

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA



UNAP

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Escuela de Formación Profesional de
Ciencias Biológicas

**“EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL DE PACIENTES CON
MALARIA ASINTOMÁTICA FALCIPARUM CONTRA ANTÍGENOS
EXCRETADOS – SECRETADOS DE *Plasmodium falciparum* EN CULTIVO *in
vitro*“**

TESIS

Requisito para optar el título profesional de

BIÓLOGO

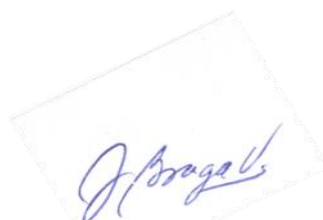
AUTOR

RAFAEL JOSÉ LUIS SAAVEDRA LANGER

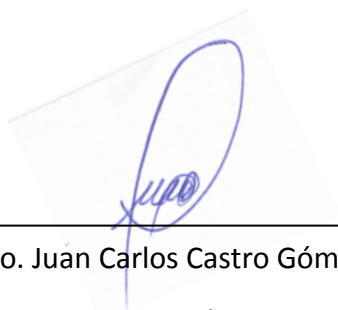
IQUITOS – PERÚ

2017

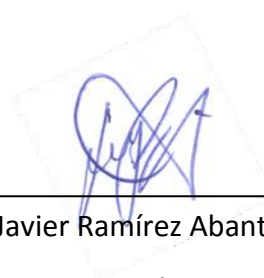
JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "J. Braga Vela", is enclosed within a faint, tilted rectangular border.

Blga. Janeth Braga Vela, Dra.
Presidente

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Juan Carlos Castro Gómez", is enclosed within a faint, tilted rectangular border.

Blgo. Juan Carlos Castro Gómez, Dr.
Miembro

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Javier Ramírez Abanto", is enclosed within a faint, tilted rectangular border.

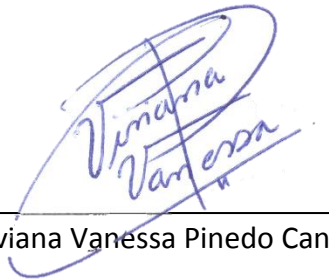
Blgo. Javier Ramírez Abanto, MSc.
Miembro

ASESORES



Blgo. Jorge Luis Marapara Del Águila, Dr.

Asesor



Blga. Viviana Vanessa Pinedo Cancino, Dra.

Asesora

ACTA DE SUSTENTACIÓN



UNAP

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Dirección de Escuela de Formación
Profesional de Ciencias Biológicas

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N° 008

Iquitos, 11 de mayo de 2017


En la ciudad de Iquitos, a los once días del mes de mayo de 2017 y, siendo las 12:10 horas; se reunió en el Auditorio de las Direcciones de Escuelas de la Facultad de Ciencias Biológicas - UNAP el Jurado Calificador y Dictaminador de la Tesis que suscribe, designado con Resolución Directoral N° 113-2015-DEFP-B-FCB-UNAP, presidido e integrado por Blga. JANETH BRAGA VELA, Dra., (Presidente); Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ, Dr., (Miembro) y Blgo. JAVIER RAMIREZ ABANTO, M.Sc. (Miembro); para escuchar, examinar y calificar la sustentación y defensa de la Tesis titulada "EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL DE PACIENTES CON MALARIA ASINTOMÁTICA FALCIPARUM CONTRA ANTÍGENOS EXCRETADOS-SECRETADOS DE *Plasmodium falciparum* EN CULTIVO *in vitro*", por el Bachiller RAFAEL JOSÉ LUIS SAAVEDRA LANGER de la Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela de Formación Profesional de Ciencias Biológicas, de la promoción 2015-II, graduado de bachiller con R.R. N° 0764-2016-UNAP de fecha 01 de julio de 2016 reconociendo como asesores: Blgo. JORGE LUIS MARAPARA DEL ÁGUILA, Dr. y como asesora Blga. VIVIANA VANESSA PINEDO CANCINO, Dra.

Durante todo el desarrollo de la sustentación y defensa de la Tesis, el Jurado Calificador y Dictaminador considerando lo establecido en el nuevo Reglamento de Grados y Títulos, aprobado y puesto en vigencia mediante RESOLUCIÓN DECANAL N° 206-2012-FCB-UNAP; realizó la evaluación del desempeño del bachiller, considerando los criterios y el puntaje consignados en la tabla de valoración.

Culminado el acto, el Jurado Calificador y Dictaminador, con el puntaje alcanzado por el bachiller y aplicando los términos establecidos en la tabla de calificación; dió como veredicto: Aprobar muy buena; LA SUSTENTACIÓN DE TESIS, CALIFICADO COMO apto; quedando en consecuencia el candidato apto para ejercer la profesión de Biólogo, previo otorgamiento del Título Profesional por la autoridad universitaria competente y, su correspondiente inscripción al Colegio de Biólogos del Perú.

Finalmente, el Presidente del Jurado Calificador y Dictaminador levantó la sesión siendo las 13:40 horas y en fe de lo cual, todos los integrantes suscriben la presente Acta de Sustentación por triplicado.


Blga. Janeth Braga Vela, Dra.
PRESIDENTE


Blgo. Juan Carlos Castro Gómez, Dr.
MIEMBRO


Blgo. Javier Ramírez Abanto, M.Sc.
MIEMBRO

Dirección: Plaza Serafín Filomeno S/N, Iquitos, Perú
Teléfono: 236121

www.unapiquitos.edu.pe
e-mail: fcbb@unapiquitos.edu.pe

[Signature]
Blgo. Javier Souza Tecco, M.S.
SECRETARIO ACADEMICO



[Signature]
Eméida Tejada Del Castillo
Jefa de Registro y Servicios Académicos



[Signature]

[Signature]

[Signature]

DEDICATORIA

Con mucho cariño y amor a mis padres RAFAEL SAAVEDRA PEREA y ALICIA LANGER ANGULO por darme la vida, motivación y ser un gran ejemplo de trabajo y sacrificio. Enseñarme a siempre seguir adelante. A mi hermana ALICIA RAFAELA por su amor e incondicional apoyo. A todas aquellas personas que hicieron posible que esta investigación se desarrolle.

AGRADECIMIENTO

A mi alma mater, la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, por ser fuente de conocimiento en nuestra región Loreto, mediante la cual pude realizar mis estudios de pre grado.

A la Facultad de Ciencias Biológicas y Escuela de Formación Profesional de Biología, por guiarme en el camino de la investigación, conservación y el desarrollo sostenible de la amazonía. Por su visión integral de lo que significa ser biólogo.

Al Blgo. Dr. Jorge Marapara Del Águila, por guiarme en el camino de la investigación, por sus consejos, enseñanzas y gran apoyo para la realización de esta tesis de pre grado. ¡Muchas gracias!

A la Blga. Dra. Viviana Vanessa Pinedo Cancino, por su incansable labor siendo guía y mentora. Gracias a sus consejos y apoyo esta investigación se pudo desarrollar satisfactoriamente. ¡Muchas gracias!

A la Br. Katty Madeleine Arista Flores, por el apoyo y consejos en el desarrollo de la prueba de ELISA. ¡Muchas gracias!

