner, 2018). Al presentarse de manera sintomática puede incluir diferentes manifestaciones desde leves como fiebre, escalofríos, dolor de cabeza, náuseas, vómitos, mialgia, artralgia e ictericia. Hasta condiciones fatales en la malaria severa, Anemia severa y la malaria cerebral que puede conducir al coma (Plewes, Leopold, Kingston, & Dondorp, 2019). En ocasiones estas condiciones pueden variar entre personas, por la interacción de la biología del parásito con la respuesta fisiopatológica humana. Los síntomas que una persona puede presentar están relacionados con niveles elevados de citocinas. Tanto los determinantes del parásito como la respuesta inmunitaria excesiva del huésped contribuyen a la aparición y el resultado de la malaria grave y cerebral (Milner, 2018). Las variaciones que ocurren entre pacientes puede deberse a la diversidad genética del parásito que expresan proteínas clave, coinfecciones, comorbilidades, retrasos en el tratamiento, polimorfismos humanos y determinantes ambientales. Las citocinas representan mediadores clave en la patogenia de la malaria ayudando en el control del parásito (Popa & Popa, 2021).

La razón probable de que *P. falciparum*, sea el causante de las muertes por malaria casi en su totalidad se debe a que es capaz de invadir glóbulos rojos de cualquier edad y causar múltiples infecciones en un solo glóbulo rojo. Modifica la superficie de estos y crea un fenotipo adhesivo, este estado citoadherente (“célula pegajosa”), se logra mediante la proteína 1 de la membrana de los eritrocitos infectados con *P. falciparum* (PfEMP1), que es el producto de la transcripción del gen *var* (Varo, Chaccour, & Bassat, 2020; Crompton, et al., 2014). Esto permite la unión de los eritrocitos infectados, a los receptores del huésped expresados en el endotelio que recubre los capilares del huésped, plaquetas o glóbulos rojos no infectados formando rosetas (eritrocitos parasitados unidos a uno o más glóbulos rojos no infectados) (Milner, 2018). Con el secuestro de glóbulos rojos el parásito se despeja de la circulación durante casi la mitad del ciclo de vida asexual, un periodo de tiempo único entre los parásitos de la malaria. Provocando una mayor virulencia y una multiplicación más rápida (Varo, Chaccour, & Bassat, 2020; Milner, 2018). Se ha demostrado que la disfunción endotelial, la elevada biomasa parasitaria, los fenómenos de secuestro de glóbulos rojos y la inflamación también inciden en la patogenia de la malaria severa (Varo, Chaccour, & Bassat, 2020). El parásito *P. vivax* presenta un antígeno *Duffy* que juega un papel preponderante en la invasión. Particularmente esta especie tiene preferencia por los

reticulocitos (glóbulos rojos inmaduros), lo que conduce a presentar síntomas menos agresivos con un nivel más bajo de parasitemia en comparación con *P. falciparum*. Las personas infectadas pueden no mostrar síntomas durante semanas, meses o años por las formas inactivas que son los hipnozoítos (Klei, et al., 2019; Milner, 2018).

7. Inmunidad

Las respuestas inmunitarias desempeñan un papel fundamental en la defensa del huésped contra las infecciones del patógeno presente. La regulación de este mecanismo es bastante compleja (Stevenson & Riley, 2004). Se presenta en dos partes: el sistema inmunitario innato que concede una respuesta temprana e inespecífica, y el sistema inmunitario adaptativo que puede ser la inmunidad la humoral y la inmunidad celular. Este último sistema de defensa es específico para distintas moléculas. (Pohl & Cockburn, 2022; Gbedande, Carpio, & Stephens, 2020). Además, tiene memoria para mejorar la respuesta al antígeno del patógeno. Este tipo de respuesta se da por proteínas de defensas llamadas citocinas que son producidas por las células del sistema innato, pueden modificar e influenciar la regulación del desarrollo de la inmunidad adaptativa. Estos procesos involucran algunas células y proteínas de defensas, que interaccionan entre sí (Gowda & Wu, 2018; Toche, 2012; Stevenson & Riley, 2004).

Los procesos del sistema inmunológico ante el paludismo se han estudiado en ratones como modelos de animales (Wykes & Good, 2009) y también en humanos de todas las edades infectados con *Plasmodium* procedentes de áreas endémicas con el fin de dilucidar los mecanismos de acción en las respuestas inmunológicas innatas y adaptativas en la etapas del ciclo de vida del parásito (Tran, et al., 2013).

7.1 Inmunidad Innata

La inmunidad innata es el primer mecanismo de defensa que se activa para proteger al huésped del patógeno, utiliza componentes como como epitelios, enzimas; células NK (natural killer), sistema del complemento; receptores tipo Toll; citocinas; neutrófilos y macrófagos que fagocitan las células infectadas con el parásito (Toche, 2012).

La activación del sistema inmunitario innato desempeña su función para la protección del huésped induciendo las respuestas proinflamatorias que producen tormentas de citocinas para posteriormente potenciar la inmunidad y eliminar el parásito *Plasmodium* (Pohl & Cockburn, 2022). Esto se produce mediante la activación de la inmunidad humoral, mediada por células adecuadas. Las respuestas proinflamatorias elevadas durante un periodo extenso debido a una programación celular inadecuada contribuyen con el desarrollo de la patogenicidad (Pohl & Cockburn, 2022; Gowda & Wu, 2018). La respuesta inmune innata hacia la infección por *Plasmodium* inicia en la piel y luego en el hígado, cuando varios receptores detectan los esporozoítos, posteriormente sigue en la sangre al detectar los glóbulos rojos infectados con merozoítos procedentes del hígado, incitando la activación de las vías de señalización y la producción de citocinas y quimiocinas (Gowda & Wu, 2018).

7.1.1 Respuesta inmune innata en el Hígado durante la infección por *Plasmodium*

El parásito ingresa por la piel con la picadura del mosquito y posteriormente llega al hígado de manera silenciosa, es decir sin la activación robusta de la respuesta innata, la cual está inducida por anticuerpos, células T CD4+ y CD8+ que responden a los esporozoítos en los individuos infectados por *Plasmodium* (Offeddu, Thathy, Marsh, & Matuschewski, 2012). Las respuestas inmunitarias innatas bajas o ineficientes probablemente se deban a la baja carga parasitaria detectada en el hígado (Pohl & Cockburn, 2022; Gowda & Wu, 2018). De esta manera el parásito puede eludir los mecanismos inmunitarios de la piel (Honda, Miyachi, & Kabashima, 2011) y el hígado (Crispe, 2009). No obstante, en la dermis las células T reguladoras (Tregs) del sistema inmunitario innato se activan durante la infección, para eliminar aquellos esporozoítos que no pudieron entrar en la circulación sanguínea (Pohl & Cockburn, 2022; Gowda & Wu, 2018; Guilbride, Gawlinski, & Guilbride, 2010). Es probable que estos esporozoítos fallidos colaboren en el desempeño del sistema inmunitario innato y sean una fuente de antígeno para las células T y B (Pohl & Cockburn, 2022). Las células dendríticas (CD) y las células (Tregs) median esta interacción por un período de 30 minutos después de la inoculación de esporozoítos, y regulan la baja del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II) y CD86 (da Silva, et al., 2012).

Cuando los esporozoítos llegan al hígado, los hepatocitos infectados por parásitos producen IFN tipo I, esta citocina colabora con las células T asesinas naturales (NKT) en la destrucción de los hepatocitos infectados por parásitos, exhibiendo los componentes del parásito (antígenos), los cuales son reconocidos por las células presentadoras de antígenos, principalmente CD y macrófagos inflamatorios. Por otra parte aquellos esporozoítos que ingresaron al torrente sanguíneo y no pudieron invadir los hepatocitos mueren y también son detectados por CD y macrófagos inflamatorios, provocando las respuestas inmunitarias mediadas por receptores de tipo Toll (TLR) e inflamomas. Luego de que las células presentadoras de antígeno reconocen los antígenos, pueden modular las respuestas inmunitarias a la infección en la etapa sanguínea (Gowda & Wu, 2018). Además la interrupción mediada por esporozoítos que causa el daño de las células de Kupffer en el hígado es un tipo de mecanismo específico del parásito y puede desactivar las defensas inmunitarias innatas y la inmunidad preeritrocítica (Usynin, Klotz, & Frevert, 2007).

Se ha observado que en áreas endémicas las continuas infecciones en un mismo individuo pueden activar la tolerancia inmunológica en las células presentadoras de antígenos y de esta manera modular la inmunidad a la infección en la etapa sanguínea (Gowda & Wu, 2018).

7.1.2 Respuesta inmune innata en la sangre durante infección por *Plasmodium*

Durante la etapa sanguínea del ciclo de vida de *Plasmodium*, se multiplica la carga parasitaria mediante ciclos eritrocíticos repetitivos. Mientras la carga parasitaria es elevada, la respuesta innata es alta (Gowda & Wu, 2018). Se activan dos procesos inmunológicos: la inflamación y su regulación, y la respuesta de anticuerpos. Estos dos procesos juegan un papel importante en el control de los parásitos y también están relacionados con la patogenicidad (Collins & Jeffery, 1999).

La respuesta innata involucra las moléculas de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) que comprenden un grupo de proteínas de *P. falciparum*, que dan inicio a la inflamación a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) expresados por las células inmunitarias. Estos PRR pueden ser receptores de tipo Toll (TLR) y CD36, o citocinas inflamatorias como el interferón- γ (IFN- γ) que reconocen los ligandos del parásito. La activación del sistema inmune innato en la etapa sanguínea inicia con las CD y los macrófagos

inflamatorios. Este último contribuye a regular el crecimiento del parásito fagocitándolo. Y solo los subconjuntos del macrófago inflamatorio que tienen ciertas características de CD, son capaces de producir citocinas. Las CD secretan las citocinas y quimiocinas que participan próximo a la respuesta de defensa a los parásitos de la malaria, además interactúan con las células del sistema inmunitario innato y adaptativo (Gowda & Wu, 2018). Las CD maduran y migran al bazo que es el sitio principal de las respuestas inmunitarias contra los parásitos *Plasmodium* en estadio sanguíneo. En la maduración de las CD están involucradas las moléculas de adhesión, la regulación positiva de la expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II, CD40, CD80, CD86 y la producción de citocinas, como la interleucina-12 (IL-12). Todo empieza cuando la IL-12 activa las células (NK) para producir IFN- γ e inducir la diferenciación de células T helper 1 (TH1). Las células TH1 específicas de antígeno producen IL-2 y activan aún más las células NK que producen IFN, el cual mejora el efecto de los estímulos de maduración derivados del parásito, lo que facilita la expansión clonal de células T CD4⁺ vírgenes específicas de antígeno. Y activa los macrófagos, potenciando la respuesta inmunitaria adaptativa (Stevenson & Riley, 2004), (Figura 4). Las CD también promueven la inflamación a través de interacciones específicas con los siguientes receptores del huésped: hemozoína (inflamasa NLRP3) (Shio, et al., 2009), motivos de ADN que contienen CpG unidos a hemozoína (TLR9) (Parroche, et al., 2007), motivos de ADN ricos en AT (receptor citosólico no identificado) (Sharma, et al., 2011), anclajes GPI (TLR2) (Krishnegowda, et al., 2005). El parásito induce fiebre y otros signos y síntomas de malaria (Collins & Jeffery, 1999), estos procesos están incitados por la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias (Esche, Stellato, & Beck, 2005). Waisberg et al (2012) realizaron un estudio utilizando *P. falciparum* y demostraron que la proteína de superficie 1 de merozoíto (MSP1), se separa de la superficie del merozoíto y bloquea la proteína proinflamatoria S100P. Involucrada en la respuesta inflamatoria del huésped. Los cambios y la gravedad de la enfermedad dependen de los polimorfismos en estas y otras proteínas (Crompton, et al., 2014).

7.2 Inmunidad Adaptativa

El sistema inmune adquirido aprovecha los mecanismos efectores de la inmunidad innata para eliminar los microorganismos, los principales elementos que utiliza son las células B y T, que se activan una vez entren en contacto con los antígenos del parásito (Toche, 2012).

En la inmunidad celular los linfocitos T CD4+ (helper) responden al diferenciarse en dos grupos: TH1 y TH2. Este último se diferencia en presencia de IL 4. Y los TH1 se diferencia ante el estímulo por el parásito y en presencia de interleucina 12 (IL12) (Toche, 2012). Las respuestas inmunes celulares controlan la parasitemia durante la primera fase del ciclo del parásito; en la segunda fase la inmunidad humoral de los centros germinales dependientes de células T permiten la eliminación del parásito (Gbedande, Carpio, & Stephens, 2020).

A pesar de todas las interacciones que se lleva a cabo durante la respuesta adaptativa, un estudio realizado por Tran et al (2013) en humanos infectados con *P. falciparum* procedentes de áreas endémicas revela que no hay evidencia convincente de inmunidad adquirida naturalmente capaz de neutralizar completamente el parásito en las primeras etapas que incluye la infección de la piel o el hígado (Stevenson & Riley, 2004).

Varios estudios realizados en poblaciones endémicas que comparan la inmunidad adquirida naturalmente de personas infectadas por *P. vivax* y por *P. falciparum*, indican que la personas infectadas por *P. vivax* adquieren inmunidad más rápido a los antígenos de estadio preeritrocíticos y los del estadio sanguíneo, para los cuales participan la inmunidad humoral y celular, y participan varios antígenos de merozoítos de *P. vivax* como la proteína de unión *Duffy* de *P. vivax* (PvDBP), las proteínas de unión de reticulocitos *Pv* (PvRBP), las proteínas de superficie de merozoíto *Pv* (PvMSP1, 3 y 9) o la proteína circunsporozoito (PvCSP) (Mueller, et al., 2013). Se ha observado que aquellos pacientes con malaria grave por *P. falciparum* activan un conjunto potente de células T reguladoras que aumenta en cantidad y en la función supresora con otros inmunorreguladores (Mueller, et al., 2013).

7.2.1 Respuesta humoral y Celular

La inmunidad humoral está mediada por anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) secretados por los linfocitos B (Toche, 2012).

En estudios realizados en humanos de todas las edades infectados con *Plasmodium* en zonas de alta transmisión observaron un retraso en el desarrollo de las células B de memoria específicas para *P. falciparum* pese a las reiteradas infecciones, esto probablemente se deba a que las respuestas inflamatorias que contribuyen a los episodios clínicos podrían tener un efecto perjudicial en estas células que son necesarias para el control efectivo de la multiplicación del parásito en estadio sanguíneo (Healer, Chiu, & Hansen, 2017; Ryg-Cornejo, Ly, & Hansen, 2016). En contraste con adultos residentes en áreas de baja transmisión, los cuales parecen generar células B de memoria específica para antígenos palúdicos que son estables por un periodo mucho más prolongado. Las células B cuando presentan defectos en la inducción de la memoria inmunológica, actúan en la respuesta humoral comprometida a la infección (Healer, Chiu, & Hansen, 2017). De acuerdo con estos hallazgos sugirieron que el desarrollo de la inmunidad adquirida naturalmente depende de la edad por ende la inmunidad a la malaria es más eficiente en las personas mayores. Los anticuerpos específicos contra *P. falciparum* analizados en los voluntarios demostraron que están presente en un lapso corto de tiempo, además de ser ineficientes en niños (Healer, Chiu, & Hansen, 2017).

En otros estudios las células T auxiliares foliculares (TFH) similares a T auxiliares (TH)1 con una función auxiliar de células B alteradas, actuaban en niños con malaria aguda (Obeng-Adjei, et al., 2015). Sin embargo, las citocinas inflamatorias que están involucradas en el desarrollo de la infección grave por paludismo también inhiben la diferenciación de las células TFH que son fundamentales para la inducción de una inmunidad humoral duradera (Ryg-Cornejo, Ly, & Hansen, 2016)

Los anticuerpos específicos de antígeno tienen un papel fundamental en el desarrollo de la inmunidad adquirida de forma natural, investigaciones previas resaltan que el aumento de los niveles de anticuerpos están asociados con resultados clínicos protectores contra los merozoítos, al llevar a cabo diferentes mecanismos efectores como la opsonización de los merozoítos mediada por los anticuerpos citofílicos; que incitan la lisis por las células blancas y el complemento; la inhibición de la invasión y replicación de los merozoítos en los glóbulos rojos, la fagocitosis de merozoítos opsonizados con IgG; producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) u óxido nítrico (NO) en respuesta a parásitos opsonizados e inhibición celular

dependiente de anticuerpos (ADCI) desencadenada por merozoítos opsonizados con IgG (Healer, Chiu, & Hansen, 2017).

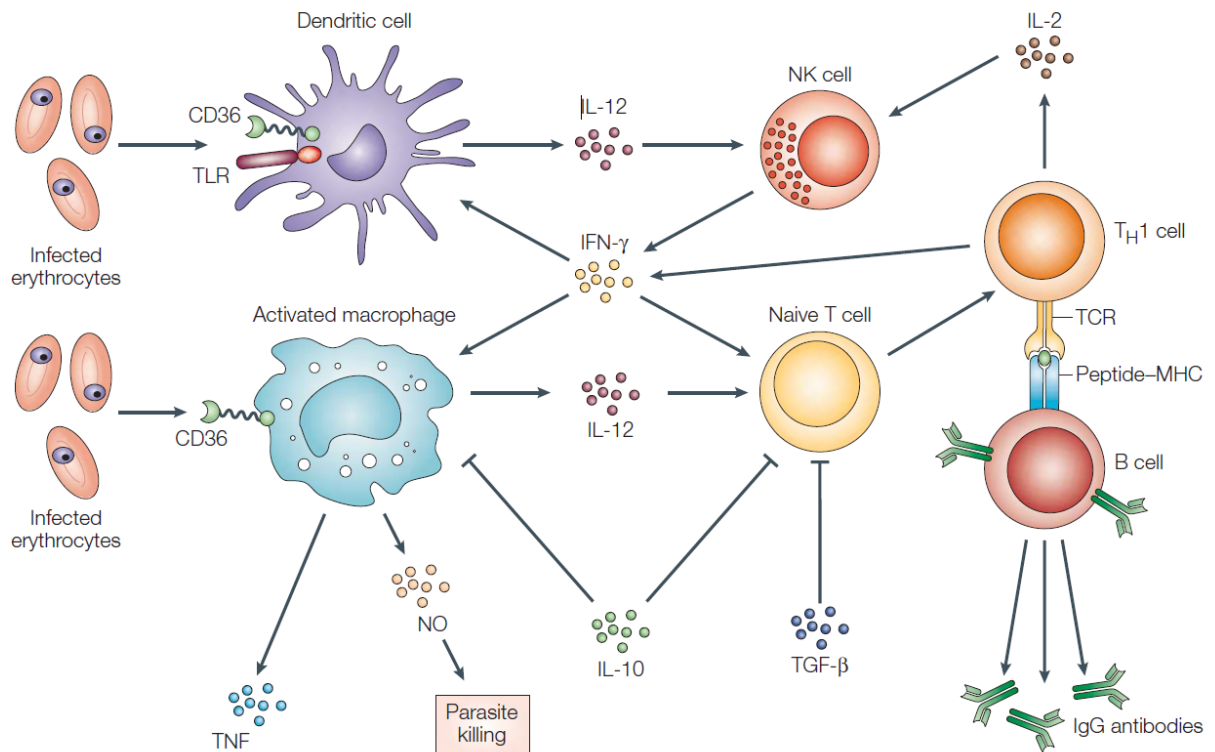


Figura 4. Vinculación de la inmunidad innata y adaptativa con la malaria en etapa sanguínea. La activación de la inmunidad innata comienza cuando las células dendríticas (CD) maduran en respuesta a los ligandos del parásito que son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), como los receptores tipo Toll (TLR) y CD36, o las citocinas inflamatorias, como el interferón- γ (IFN- γ), posterior a la maduración las CD migran al bazo, este órgano es el sitio primordial de las respuestas inmunitarias contra los parásitos *Plasmodium* en estadio sanguíneo. Las CD maduran por la regulación positiva de la expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II), CD40, CD80, CD86, las moléculas de adhesión y la liberación de citocina como la interleucina-12 (IL-12), que también está implicada en la activación de las células asesinas naturales (NK) para producir IFN- γ e inducir la diferenciación de células T helper 1 (TH1). El IFN- γ secretado de las células NK también está vinculado a la maduración de las CD y mejora el efecto de los estímulos de maduración derivados del parásito, lo que facilita la expansión clonal de células T CD4⁺ vírgenes específicas de antígeno. La IL-2 producida por células TH1 específicas de antígeno potencia la activación de las células NK para producir IFN- γ y activar a los macrófagos que para producen óxido nítrico (NO); factor de necrosis tumoral (TNF) expandiendo la respuesta inmunitaria adaptativa. La inmunidad innata y adaptativa se regulan negativamente con IL-10 y el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) (Stevenson & Riley, 2004).