A la Br. María Vásquez Chasnamote, por el apoyo, compañía y consejos durante el cultivo *in vitro*. Las noches de desvelo hicieron posible este trabajo. ¡Muchas gracias!

Al Br. Andrei Arana Carvalho, por el apoyo en el desarrollo de esta investigación. Tu colaboración hizo posible esta investigación. ¡Muchas gracias!

A las Brs. Marilly Donayre Urquiza y Saby Pinedo Sotelo, por el gran apoyo, consejos y paciencia durante el desarrollo de las pruebas serológicas. ¡Muchas gracias!

A todos los integrantes del proyecto MIGIA, por el apoyo, colaboración y ánimos puestos hacia mi persona para el desarrollo satisfactorio de este proyecto. ¡Muchas gracias!

A mi familia, por siempre estar detrás de mí apoyándome y empujando para seguir adelante. Por la comprensión de mis ausencias durante este tiempo. ¡Muchas gracias!

A los amigos, compañeros y conocidos que directa o indirectamente apoyaron en el desarrollo de esta investigación, no lo hubiese podido lograr sin ustedes. ¡Muchas gracias!

A INNOVATE PERÚ por haber financiado esta investigación a través del Proyecto 385-PNICP-PIBA-2014. ¡Muchas gracias!

INDICE DE CONTENIDOS

JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR.....	ii
ASESORES.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
INDICE DE CONTENIDOS.....	viii
LISTA DE TABLAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ANEXOS.....	xii
RESUMEN.....	xii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Generalidades de Malaria.....	4
2.2. Epidemiología.....	5
2.3. Taxonomía.....	7
2.4. Ciclo Biológico.....	7
2.5. Anticuerpos.....	10
2.6. Antígenos.....	11
2.7. Antígenos Excretados – Secretados.....	12
2.8. Respuesta Inmune Humoral.....	13
2.9. Respuesta Inmune a Infecciones por <i>Plasmodium</i>	15
2.10. Estudios sobre los ESAs de <i>P. falciparum</i>	16
2.11. Evaluación de la Respuesta Inmune Humoral en <i>P. falciparum</i>	21
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1. Área de Estudio.....	23
3.2. Población y Muestra.....	23
3.3. Material Biológico.....	24
3.4. Metodología.....	24
3.4.1. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>P. falciparum</i>	24

3.4.2. Antígenos Excretados – Secretados.....	25
3.4.3. Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA).....	25
3.5. Cálculo de Parámetros Inmunodiagnósticos.....	26
IV. RESULTADOS.....	27
4.1. Evaluación de los parámetros inmunodiagnósticos de los ESAs.....	27
4.1.1. Cálculo del Umbral de Reactividad.....	27
4.1.2. Sensibilidad en pacintes positivos a malaria.....	31
4.1.3. Especificidad.....	33
V. DISCUSIÓN.....	35
VI. CONCLUSIONES.....	38
VII. RECOMENDACIONES.....	39
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
IX. ANEXOS.....	60

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 - Umbral de reactividad de ESAs – AT, ESAs – TE y ESAs – Pool obtenidas por la Σ Abs $_{450nm}$ + 3SD y curva COR.....	30
Tabla 2 - Porcentaje de sensibilidad de ESAs – A, ESAs – TE y ESAs – ME calculada por la Σ Abs $_{450nm}$ + 3SD y curva COR de plasma de pacientes positivos a malaria falciparum.....	32
Tabla 3 - Porcentaje de sensibilidad relativa de ESAs –A, ESAs – TE y ESAs – Pool de acuerdo con el cuadro clínico de los 40 pacientes positivos a malaria falciparum.....	33
Tabla 4 - Porcentaje de especificidad de ESAs – A, ESAs –TE y ESAs – ME obtenidas por dos análisis del cálculo UR.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida de <i>P. falciparum</i>	10
Figura 2 - a, representación esquemática de la estructura de una molécula de anticuerpo; ilustra la composición de cuatro cadenas y los dominios separados que forman cada una. b, se muestra una representación esquemática simplificada de una molécula de anticuerpo.....	11
Figura 3 - Exoantígenos de <i>P. falciparum</i> . Prepresenta la ubicación de estos en el eritrocito infectado.....	13
Figura 4 - Etapas de una respuesta inmune humoral, expresadas como título de anticuerpos: Fase de latencia, logarítmica, de meseta y de decadencia.....	14
Figura 5 - Diferencias entre las respuestas inmune humoral primaria y secundaria, con respecto a la clase de inmunoglobulinas y a título de los anticuerpos. Destaca que en la respuesta primaria, se sintetiza primero IgM en bajo título y en la respuesta secundaria predomina la síntesis de IgG, en un título significativamente superior.....	15
Figura 6 - Cálculo del umbral de reactividad de ESAs – ME por la curva COR, la intersección de las líneas indica el punto de corte de 0.280.	28

Figura 7 - Cálculo del umbral de reactividad de ESAs – A por la curva COR, la intersección de las líneas indica el punto de corte de 0.240.	29
Figura 8 - Cálculo del umbral de reactividad de ESAs – TE por la curva COR, la intersección de las líneas indica el punto de corte de 0.223.....	29
Figura 9 - Distribución de la reactividad de los diferentes antígenos evaluados.....	30
Figura 10 - Distribución de la reactividad de plasmas positivos a <i>P. falciparum</i> (asintomáticos y sintomáticos) para los tres antígenos. La línea roja horizontal indica el punto de corte.....	33
Figura 11 - Distribución de la reactividad de controles negativos (CN) y otras infecciones (OI) para los tres antígenos. La línea roja horizontal indica el punto de corte.....	34

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 - Mapa Comunidad de Zungarococha.....	59
Anexo 2 - Consentimiento informado Comité de ética University of New York.....	60
Anexo 3 - Flujograma de Cultivo <i>in vitro</i> de <i>P. falciparum</i>	66
Anexo 4 - Flujograma prueba de ELISA.....	67

RESUMEN

Malaria es prioridad para la Organización Mundial de la Salud. La región Loreto, en la Amazonía peruana es el área más afectada por esta enfermedad, donde infecciones asintomáticas y con baja densidad dificultan el control y eliminación de malaria. *Plasmodium falciparum* (*Pf*) presenta una gran variación antigénica asociada a su membrana que le permite evadir el sistema inmune del huésped, siendo los antígenos excretados – secretados (ESAs) actores importantes en el desarrollo de la inmunidad a malaria. Nuestro objetivo fue evaluar la respuesta inmune humoral de pacientes con malaria asintomática *falciparum* contra ESAs de *Pf* obtenidos en cultivo *in vitro*. Para el cultivo *in vitro* seguimos el protocolo de “candle jar” en medio RPMI – 1640 suplementado con AlbuMax II al 5% y atmósfera de CO₂ al 5%. ESAs fueron obtenidos a partir de parasitemias del 20% en medio RPMI – 1640 a 37°C y evaluados por ELISA contra plasma de pacientes sintomáticos y asintomáticos (confirmado por microscopía y PCR), controles negativos y muestras de otras infecciones. Obteniendo ESAs-ME con sensibilidad del 85% y especificidad del 92.9%, y observando diferencias entre los títulos de pacientes sintomáticos y asintomáticos. Demostrando las ventajas de los ESAs en la investigación de la respuesta inmune en malaria asintomática.

Palabras clave: *P. falciparum*, Amazonía, exoantígenos, ELISA.

I. INTRODUCCIÓN

Malaria es una enfermedad causada por parásitos Apicomplexos del género *Plasmodium*, causante de 214 millones de casos clínicos con una secuela de 438 000 muertes en el año 2015⁽¹⁾. Afectando a 3,2 millones de personas que habitan en áreas tropicales y subtropicales⁽²⁾, lo que de por sí genera un importante problema socioeconómico y de salud para la mitad de la población mundial, estimando los costos en cerca de 12 millones de dólares por año⁽³⁾.

En América, alrededor de 20 millones de personas se encuentran en alto riesgo de contraer malaria (incidencia >1 por 1000 habitantes)⁽¹⁾.

En Perú, se reportaron en 2015 alrededor de 62 200 casos, que afectan las regiones de la costa norte y la amazonia⁽³⁾, principalmente el departamento de Loreto, que ha representado históricamente la mayor carga de malaria en el país⁽⁴⁾. Dicho año, en esta región se reportaron 59 000 casos, entre *Plasmodium vivax* (*P. vivax*) y *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*)⁽⁵⁾.

P. falciparum pese a tener una menor incidencia es el parásito más agresivo de las especies del género *Plasmodium* que afectan al hombre, debido a la alta diversidad genética del que se sirve para evadir la respuesta inmunológica, resistir al tratamiento antimalárico y causar la potencialmente letal malaria severa⁽⁵⁾, a esta situación se suma la presencia de infecciones asintomáticas y de baja densidad, que dificultan la eliminación de esta enfermedad. Los datos sugieren que los reservorios humanos asintomáticos pueden ser los responsables de la mayoría de las infecciones en zonas de baja transmisión contribuyendo a la propagación de la enfermedad⁽⁶⁻¹⁵⁾.

Aún no está claro la ausencia de síntomas; se sugiere la existencia de una interrelación entre el sistema inmune del huésped, condiciones ambientales y factores asociados al parásito. Entre los que se destacan la variación de antígenos de membrana y proteínas secretadas por *Plasmodium*, que son usadas para contrarrestar y estimular la inmunidad del hospedero, posibles factores que interfieren en la clínica de la infección ⁽¹⁶⁻²⁹⁾.

Esto abre la posibilidad de emplear los antígenos excretados – secretados (ESAs) de *P. falciparum* en la evaluación de la respuesta inmune humoral (anticuerpos IgG) en la misma forma como se viene haciendo con un gran número de otras parasitosis, donde los ESAs presentan diversa utilidad; desde estudios de infecciones en el ganado^(30,31), hasta el desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento del asma crónico⁽³²⁾. Son reconocidos por su potencial uso en vacunas contra la *Haemonchus contortus*⁽³³⁾, y otros Apicomplexos como *Toxoplasma gondii*⁽³⁴⁻³⁶⁾ *Leishmania spp* ⁽³⁷⁻³⁸⁾. También se emplea en el diagnóstico serológico de *Fasciola hepatica*, *Trypanozoma cruzi*, *Giardia intestinalis*, *Trichinella spiralis*⁽³⁹⁻⁴⁸⁾ donde se observó elevada sensibilidad y especificidad. A partir de estos resultados se empezó a seleccionar del cóctel antigénico, proteínas específicas como biomarcadores de infección⁽⁴⁹⁾. En estos términos se comprobó la existencia de una relación entre los ESAs de *P. falciparum* in vivo e in vitro, que permite comprender los mecanismos intervinientes en la interrelación hospedero-parásito⁽⁵⁰⁻⁵³⁾.

Estudios realizados a los ESAs, permitió caracterizarlos, aislándolos del medio de cultivo, para así concentrarlos para el desarrollo de inmunoensayos, dando como

resultado la estimulación del sistema inmune, reactividad frente a sueros en pruebas serológicas, inmunización de primates no humanos, reconocimiento y caracterización de nuevas proteínas⁽⁵⁰⁻⁶⁷⁾, pero sin indagar la implicancia de estos antígenos en el estudio y detección de casos asintomáticos de la enfermedad.

En este contexto, esta investigación tiene como objetivo evaluar la respuesta inmune humoral (anticuerpos IgG) de pacientes con malaria asintomática frente a los antígenos excretados secretados de *P. falciparum*; detallando las condiciones físicas, químicas y biológicas óptimas en el proceso de producción antigénica.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades de Malaria

Etimológicamente, la palabra malaria, proviene del italiano “mal’aria”, que significa “mal aire”, relacionando así a la enfermedad con los malos olores de los pantanos. Llamada también paludismo, del latín “palud”, que significa pantanoso^(68,69).

Los parásitos del género *Plasmodium*, fueron descubiertos por Charles Louis Alphonse Laveran, cirujano del ejército francés, en 1880; se transmiten al ser humano por la picadura de mosquitos infectados del género *Anopheles*⁽⁷⁰⁾, hecho demostrado por el oficial británico Ronald Ross en 1887⁽⁶⁸⁾.

Existen cinco especies de *Plasmodium*, que se transmiten al ser humano por la picadura de especies infectadas del género *Anopheles*, estos son *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* (dos especies), *P. malariae* y *P. knowlesi*, cuyas infecciones, se dan a la vez en primates no humanos. Las tasas de transmisión de esta parasitosis pueden variar dependiendo de factores locales, como la estación de lluvias, la proximidad de los criaderos de mosquitos y las especies de estos en la zona^(68,71).

Los primeros síntomas de esta dolencia son inespecíficos y similares a los de una enfermedad viral sistémica menos grave.⁽⁷²⁾

2.2. Epidemiología

Malaria hace su ingreso al Perú en el siglo XVI durante la invasión ibérica al Tahuantinsuyo. Como resultado, habría predominado en un inicio en las llanuras costeras, estribaciones de los Andes y valles interandinos⁽⁷³⁾.

Hasta inicios del siglo XX, los Andes dividieron geográficamente la transmisión de malaria a la costa del Pacífico y la selva amazónica. En ambas regiones, la exposición desde la niñez concedía inmunidad parcial a las dolencias clínicas en sus habitantes. Mientras que las poblaciones en los andes se encontraban inmunológicamente desprotegidos a esta enfermedad, debido a la ausencia del vector a alturas mayores a los 1 500 msnm⁽⁷⁴⁾.

El incremento de la migración de las poblaciones andinas durante la colonización de la selva, y en la estación de siembra y cosecha a las plantaciones costeras, época de coincidía con el aumento de la población de *Anopheles spp*, sumado al pobre acceso a prácticas preventivas y al tratamiento post infección; los migrantes, quienes ya se encontraban con desventajas inmunológicas, contribuyeron a la aparición de las primeras epidemias en el Perú. Lo que conllevó al gobierno peruano a tomar participación activa en el control y erradicación de los vectores de esta enfermedad, sin embargo, en la década de 1980 la campaña de erradicación y los programas de fumigación fueron descuidados⁽⁷⁴⁾.