8. Mecanismo de acción de las citocinas y quimiocinas en la infección por *Plasmodium sp.*

Las citocinas son un grupo de pequeñas proteínas, que incluyen a las interleucinas (IL), los factores de necrosis tumoral (TNF), los interferones (IFN), los factores estimulantes de colonias (CSF) y las quimiocinas (Filellaa, Molinaa, & Ballestaa, 2002). Se originan de diferentes tipos de células, actúan mediando interacciones complejas regulando la función de las células que las producen y de otras células, interaccionan con los receptores de membrana específicos de la célula en la que ejercen su función, para conducir la respuesta inflamatoria, desatando una cascada de reacciones bioquímicas. (Filellaa, Molinaa, & Ballestaa, 2002; Popa & Popa, 2021). Las citocinas inflamatorias tienen un doble papel en la regulación de la infección, contribuyen a la eliminación del parásito, pero también son responsables de los cambios patológicos encontrados en la malaria, (Cuadro 1) (Popa & Popa, 2021).

Las quimiocinas son un tipo de citocinas producidas por células en respuesta a estímulos irritantes, presentan una homología entre el 20 y el 50% en su secuencia de aminoácidos. Tienen función en las respuestas inflamatorias y la quimiotaxis de fagocitos (Filellaa, Molinaa, & Ballestaa, 2002). Además, contribuyen en el reclutamiento de macrófagos y otras células de defensa para la eliminación del parásito. El incremento del nivel de las quimiocinas se ha visto expresado predominantemente en la malaria aguda (Dobbs, Crabtree, & Dent, 2020).

Las células Th1 producen las citocinas proinflamatorias como la interleucinas (IL) 1, 1 β , 2, 6, 7, 8, 12(p70), IFN- γ y TNF expresadas durante la malaria (Dobbs, Crabtree, & Dent, 2020; Barros de Oliveira, et al., 2011). Se ha demostrado que la IL-12 y el IFN- γ pueden limitar la progresión de la malaria (Barros de Oliveira, et al., 2011). Inhiben la multiplicación del parásito y estimulan la fagocitosis de los monocitos para mejorar la eliminación de los eritrocitos parasitados (Dobbs, Crabtree, & Dent, 2020). Las células Th17 también producen otras citocinas proinflamatorias como la IL-17 y la IL-22, que de igual manera están involucradas en la respuesta inmunitaria frente a *Plasmodium*, y colaboran en el reclutamiento de neutrófilos y la inducción de la secreción de varias citocinas proinflamatorias (Oyegue-Liabagui, et al., 2017). Estos hallazgos se demostraron en un estudio realizado por Bueno y colaboradores (2012) en el que incluía pacientes con malaria infectados por *P. vivax*.

Las citocinas antiinflamatorias reducen la inflamación y promueven la curación (Dinarello, 2000). Son producidas por las células Th2, unas de las citocinas antiinflamatorias secretadas son la IL-4, IL10, IL-13 y TGF β (factor transformador de crecimiento β) (Wang, et al., 2014; Riley, Wahl, Perkins, & Schofield, 2006) La IL-4 y la IL-13, regulan la respuesta inmunitaria humoral, están implicadas en a la eliminación del parásito inhibiendo la producción de citocinas Th1 (Riley, Wahl, Perkins, & Schofield, 2006)

Los niveles muy elevados de citocinas inflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, y TNF- α están relacionados con la malaria grave, estos hallazgos se reportaron en el 2004 en una investigación realizada por Lyke y otros. La citocina antiinflamatoria, especialmente IL-10, puede contribuir a la gravedad de la malaria, al inhibir la producción de INF- γ (Oyegue-Liabagui, et al., 2017).

El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), es producido por monocitos, células endoteliales y células epiteliales. Su función general es la intervención en la hematopoyesis incitando específicamente la formación de colonias de granulocitos (basófilos, neutrófilos y eosinófilos) (Filellaa, Molinaa, & Ballestaa, 2002). Estimula principalmente la producción de los neutrófilos para combatir las infecciones (Stoiser, et al., 2000). Se ha observado que concentraciones elevadas de esta citocina proinflamatoria durante la malaria por *P. vivax* y *P. falciparum* aumenta la función fagocítica incluyendo la fagocitosis de trombocitos, relacionándose con la trombocitopenia (recuento de plaquetas demasiado bajo) (Prasasty, Leni, Anwar, & Handayani, 2018; Rodrigues, et al., 2014).

IFN- γ es una citocina proinflamatoria fundamental en las respuestas inmunitarias innata y adaptativas tanto en la etapa preeritrocítica como en la etapa sanguínea del ciclo del parásito durante la infección por paludismo (Figura 5) (Popa & Popa, 2021; McCall & Sauerwein, 2010). Presenta función reguladora y protectora como la fagocitosis mejorada de merozoítos y pRBC, aumento en la producción de especies reactivas de nitrógeno (iNOS) por parte de células hepáticas contra el parásito, inhibición de la infectividad de los gametocitos a los mosquitos, regulación positiva de la expresión de MHC de clase I y II, inducción mejorada de respuestas de memoria celular, aumento de la relación Th1/Th2 entre las células T. Además induce múltiples vías celulares para una amplia respuesta inmunitaria (McCall & Sauerwein, 2010).

El TNF- α , es una citocina pro-inflamatoria producida principalmente por monocitos, macrófagos y linfocitos T (Barros de Oliveira, et al., 2011). Se secretan cuando los eritrocitos parasitados inducen a las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de los pacientes infectados además de la producción de otras citocinas como IL-12 e IFN- γ (Stevenson & Riley, 2004). El TNF-a, solo o en conjunto con la IL-1 e IL-3 puede contribuir en la respuesta inmunitaria del sistema nervioso central (SNC) al incitar la liberación de otras citocinas, especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO) (Medana, Hunt, & Chaudhri, 1997). Una de sus funciones en equipo es inducir las células fagocitarias para la eliminación del parásito (Oyegue-Liabagui, et al., 2017). Y junto con otras citocinas inflamatorias con niveles muy elevados pueden contribuir a la progresión de la enfermedad (Dobbs, Crabtree, & Dent, 2020). Sin embargo por sí solo no es suficiente para la influir en las complicaciones severas de la malaria humana (Medana, Hunt, & Chaudhri, 1997).

La (IL-2) es una citocina proinflamatoria, producida principalmente por linfocitos T activados, una de sus funciones es promover la proliferación de células T y B (Barros de Oliveira, et al., 2011; Filellaa, Molinaa, & Ballestaa, 2002). Además, de impulsar la producción de otras citocinas como el IFN- γ . De esta manera se activan los monocitos, neutrófilos y células NK, implicadas en las respuestas inmunológicas específicas del antígeno del parásito (Barros de Oliveira, et al., 2011). La IL-2 también está involucrada en la regulación del equilibrio de las células Treg, y las células T CD4, para la eliminación de la infección por *Plasmodium* durante la etapa sanguínea de la malaria (Berretta, St-Pierre, Piccirillo, & Stevenson, 2011).

La (IL-5) forma parte de las citocinas expresadas en las respuestas antiinflamatorias, es producida por los linfocitos T activados y una de sus funciones principales es la regulación de la eosinofilia durante la infección por *Plasmodium*, también provoca la activación, crecimiento y diferenciación de los linfocitos B (Filellaa, Molinaa, & Ballestaa, 2002). Luego de la infección las células linfoides innatas 2 (ILC2) producen la IL-5, que induce las células Th2 y ILC2 para la eliminación del parásito (Tran, et al., 2017).

La (IL-8) conocida como (CXCL8) es una quimiocina proinflamatoria que actúa inmediatamente en la inmunidad innata induciendo la NETosis (mecanismo que involucra a los neutrófilos para la destrucción de los parásitos extracelulares). De esta manera contribuye en el mecanismo de defensa ante la infecciones por *P. falciparum*. Esta y otras citocinas en

concentraciones elevadas están involucradas en la patogenia, específicamente la IL-8 puede considerarse como marcador de la malaria grave (Popa & Popa, 2021).

La IL-10 juega un papel muy importante en la inmunidad contra la malaria, es la principal citocina antiinflamatoria, que neutraliza la producción excesiva de citocinas Th1 inflamatorias, se produce principalmente en los linfocitos T de tipo Th2, al segregarse puede inhibir la síntesis de algunas citocinas como (IFN, IL-2) producidas tanto por los linfocitos T, como las citocinas (IL-1, IL-6 y TNF) producidas por macrófagos (Oyegue-Liabagui, et al., 2017; Filellaa, Molinaa, & Ballestaa, 2002; Singh, et al., 2002). Los altos niveles de la IL-10 están relacionados con el aumento de la parasitemia. *P. falciparum* estimula la producción de IL-10 dependientemente de la carga parasitaria (Oyegue-Liabagui, et al., 2017). Keller y colaboradores (2006) sugirieron que la captación de la hemozoína (PfHz) por parte de los monocitos en la infección por *P. falciparum*, está asociado a una mayor producción de IL-10 y TNF- α . Además, el aumento exagerado de esta citocina y la regulación negativa que pueda ejercer también está vinculado a la gravedad de la malaria (Mahittikorn, et al., 2022).

La IL-17A (CTLA-8) es una citocina proinflamatoria originalmente conocida como CTLA8, está incluida dentro de la familia de interleucinas 17 (IL-17), la cual está constituida por glucoproteínas estructuralmente similares (IL-17A-F) (McGeachy, Cua, & Gaffen, 2019). Y producida principalmente por linfocitos-T-CD4 (Barros de Oliveira, et al., 2011). Una de sus funciones es inducir las siguientes quimiocinas CXCL1, CXCL2 y CXCL8 (IL-8), para dar una respuesta inflamatoria innata en presencia del parásito, incitando la llegada de los neutrófilos, al tejido infectado, regulando positivamente la segregación de citocinas inflamatorias. También interacciona con células no hematopoyéticas para inducir una respuesta inmune aguda similar a las respuestas innatas (Onishi & Gaffen, 2010). Además, la IL-17 induce otras citocinas como IL-6 y G-CSF, para promover la inflamación innata impulsada por mieloides (Gaffen, Jain, Garg, & Cua, 2014). La IL-17A, es fundamental para el mantenimiento de los macrófagos esplénicos, induce el reclutamiento de más macrófagos como mecanismo de protección contra la malaria (Ishida, et al., 2013). También, se ha observado que tiene potencial junto con la IL-22 e IL-23 en el control de la parasitemia por *Plasmodium vivax* y evita la manifestación grave de la malaria (Megnekou, Lissom, Bigoga, & Djontu, 2015).

La proteína quimiotáctica de monocitos 1, MCP-1 (CCL2) es una quimiocina producida principalmente por macrófagos (Sexton, et al., 2004), durante la malaria tiene un papel fundamental como quimioatrayente de monocitos (Ioannidis, Nie, & Hansen, 2014). También está involucrada en el mecanismo de protección, ya que al ser inducida por la IL-17, esta quimiocina comienza el reclutamiento de macrófagos (Ishida, et al., 2013). Los eritrocitos infectados por *P. falciparum* inducen a las células endoteliales la producción de esta citocina. Se ha observado en estudios realizados en ratones con malaria cerebral que esta citocina aumenta en respuesta a la infección por *Plasmodium* (Ioannidis, Nie, & Hansen, 2014).

La proteína inflamatoria de macrófagos 1 α (MIP-1 α), inicialmente conocida como (CCL3), es una quimiocina proinflamatoria y quimiotáctica especialmente en neutrófilos que actúa en la respuesta inmune durante la inflamación aguda y crónica de la infección palúdica. (Ren, et al., 2010; Burgmann, et al., 1995). Induce la síntesis y liberación de otras citocinas proinflamatorias (Ali, Palmer, Banerjee, Fritchley, & Kirby, 2000). En la malaria aguda (MIP-1 α) en conjunto con otras quimiocinas como (MIP-1 β /CCL4, IL-8/CXCL8 y CCL5), se expresan con niveles elevados (Dobbs, Crabtree, & Dent, 2020). También puede inhibir la proliferación de células madres hematopoyéticas en personas infectadas con *P. falciparum* que presentan anemia prolongada (Burgmann, et al., 1995).

EOTAXIN (CCL11), quimiocina inflamatoria 11 con motivo cc, nombrada también eotaxina. Al igual que otras quimiocinas proinflamatorias se expresa en la infección por *Plasmodium*. Durante las respuestas inmunitarias tiene como función principal el reclutamiento de eosinófilos, y de linfocitos B al tejido infectado por el parásito *P. vivax* y *P. falciparum* (Requena, et al., 2014).

Monocina inducida por interferón gamma (MIG), conocida también como CXCL9, es una quimiocina expresada por la inducción de citocinas proinflamatorias como IFN- γ o TNF, para actuar en respuesta a la infección por *Plasmodium*, tiene un efecto quimioatrayente en los linfocitos T, estos datos se han observado en modelos de ratones, indicando que sus niveles elevados están correlacionado con la densidad del parásito y con la gravedad de la malaria CM (Ioannidis, Nie, & Hansen, 2014).

La proteína 10, (IP-10) también nombrada como CXCL10, es una quimiocina proinflamatoria, que se expresa principalmente por monocitos en respuesta a la presencia de *P. falciparum*,

aunque también puede ser expresada por otras células como neutrófilos, eosinófilos y células dendríticas inducidas por IFN- γ . Estudios han mencionado que está vinculada con el desarrollo y la gravedad de la malaria cerebral, ya que se libera en individuos con paludismo severo, a diferencia de los pacientes con paludismo agudo (Dobbs, Crabtree, & Dent, 2020; Majumder, Bhattacharjee, Chowdhury, & Majumdar, 2012).

El factor 1 derivado de células del estroma alpha (SDF-1 α), también conocido como quimiocina 12 con motivo C-X-C (CXCL12), es un intermediario proinflamatorio crucial de las respuestas inmunitarias y hematopoyéticas. En la malaria humana esta proteína protege a los pacientes contra la infección por *P. falciparum* modulando el ciclo eritrocítico del parásito (Otieno, 2010). Además se eleva en el paludismo cerebral y en la anemia de leve a moderada (Karin, 2010). En un estudio realizado por Ramos y colaboradores (2002), utilizando ratones con paludismo para observar el comportamiento de SDF-1 α indican que las secuencias de esta proteína están genéticamente conservadas entre ratones y humanos, y que esta quimiocina, se produce principalmente en el bazo en el momento ascendente de la parasitemia en la malaria no letal, para inducir a las células de defensa a la activación de la inmunidad protectora y controlar la parasitemia. SDF-1 α amplifica la respuesta de la inmunidad celular especialmente de los linfocitos T y B (Ramos, Trindade, Santana, & Francode, 2002).

Cuadro 1. Mecanismo de acción de las citocinas y quimiocinas en la infección por *Plasmodium sp.*

Citocina	Actividad	Función	Referencias
G-CSF	Citocina Proinflamatoria	Estimula la producción de granulocitos, principalmente neutrófilos para combatir infecciones; induce la activación de células fagocíticas.	Prasasty, Leni, Anwar, & Handayani, 2018; Rodrigues, et al., 2014; Stoiser, et al., 2000.
IFN-γ	Citocina Proinflamatoria	Induce múltiples vías celulares para el control y eliminación del parásito.	McCall & Sauerwein, 2010.
TNF-α	Citocina Proinflamatoria	Induce la secreción de otras citocinas y acción de células fagocíticas para eliminar al parásito.	Oyegue-Liabagui, et al., 2017; Medana, Hunt, & Chaudhri, 1997.
IL-2	Citocina Proinflamatoria	Promueve la proliferación de células T y B; induce la proliferación de otras citocinas proinflamatorias.	Barros de Oliveira, et al., 2011.
IL-5	Citocina Antiinflamatoria	Regulación de la eosinofilia, induce células de defensa para eliminar al parásito.	Tran, et al., 2017; Filellaa, Molinaa, & Ballestaa, 2002.
IL-8	Quimiocina Proinflamatoria	Induce la NETosis en la inmunidad innata.	Popa & Popa, 2021.
IL-10	Citocina Antiinflamatoria	Regulación de citocinas proinflamatorias excesivas.	Oyegue-Liabagui, et al., 2017.
IL-17A	Citocina Proinflamatoria	Induce quimiocinas para la respuesta inmune innata; incita la llegada de neutrófilos a la zona infectada.	Onishi & Gaffen, 2010.
MCP1	Quimiocina Proinflamatoria	Quimioatrayente de monocitos y reclutamiento de macrófagos.	Ioannidis, Nie, & Hansen, 2014; Ishida, et al., 2013.
MIP-1 α	Quimiocina Proinflamatoria	Quimioatrayente de neutrófilos; induce la liberación otras citocinas proinflamatorias.	Ren, et al., 2010; Ali, Palmer, Banerjee, Fritchley, & Kirby, 2000.
Eotaxin-1	Quimiocina Proinflamatoria	Reclutamiento de eosinófilos y linfocitos B al tejido infectado.	Requena, et al., 2014.
MIG	Quimiocina Proinflamatoria	Quimioatrayente en los linfocitos T.	Ioannidis, Nie, & Hansen, 2014.
IP-10	Quimiocina Proinflamatoria	Quimioatrayente de monocitos, macrófagos y neutrófilos; marcador de anemia leve.	Jain, et al., 2010.
SDF-1 α	Quimiocina Proinflamatoria	Control del ciclo eritrocítico del parásito y protección del huésped; induce células de defensa a la activación de la inmunidad protectora.	Otieno, 2010; Ramos, Trindade, Santana, & Francode, 2002.