En 1988 se reportó por primera vez a *P. falciparum* en la región Loreto y entre los años 1995 – 1998, en la zona que rodea la ciudad de Iquitos, hubo una epidemia de *P. falciparum* y *P. vivax*, resultado del abandono de las campañas

nacionales de fumigación con dicloro difenil tricloroetano (DDT). Desde esta epidemia, malaria ha seguido siendo detectada en la región Loreto con una incidencia anual de la infección por *P. falciparum* y *P. vivax* que varía entre 5 y 50 casos / 1.000 personas⁽⁷⁵⁾.

En el siglo XXI la incidencia de malaria ha ido disminuyendo progresivamente, con excepción del año 2012 donde se dio un incremento de los casos, ascendiendo a 31 000 personas, alcanzando el clímax en 2014 donde en solo dos años los casos de malaria se duplicaron. Desde esta fecha inició el declive de la incidencia, que se mantiene hasta estos días⁽³⁾.

Pero, al ser la detección pasiva de casos en los puestos de salud del Ministerio de Salud (MINSA, el método fundamental de lucha contra el paludismo no se puede reflejar con precisión la incidencia y velocidad de transmisión de malaria, especialmente las infecciones asintomáticas y con baja densidad de parásitos en sangre, que son los contribuyentes sustanciales en la transmisión y son obstáculos de los programas de control y erradicación de esta enfermedad⁽⁷⁵⁾.

2.3. Taxonomía

Súper Reino	: Eucariota
Reino	: Protista
Super Filo	: Alveolata
Filo	: Apicomplexa
Clase	: Aconoidasida
Orden	: Haemosporida
Familia	: Plasmodiidae
Género	: Plasmodium
Subgénero	: <i>Plasmodium</i> (Laverania)
Especie	: <i>Plasmodium falciparum</i>

Plasmodium falciparum pertenece al reino protista⁽⁷⁶⁻⁷⁸⁾.

2.4. Ciclo Biológico

El ciclo biológico del parásito está dividido en dos fases, una en el vector y otra en el hospedero (Figura 1).

2.4.1. Ciclo Sexual (vector):

Las hembras de mosquitos del género *Anopheles*, se infectan al ingerir sangre de una persona con parásitos sexualmente diferenciados micro y macrogametocitos. Estas formas sexuadas entran al estómago del mosquito, los microgametocitos comienzan el proceso de exflagelación, convirtiéndose en microgametos, que al liberarse

buscan las células femeninas para fecundarlas. Los macrogametocitos maduran y se transforman en macrogametos; en cada uno de éstos se forman de 1 a 2 cuerpos polares que se mueven a la superficie del parásito, para recibir al microgameto que los fecundará. Ocurre así la fusión de sus cromatinas, para conformar el cigoto. Este, a la vez se transforma en un ooquinetto, el cual penetra la pared del estómago del mosquito. Allí crece forma el ooquiste, donde ocurre la división del núcleo y el citoplasma, generando los esporozoítos⁽⁷⁹⁾. Estos se localizan en las glándulas salivares, donde permanecen hasta ser inoculados al hombre durante una nueva picadura⁽⁷⁹⁾.

2.4.2. Ciclo Asexual:

Se desarrolla completamente en el hospedero infectado.

2.4.2.1. Etapa Pre eritrocítica:

Una hora después de la inoculación, los esporozoítos llegan al hígado, invadiendo los hepatocitos, donde se forma el esquizonte tisular primario. Después de 6 a 12 se lisa y libera miles de merozoítos tisulares, los cuales van a la circulación para invadir los eritrocitos⁽⁷⁹⁾.

2.4.2.2. Etapa Eritrocítica:

Después de la invasión toman inicialmente forma anillada, denominados trofozoítos (anillos) que al madurar adquieren una configuración ameboide. Al dividir su cromatina se constituye el esquizonte, que madura y toma forma de roseta. *P. falciparum* realiza la formación de esquizontes en los eritrocitos adheridos a las paredes de los capilares viscerales^(79,80).

El esquizonte maduro al romper el eritrocito liberando merozoitos, suceso que se repite cada 48 horas en *P. falciparum*. Cada una de estas formas del parásito invade un nuevo eritrocito y da comienzo a otro ciclo eritrocítico⁽⁷⁹⁾.

Algunos merozoítos, al parecer, tienen una determinación genética para constituir los gametocitos, que circulan como formas infectantes para los mosquitos y no producen sintomatología en el hombre^(79,80).

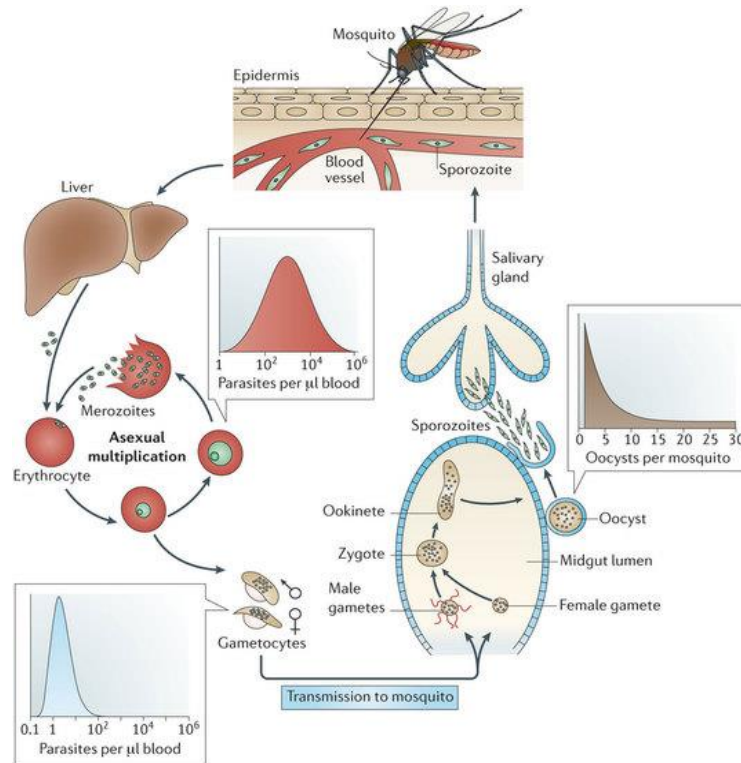


Figura 1 - Ciclo de vida de *P. falciparum*, Bousema et al, 2014 ⁽⁸¹⁾.

2.5. Anticuerpos

Los anticuerpos, también llamados inmunoglobulinas, son moléculas solubles o anclados a la membrana de las células B. Están constituidas por dos cadenas pesadas (H) de masa relativa entre 50-55 kDa y dos cadenas livianas que pesan de 20-25 kDa⁽⁸²⁾. Están organizadas en tres fragmentos evidenciados por primera vez por Porter en 1959, dos fragmentos de unión al antígeno (Fab) que está compuesto por una cadena liviana y una pesada, que participan como sitio de unión al antígeno y un fragmento cristalizante (Fc) que está formado por las dos cadenas pesadas restantes, además tiene sitios de unión para el sistema del complemento (Figura 2)^(82, 83).

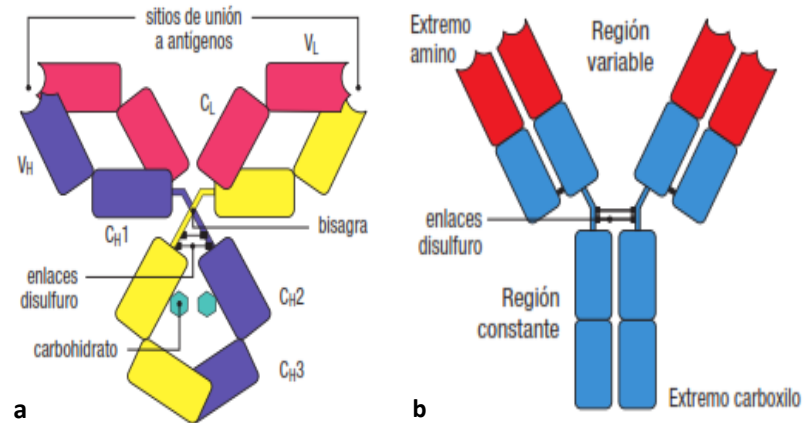


Figura 2 - a, representación esquemática de la estructura de una molécula de anticuerpo; ilustra la composición de cuatro cadenas y los dominios separados que forman cada una. b, se muestra una representación esquemática simplificada de una molécula de anticuerpo⁽⁸³⁾.

Los anticuerpos contribuyen con la respuesta inmune de tres maneras principales. La primera se conoce como neutralización, en la que se unen al patógeno con el fin de evitar la invasión a la célula diana, “neutralizándolo”. En segundo lugar, los anticuerpos unidos al patógeno son reconocidos por los fagocitos mediante receptores llamados receptores Fc que se unen a la región constante del anticuerpo. En tercer lugar, los anticuerpos que cubren al patógeno pueden activar las proteínas del sistema del complemento por medio de la vía clásica^(83, 84).

2.6. Antígenos

Son compuestos de diversa naturaleza química, biológica o física, provenientes del ambiente o generados por el propio organismo, que son capaces de inducir una respuesta inmunológica en los vertebrados, propiedad

denominada inmunogenicidad. La interacción del antígeno con los productos de la respuesta inmune y especialmente, con los anticuerpos ha permitido conocer la estructura y función de numerosos antígenos, demostrándose que los productos de la respuesta inmune interactúan con regiones específicas del antígeno, denominadas epítomos, los cuales pueden corresponder a una secuencia de aminoácidos determinada (epítomos lineales) o a un arreglo espacial de la cadena polipeptídica (epítomos conformacionales)⁽⁸⁴⁾.

2.7. Antígenos Excretados-Secretados

Son los exoantígenos liberados en el plasma de pacientes y/o en el medio de cultivo *in vitro*, los cuales son secretados durante el desarrollo normal del parásito dentro del eritrocito y en la liberación de los merozoitos (Figura 3)
(53,85,86).

Fueron detectados mediante la técnica de inmunodifusión en agar por Mc Gregor en 1968 en el plasma de pacientes infectados. Numerándose los siguientes:

Pf HSP70-1, proteína de shock térmico que se libera con el incremento de temperatura⁽⁸⁶⁾⁽²⁸⁾.

Pf HRPII, antígeno termoestable muy abundante en la circulación, donde se puede encontrar hasta un mes después de finalizada la infección por el parásito⁽⁸⁷⁾.

Pf Ag2, termolábil de 136 kDa, localizado cerca de la superficie de la membrana de la vacuola parasítica del esquizonte y en las granulaciones del citoplasma del eritrocito⁽²⁹⁾.

Pf MSP1, es el antígeno de superficie del merozoito más caracterizado. Es sintetizado durante la etapa de esquizonte como una proteína de 190 kDa. Juega un rol muy importante al inicio de la invasión del eritrocito⁽⁸⁸⁾.

Pf EBA-175, antígeno de unión al eritrocito, es expresado en la membrana del merozoito y se encuentra envuelto en la invasión del eritrocito.^(17, 89).

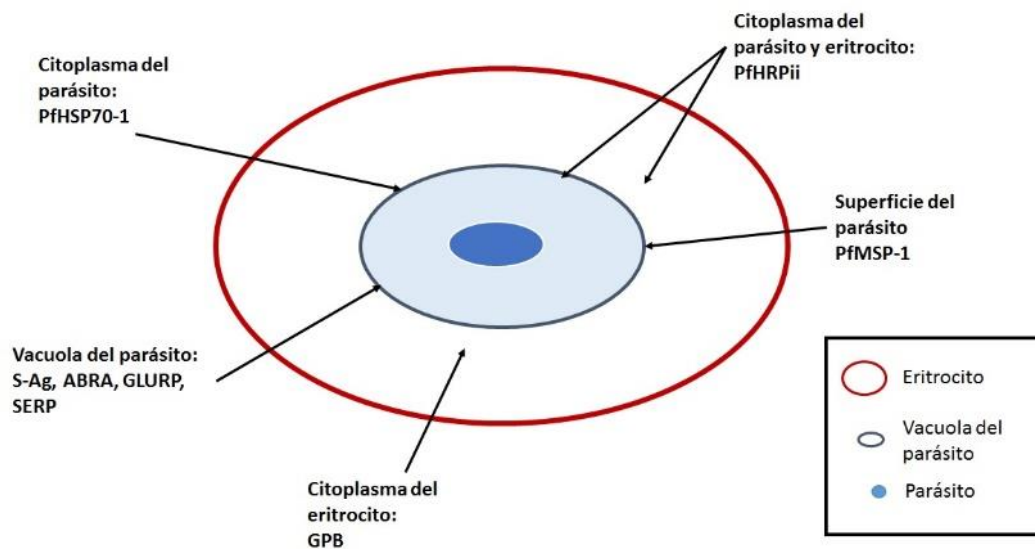


Figura 3 - Exoantígenos de *P. falciparum*. Se representa la ubicación de estos en el eritrocito infectado, modificado de Jakobsen *et al.* 1991⁽⁸⁶⁾.

2.8. Respuesta Inmune Humoral

La activación de células B requiere la unión del antígeno con la inmunoglobulina de superficie y la interacción de la célula B con células T auxiliares específicas al antígeno. Las células T auxiliares estimulan a la célula B mediante la unión del ligando CD40 de la célula T al receptor CD40 de la célula B⁽⁸³⁾. Estas células inducen una fase de proliferación vigorosa y dirigen la diferenciación de la progenie de células B en células plasmáticas secretoras

de anticuerpos o en células B de memoria. Los anticuerpos producidos son mediadores de la respuesta inmune humoral y responsables de la neutralización y eliminación de diversos antígenos, gatillando una variedad de reacciones inmunológicas siendo de carácter específico y heterogéneo⁽⁸³⁾.

En un individuo que por primera vez toma contacto con un antígeno, se distinguen cuatro fases en la respuesta primaria de producción de anticuerpos (Figura 4)⁽⁸⁴⁾.