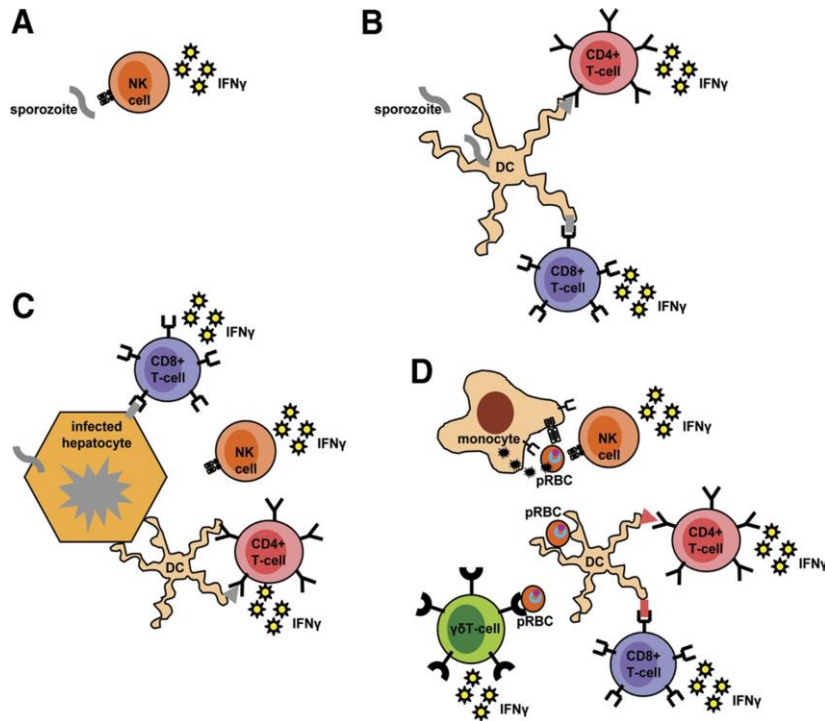


Figura 5. Inducción y producción de IFN- γ en defensa del huésped contra el parásito de la malaria. **A)** Las células NK reconocen los esporozoítos libres. **B)** Las CD que se encuentran en los ganglios linfáticos que drenan la piel absorben los esporozoítos al mismo tiempo las CD se unen y activan a las células T CD4⁺ y a las células T CD8⁺. **C)** Las células T CD8⁺ reconocen los hepatocitos infectados; las células T CD4⁺ responden al antígeno presentado por las células presentadoras de antígeno (APC) locales. Las células NK se activan de manera temporal. **D)** En la sangre o el bazo, las células T $\gamma\delta$ reconocen antígenos fosforilados por pRBC. Las APC (Los monocitos y/o células mieloides) reconocen ligandos de pRBC a través de PRR como hemozoína y/o ADN del parásito asociado a través de receptor tipo Toll 9 (TLR-9). Las CD4⁺ y CD8⁺ reconocen de forma cruzada los antígenos pRBC presentados por las CD, MHC-II y MHC-I respectivamente. Las células NK reconocen pRBC directamente, pero requieren la cooperación de APC y probablemente de células T para una activación completa.

CAPÍTULO II: METODOLOGÍA

1. Consideraciones éticas

Este estudio se llevó a cabo en el Bioterio de primates no humanos y en los laboratorios de malaria del Departamento de Parasitología del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES). Los experimentos que involucraron primates no humanos fueron revisados y aprobados por el Comité Institucional para el Buen Uso y Cuidado de los Animales de Laboratorios (CIUCAL-ICGES) y por el comité de bioética del mismo instituto de investigación (CBI-ICGES) y se realizaron según las normas de bioseguridad y bajo la supervisión y control de un veterinario.

2. Inoculación de parásitos y administración de medicamentos antipalúdicos

Se infectaron a diez *NHP* de la especie *Aotus lemurinus lemurinus*, cuatro con la cepa *P. falciparum-FVO*, tres con la cepa *P. vivax-AMRU-1* y tres con la cepa *P. vivax-SAL-1* (cada espécimen se registró con un código). Los especímenes fueron curados con 50 mg/kg de mefloquina para los ejemplares infectados con *P. falciparum* y 25 mg/kg de mefloquina o cloroquina a los infectados con *P. vivax* para su recuperación completa.

Parásitos preservados en nitrógeno líquido se descongelaron por gradiente de sal utilizando solución salina al 12%, 1.6% y 0.9%. Se realizó inoculación de los parásitos mediante venopunción a través de la vena safena. El periodo total de infección fue de aproximadamente entre 15-21 días, durante esta fase se llevó a cabo una vigilancia clínica donde se monitoreó el porcentaje de parasitemia de cada individuo y para atender episodios de fiebres u otros síntomas de malaria. Posterior a esto los monos fueron tratados vía oral con la droga antimalárica.

De los cuatro ejemplares infectados con la cepa *Pf-FVO* los especímenes I, II y III fueron inoculados con 1.0×10^4 de eritrocitos infectados; el espécimen IV fue inoculado con 0.33×10^4 eritrocitos infectados. El primer espécimen fue curado el día 21, los especímenes II y III fueron curados el día 15 y el IV espécimen al día 14 de su periodo de infección. (Escala & Pérez, 2021).

Tres ejemplares fueron infectados con la cepa *Pv-AMRUI* a los cuales se les inocularon $\sim 1.0 \times 10^5$ eritrocitos infectados y fueron curados el día 15 de su periodo de infección. Otros tres ejemplares fueron infectados con la cepa *Pv-SALI* A LOS QUE se les inocularon $\sim 1.0 \times 10^5$

eritrocitos infectados; un espécimen fue tratado el día 15 post-inoculación, otro al día 17 y el último se le administró el medicamento al día 21 de su periodo de infección, (Cuadro 2).

3. Colecta de sangre y obtención de plasma

Se colectaron muestras de sangre para la determinación de la parasitemia por qPCR a partir del día 5 al día 21 post-inoculación, (cuadro 2). Se extrajo aproximadamente 10 µL mediante punción en el lóbulo marginal de las orejas izquierda o derecha, alternadas por día para facilitar la recuperación de los monos; estas muestras se colectaron en papel filtro para posterior análisis de parasitemia. Además se extrajo aproximadamente 1.5 mL de sangre por extracción venosa en tubos de heparina/litio (0.6 mL) o EDTA (0.9 mL), en periodos específicos, 0 día Pre-inoculación (PRE), 6-8 días post- inoculación (EARLY) y 14-21 días post- inoculación (LATE) para realizar análisis hematológicos para la determinación de citocinas en plasma. Se utilizó 0.6 mL para análisis de hematología en un analizador hematológico Abaxis VetScan HM5 y 0.4 mL para química sanguínea en un analizador bioquímico Abaxis VetScan VS2. Posteriormente una alícuota de 0.5 mL se centrifugó a 3,000 g durante 15 minutos, para separar los eritrocitos del resto de la sangre y obtener el plasma. Se colectó el sobrenadante (fase superior) y se obtuvo aproximadamente ~0.25 mL del plasma sanguíneo, las muestras de plasmas se conservaron en crioviales a -70°C.

4. Extracción del ADN genómico de *P. falciparum* y *P. vivax*

La extracción del ADN genómico de las cepas de *P. falciparum* y *P. vivax* a partir de las muestras de sangre en el papel filtro obtenidas de los ejemplares *Aotus sp.* infectados se realizó utilizando el kit de extracción PureLink Genomic DNA Mini (Invitrogen, N° K1820-01), siguiendo el protocolo del fabricante. Las muestras de sangre colectadas en el papel filtro se recortaron con una tijera esterilizada con hipoclorito de sodio (NaClO⁻) al 7% y Etanol al 70%. Las muestras fueron incubadas en tubos cónicos de 1.5 mL con tampón de digestión y proteinasa K por un periodo de 30 minutos a 55°C para su completa digestión, posteriormente se centrifugó a 14,000 g por 3 minutos. El sobrenadante fue transferido a tubos cónicos de 1.5mL estéril y limpios. Se le agregó RNase A y tampón de lisis. La mezcla fue transferida a la columna de extracción y se centrifugó a 10,000 g por 1 minuto, para luego realizar el lavado con el fin de

eliminar impurezas, por último, se realizaron dos eluciones con el tampón de elución, 50 μL para la primera elución y 25 μL para la segunda elución. Es decir, el ADN fue eluído con un volumen final de 75 μL .

Cuadro 2. Colecta de sangre y administración de medicamentos antipalúdicos: Se obtuvieron muestras de sangre de los dos monos control y de los monos *Aotus lemurinus lemurinus*. infectados con *Pf-FVO*, *Pv-AMRUI* y *Pv-SALI* del día 0 (pre-inoculación) y desde el día 5 o 6 al día 21 post-inoculación. Estas muestras de sangre fueron utilizadas para exámenes sanguíneos (hematología y química sanguínea), para la extracción de plasma y posterior análisis de los biomarcadores de inflamación expresados. Los días marcados en rojo representan el día en que se le administró el medicamento a cada espécimen.

	Espécimen/ Código	Días														
		0	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	21	
<i>Pf-FVO</i>	I (32011)	0	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	21	
	II (33018)	0	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	-	-	
	III (33036)	0	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	-	-	
	IV (36040)	0	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	-	-	
<i>Pv-AMRUI</i>	Espécimen/ Código															
	I (35006)	0	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	-	-	
	II (38035)	0	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	-	-	
	III (38038)	0	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	-	-	
<i>Pv-SALI</i>	Espécimen/ Código															
	I(37015)	0	-	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	-	21	
	II(35028)	0	-	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
	III(35008)	0	-	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	-	-	

5. PCR convencional y purificación del producto de PCR

Se amplificó el gen 18S rRNA utilizando los cebadores específicos (Plasmodial 18S) de *Pf-FVO* y *Pv-AMRUI* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los siguientes reactivos para *Pf-FVO*: 23.1 μL de agua libre de nucleasas, 5 μL de buffer [10X], 0.5 μL de taq polimerasa [5 u/ μL], 0.8 μL de DNTP's a [2.5 mM], 2.8 μL del cebador Forward Plasmol1a [1 uM], 2.8 μL del cebador Reverse Plasmol2 a [1 uM] y 15 μL de ADN con 3% de concentración y diluido con 200 μL de H₂O.

Y para *Pv-AMRUI* se utilizaron los siguientes reactivos: 32.1 μL de agua libre de nucleasas, 5 μL de buffer [10X], 0.6 μL de taq polimerasa [5 u/ μL], 0.8 μL de DNTP's a [2.5 mM], 2.8 μL del cebador Forward Plasmol1a [1 uM], 2.8 μL del cebador Reverse Plasmol2 a [1 uM] y 6 μL de ADN. Para la amplificación de las dos cepas de *Plasmodium* mencionadas se llevó a cabo la

reacción bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 95°C durante 1 minutos y 45 ciclos sucesivos de desnaturalización a 95°C durante 10 segundos, hibridación a 50°C durante 15 segundos, elongación a 72°C durante 90 segundos y adicional una elongación final a 72°C durante 5 minutos.

Se utilizó la mitad del producto de PCR para la purificación y los siguientes pasos. La purificación de los productos de PCR se realizó con el Kit comercial PureLink PCR Purification (Invitrogen, no.K3100-01 y K3100-02) y siguiendo la recomendación del fabricante, agregando 4 volúmenes del buffer de unión al producto de PCR (25 µL) en una columna, se centrifugó a 10,000 g por 1 minuto, se descartó el sobrenadante para eliminar cualquier impureza que pudiera interferir en el rendimiento de la reacción, se realizó el lavado y finalmente la elución con un volumen final de 50 µL.

6. Estandarización de cebadores

Se llevó a cabo la estandarización de las concentraciones de cebadores para el gen plasmodial 18S. Con el fin de evitar la formación de dímeros de cebadores, que causan interferencia en las amplificaciones realizadas por la qPCR. Se utilizaron los siguientes reactivos: 10 µL de SYBR Green PCR Máster Mix, 7.6 µL de agua libre de nucleasas, 1.2 µL del cebador Forward Plasmo1 a [1 µM], 1.2 µL del cebador Reverse Plasmo2 a [1 µM] y 5 µL del ADN de la cepas *Pv-AMRUI*. Se probaron diferentes concentraciones de los cebadores (0.5 µM, 1 µM y 5 µM), y se comprobó la concentración óptima de [1 µM] para los cebadores por medio de QuantStudio Software V1.5., utilizando la curva de disociación (*melting curve*), la cual permite observar (en forma de una curva o pico angosto y alto) la disociación de los productos de PCR amplificados. De acuerdo a la temperatura de desnaturalización, se emite una fluorescencia debido al Syber Green que se une a la hebra de ADN disociada. También permite distinguir los dímeros de *primers* que se forman con el anillado inespecífico a una temperatura menor.

7. Análisis cuantitativo de la carga parasitaria por qPCR

Para cuantificar la carga parasitaria de los especímenes infectados con *P. falciparum* y *P. vivax*, durante el periodo de malaria se comparó con una curva estándar por especie del parásito, la

cual se estandarizó realizando 5 diluciones (log 10) de ADN en series a partir de la dilución 1/10000. Se utilizó 5 µL de cada dilución para generar la curva.

El análisis cuantitativo de la parasitemia se realizó mediante qPCR utilizando una Master Mix, la cual contenía los siguientes reactivos: 7.6 µL de agua libre de nucleasas, 10 µL de SYBR Green PCR Máster Mix, 1.2 µL del cebador Forward Plasmo1 a [1 µM], 1.2 µL del cebador Reverse Plasmo2 a [1 µM] por Reacción (*P. vivax*: 213 reacciones y *P. falciparum*: 203 reacciones). Los 5 µL del ADN de los cinco puntos diluidos para generar la curva, la Master Mix, más 5 µL del ADN correspondiente a cada muestra por día de parasitemia, fueron colocadas en placas 98 pocillos, todas las muestras se analizaron por triplicado. Primero se determinó la parasitemia por día de infección de los seis ejemplares *Aotus sp.* infectados, con *P. vivax* (tres con la cepa de *Pv-AMRUI* y tres con la cepa *P.v-SALI*). Luego se cuantificó la parasitemia por día de infección de los cuatro ejemplares *Aotus sp.* infectados, con *Pf-FVO*. La qPCR se llevó a cabo según las siguientes condiciones: 50°C durante 2 minutos, 95°C durante 10 minutos; y 40 ciclos sucesivos de 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto; se añadió un paso adicional de curva de disociación a 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto, 95°C durante 15 segundos. En el termociclador de tiempo real *Applied Biosystems Quant Studio 5*, posterior a esto los datos fueron procesados con el programa *QuantStudio Software V1.5*.

8. Preparación de muestras de plasma

Se utilizaron muestras de plasmas de días específicos para la preparación y posterior cuantificación de los biomarcadores de inflamación. Para el espécimen I infectado con *Pf-FVO*, se utilizaron los plasmas de los días 0, 6, 20; para el espécimen II, y III; los días 0, 8 y 19; para el espécimen IV los días 0, 8 y 16. Se utilizaron los plasmas de los días 0, 7 y 15 para los primates infectados con *Pv-AMRUI*. Para el espécimen I infectado con *Pv-SALI* se utilizaron los plasmas de los días 0, 7 y 15. Para el espécimen II los días 0, 7 y 17. Y para el espécimen III los plasmas de los días 0, 7, 21.

Las muestras de los plasmas se prepararon utilizando 25 µL de plasma crudo y 25 µL de PBS 0.5X, se centrifugó a 14,000 g por 20 minutos, se extrajo del sobrenadante 40 µL del cual se preparó una dilución 1/80 con agua estéril ultra pura. Considerando que algunos biomarcadores

salían fuera de rango con lecturas mayores al límite superior de detección, se reanalizaron estos marcadores utilizando una dilución 1/200.

9. Ensayo inmunoenzimático, Luminex - Cuantificación de biomarcadores en plasma

Los ensayos de cuantificación de los biomarcadores de inflamación involucrados en la respuesta inmune celular de los diez monos *Aotus sp.* durante el periodo de malaria, se llevaron a cabo en el laboratorio de parasitología del (ICGES). Los ensayos se realizaron bajo poca iluminación, ya que el kit incluye perlas magnéticas fluorescentes conjugadas con anticuerpos monoclonales específicos para detectar los distintos marcadores.

Se realizó la preparación de los reactivos y de los antígenos utilizando el Kit ProcartaPlex NHP Cytokine/Chemokine/GF 37plex (Invitrogen) que contiene perlas magnéticas para detección de las **citocinas**: CD40L, G-CSF (CSF-3), IFN alpha, IL-1RA, IL-7, IL-15; **citocinas T helper**: GM-CSF, IFN gamma, IL-1 beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 (CXCL8), IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A (CTLA-8), IL-18, IL-23, TNF alpha; **quimiocinas**: BLC (CXCL13), Eotaxin (CCL11), IP-10 (CXCL10), I-TAC (CXCL11), MCP-1 (CCL2), MIG (CXCL9), MIP-1 alpha (CCL3), MIP-1 beta (CCL4), SDF- alpha; y **factores de crecimiento**: BDNF, FGF-2, NGF beta, PDGF-BB, SCF, VEGF-A, VEGF-D y siguiendo el protocolo del fabricante.

Las perlas magnéticas se prepararon a partir de los Buffer concentrados A, B, C y D a 50X, utilizando 1,940 µL de cada uno y 480 µL del Universal Assay Buffer (UACB, 1X). Las perlas se mezclaron en un vial y de esta preparación se agregó 80 µL/por pocillo a un plato de 96 pocillos suplementado por el kit. Para la preparación de las curvas estándar (Std1-7), se agregó 50 µL del UAB al Std Mix A buffer y al Std Mix B buffer, y se mezcló agitando en un vortex. Se agregó 200 µL de esta mezcla al tubo Std1, y 150 µL del UAB a los tubos Std2-7 y se realizó una dilución seriada (1/2) transfiriendo 50 µL del Std1 al Std2 y así sucesivamente hasta obtener los siete estándares diluidos. Se realizaron dos lavados de las perlas magnéticas utilizando 50 µL de PBS 0.5X a cada pocillo, se colocó el plato magnético para evitar la pérdida de las microesferas y se volteó el plato para retirar el PBS. Se colocaron en el plato 50 µL/por pocillo de las muestras de los plasmas obtenidos de los tiempos de análisis durante el periodo de infección por malaria de los *Aotus sp.* infectados, las muestras de los plasmas control obtenidos

de los *Aotus* no infectados, los estándares (Std1-7), y el blanco. Todas las muestras se analizaron por triplicado. Las muestras contenidas en el plato se cubrieron con un sello y una tapa, y se dejaron en incubación *overnight* a temperatura ambiente con leves movimientos. Al día siguiente se realizó otro lavado de las perlas. Posterior a esto se preparó la mezcla de anticuerpos de detección 1X agregando 50 μ L de cada concentrado de anticuerpo de detección Ab Mix A, Ab Mix B, Ab Mix C y Ab Mix D a un recipiente de mezcla, más 2000 μ L del detection Ab diluent, y 300 μ L del UAB. Y Se utilizó 25 μ L/por pocillo. Se incubó a temperatura ambiente con movimientos por 30 minutos. Luego de esto se realizaron dos lavados al plato. Posteriormente se agregó 50 μ L/por pocillo de Streptavidin-PE, y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos con movimientos. Se realizó nuevamente el lavado doble de las perlas. Para luego agregar 120 μ L/por pocillo del *Reading buffer*, se resuspendió varias veces y luego se pasaron todas las muestras a otro plato de 96 pocillos. Por último, se incubó a temperatura ambiente con leves movimientos por 5 minutos. Las muestras contenidas en el plato se analizaron utilizando el software XPONENT solution en un Sistema Luminex™ 100/200, Magpix™, que permitió la detección y cuantificación de cada biomarcador de respuesta inmunitaria expresado durante el periodo de malaria. Se llevaron a cabo tres ensayos para garantizar la representatividad y reproducibilidad de los mismos.