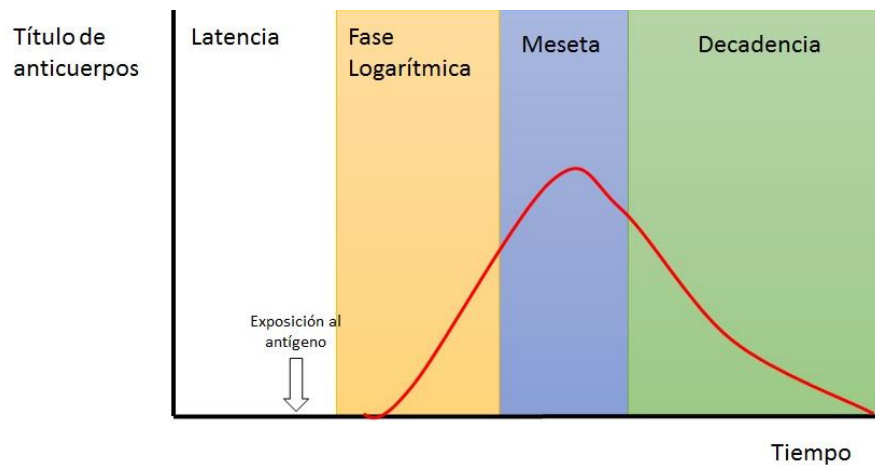


Figura 4 - Etapas de una respuesta inmune humoral, expresadas como título de anticuerpos. Modificada de Murphey *et al*, 2009⁽⁸³⁾.

Aunque estas fases de producción de anticuerpos se presentan siempre en la respuesta primaria, en los posteriores contactos con el antígeno pueden distinguirse (Figura 5): la evolución cronológica, fase de latencia más corta y fases de meseta y de descenso más largas⁽⁸⁴⁾.

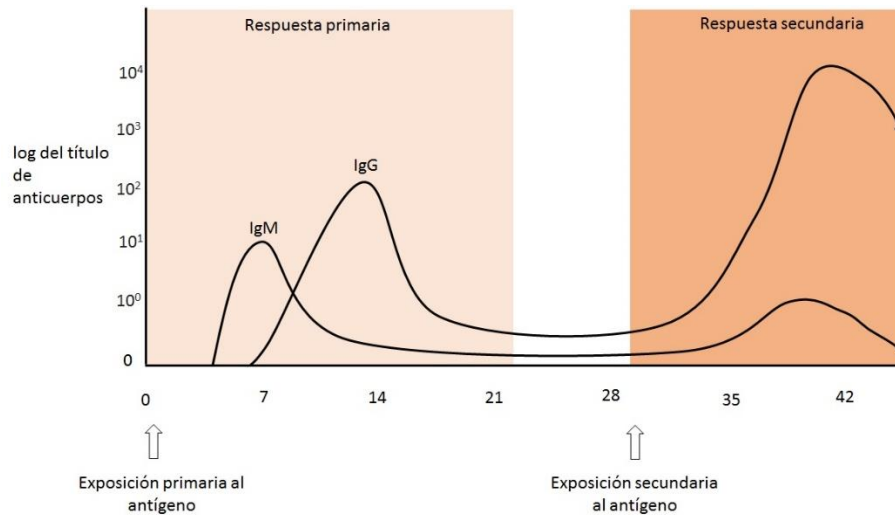


Figura 5 - Diferencias entre las respuestas inmune humoral primaria y secundaria. En la respuesta primaria, se sintetiza primero IgM y en la respuesta secundaria predomina la síntesis de IgG, Murphey *et al*, 2009⁽⁸³⁾.

2.9. Respuesta Inmune en infecciones por *Plasmodium*

Aquellos merozoitos que sobreviven a pre-eritrocítica son responsables de la modificación de los eritrocitos infectados, resultando en las manifestaciones clínicas de malaria. La destrucción de los parásitos representa un enorme estímulo para el sistema fagocítico, el cual participa en el control de la infección a través de fagocitosis dependiente e independiente de anticuerpos, y la secreción de factores solubles directa o indirectamente tóxicos para el parásito, como Interleucina – 1 (IL-1), TNF α , factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), nitrógeno reactivo (NOI) y radicales de oxígeno (ROI)⁽⁹⁰⁾.

El resultado de la infección depende de un delicado equilibrio entre la inducción apropiada de citosina, como el TNF. El TNF puede aumentar la

capacidad fagocítica de los macrófagos al aumentar la expresión de receptores de Fc y sobre los linfocitos al aumentar mecanismos de inhibición de *Plasmodium* no relacionados con la fagocitosis⁽⁹⁰⁾.

Otra citosina como el IFN- γ , el cual es un factor activador de macrófagos implicado en la respuesta inmune innata a la malaria, es producido por células T CD4 + contra antígenos eritrocitarios específicos, siendo asociada con la protección contra la reinfección de la malaria en África.⁽⁹⁰⁾.

Es esencial en la resolución de la infección primaria mediante la limitación de la fase inicial de la replicación del parásito, pero también contribuye con los síntomas agudos de esta, tales como fiebre, náuseas y dolor de cabeza a través de la inducción de TNF e IL-1, citosinas relacionadas con la predisposición a patologías graves de la enfermedad⁽⁹⁰⁻⁹³⁾.

2.10. Estudios sobre los ESAs de *P. falciparum*

Aislaron y purificaron ESAs del sobrenadante de cultivo *in vitro* de *P. falciparum*, obteniendo en una fracción al “antígeno E”, el cual al ser probado en ensayos serológicos tuvo similar reactividad que el antígeno bruto del mismo parásito. Además este antígeno presentó propiedades termoestables⁽⁵⁰⁾. Años después, se logró determinar los pesos moleculares (58, 80, 145, 200 y 290 KDa) de las fracciones purificadas de mencionado sobrenadante. Estas fracciones presentaron naturaleza proteica asociada a lípidos⁽⁵⁵⁾.

Observaron que el antígeno de 120 kDa presente en el sobrenadante de cultivo *in vitro* de *P. falciparum* es característico de cepas nativas de Papúa

Nueva Guinea, el cual no es compartido con cepas africanas ni asiáticas. Siendo así característico de esta subpoblación de *P. falciparum* en Oceanía⁽⁹⁴⁾. Identificaron como proteínas unidas a lípidos y a carbohidratos a antígenos presentes en el sobrenadante de cultivo *in vitro* de *P. falciparum*, los cuales son capaces de generar reacción antígeno anticuerpo frente a suero de conejos pre inmunizados y humanos expuestos a malaria falciparum⁽⁵²⁾. Sugieren que los sobrenadantes de cultivo *in vitro* de *P. falciparum* son una rica fuente antigénica para la inducción de la protección contra esta enfermedad y pudiendo ser una importante fuente para el inmunodiagnóstico, en especial en infecciones recientes por *P. falciparum*⁽⁵¹⁾. Proponen que los exoantígenos liberados en el sobrenadante de cultivo *in vitro* de *P. falciparum* contiene mitógenos que actúan sobre linfocitos T, los cuales una vez estimulados liberan linfocinas que aumentan la actividad fagocítica de los macrófagos⁽⁶⁴⁾. Realizaron inmunizaciones a *Saimiri sciureus* con sobrenadante de cultivo *in vitro* de *P. falciparum*, brindando a los animales elevada protección contra cepas homólogas, pero baja para cepas heterólogas⁽⁵⁷⁾. Más adelante determinaron la secuencia N-terminal de 5 exoantígenos de *P. falciparum* liberados en el medio de cultivo *in vitro*. De uno de los antígenos, 83 kDa, se sintetizó una secuencia de 29 aminoácidos, la cual a ser unido a una proteína mostró elevada reactividad en pruebas serológicas e inmunogenicidad en animales. Esta proteína sintetizada les sirvió como base para el desarrollo de pruebas enzimáticas de diagnóstico para la detección de anticuerpos contra