10. Análisis Estadístico

Se analizaron los 37 biomarcadores de inflamación del kit *ProcartaPlex NHP Cytokine/Chemokine/GF 37plex* (Invitrogen). Los valores de p se calcularon comparando las observaciones emparejadas para cada individuo en tres grupos de acuerdo con el punto de muestreo durante la infección: Pre- inoculación (PRE) /6-8 días post- inoculación (EARLY) y 11-15 días post- inoculación (LATE). Estos valores se analizaron utilizando las pruebas no paramétricas de Friedman y de Comparación Múltiple de Dunn. Los niveles de significancia se establecieron en $p \leq 0,001$ (***), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,05$ (*). En los gráficos presentados se muestran los valores de las citocinas y quimiocinas que mostraron diferencias significativas en sus niveles durante la infección por *Plasmodium*, G-CSF, IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-5, IL-8, IL-10, IL-17A, MCP1, MIP-1 β , Eotaxin-1, MIG, IP-10 y SDF-1.

CAPÍTULO III:

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis cuantitativo de la carga parasitaria

Se observó que el nivel de parasitemia fue mayor en los especímenes infectados con la especie *P. falciparum* FVO en comparación con las dos cepas de *P. vivax* (AMRU-I y SAL-I). La diferencia en la carga parasitaria entre *P. falciparum* y *P. vivax* probablemente se deba a la preferencia estricta que tiene *P. vivax* por los reticulocitos, estos glóbulos rojos inmaduros presentan un periodo de vida más corto, y constituyen entre el 0.5% a 2.5% de los glóbulos rojos. Además, *P. vivax* presenta un secuestro menos fuerte que *P. falciparum*, por ende, los parásitos quedan expuestos y son eliminados por el bazo. Por el contrario, la preferencia de *P. falciparum* por los glóbulos rojos de cualquier edad y la citoadherencia con mayor fuerza confiere una carga parasitaria mayor y una enfermedad más grave (Pohl & Cockburn, 2022; Rai, Wilson, & Moosavi, 2022; Milner, 2018).

La carga parasitaria para los especímenes infectados fue calculada diariamente durante el periodo de infección. La densidad parasitaria de cada espécimen en la etapa *EARLY* y *LATE* durante la malaria es la siguiente:

El espécimen *PfFVO-I* en el periodo temprano mostró 158 parásitos/ μ L y en el periodo tardío 413,570 parásitos/ μ L. Sin embargo, la parasitemia más alta se registró el día 21 post-inoculación con 1,171,450 parásitos/ μ L. Mientras que el espécimen *PfFVO-II* presentó una parasitemia de 1,649 parásitos/ μ L durante el periodo temprano y 37,770 parásitos/ μ L en el periodo tardío. En el espécimen *PfFVO-III* se observó una densidad parasitaria de 1,838 parásitos/ μ L durante el periodo temprano y 45,256 parásitos/ μ L durante el periodo tardío. Y el espécimen *PfFVO-IV* registró 424 parásitos/ μ L en el periodo temprano y 15,211 parásitos/ μ L durante el periodo tardío. La baja densidad parasitaria en este espécimen, se debe a la cantidad de parásitos infectados que se le inoculó. Además, la diferencia en la densidad parasitaria entre los otros individuos infectados con la misma cepa (*PfFVO*), probablemente se deba a las diferencias fisiológicas que cada individuo presenta y a las interacciones como respuesta a la infección.

El espécimen *PvAMRUI-I* mostró una densidad de 706 parásitos/ μ L durante el período temprano y 484,000 parásitos/ μ L durante el período tardío. El espécimen *PvAMRUI-II* presentó 281 parásitos/ μ L en la etapa temprana y 870,118 parásitos/ μ L en la etapa tardía. Y para el

especimen *PvAMRU-I-III* se calculó 482 parásitos/ μL en la etapa temprana y 405,385 parásitos/ μL durante la etapa tardía.

El espécimen *PvSALI-I* durante el período temprano mostró 47 parásitos/ μL y 3,698 parásitos/ μL durante el periodo tardío. Mientras que el espécimen *PvSALI-II* mostró 60 parásitos/ μL en el periodo temprano y 486,038 parásitos/ μL en el período tardío. El espécimen *PvSALI-III* presentó una carga parasitaria de 85 parásitos/ μL en el período temprano y 6, 901,709 parásitos/ μL en el periodo tardío. Las diferencias entre el espécimen I y los especímenes II y III de la cepa *P. vivax SAL-I* probablemente se deba a una posible falla técnica durante la inoculación de este espécimen infiriendo que la dosis inoculada fue inferior a las dosis inoculadas en los especímenes II y III infectados con la cepa *SAL-I*. Cabe resaltar que la cepa *AMRU-I* mostró un comportamiento similar a *P. falciparum FVO* durante el periodo *Early* post-inoculación, se observa que al día 7 del período de infección *PV-AMRU-I* presentó una carga parasitaria mayor en comparación con *PV-SALI*, esa misma densidad parasitaria se observa en el día 11 de su periodo de infección. Con estos datos se puede inferir que la cepa *AMRU-I* de *P. vivax* presenta un período de infección temprano más agresivo que la cepa *SAL-I* (Figura 6).

Estos resultados muestran evidencia de que el método para detectar y cuantificar parásitos por qPCR es fiable, pudiendo detectar baja carga parasitaria en la etapa sanguínea.

Cuantificación de biomarcadores de inflamación en plasma durante el periodo de malaria

La cuantificación de los niveles de los biomarcadores de inflamación expresados durante el ensayo se calculó en tres periodos: Pre- inoculación (PRE), 6-8 días post- inoculación (EARLY) y 11-15 días post- inoculación (LATE).

Factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), en los especímenes infectados con *Pf-FVO* los niveles disminuyeron y se mantuvieron bajos durante el periodo de infección. Sin embargo, en los individuos infectados con las cepas *AMRU-I* y *SAL-I* de *P. vivax* los niveles de G-CSF disminuyeron en la etapa temprana y aumentaron en la etapa tardía (Figura 9). Estos datos son consistentes con estudios anteriores, en donde reportan una disminución de esta citocina en pacientes infectados con *P. falciparum*, (Stoiser, et al., 2000). En cambio, son

contradictorios con datos reportados por Prasasty, et al., (2018) en donde informan un aumento excesivo en pacientes infectados por *P. vivax*, sin embargo, mencionan que la expresión de esta citocina está relacionada a la trombocitopenia YA QUE G-CSF induce la fagocitosis incluyendo trombocitos. Probablemente los niveles de plaquetas disminuyeron por el aumento de G-CSF en la etapa tardía post-inoculación de los infectados por *P. vivax* (Figura 8).

Interferón gamma (IFN- γ), en los ejemplares infectados con *Pf-FVO*, se mantuvieron bajos tanto en la etapa temprana y tardía de la infección a comparación de los ejemplares infectados con las dos cepas de *P. vivax* (*AMRU-1* y *SAL-1*) que mostraron un aumento significativo entre la etapa temprana y la etapa tardía post-inoculación (Figura 10). Varios estudios realizados en pacientes con paludismo han reportado una disminución de esta citocina con la progresión de la enfermedad en personas infectadas con *P. falciparum*, y mencionan que la IL-10 puede inhibir la producción de IFN- γ (Oyegue-Liabagui, et al., 2017). Esos datos se relacionan con los resultados observados de los ejemplares infectados con *P. falciparum* en este trabajo. Probablemente la IL-10 inhibió la producción de IFN- γ , y los bajos niveles de esta citocina reguladora contribuyeron al aumento de la parasitemia, ya que esta citocina está vinculada al control del crecimiento del parásito. Además, los datos obtenidos en este estudio son similares con estudios anteriores que comparan la secreción de IFN- γ , en respuesta a *P. falciparum* y *P. vivax*, en donde mencionan que esta última especie induce respuestas específicas y no específicas de la especie, esto conduce a la activación de una respuesta inflamatoria más elevada para la regulación y control del parásito durante la etapa sanguínea de *P. vivax* o período tardío post-inoculación, que evidencia lo mencionado por la literatura. Mencionan también que pacientes infectados con *P. falciparum* expresan niveles elevados del antígeno que inhibe a las células T (T CTLA-4) responsables en parte de la secreción de IFN- γ . En este trabajo los exámenes hematológicos mostraron una disminución de linfocitos en los infectados por *P. falciparum*, la inhibición de los linfocitos T por parte del antígeno T (CTLA-4) quizás inhibió la expresión de IFN- γ , (Salwati, et al., 2011).

Los niveles de Factor de necrosis tumoral α (TNF- α), aumentaron en los *Aotus sp.* infectados con *P. falciparum FVO*, y en los ejemplares infectados con las dos cepas de *P. vivax* (*AMRU-1* y *SAL-1*) tanto en la etapa temprana como en la etapa tardía (Figura 11). Estos datos son semejantes con varios estudios reportados anteriormente. Esta citocina proinflamatoria es

producida por macrófagos y monocitos sanguíneos (Popa & Popa, 2021; Lyke, et al., 2004). Se puede inferir que la producción elevada de TNF- α en los ejemplares infectados tanto por *P. falciparum* como por *P. vivax* indujo a los monocitos y macrófagos la fagocitosis de los glóbulos rojos infectados y el control del crecimiento del parásito durante la infección en etapa temprana y tardía post inoculación, (Popa & Popa, 2021; Lyke, et al., 2004; Lapinet, Scapini, Calzetti, Pérez, & Cassatella, 2000).

Niveles de IL-2, aumentaron progresivamente con el aumento de la parasitemia en los ejemplares infectados con *Pf-FVO*, en los infectados con *Pv-AMRUI* se observó incremento significativo durante la etapa tardía post-inoculación. En cambio, en los monos infectados con *Pv-SALI* se observa un leve incremento no significativo en la etapa temprana los cuales disminuyen levemente durante el periodo post-infección (Figura 12). Estudios anteriores en donde han investigado el papel de algunas citocinas en la gravedad de la malaria, sugieren que los niveles elevados de IL-2, son indicativos de malaria leve (Prakash, et al., 2006). Esta citocina proinflamatoria es producida por las células T CD4 como respuesta ante la infección por paludismo, impulsa a otras citocinas y células de defensa a la protección del huésped, está involucrada en la diferenciación y función de varios tipos de células inmunitarias (Malek, 2008). Los niveles bajos están asociados a la trombocitopenia observado a pacientes infectados con *P. vivax* (da Costa, et al., 2020). Estos datos se correlacionan con los niveles bajos de plaquetas obtenidos en los ejemplares infectados con *Pv-SALI*, pero no con los niveles de IL-2 en los ejemplares infectados con *Pv-AMRUI*. Se puede deducir que el incremento de la IL-2 en estos ejemplares dio paso a los mecanismos regulatorios induciendo otras citocinas inflamatorias a controlar la infección.

Los niveles de IL-5, en los ejemplares infectados con *Pf-FVO* no se muestran diferencias en los niveles de IL-5 durante el periodo de infección. En los monos infectados por *Pv-SALI* y *Pv-AMRUI* se observa un incremento en los valores en la etapa temprana los cuales disminuyen ligeramente en la etapa tardía. (Figura 13). En estudios realizados para determinar el papel de citocinas inflamatorias relacionadas con la malaria por *P. falciparum* y *P. vivax* han informado que la IL-5 está relacionada con la gravedad de la enfermedad, esta citocina proinflamatoria, en conjunto con otras citocinas, puede estar implicada en el control de la enfermedad y no de la carga parasitaria (da Costa, et al., 2014; Prakash, et al., 2006). En este caso, en todos los

ejemplares infectados (*PfFVO*, *PvAMU-1* y *PvSal-1*) se observa disminución del hematocrito y disminución del número de plaquetas (Figura 8) lo que es considerado un síntoma de malaria grave.

Niveles de IL-8, se elevaron en la etapa temprana y se mantuvieron elevados durante la etapa tardía post-inoculación en los ejemplares infectados con *Pf-FVO*, *Pv-AMRUI* y *Pv-SALI*. Estos datos obtenidos son similares a los observados por Rodrigues-da-Silva y colaboradores (2014) en donde han reportado niveles elevados de la IL-8 en un grupo de pacientes con paludismo infectados por *P. falciparum* y en otro grupo de pacientes con malaria por *P. vivax* durante la fase aguda de la malaria. Probablemente, la quimiocina IL-8 se eleva en la malaria aguda, para atraer neutrófilos al tejido infectado y destruir a los parásitos (McGeachy, Cua, & Gaffen, 2019), ya que esta quimiocina se expresa como respuesta proinflamatoria del sistema inmune innato para inducir a las células de defensa a la eliminación del parásito (Figura 14) (Dobbs, Crabtree, & Dent, 2020).

Niveles de IL-10, no mostraron diferencias en los valores registrados para los infectados con *Pf-FVO*. Mientras que en los ejemplares infectados por *Pv-AMRUI* hay un leve aumento en la etapa tardía post-inoculación. Y en los infectados por *Pv-SALI* los valores de IL-10 aumentaron considerablemente desde la etapa temprana hasta la etapa tardía post-inoculación. Se ha documentado que los niveles sumamente altos de IL-10 en pacientes infectados con *P. vivax* están asociados a la trombocitopenia y también a la anemia (Punnath, et al., 2019; Raza, Khan, Ghanchi, Raheem, & Beg, 2014; Coelho, et al., 2013). En las infecciones por *P. falciparum* Lyke, et al., (2004) han informado que durante la malaria la fagocitosis del pigmento palúdico derivado de *P. falciparum* llamado hemozoína por parte de los monocitos o macrófagos altera la secreción de algunas citocinas entre esas la IL-10. Además, los niveles exagerados de la IL-10 están implicados en la patogenia de la malaria al suprimir las respuestas protectoras antiparasitarias de tipo Th1 (Oyegue-Liabagui, et al., 2017). Esta citocina antiinflamatoria regula las citocinas proinflamatorias excesivas que estimulan a los fagocitos para la absorción y eliminación del parásito en la protección del huésped. Las respuestas de defensas se expresan más ante la infección por *P. vivax* en comparación con *P. falciparum*, probablemente los niveles

más elevados en los monos infectados con las dos cepas de *P. vivax* permitió la regulación y el control de la secreción elevada de citocinas proinflamatorias (Figura 15).

Valores de la IL-17A, fueron similares en los monos infectados por *Pf-FVO* y *Pv-AMRUI*, con un patrón que muestra un ligero aumento significativo en la etapa tardía post-inoculación. En los ejemplares infectados por *Pv-SALI* la IL-17A se elevó fuertemente en la etapa temprana post-inoculación y mostró un descenso de los valores en la etapa tardía post-inoculación (Figura 16). Se ha reportado que los altos niveles de IL-17 y otras citocinas relacionadas reducen la intensidad del parásito en pacientes infectados por *Plasmodium vivax*, e inducen la protección del huésped contra la malaria complicada (McGeachy, Cua, & Gaffen, 2019). Otros datos publicados por Rodrigues, et al., (2014) mencionan que pacientes infectados por *Plasmodium falciparum* y *P. vivax* presentan niveles elevados de IL-17A durante la fase aguda. Probablemente los altos niveles expresados en los ejemplares infectados por *Pv-SALI* pueden estar relacionados a la protección del individuo evitando la progresión de la enfermedad.

Niveles de la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), en los ejemplares infectados con *Pf-FVO*, *Pv-AMRUI* y *Pv-SALI*, los valores de MCP-1 se elevaron desde etapa temprana hasta la tardía post-inoculación (Figura 17). Los resultados del presente estudio son respaldados por Hojo-Souza, et al., (2017) en donde observaron una alta producción de MCP-1 durante la malaria aguda por *P. vivax*. Esta quimiocina atrayente de monocitos está relacionada a la malaria aguda, tanto en las infecciones por *P. vivax* como por *P. falciparum*, (Dechkum, et al., 2006). Ya que esta proteína está asociada a las respuestas inflamatorias participando fuertemente en los procesos regulatorios, la expresión notable en los ejemplares infectados por *P. vivax* puede ser indicativo del proceso inflamatorio en el reclutamiento de los macrófagos en el que está involucrada para mantener la malaria no complicada.

Niveles de la proteína inflamatoria de macrófagos 1 α (MIP-1 α), aumentaron levemente durante la etapa temprana post-inoculación y volvieron a sus niveles basales en la etapa tardía post-inoculación en los ejemplares infectados con *Pf-FVO*. El mismo comportamiento se reflejó en los infectados con *Pv-AMRUI* sin embargo, en este caso los niveles de (MIP-1 α) durante la etapa temprana fueron más elevados. En los individuos infectados con *Pv-SALI* los niveles de (MIP-1 α) no mostraron diferencia ni en la etapa temprana, ni en la etapa tardía post-inoculación (Figura 18). Esta quimiocina está asociada con actividad quimiotáctica en células de defensas e

induciendo la liberación de otras citocinas proinflamatorias. Las concentraciones de MIP-1 α se elevan durante el paludismo agudo de *P. falciparum* y *P. vivax* (Dobbs, Crabtree, & Dent, 2020). La expresión de la proteína inflamatoria de macrófagos 1 α , también es indicativo de paludismo agudo, sin embargo, se expresa tanto en la inflamación aguda como crónica, también se ha reportado su vinculación con la anemia malárica ya que es capaz de inhibir la proliferación de células madre hematopoyéticas durante la malaria por *P. falciparum* (Burgmann, et al., 1995).

Niveles de Eotaxin, disminuyeron considerablemente desde la etapa temprana hasta la etapa tardía post-inoculación de los individuos infectados con *Pf-FVO* y *Pv-AMRU1*. En cambio, en los ejemplares infectados con *Pv-SALI* los valores aumentaron hacia la etapa tardía post-inoculación (Figura9). Investigaciones recientes han sugerido que los niveles bajos de Eotaxin están asociados a la malaria grave causada por *P. falciparum* y *P. vivax*. (Mancebo-Pérez, et al., 2022; Dobaño, et al., 2020). En este estudio se observa un incremento en los casos de infección por *Pv-Sall*, potencialmente puede ser una respuesta de los monos para contrarrestar los efectos de la infección ya que se ha visto que los niveles altos de esta quimiocina están relacionados a niveles estables de hemoglobina.

Valores de la Monocina inducida por interferón gamma (MIG), en los primates infectados con *Pf-FVO* y con *Pv-AMRU1* registró una considerable disminución en la etapa temprana post-inoculación y un aumento significativo durante la etapa tardía post-inoculación. En los individuos infectados con *Pv-SALI* se observa una disminución en la etapa temprana de la infección, la cual progresa hacia la etapa tardía post-inoculación (Figura 20). En comparación con reportes publicados sobre la concentración de la quimiocina MIG durante la malaria, se puede decir que esta quimiocina podría ser un marcador de malaria aguda y que las diferencias fisiológicas de los individuos podrían ser responsables de las variaciones en las concentraciones de MIG. Estos autores sugieren que MIG tiene acción en el control del parásito y en los síntomas de la malaria (Farrington, et al., 2017).

Valores de la Proteína 10 inducida por interferón gamma (IP-10), no se observó cambios en los individuos infectados con *Pf-FVO*. En los ejemplares infectados con *Pv-AMRU1* los niveles de IP-10 disminuyeron notablemente en la etapa temprana y ascendieron drásticamente en la etapa tardía post-inoculación. Mientras que en los infectados con *Pv-SALI* se observa lo contrario, registrándose un aumento directo de los niveles de IP-10 durante la etapa temprana y

una disminución de los niveles en la etapa tardía post-inoculación (Figura 21). En la malaria por *P. falciparum* los niveles elevados de la IP-10 se relacionan con la gravedad de la infección en el desarrollo de la malaria cerebral (Dobbs, Crabtree, & Dent, 2020). En los monos *Aotus* no se ha reportado episodios o complicaciones asociadas a la malaria cerebral. Algunos reportes señalan que la expresión de IP-10 está asociada a individuos infectados con la especie *P. vivax* (Hojo-Souza, 2017). En nuestro caso solo se observó expresión de esta quimiocina en los episodios de *P. vivax* en fase temprana con *Pv-Sall* y en fase tardía con *Pv-AMRU1*. Otros estudios señalan que en episodios de malaria por *P. vivax* las concentraciones elevadas de IP-10 se asocian con anemia leve durante la malaria (Jain, et al., 2010) y en nuestro caso, ambos grupos de animales, infectados por *Pv-AMRU1* y *Pv-Sall* desarrollaron anemia.

Niveles del factor 1 derivado de células del estroma α (SDF-1 α), mostraron un incremento con el aumento desde la etapa temprana hasta la etapa tardía post-inoculación en los ejemplares infectados con *Pf-FVO* y con las dos cepas de *Pv-AMRU1* y *Pv-SALI* (Figura 22). En regiones endémicas de malaria, los pacientes muestran altos niveles de esta quimiocina proinflamatoria SDF-1 α que es un mediador fundamental en la respuesta inflamatoria. SDF-1 α está asociado a la anemia de leve a moderada y al paludismo cerebral por *P. falciparum* (Otieno, 2010). *P. vivax* Klei, et al., (2019) mencionan que en la malaria por *P. vivax*, SDF-1 α restringe los precursores de neutrófilos reduciendo los niveles de neutrófilos, aunque en este estudio no se observó tal efecto considerando elevados niveles de SDF-1 α en los ejemplares infectados con *Pv-SALI*.

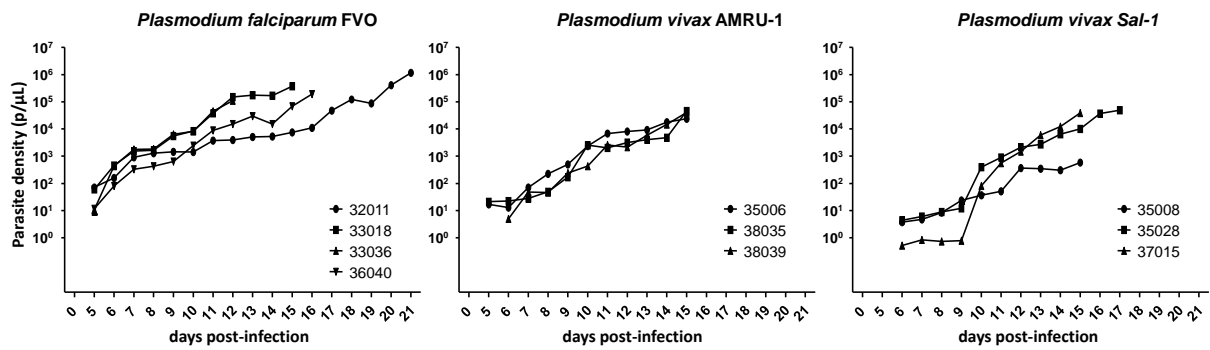


Figura 6. Densidad de parásitos *Plasmodium* detectado por qPCR. A). Carga parasitaria de *P. falciparum* FVO en los cuatro ejemplares *Aotus* durante el periodo de malaria. **B).** Carga parasitaria de la cepa AMRU-1 de *P. vivax* en los tres ejemplares *Aotus* durante el periodo de malaria **C).** Carga parasitaria de la cepa SAL-1 de *P. vivax* en los tres ejemplares *Aotus* durante el periodo de malaria.

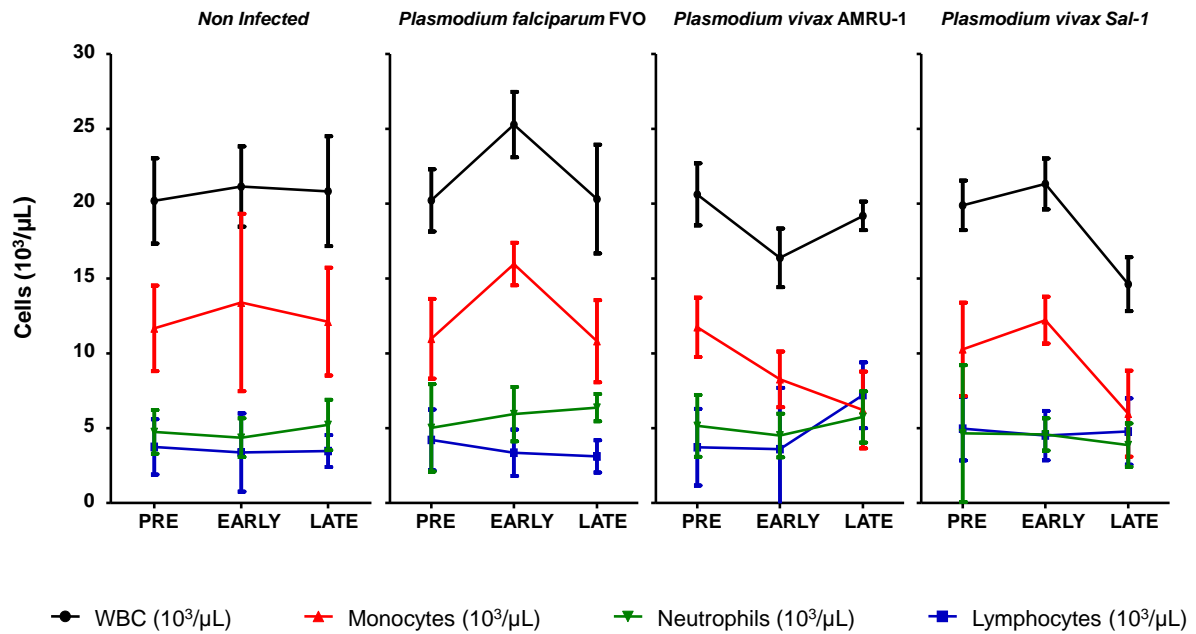


Figura 7. Análisis sanguíneos que muestra los valores de algunos leucocitos (monocitos, neutrófilos y linfocitos). Valores de los ejemplares no infectados tomados como control, y de los ejemplares infectados con *P. falciparum* FVO, *P. vivax* AMRU-1 y *P. vivax* SAL-1 en tres periodos (PRE, EARLY y LATE). PRE: pre-inoculación. EARLY: 6-8 días post-inoculación. LATE: 11-15 días post-inoculación.

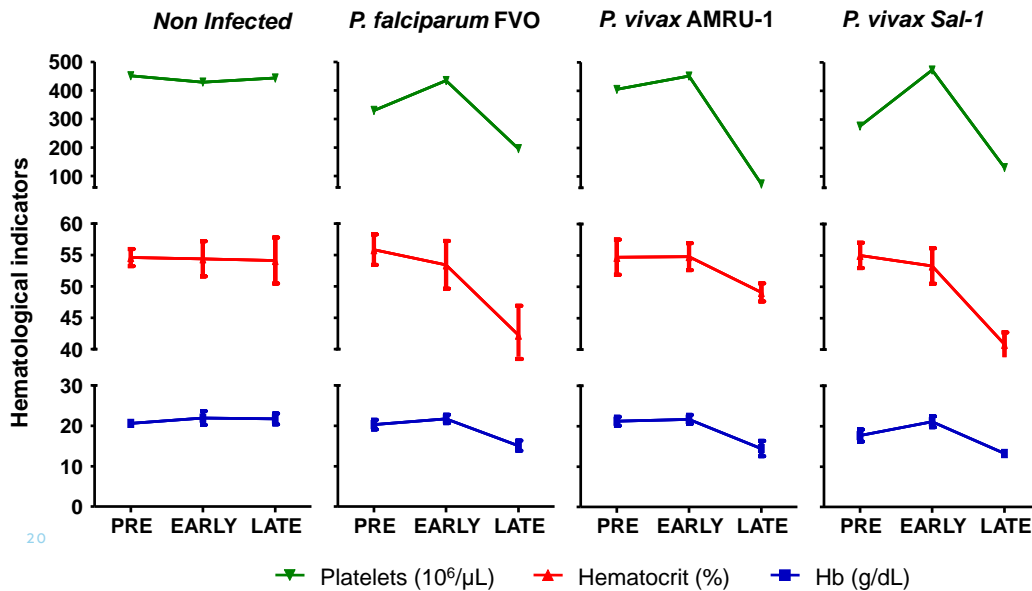


Figura 8. Análisis sanguíneos que muestra los valores de plaquetas, hematocrito y hemoglobina. Valores de los ejemplares no infectados tomados como control, y de los ejemplares infectados con *P. falciparum* FVO, *P. vivax* AMRU-1 y *P. vivax* SAL-1 en tres periodos (PRE, EARLY y LATE). PRE: (pre-inoculación). EARLY: (6-8 días post-inoculación). LATE: (11-15 días post-inoculación).

GSF

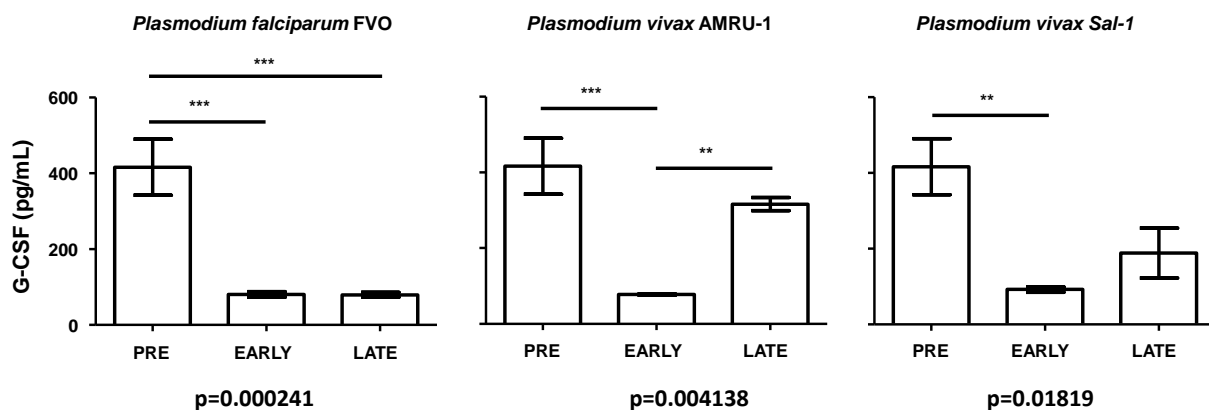


Figura 9. Niveles (pg/mL) del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). Las barras muestran los valores mediana±IC95% del biomarcador (G-CSF) expresado en los *Aotus* infectados con *P. falciparum* FVO, *P. vivax* AMRU-1 y *P. vivax* SAL-1 durante el periodo de malaria. Y comparándose con los valores del control. PRE: Pre-inoculación. Periodo de infección: EARLY (6-8 días post-inoculación) / LATE (11-15 días post-inoculación).

IFN- γ

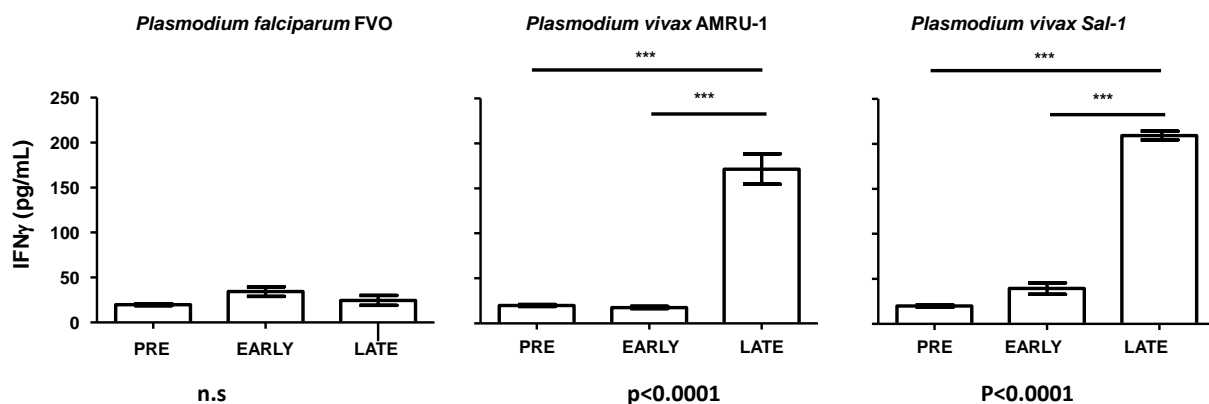


Figura 10. Niveles (pg/mL) del Interferón gamma (IFN- γ). Las barras muestran los valores mediana±IC95% del del biomarcador (IFN- γ) expresado en los *Aotus* infectados con *P. falciparum* FVO, *P. vivax* AMRU-1 y *P. vivax* SAL-1 durante el periodo de malaria. Y comparándose con los valores del control. PRE: Pre-inoculación. Periodo de infección: EARLY (6-8 días post-inoculación) / LATE (11-15 días post-inoculación).

TNF- α

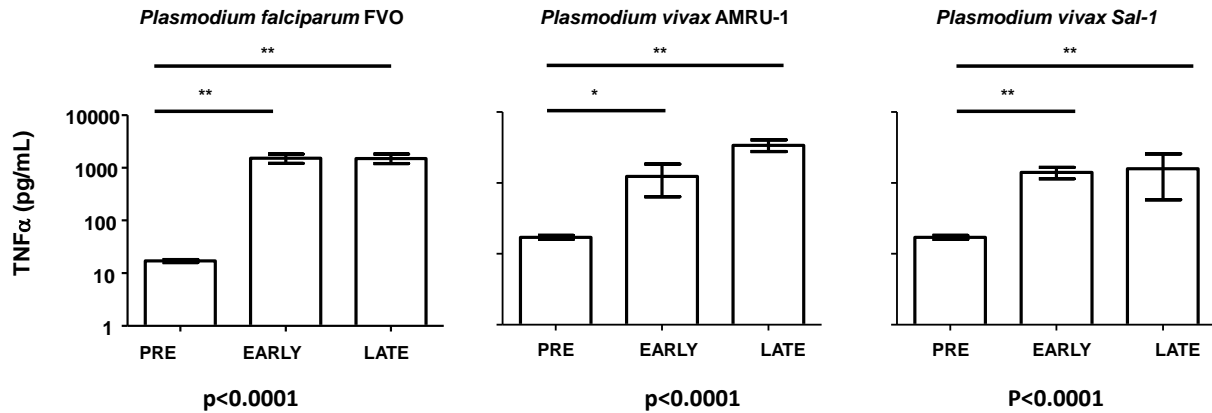


Figura 11. Niveles (pg/mL) de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Las barras muestran los valores mediana \pm IC95% del del biomarcador (TNF- α) expresado en los *Aotus* infectados con *P. falciparum* FVO, *P. vivax* AMRU-1 y *P. vivax* SAL-1 durante el periodo de malaria. Y comparándose con los valores del control. PRE: Pre-inoculación. Periodo de infección: EARLY (6-8 días post-inoculación) / LATE (11-15 días post-inoculación).

IL-2

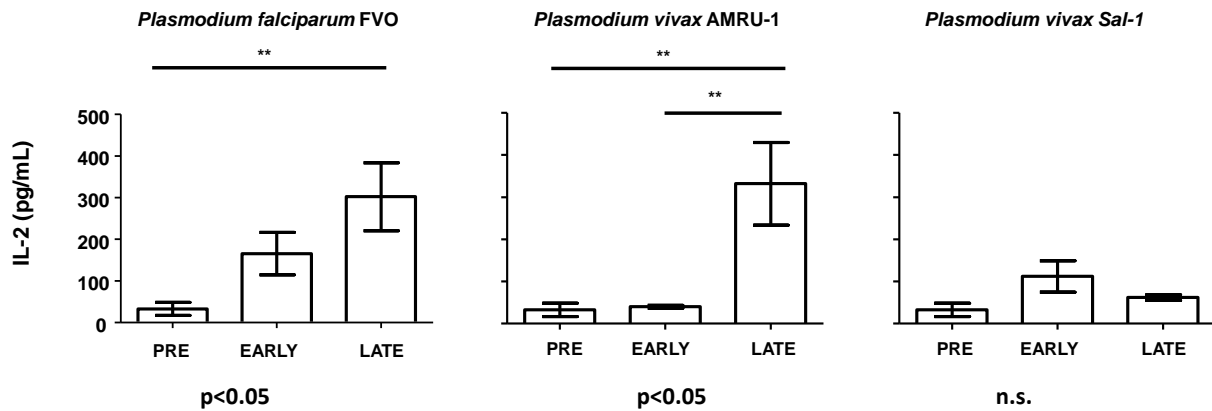


Figura 12. Niveles (pg/mL) de Interleucina-2 (IL-2). Las barras muestran los valores mediana \pm IC95% del biomarcador (IL-2) expresado en los *Aotus* infectados con *P. falciparum* FVO, *P. vivax* AMRU-1 y *P. vivax* SAL-1 durante el periodo de malaria. Y comparándose con los valores del control. PRE: Pre-inoculación. Periodo de infección: EARLY (6-8 días post-inoculación) / LATE (11-15 días post-inoculación).

IL-5

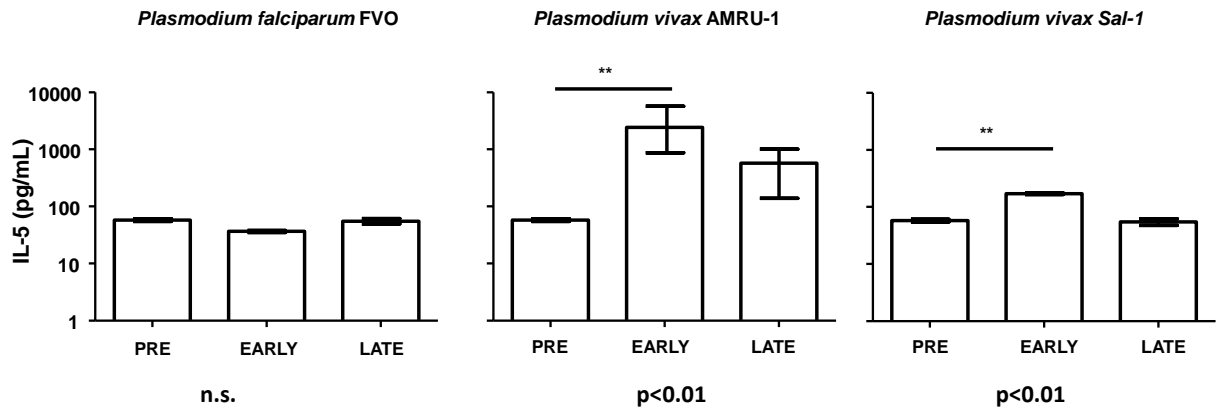


Figura 13. Niveles (pg/mL) de Interleucina-5 (IL-5). Las barras muestran los valores mediana \pm IC95% del biomarcador (IL-5) expresado en los *Aotus* infectados con *P. falciparum* FVO, *P. vivax* AMRU-1 y *P. vivax* SAL-1 durante el periodo de malaria. Y comparándose con los valores del control. PRE: Pre-inoculación. Periodo de infección: EARLY (6-8 días post-inoculación) / LATE (11-15 días post-inoculación).