estadios sanguíneos de malaria en individuos de zonas endémicas⁽⁶²⁾. Observaron que la vacunación a monos *Aotus spp* con polipéptidos purificados inducían protección contra el parásito, lo cual se veía evidenciado en los niveles de hematocrito y hemoglobina, pero estos seguían aun constantes para cepas homólogos, lo que manifiesta la gran diversidad antigénica entre las diferentes cepas de *P. falciparum*⁽⁶⁵⁾.

Demostraron que el crecimiento de los cultivos *in vitro* de *P. falciparum* puede ser inhibido por la presencia de anticuerpos anti *Babesia bovis*, enfermedad similar a malaria. Además que los exoantígenos obtenidos de los sobrenadantes de ambos cultivos *in vitro* muestran reacción cruzada entre sí en las pruebas serológicas, estableciendo una estrecha relación entre ambos parásitos⁽⁹⁵⁾.

Identificaron a un antígeno 33 kDa en los sobrenadantes de cultivo *in vitro* de *P. falciparum*, el cual presenta características termolábiles y es reconocido por anticuerpos capaces de inhibir el desarrollo del cultivo *in vitro* de *P. falciparum*⁽⁶⁷⁾.

Observaron que la inmunización con ESAs procedentes del cultivo *in vitro* de *P. falciparum* provee protección contra las complicaciones clínicas de malaria, reduciendo la producción de citosinas. Pero aún es necesario conferir a los ESAs la capacidad de estimular las células T y generar memoria inmunológica⁽⁵⁸⁾.

Aislaron el antígeno 6 (Ag1) y antígeno 7 (Ag7) de sobrenadantes de cultivo *in vitro* de *P. falciparum*, demostrando que estos antígenos inducen la

producción de TNF en pacientes con malaria. Además que la prevalencia del Ag7 está correlacionada con el desarrollo de la inmunidad contra las manifestaciones clínicas de la enfermedad, siendo este antígeno una de las causas de las manifestaciones patológicas de malaria⁽⁹⁶⁾. Después observaron que el Ag7 posee también propiedades de estimular la secreción de IL-1 y pirógenas. Teniendo este Ag propiedades de endotoxina, dándole vigor como potencial candidato para una vacuna antitoxina en malaria⁽⁶⁶⁾.

Caracterizaron el Ag2, procedente de los sobrenadantes de cultivo *in vitro* de *P. falciparum*. Este antígeno está conformado por dos subunidades de 136 y 120 kDa. Identificaron que este antígeno se encuentra en la superficie de la vacuola parasítica de los esquizontes⁽²⁹⁾.

Demostraron relación entre los exoantígenos de *P. vivax*, *P. falciparum* y *P. yoelii*, los cuales además de estimular la secreción de TNF, son capaces de inducir anticuerpos que son inhibidores de los exoantígenos de las otras dos especies⁽⁵⁹⁾.

Evaluaron los exoantígenos de *P. falciparum* para medir la exposición a malaria de una población, obteniéndose 44.9% y 8.9% de prevalencia para IgG e IgM respectivamente⁽⁶³⁾. Luego, en fue observado que el nivel de IgG e IgM estaba relacionado con el número de ataques de malaria, siendo los valores de IgM mayores en pacientes con más de un episodio de esta enfermedad. En pacientes negativos a malaria los niveles de IgG fueron mayores, lo que indica la posible presencia de algunos casos asintomáticos no detectados en el diagnóstico clásico⁽²²⁾.

Proponen el potencial uso de los ESAs de *P. falciparum* como herramientas en el inmunodiagnóstico, reportándose estudios en la detección de anticuerpos en personas con malaria, pero que los niveles de sensibilidad y especificidad deben incrementarse más. Pero no se excluye su participación en las estrategias de inmunización⁽⁶⁰⁾.

También observaron que en una población de la amazonia brasileña predominan los anticuerpos IgG2 frente a ESAs obtenidos del sobrenadante de cultivo *in vitro* y antígeno bruto de *P. falciparum*⁽⁶¹⁾.

Se observó que a partir de las proteínas purificadas de los exoantígenos de cultivos de gametocitos de *P. falciparum* y *P. vivax*, se podía estimular específicamente a linfocitos, siendo el receptor CD25+ activado, solo en aquellos pacientes con infecciones secundarias de malaria, pero no en aquellos con infección primaria⁽⁹⁷⁾.

Identificaron 27 nuevas proteínas en el sobrenadante de cultivo *in vitro* de *P. falciparum*, confirmando que son exportadas fuera de la membrana del eritrocito. De las 27, cuatro fueron caracterizadas, entre las que se encuentran las proteínas PfSEL1 y PfSEL2 encargadas de inhibir la expresión de moléculas NOTCH en la superficie de la célula huésped. También las proteínas PfEK y PfEP, que fosforilan y defosforilan proteínas de *P. falciparum* en el medio de cultivo. El estudio demuestra que los ESAs son esenciales para el desarrollo del parásito y que pueden ser usados como blancos de la terapia farmacológica⁽⁵³⁾.

2.11. Evaluación de la Respuesta Inmune Humoral en *P. falciparum*

Demostraron que los títulos de la respuesta de anticuerpos contra antígenos de *P. falciparum* incrementa con el tiempo, en especial frente a AMA1 y MSP3, antígenos asociados con la protección frente a la sintomatología clínica de malaria⁽⁹⁸⁾.

Evaluaron antígenos candidatos a vacunas en la comunidad de Zungarococha, Loreto. Siendo el antígeno *PfMSP1-19kDa* el que generó respuesta inmune más robusta. Esta respuesta tiene una duración mayor a 5 meses y solo necesita de una sola infección para generarse. Resultados que muestran que en una zona de baja transmisión sí se desarrolla la inmunidad contra malaria⁽⁹⁹⁾.

Encontraron que títulos de anticuerpos IgG contra los antígenos EBA-181, MSP2-3D7, MSP2-FC27 y AMA1 de *P. falciparum* fueron significativamente más altos en pacientes con malaria no complicada, en comparación con pacientes con complicaciones de la enfermedad. Esto defiende la asociación entre altos títulos de anticuerpos contra antígenos del merozoito y la protección contra la sintomatología clínica⁽¹⁰⁰⁾.