IL-8

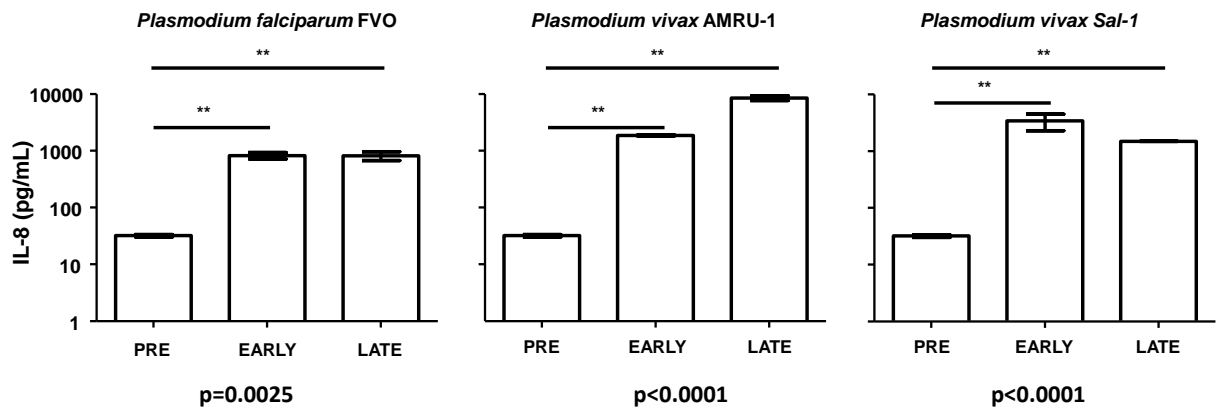


Figura 14. Niveles (pg/mL) de Interleucina-8 (IL-8). Las barras muestran los valores mediana \pm IC95% del biomarcador (IL-8) expresado en los *Aotus* infectados con *P. falciparum* FVO, *P. vivax* AMRU-1 y *P. vivax* SAL-1 durante el periodo de malaria. Y comparándose con los valores del control. PRE: Pre-inoculación. Periodo de infección: EARLY (6-8 días post-inoculación) / LATE (11-15 días post-inoculación).

IL-10

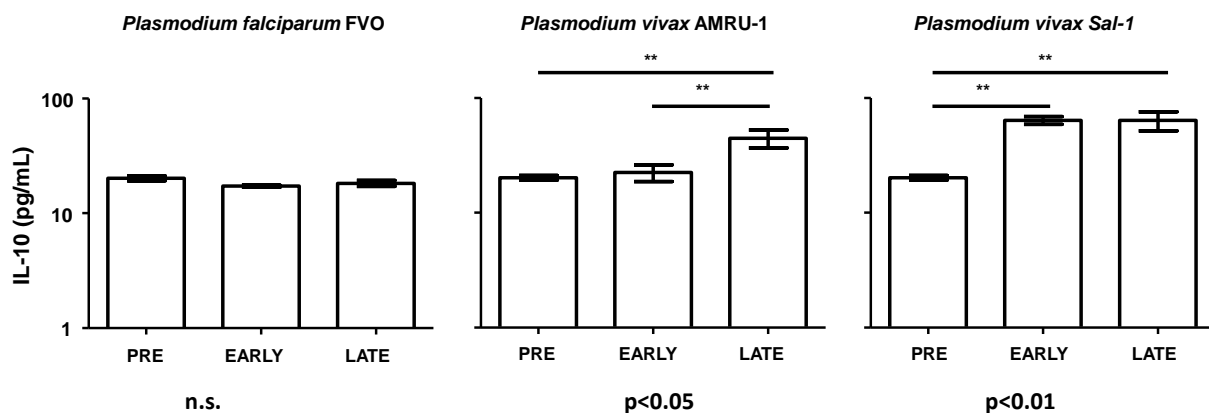


Figura 15. Niveles (pg/mL) de Interleucina-10 (IL-10). Las barras muestran los valores mediana \pm IC95% del biomarcador (IL-10) expresado en los *Aotus* infectados con *P. falciparum* FVO, *P. vivax* AMRU-1 y *P. vivax* SAL-1 durante el periodo de malaria. Y comparándose con los valores del control. PRE: Pre-inoculación. Periodo de infección: EARLY (6-8 días post-inoculación) / LATE (11-15 días post-inoculación).

IL-17A

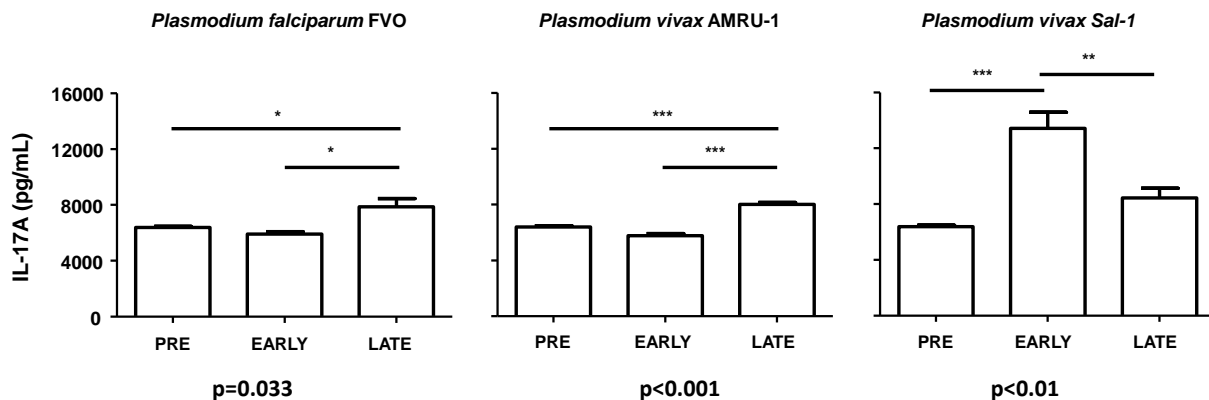


Figura. 16. Niveles (pg/mL) de interleucina-17A (IL-17A) [también conocido como antígeno 8 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-8)]. Las barras muestran los valores mediana \pm IC95% del biomarcador (IL-17A) expresado en los *Aotus* infectados con *P. falciparum* FVO, *P. vivax* AMRU-1 y *P. vivax* SAL-1 durante el periodo de malaria. Y comparándose con los valores del control. PRE: Pre-inoculación. Periodo de infección: EARLY (6-8 días post-inoculación) / LATE (11-15 días post-inoculación).

MCP-1

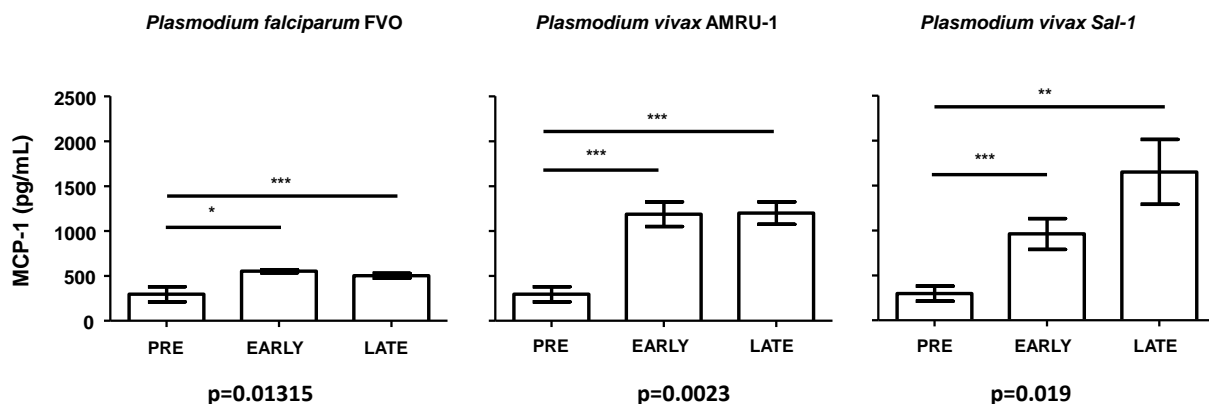


Figura. 17. Niveles (pg/mL) de proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP1) [también conocida como ligando 2 de quimiocina (motivo C-C) (CCL2)]. Las barras muestran los valores mediana \pm IC95% del biomarcador (MCP1) expresado en los *Aotus* infectados con *P. falciparum* FVO, *P. vivax* AMRU-1 y *P. vivax* SAL-1 durante el periodo de malaria. Y comparándose con los valores del control. PRE: Pre-inoculación. Periodo de infección: EARLY (6-8 días post-inoculación) / LATE (11-15 días post-inoculación).

MIP-1 α

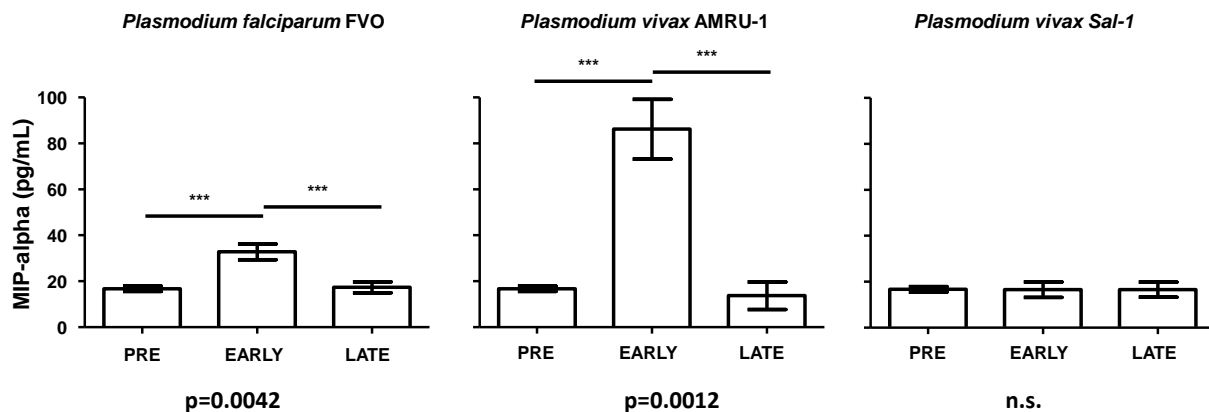


Figura. 18. Niveles (pg/mL) de proteína inflamatoria de macrófagos 1-alfa (MIP-1 α) [también conocida como quimiocina (motivo C-C) ligando 3 (CCL3)]. Las barras muestran los valores mediana \pm IC95% del biomarcador (MIP-1 α) expresado en los *Aotus* infectados con *P. falciparum* FVO, *P. vivax* AMRU-1 y *P. vivax* SAL-1 durante el periodo de malaria. Y comparándose con los valores del control. PRE: Pre-inoculación. Periodo de infección: EARLY (6-8 días post-inoculación) / LATE (11-15 días post-inoculación).

Eotaxin-1 (CCL11)

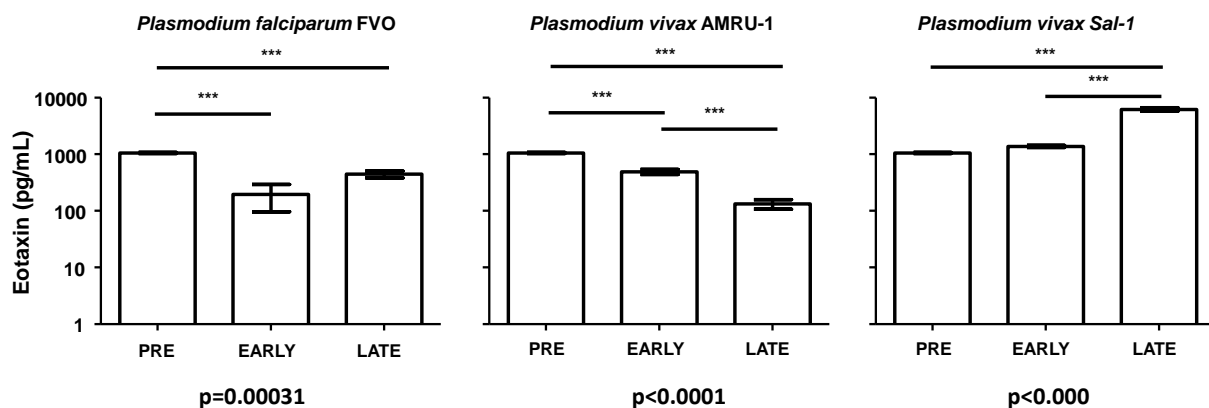


Figura. 19. Niveles (pg/mL) de proteína quimiotáctica de eosinófilos (Eotaxina-1) [también conocida como quimiocina 11 con motivo C-C (CCL11)]. Las barras muestran los valores mediana±IC95% del biomarcador (Eotaxina-1) expresado en los *Aotus* infectados con *P. falciparum* FVO, *P. vivax* AMRU-1 y *P. vivax* SAL-1 durante el periodo de malaria. Y comparándose con los valores del control. PRE: Pre-inoculación. Periodo de infección: EARLY (6-8 días post-inoculación) / LATE (11-15 días post-inoculación).

MIG (CXCL9)

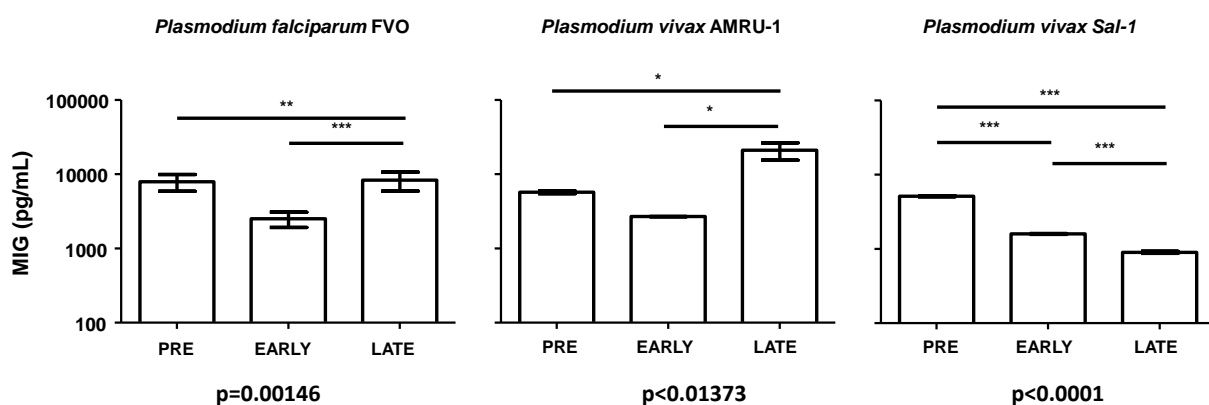


Figura. 20. Niveles (pg/mL) de monocina inducida por interferón gamma (MIG) [también conocido como quimiocina (motivo C-X-C) ligando 9 (CXCL9)]. Las barras muestran los valores mediana±IC95% del biomarcador (MIG) expresado en los *Aotus* infectados con *P. falciparum* FVO, *P. vivax* AMRU-1 y *P. vivax* SAL-1 durante el periodo de malaria. Y comparándose con los valores del control. PRE: Pre-inoculación. Periodo de infección: EARLY (6-8 días post-inoculación) / LATE (11-15 días post-inoculación).

IP-10 (CXCL10)

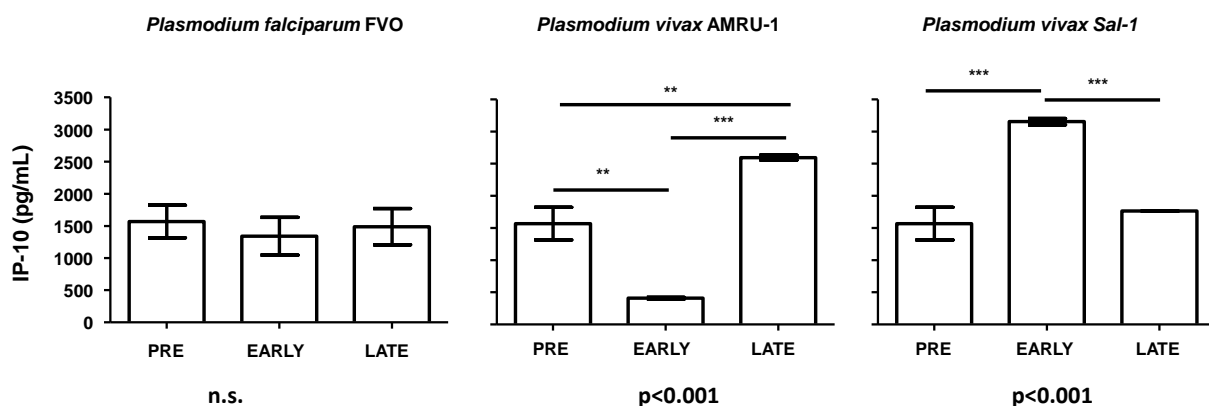


Figura. 21. Niveles (pg/mL) de proteína 10 inducida por interferón gamma (IP-10) [también conocido como ligando de quimiocina 10 con motivo C-X-C (CXCL10)]. Las barras muestran los valores mediana±IC95% del biomarcador (IP-10) expresado en los *Aotus* infectados con *P. falciparum* FVO, *P. vivax* AMRU-1 y *P. vivax* SAL-1 durante el periodo de malaria. Y comparándose con los valores del control. PRE: Pre-inoculación. Periodo de infección: EARLY (6-8 días post-inoculación) / LATE (11-15 días post-inoculación).

SDF-1α (CXCL12)

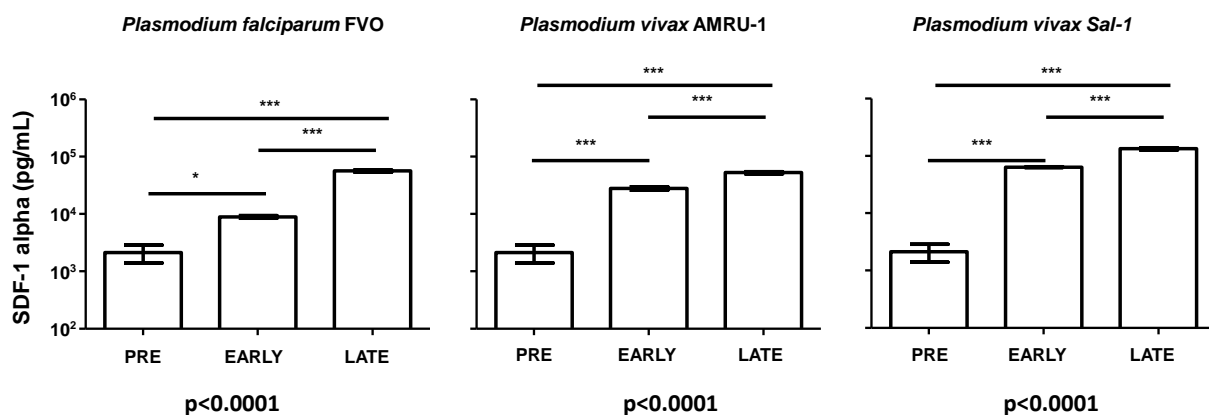


Figura 22. . Niveles (pg/mL) de factor 1 derivado de células estromales (SDF-1) [también conocido como quimiocina 12 de motivo C-X-C (CXCL12)]. Las barras muestran los valores mediana±IC95% del biomarcador (SDF-1) expresado en los *Aotus* infectados con *P. falciparum* FVO, *P. vivax* AMRU-1 y *P. vivax* SAL-1 durante el periodo de malaria. Y comparándose con los valores del control. PRE: Pre-inoculación. Periodo de infección: EARLY (6-8 días post-inoculación) / LATE (11-15 días post-inoculación).

CAPÍTULO IV:
CONCLUSIONES Y
RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

1. Se indujo eficazmente episodios de malaria en primates no humanos de la especie *Aotus lemurinus lemurinus* mediante la inoculación de *P. falciparum*-FVO y dos cepas de *P. vivax* (AMRU-1 y SAL-1). El periodo de infección controlado fue entre 15 a 21 días y mostró síntomas de malaria grave.
2. Se logró cuantificar exitosamente mediante qPCR la carga parasitaria de *Plasmodium sp.* en los ejemplares *Aotus lemurinus lemurinus* diariamente durante el periodo de infección. Como era de esperar la especie *P. falciparum* registró una carga parasitaria mayor en comparación con *P. vivax*. Entre las dos cepas de *P. vivax* analizadas la cepa AMRU-1 mostró un comportamiento similar a *P. falciparum* FVO durante el periodo temprano post-inoculación. Se puede inferir que la cepa AMRU-1 de *P. vivax* presenta un período de infección temprano más agresivo que la cepa SAL-1. Se resalta que el método para detectar y cuantificar parásitos por qPCR es sensible y eficiente, pudiendo detectar cualquier estadio del parásito en la etapa sanguínea.
3. Se determinó y cuantificó los niveles de las citocinas mediadoras de interacciones entre células involucradas en la respuesta inmunitaria de los ejemplares *Aotus lemurinus lemurinus* infectados con *P. falciparum* FVO, *P. vivax* AMRU-1 y *P. vivax* SAL-1 en tres periodos pre-inoculación, etapa temprana post-inoculación y etapa tardía post-inoculación. Los altos niveles de algunas citocinas inflamatorias están relacionados con la protección del huésped, pero también están asociada a la manifestación de la enfermedad.
4. Se midieron los niveles de quimiocinas implicadas en los mecanismos de la respuesta inmune de los ejemplares *Aotus lemurinus lemurinus* infectados con *P. falciparum* FVO, *P. vivax* AMRU-1 y *P. vivax* SAL-1 en tres periodos pre-inoculación, etapa temprana post-inoculación y etapa tardía post-inoculación. Los altos niveles de algunas quimiocinas se asocian con la protección del huésped. Sin embargo, algunas también se relacionan con la malaria aguda y otras con la gravedad de la enfermedad.

RECOMENDACIONES

1. Realizar ensayos que involucren otras citocinas de inflamación expresadas en la respuesta inmunitaria durante la infección por *Plasmodium* para entender mejor el papel de cada citocina dentro de la red de interacción.
2. Realizar estudios comparativos en pacientes con malaria leve y pacientes con malaria grave para determinar cuáles citocinas están involucradas en la progresión del paludismo y cuales se mantienen expresadas para mitigar la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- Rodrigues-da-Silva, R. N., Lima-Junior, J., Fonseca, B., Antas, P. R., Baldez, A., Storer, F. L., . . . Oliveira-Ferreira, J. d. (2014). Alterations in cytokines and haematological parameters during the acute and convalescent phases of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(2), 154–162.
- [OPS], O. P. (2021). Obtenido de Malaria: <https://www.paho.org/es/temas/malaria>
- AEP Asociación Española de Pediatría. (2022). *continuum*. Obtenido de El mosquito del tipo Anopheles únicamente ejerce de vector intermedio entre humanos, y la enfermedad es debida a la infección por un parásito del género Plasmodium: ISSN: 2444-409X
- Ali, S., Palmer, A. C., Banerjee, B., Fritchley, S. J., & Kirby, J. A. (2000). Examination of the function of RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta following interaction with heparin-like glycosaminoglycans. *The Journal of biological chemistry*, 275(16), 11721–11727.
- Alves, F. A., Souza, M. T., Gonçalves, E. C., Schneider, M. C., Marinho, A. M., Muniz, J. C., . . . Carvalho, L. (2010). DNA sequencing of 13 cytokine gene fragments of *Aotus infulatus* and *Saimiri sciureus*, two non-human primate models for malaria. *Cytokine*, 52(3), 151–155.
- Antinori, S., Galimberti, L., Milazzo, L., & Corbellino, M. (2012). Biology of human malaria plasmodia including *Plasmodium knowlesi*. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*, 4(1), e2012013.
- Antonelli, L. R., Junqueira, C., Vinetz, J. M., Golenbock, D. T., Ferreira, M. U., & Gazzinelli, R. T. (2020). The immunology of *Plasmodium vivax* malaria. *Immunological reviews*, 293(1), 163–189.
- Ashley, E., Pyae, A., & Woodrow, C. (2018). Malaria. *Lancet*, 391(10130), 1608-1621.
- Barros de Oliveira, C. o., Sakata, R. K., TSA, Machado, A., Gerola, L. R., & Salomão, R. (2011). Citocinas y Dolor. *Rev Bras Anesthesiol*, 61(2), 137-142.
- Berretta, F., St-Pierre, J., Piccirillo, C. A., & Stevenson, M. M. (2011). IL-2 Contributes to Maintaining a Balance between CD4+Foxp3+ Regulatory T Cells and Effector CD4+ T Cells Required for Immune Control of Blood-Stage Malaria Infection. *J Immunol*, 186(8), 4862–4871.
- Bueno, L. L., Morais, C. G., Lacerda, M. V., Fujiwara, R. T., & Bragaa, É. M. (2012). Interleukin-17 producing T helper cells are increased during natural *Plasmodium vivax* infection. *Acta tropica*, 123(1), 53–57.
- Burgmann, H., Hollenstein, U., Wenisch, C., Thalhammer, F., Looareesuwan, S., & Graninger, W. (1995). Serum concentrations of MIP-1 alpha and interleukin-8 in patients suffering from acute *Plasmodium falciparum* malaria. *Clinical immunology and immunopathology*, 76(1), 32–36.
- Burgmann, H., Hollenstein, U., Wenisch, C., Thalhammer, F., Looareesuwan, S., & Graninger, W. (1995). Serum concentrations of MIP-1 alpha and interleukin-8 in patients suffering from acute *Plasmodium falciparum* malaria. *Clinical immunology and immunopathology*, 76(1), 32–36.

- Carmona-Fonseca, J., Sánchez, Y., & Yasnot, M. (2015). Malaria por Plasmodium vivax o P. falciparum en hospital de tercer nivel en la región más endémica de Colombia. *Acta Medica Colombiana*, 40(4), 294-304.
- Clark, H. C., & Komp, W. H. (1938). A Seventh Year's Observations on Malaria in Panama. *American Journal of Tropical Medicine*, 18(3), 271-286.
- Coelho, H. C., Lopes, S. C., Pimentel, J. P., Pimentel, J. P., Nogueira, P. A., Costa, F. T., . . . Lacerda, M. V. (2013). Thrombocytopenia in Plasmodium vivax malaria is related to platelets phagocytosis. *PLoS one*, 8(5), e63410.
- Collins, W. E., & Jeffery, G. M. (1999). A retrospective examination of secondary sporozoite- and trophozoite-induced infections with Plasmodium falciparum: development of parasitologic and clinical immunity following secondary infection. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 61(1), 20–35.
- Costa, F. T., Lopes, S. C., Ferrer, M., Leite, J. A., Martin-Jaular, L., Bernabeu, M., . . . del Portillo, H. (2011). On cytoadhesion of Plasmodium vivax: raison d'être? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(1).
- Crispe, I. N. (2009). The liver as a lymphoid organ. *Annual review of immunology*, 27, 147-163.
- Crompton, P. D., Moebius, J., Portugal, S., Waisberg, M., Geoffrey, H., Garver, L. S., . . . Pierce, S. K. (2014). Malaria immunity in man and mosquito: insights into unsolved mysteries of a deadly infectious disease. *Annual review of immunology*, 32, 157-187.
- da Costa, A. G., Antonelli, L. R., Costa, P. A., Pimentel, J. P., Garcia, N. P., Tarragô, A. M., . . . Malheiro, A. (2014). The robust and modulated biomarker network elicited by the Plasmodium vivax infection is mainly mediated by the IL-6/IL-10 axis and is associated with the parasite load. *Journal of immunology research*, 318250.
- da Costa, A. G., Chaves, Y. O., Teixeira-Carvalho, A., Ramasawmy, R., Antonelli, L., Barbosa, L., . . . Nogueira, P. A. (2020). Increased platelet distribution width and reduced IL-2 and IL-12 are associated with thrombocytopenia in Plasmodium vivax malaria. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*(115), e200080.
- da Silva, H. B., Caetano, S. S., Monteiro, I., Gómez-Conde, I., Hanson, K., Penha-Gonçalves, C., . . . Tadokoro, C. E. (2012). Early skin immunological disturbance after Plasmodium-infected mosquito bites. *Cellular immunology*, 277(1-2), 22–32.
- Dechkum, N., Hananantachai, H., Patarapotikul, J., Ohashi, J., Krudsood, S., Looareesuwan, S., & Tokunaga, K. (2006). Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) gene polymorphism is not associated with severe and cerebral malaria in Thailand. *Japanese journal of infectious diseases*, 59(4), 239–244.
- Dinarelli, C. A. (2000). Proinflammatory cytokines. *Chest*, 118(2), 503–508.
- Dobaño, C., Bardají, A., Aréval, M., Martínez-Espinosa, F. E., Bôtto-Menezes, C., Padilla, N., . . . Requena, P. (2020). Cytokine signatures of Plasmodium vivax infection during pregnancy and delivery outcomes. *PLoS neglected tropical diseases*, 14(5), e0008155.

- Dobbs, K. R., Crabtree, J. N., & Dent, A. E. (2020). Innate immunity to malaria-The role of monocytes. *Immunological reviews*, 293(1), 8–24.
- Duan, S., Yang, F., Li, Y., Zhao, Y., Shi, L., Qin, M., . . . Q, L. (2022). Pathogenic analysis of coxsackievirus A10 in rhesus macaques. *Virologica Sinica*, 37(4), 610–618.
- Dvorin, J. D., & Goldberg, D. E. (2022). Plasmodium Egress Across the Parasite Life Cycle. *Annual review of microbiology*, 76, 67–90.
- El Canal de Panamá. (2020). *Centros de Control y Prevención de Enfermedades*.
- Escala, K. J., & Pérez, M. K. (2021). ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES VAR ASOCIADOS CON CITOADHESIÓN EN EL MODELO DE INFECCIÓN PLASMODIUM / AOTUS. Panamá: Universidad de Panamá.
- Escalante, A. A., & Ayala, F. J. (1995). Evolutionary origin of Plasmodium and other Apicomplexa based. *NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES USA*, 92, 5793-5797.
- Esche, C., Stellato, C., & Beck, L. A. (2005). Chemokines: Key Players in Innate and Adaptive Immunity. *Journal of Investigative Dermatology*, 125(4), 615-628.
- Farrington, L., Vance, H., Rek, J., Prahl, M., Jagannathan, P., Katureebe, A., . . . Feeney, M. E. (2017). Both inflammatory and regulatory cytokine responses to malaria are blunted with increasing age in highly exposed children. *Malaria journal*, 16(1), 499.
- Fecchio, A., Chagas, C. R., Bell, J. A., & Kirchgatter, K. (2020). Evolutionary ecology, taxonomy, and systematics of avian malaria and related parasites. *Acta Tropica*, 204.
- Filellaa, X., Molinaa, R., & Ballestaa, A. M. (2002). Estructura y función de las citocinas. *Medicina Integral*, 39(2), 63-71.
- Gaffen, S. L., Jain, R., Garg, A. V., & Cua, D. J. (2014). The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nature reviews. Immunology*, 14(9), 585–600.
- Gardner, M. B., & Luciw, P. A. (2008). Macaque models of human infectious disease. *ILAR journal*, 49(2), 220–255.
- Garnham, P. C. (1966). Malaria Parasites and Other Haemosporidia. *Blackwell Scientific, Oxford*, 60-84.
- Gbedande, K., Carpio, V. H., & Stephens, R. (2020). Using two phases of the CD4 T cell response to blood-stage murine malaria to understand regulation of systemic immunity and placental pathology in Plasmodium falciparum infection. *Immunological Reviews*, 293(1), 88-114.
- Gonçalves, R. M., Lima, N. F., & Ferreira, M. U. (2014). Parasite virulence, co-infections and cytokine balance in malaria. *Pathogens and global health*, 108(4), 173–178.
- Good, M. F., & Doolan, D. L. (2010). Malaria vaccine design: immunological considerations. *Immunity*, 33(4), 555–566.
- Gowda, D., & Wu, X. (2018). Parasite Recognition and Signaling Mechanisms in Innate Immune Responses to Malaria. *Front Immunol*, 9, Front Immunol.

- Guilbride, D. L., Gawlinski, P., & Guilbride, P. D. (2010). Why functional pre-erythrocytic and bloodstage malaria vaccines fail: a meta-analysis of fully protective immunizations and novel immunological model. *PloS one*, *5*(5), e10685.
- Healer, J., Chiu, C. Y., & Hansen, D. S. (2017). Mechanisms of naturally acquired immunity to *P. falciparum* and approaches to identify merozoite antigen targets. *Parasitology*, *145*(7), 839-847.
- Henry, C. (2016). Artemisinina: El Famoso Fármaco Contra La Malaria Funciona Atacando Varias Proteínas Del Parásito. *Chemical & Engineering News*, *94*(1), ISSN 0009-2347.
- Hojo-Souza, N. S. (2017). On the cytokine/chemokine network during *Plasmodium vivax* malaria: new insights to understand the disease. *Malaria journal*, *16*(1), 42.
- Honda, T., Miyachi, Y., & Kabashima, K. (2011). Regulatory T cells in cutaneous immune responses. *Journal of dermatological science*, *63*(2), 75–82.
- Hurtado, L., Cumbreira, A., Rigg, C., Perea, M., Santamaría, A. M., Chaves, L. F., . . . Calzada, J. E. (2020). Long-term transmission patterns and public health policies leading to malaria elimination in Panamá. *Malaria Journal*(9), 265.
- Ioannidis, L. J., Nie, C. Q., & Hansen, D. S. (2014). The role of chemokines in severe malaria: more than meets the eye. *Parasitology*, *141*(5), 602–613.
- Ishida, H., Imai, T., Suzue, K., Hirai, M., Taniguchi, T., Yoshimura, A., . . . Hisaeda, H. (2013). IL-23 protection against *Plasmodium berghei* infection in mice is partially dependent on IL-17 from macrophages. *European journal of immunology*, *43*(10), 2696–2706.
- Jain, V., Singh, P. P., Silawat, N., Patel, R., Saxena, A., Bharti, P. K., . . . Singh, N. (2010). A preliminary study on pro- and anti-inflammatory cytokine profiles in *Plasmodium vivax* malaria patients from central zone of India. *Acta tropica*, *113*(3), 263–268.
- Karin, N. (2010). The multiple faces of CXCL12 (SDF-1 α) in the regulation of immunity during health and disease. *Journal of leukocyte biology*, *88*(3), 463–473.
- Keller, C. C., Yamo, O., Ouma, C., Ong'echa, J. M., Ounah, D., Hittner, J. B., . . . Perkins, D. J. (2006). Acquisition of Hemozoin by Monocytes Down-Regulates Interleukin-12 p40 (IL-12p40) Transcripts and Circulating IL-12p70 through an IL-10-Dependent Mechanism: In Vivo and In Vitro Findings in Severe Malarial Anemia. *Infection and immunity*, *74*(9), 5249–5260.
- Klei, T., Aglialoro, F., Mul, F., Tol, S., Ligthart, P. C., Seignette, I. M., . . . van Brugge, R. (2019). Differential interaction between DARC and SDF-1 on erythrocytes and their precursors. *Scientific reports*, *9*(1), 16245.
- Krishnegowda, G., Hajjar, A. M., Zhu, J., Douglass, E. J., Uematsu, S., Akira, S., . . . Gowda, C. D. (2005). Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *The Journal of biological chemistry*, *280*(9), 8606–8616.

- Lapinet, J. A., Scapini, P., Calzetti, F., Pérez, O., & Cassatella, M. A. (2000). Gene expression and production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta (IL-1beta), IL-8, macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha), MIP-1beta, and gamma interferon-inducible protein 10 by human neutrophils stimulated with group B meningococcus. *Infection and immunity*, *68*(12), 6917–6923.
- Luth, M. R., Gupta, P., Otilie, S., & Winzeler, E. A. (2018). Using in Vitro Evolution and Whole Genome Analysis To Discover Next Generation Targets for Antimalarial Drug Discovery. *ACS infectious diseases*, *4*(3), 301–314.
- Lyke, K. E., Burges, R., Cissoko, Y., Sangare, L., Dao, M., Diarra, I., . . . Szein, M. B. (2004). Serum Levels of the Proinflammatory Cytokines Interleukin-1 Beta (IL-1 β), IL-6, IL-8, IL-10, Tumor Necrosis Factor Alpha, and IL-12(p70) in Malian Children with Severe Plasmodium falciparum Malaria and Matched Uncomplicated Malaria or Healthy Controls. *Infection and immunity*, *72*(10), 5630–5637.
- Mahittikorn, A., Mala, W., Masangkay, F. R., Kotepui, K. U., Wilairatana, P., & Kotepui, M. (2022). Increased interferon- γ levels and risk of severe malaria: a meta-analysis. *Scientific reports*, *12*(1), 18917.
- Majumder, S., Bhattacharjee, S., Chowdhury, B. P., & Majumdar, S. (2012). CXCL10 is critical for the generation of protective CD8 T cell response induced by antigen pulsed CpG-ODN activated dendritic cells. *PloS one*, *7*(11), e48727.
- Malek, T. R. (2008). The biology of interleukin-2. *Annual review of immunology*(26), 453–479.
- Mancebo-Pérez, C., Vidal, M., Aguilar, R., Barrios, D., Bardají, A., Kaius, M. O., . . . Requena, P. (2022). Eotaxin-2 and eotaxin-3 in malaria exposure and pregnancy. *Malaria journal*, *21*(1), 336.
- Mandala, W. L., Msefula, C. L., Gondwe, E. N., Drayson, M. T., Molyneux, M. E., & MacLennan, C. A. (2017). Cytokine Profiles in Malawian Children Presenting with Uncomplicated Malaria, Severe Malarial Anemia, and Cerebral Malaria. *Clinical and vaccine immunology*, *24*(4), e00533-16.
- Mattingly, P. F. (1965). Evolution of Parasite-arthropod vector system. *Oxford: Blackwell Scientific Publications.*, 29-45.
- Matuschewski, K. (2017). Vaccines against malaria-still a long way to go. *The FEBS journal*, *284*(16), 2560–2568.
- Mbani-Mpega, C. N., Oyegue-Liabagui, S. L., Kouna, L. C., Imboumy, K. R., Tsafack, N. P., Okouga, A. P., . . . Lekana-Douki, J. B. (2021). Inflammatory cytokine responses in children with asymptomatic malaria infection living in rural, semi-urban and urban areas in south-eastern Gabon. *Clinical and Experimental Immunology*, *206*(3), 395–409.
- McCall, M. B., & Sauerwein, R. W. (2010). Interferon- γ —central mediator of protective immune responses against the pre-erythrocytic and blood stage of malaria. *Journal of Leukocyte Biology*, *88*(6), 1131-1143.

- McGeachy, M. J., Cua, D. J., & Gaffen, S. L. (2019). The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. *Immunity*, *50*(4), 892–906.
- Medana, I. m., Hunt, N. H., & Chaudhri, G. (1997). Tumor necrosis factor-alpha expression in the brain during fatal murine cerebral malaria: evidence for production by microglia and astrocytes. *The American journal of pathology*, *150*(4), 1473–1486.
- Megnekou, R., Lissom, A., Bigoga, J. D., & Djontu, J. C. (2015). Effects of Pregnancy-associated Malaria on T Cell Cytokines in Cameroonian Women. *Scandinavian journal of immunology*, *81*(6), 508–514.
- Milner, D. A. (2018). Malaria Pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*, *8*(1), a025569.
- Ministerio de Salud (MINSAL). (2022). *Guía de Abordaje Integral para la Eliminación de la Malaria en la República de Panamá*. Gaceta Oficial.
- Ministerio de Salud. (2018). *Plan Estratégico de Eliminación de la Malaria (PEEM) en Panamá, 2018-2022*. Panamá:: Ministerio de Salud.
- Ministerio de Trabajo, Previsión Social y Salud Pública. (1960). *Servicio Nacional de Erradicación de la Malaria (SNEM) 1956–1960. Informe del Programa de Erradicación de la Malaria*. Panamá, República de Panamá.
- Moreno-Pérez, D. A., García-Valiente, R., Ibarrola, N., Muro, A., & Patarroyo, M. A. (2017). The Aotus nancymae erythrocyte proteome and its importance for biomedical research. *Journal of proteomics*, *131–137*, 131–137.
- Mu, J., Joy, D. A., Duan, J., Huang, Y., Carlton, J., Walker, J., . . . Su, X.-Z. (2005). Host switch leads to emergence of Plasmodium vivax malaria in humans. *Molecular biology and evolution*, *22*(8), 1686–1693.
- Mueller, I., Galinski, M. R., Tsuboi, T., Arevalo-Herrera, M., Collins, W. E., & King, C. L. (2013). Natural Acquisition of Immunity to Plasmodium vivax: Epidemiological Observations and Potential Targets. *Advances in Parasitology*(81), 77-131.
- Naing, C., Whittaker, M. A., Nyunt Wai, V., & Mak, J. W. (2014). Is Plasmodium vivax Malaria a Severe Malaria?: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Neglect Trop Dis*.
- Obaldia 3rd, N., Baro, N. K., Calzada, J. E., Santamaria, A., Daniels, R., Wong, W., . . . Volkman, S. K. (2015). Clonal outbreak of Plasmodium falciparum infection in eastern Panama. *The Journal of infectious diseases*, *211*(7), 1087-96.
- Obeng-Adjei, N., Portugal, S., Tran, T. M., Yazew, T. B., Skinner, J., Li, S., . . . Crompton, P. D. (2015). Circulating Th1-Cell-type Tfh Cells that Exhibit Impaired B Cell Help Are Preferentially Activated during Acute Malaria in Children. *Cell reports*, *13*(2), 425–439.
- Offeddu, V., Thathy, V., Marsh, K., & Matuschewski, K. (2012). Naturally acquired immune responses against Plasmodium falciparum sporozoites and liver infection. *International journal for parasitology*, *42*(6), 535–548.

- Onishi, R. M., & Gaffen, S. L. (2010). Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology*, *129*(3), 311–321.
- OPS. (2021). *Malaria*. Obtenido de <https://www.paho.org/es/temas/malaria>
- Otieno, E. O. (2010). *ASSOCIATIONS BETWEEN SDF-1 ALPHA POLYMORPHISMS AND MALARIAL OUTCOMES IN CHILDREN AT SIAYA COUNTY REFERAL HOSPITAL, WESTERN KENYA*. Tesis de master, Kenyatta University .
- Oyegue-Liabagui, S. L., Bouopda-Tuedom, A. G., Lady, C. K., Sydney, M.-N., Nzoughe, H., Tchitoula-Makaya, N., . . . Lekana-Douki, J. B. (2017). Pro- and anti-inflammatory cytokines in children with malaria in Franceville, Gabon. *Am J Clin Exp Immunol*, *6*(2), 9–20.
- Pamplona, A., & Silva-Santos, B. (2021). $\gamma\delta$ T cells in malaria: a double-edged sword. *The FEBS journal*, *288*(4), 1118–1129.
- Parroche, P., Lauw, F. N., Goutagny, N., Latz, E., Monks, B. G., Visintin, A., . . . Golenbock, D. T. (2007). Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(6), 1919–1924.
- Plewes, K., Leopold, S. J., Kingston, H. W., & Dondorp, A. M. (2019). Malaria: what's new in the management of malaria? *Infectious Disease Clinics*, *33*(1), 39–60.
- Pohl, K., & Cockburn, I. A. (2022). Innate immunity to malaria: The good, the bad and the unknown. *Front Immunol*, *13*, 914598.
- Popa , G. L., & Popa, M. I. (2021). Avances recientes en la comprensión de la respuesta inflamatoria en la malaria: una revisión del papel dual de las citoquinas. *Journal of immunology research*, 7785180.
- Pradines, B., & Robert, M. (2019). Situation du paludisme dans le monde [Current situation of malaria in the world]. *La Revue du praticien*, *69*(2), 146-149.
- Prakash, D., Fesel, C., Jain, R., Cazenave, P. A., Mishra, G. C., & Pied, S. (2006). Clusters of cytokines determine malaria severity in Plasmodium falciparum-infected patients from endemic areas of Central India. *The Journal of infectious diseases*, *194*(2), 198–207.
- Prasasty, G. D., Leni, R. A., Anwar, C., & Handayani, D. (2018). Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF) Quantitative Analysis in Plasmodium Vivax-infected Malaria Patients Experiencing Thrombocytopenia. *Bioscientia Medicina*, *2*(2), 16-24.
- Punnath, K., Dayanand, K. K., Chandrashekhar, V. N., Achur, R. N., Kakkilaya, S. B., Ghosh, S. K., . . . Gowda, D. C. (2019). Association between inflammatory cytokine levels and anemia during Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax infections in Mangaluru: A Southwestern Coastal Region of India. *Tropical parasitology*, *9*(2), 98–107.
- Rai, D., Wilson, A. M., & Moosavi, L. (2022). *Histology, Reticulocytes*. En: StatPearls [Internet].

- Ramos, M., Trindade, J., Santana, J., & Francode, H. (2002). Stromal cell derived factor 1 synthesis by spleen cells in rodent malaria, and the effects of in vivo supplementation of SDF-1 α and CXCR4 receptor blocker. *Immunology Letters*, 83(1), 47-53.
- Raza, A., Khan, M. S., Ghanchi, N. K., Raheem, A., & Beg, M. A. (2014). Tumour necrosis factor, interleukin-6 and interleukin-10 are possibly involved in Plasmodium vivax-associated thrombocytopaenia in southern Pakistani population. *Malaria journal*, 1475-2875-13-323.
- Ren, M., Guo, Q., Guo, L., Lenz, M., Qian, F., Koenen, R. R., . . . Tang, W. J. (2010). Polymerization of MIP-1 chemokine (CCL3 and CCL4) and clearance of MIP-1 by insulin-degrading enzyme. *The EMBO journal*, 29(23), 3952–3966.
- Requena, P. C.-U.-H.-B., Siba, P. M., Bardají, A., Mueller, I., Rogerson, S., Menéndez, C., & Dobaño, C. (2014). Pregnancy and malaria exposure are associated with changes in the B cell pool and in plasma eotaxin levels. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 193(6), 2971–2983.
- Ribeiro, B., Cassiano, G. C., de Souza, R. M., Cysne, D. N., Grisotto, M. A., de Azevedo dos Santos, A. P., . . . Nascimento, F. R. (2016). Polymorphisms in Plasmodium vivax Circumsporozoite Protein (CSP) Influence Parasite Burden and Cytokine Balance in a Pre-Amazon Endemic Area from Brazil. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(3), e0004479.
- Riccio, E. K., Pratt-Riccio, L. R., Bianco-Júnior, C., Sanchez, V., Totino, P. R., Carvalho, L. J., & Daniel-Ribeiro, C. T. (2015). Molecular and immunological tools for the evaluation of the cellular immune response in the neotropical monkey Saimiri sciureus, a non-human primate model for malaria research. *Malaria journal*, 14, 166.
- Riley, E. M., Wahl, D. J., Perkins, J., & Schofield, L. (2006). Regulating immunity to malaria. *Parasite Immunol*, 28(1-2), 35-49.
- Rodrigues, R. N., Lima, J. d., Fonseca, B. P., Zuquim, P. R., Baldez, A., Storer, F. L., . . . de Oliveira, J. (2014). Alterations in cytokines and haematological parameters during the acute and convalescent phases of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 109(2), 154–162.
- Rossati, A., Bargiacchi, O., Kroumova, V., Zaramella, M., Caputo, A., & Garavelli, P. L. (2016). Climate, environment and transmission of malaria. *Le Infezioni in Medicina*(2), 93-104.
- Ryg-Cornejo, V., Ly, A., & Hansen, D. S. (2016). Immunological processes underlying the slow acquisition of humoral immunity to malaria. *Parasitology*, 143(2), 199-207.
- Salwati, E., Minigo, G., Woodberry, T., Piera, K. A., de Silva, H. D., Kenangalem, E., . . . Plebanski, M. (2011). Differential cellular recognition of antigens during acute Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax malaria. *The Journal of infectious diseases*, 203(8), 1192–1199.
- Santamaría, A. M., Vásquez, V., Rigg, C., Moreno, D., Romero, L., Justo, C., . . . Calzada, J. E. (2020). Plasmodium falciparum Genetic Diversity in Panamá Based on glurp, msp-1 and msp-2 Genes: Implications for Malaria Elimination in Mesoamerica. *Life (Basel, Switzerland)*, 10(12), 319.
- Schoch CL, et al. A comprehensive update on curation, resources and tools. (2020). *NCBI Taxonomy*.

- Serrano-Medina, L., & Suarez-Ferro, Y. (2019). Características generales e inmunológicas de *Aotus* sp. y su importancia como modelo animal no humano -revisión bibliográfica. *Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca*.
- Sexton, A. C., Good, R. T., Hansen, D. S., Ombrain, M. C., Buckingham, L., Simpson, K., & Schofield, L. (2004). Transcriptional profiling reveals suppressed erythropoiesis, up-regulated glycolysis, and interferon-associated responses in murine malaria. *The Journal of infectious diseases*, *189*(7), 1245–1256.
- Sharma, S., DeOliveira, R. B., Kalantari, P., Parroche, P., Goutagny, N., Jiang, Z., . . . Golenbock, D. T. (2011). Innate immune recognition of an AT-rich stem-loop DNA motif in the *Plasmodium falciparum* genome. *Immunity*, *35*(2), 194–207.
- Shio, M. T., Eisenbarth, S. C., Savaria, M., Vinet, A. F., Bellemare, M. J., Harder, K. W., . . . Olivier, M. (2009). Malarial hemozoin activates the NLRP3 inflammasome through Lyn and Syk kinases. *PLoS pathogens*, *5*(8), e1000559.
- Singh, R. P., Kashiwamura, S. i., Rao, P., Okamura, H., Mukherjee, A., & Singh, V. (2002). The Role of IL-18 in Blood-Stage Immunity Against Murine Malaria *Plasmodium yoelii* 265 and *Plasmodium berghei* ANKA. *Journal of immunology*, *168*(9), 4674–4681.
- Sommer, C., & White, F. (2010). Cytokines, Chemokines, and Pain. En L. D. em: Beaulieu P, *Pharmacology of Pain* (págs. 279-302). 1st Ed, Seattle: IASP Press.
- Stevenson, M. M., & Riley, E. M. (2004). Innate immunity to malaria. *Nature reviews. Immunology*, *4*(3), 169–180.
- Stevenson, M. M., Ing, R., Berretta, F., & Miu, J. (2011). Regulating the adaptive immune response to blood-stage malaria: role of dendritic cells and CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *International journal of biological sciences*, *7*(9), 1311–1322.
- Stoiser, B., Looareesuwan, S., Thalhammer, F., Daxböck, F., Chullawichit, S., El-Menyawi, I., . . . Burgmann, H. (2000). Serum concentrations of granulocyte-colony stimulating factor in complicated *Plasmodium falciparum* malaria. *European cytokine network*, *11*(1), 75–80.
- Toche, P. (2012). Visión panorámica del sistema inmune. *Revista Médica Clínica Las Condes*, *23*(4), 446-457.
- Tran, G. T., Wilcox, P. L., Dent, L. A., Robinson, C. M., Carter, N., Verma, N. D., . . . Hodgkinson, S. J. (2017). Interleukin-5 Mediates Parasite-Induced Protection against Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Association with Induction of Antigen-Specific CD4⁺CD25⁺ T Regulatory Cells. *Frontiers in immunology*, *8*, 1453.
- Tran, T. M., Li, S., Doumbo, S., Doumtabe, D., Huang, C. Y., Dia, S., . . . Crompton, P. D. (2013). An intensive longitudinal cohort study of Malian children and adults reveals no evidence of acquired immunity to *Plasmodium falciparum* infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, *57*(1), 40-47.
- Usynin, I., Klotz, C., & Frevert, U. (2007). Malaria circumsporozoite protein inhibits the respiratory burst in Kupffer cells. *Cellular microbiology*, *9*(11), 2610–2628.

- Valkiunas, G. (2005). *Avian Malaria Parasites and other Haemosporidia* (1st ed. ed.). CRC Press.
- Varo, R., Chaccour, C., & Bassat, Q. (2020). Update on malaria. *Medicina clinica*, 155(9), 395-402.
- Waisberg, M., Cerqueira, G. C., Yager, S. B., Francischetti, I. M., Lu, J., Gera, N., . . . Pierce, S. K. (2012). Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 blocks the proinflammatory protein S100P. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(14), 5429–5434.
- Wang, M. l., Feng, Y. h., Pang, W., Qi, Z. m., Zhang, Y., Guo, Y. j., . . . Cao, Y. m. (2014). Parasite densities modulate susceptibility of mice to cerebral malaria during co-infection with Schistosoma japonicum and Plasmodium berghei. *Malaria Journal*, 13(116).
- WHO. (1988). Role of non-human primates in malaria vaccine development: Memorandum from a WHO Meeting. 66(6), 719–28.
- Wilairatana, P., Mala, W., Milanez, G. D., Masangkay, F. R., Kotepui, U., & Kotepu, M. (2022). Increased interleukin-6 levels associated with malaria infection and disease severity: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, 12.
- World Health Organization . (2021). *World Malaria Report 2021*.
- World Health Organization (WHO). (2022). *World malaria report 2022*.
- Wykes, M. N., & Good, M. F. (2009). What have we learnt from mouse models for the study of malaria? *European journal of immunology*, 39(8), 2004–2007.
- Yadava, A., Hall, C. E., Sullivan, J. S., Nace, D., Williams, T., Collins, W. E., . . . Barnwell, J. W. (2014). Protective efficacy of a Plasmodium vivax circumsporozoite protein-based vaccine in Aotus nancymaae is associated with antibodies to the repeat region. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(10), e3268.
- Zerka, A., Kaczmarek, R., & Jaśkiewicz, E. (2015). [From malaria parasite point of view--Plasmodium falciparum evolution]. *Postepy Hig Med Dosw*, 69, 1519–1529.
- Zheng, J., Pan, H., Gu, Y., Zuo, X., Ran, N., Yuan, Y., . . . Wang, F. (2019). Prospects for Malaria Vaccines: Pre-Erythrocytic Stages, Blood Stages, and Transmission-Blocking Stages. *BioMed research international*, 9751471.

ANEXOS

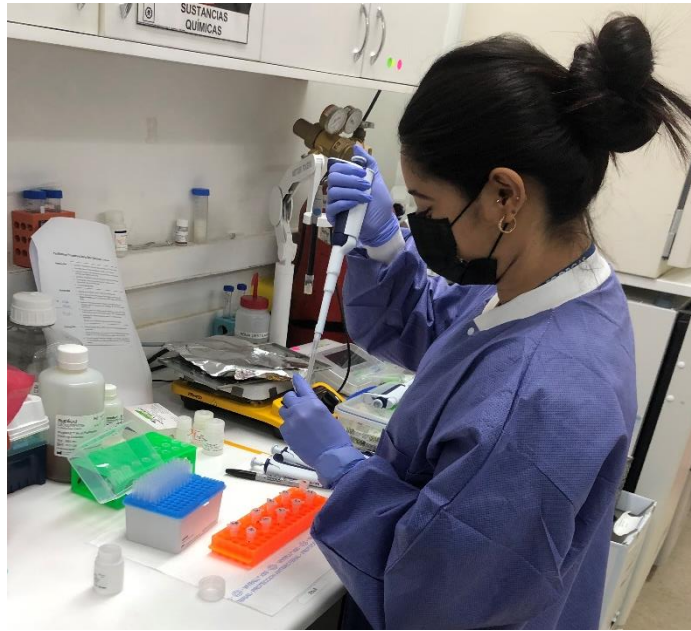


Figura 23. Extracción de ADN

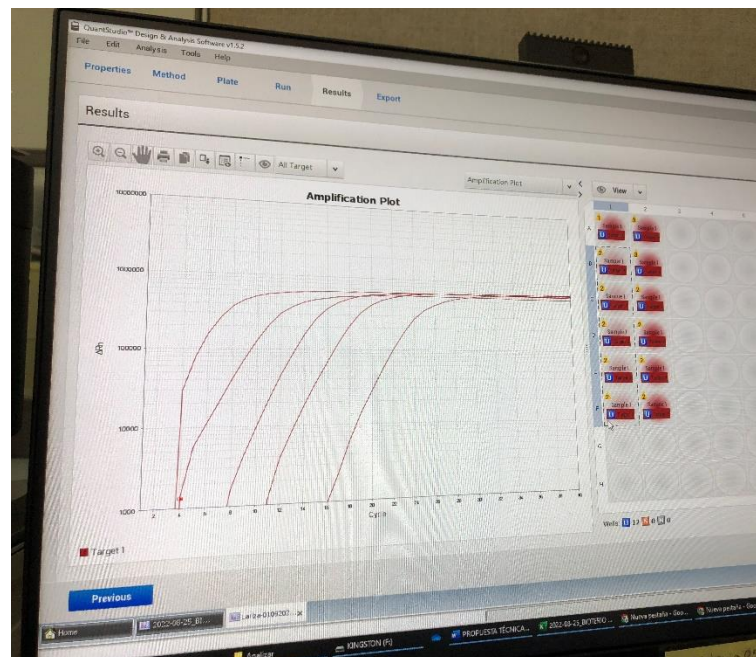


Figura 24. Estandarización de cebadores en el Sistema Real-Time PCR QuantStudio 5 de Applied Biosystems



Figura 25. Preparación de plasma



Figura 26. Sistema Luminex™ 100/200, Magpix™.