Encontraron que la amplitud de la respuesta de anticuerpos contra antígenos del merozoito (MSP2-Dd2, MSP2, MSP2-CH150, MSP1-19kDa, MSP3K1 y MSP3-3D7) esta positivamente correlacionada con infecciones policlonales. Este factor reduce el riesgo de manifestaciones clínicas complicadas, sugiriendo que el uso de vacunas multiantigénicas puede ser una importante contribución a la inmunización contra malaria⁽¹⁰¹⁾.

También indicaron que la respuesta de anticuerpos contra GPI (glicofosfatidil inositol) no está asociada con infecciones asintomáticas en individuos con exposición clínica a malaria⁽¹⁰²⁾.

Se indicó que la edad de la primera infección no influencia la magnitud de la respuesta de anticuerpos IgG, pero que para adquirir una respuesta IgG contra el antígeno EBA 175, son necesarias muchas exposiciones. Altos títulos de anticuerpos contra este antígeno está relacionado con la protección de síntomas clínicos de malaria⁽¹⁰³⁾.

Asociaron la respuesta IgG contra el antígeno *PfMSP3* y altos niveles de IL-10 e IFN- γ pueden contribuir como mecanismos inmunoprotectores en infecciones asintomáticas de *P. falciparum*⁽¹⁰⁴⁾.

Encontraron que los títulos de anticuerpos de pacientes infectados por *P. falciparum* frente a diversos antígenos del parásito fueron idénticos tanto en sintomáticos como en asintomáticos. Pero al compararlos frente a antígenos de *P. vivax* los asintomáticos presentaron niveles significativamente más altos de respuesta antígeno anticuerpo. Además, los títulos de anticuerpos fueron mayores contra la proteína *PfMSP2* en pacientes asintomáticos, esta respuesta se relaciona con la protección a la sintomatología clínica de esta enfermedad⁽¹⁰⁵⁾.

Demostraron que en un área de transmisión estable de malaria los niveles de IgG1 e IgG3 son elevados, a diferencia de lo observado en zonas sin transmisión estable, donde no se observó el incremento de títulos de IgG1⁽¹⁰⁶⁾.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Área de Estudio

El estudio se desarrolló en la comunidad de Zungarococha, ubicada en el distrito de San Juan, provincia de Maynas, región Loreto – Perú, la que esta subdividida en 4 villas: Zungarococha, Puerto Almendra, Nina Rumi y Llanchama⁽⁷⁵⁾.

Ubicada en la cuenca del río Nanay, presenta un clima tropical húmedo con estación lluviosa de noviembre a mayo y seca desde junio a octubre, con un promedio de temperatura anual de 27°C, humedad relativa del 80% y 4 m de precipitaciones en promedio⁽⁴⁾. Malaria presenta una transmisión perianual, con un incremento sustancial en los meses de febrero a julio. Siendo *Anopheles darlingi* el vector responsable de la transmisión en esta comunidad, donde los ratios de infección de *P. vivax* y *P. falciparum* son de 5:1 respectivamente⁽⁷⁵⁾.

3.2. Población y Muestra

La población estuvo conformada por los participantes del estudio de cohorte que el PROYECTO MIGIA (Malaria e Inmunología en la Amazonía) ha venido obteniendo a lo largo de sus años de investigación (2003 – 2013). Las muestras fueron recolectadas utilizando el protocolo bajo la aprobación ética de la University of Alabama en Birmingham, la University New York y el MINSA (Anexo 2). El consentimiento informado se obtuvo de todos los participantes del estudio o sus tutores.

Las muestras de plasma utilizadas fueron clasificadas de la siguiente manera:

- (i) Pacientes considerados con malaria sintomática (n=16), quienes presentaron los síntomas clínicos de la enfermedad y fueron positivos en diagnóstico por microscopía, respaldado por diagnóstico molecular por PCR.
- (ii) Pacientes con malaria asintomática(n=24), quienes no presentaron la sintomatología clínica de la enfermedad y fueron negativos en diagnóstico por microscopía o presentaron baja densidad de parásitos, pero positivos para PCR.
- (iii) controles negativos (n=20) de zonas endémicas como no endémicas, con serología, microscopía y PCR negativos para *P. falciparum*.
- (iv) plasma de pacientes positivos *P. vivax* (n=5), leishmaniasis (n=3), lepra (n=1), VIH (n=2), toxoplasmosis (n=3), hepatitis B (n=2), ascariasis (n=1), sífilis (n=2), tuberculosis (n=2) y herpes zoster (n=1).

3.3. Material Biológico

La cepa referencial internacional de *P. falciparum* 3D7 utilizada en los experimentos fue proporcionada por el Centro de Investigaciones de la Marina de los Estados Unidos (NAMRU-6). Los eritrocitos no parasitados se obtuvieron de donantes sanos tipo sanguíneo Rh O⁺

3.4. Metodología

3.4.1. Cultivo *in vitro* de *P. falciparum*

La cepa 3D7 fue cultivada en medio RPMI 1640 según la técnica de candle – jar modificada (AlbuMax II al 5%) y mezcla de gases (5% de O₂, 5% de CO₂ y 90% de N₂). Una vez superado el 5% de parasitemia, el cultivo fue sincronizado

con gradiente de Percoll. Cuando se alcanzó la parasitemia del 20% inició la obtención de ESAs.

3.4.2. Antígenos Excretados-Secretados

Cultivos sincronizados con parasitemias del 20% fueron sometidos a 3 lavados en medio incompleto (RPMI – 1640) por centrifugación a $1460 \times g$ por 2:30 minutos, 27°C . Luego fueron colocados en medio incompleto a un hematocrito del 5% e incubados durante 24 horas a 37°C . Después se colectó el sobrenadante del medio de cultivo por centrifugación a $2000 \times g$ por 5 minutos a 27°C . El sobrenadante colectado se sometió nuevamente a centrifugación a $7000 \times g$ durante 30 minutos a 4°C . La cuantificación proteica se realizó según el método de Bradford⁽¹⁰⁷⁾.

3.4.3. Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)

Las pruebas ELISA para medir los anticuerpos IgG, se realizaron en placas de poliestireno con fondo plano de 96 pocillos, sensibilizadas con $50 \mu\text{L}$ de los ESAs diluidos en tampón borato (20 mM ácido bórico, 100 mM cloruro de sodio y 20mM EDTA; pH 7.4). Después de la incubación durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda, las placas se lavaron con $200 \mu\text{L}$ de PBS que contiene 0.05% de Tween 20 (PBS-T) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente (TA) con $200 \mu\text{L}$ de solución bloqueadora (PBS-T + 2% de leche descremada). Después de desechar el bloqueo y lavar las placas 3 veces con $200 \mu\text{L}$ de PBS-T, se añadió $50 \mu\text{L}$ de plasma diluido (1/200) en solución diluyente (solución AB con 1.5% de leche descremada) y las placas se incubaron nuevamente por 1 hora a TA. Después de lavar cuatro veces la placa

con 200 μL de solución AB se añadió 50 μL de conjugado cabra anti IgG de humano (IgG-HRP) diluído (1:2000) en solución AB y se incubaron durante 1 hora a TA. Después de lavar 3 veces con 200 μL de solución AB (NaHPO_4 , 0.45%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5%, NaCl 3%, suero fetal bovino 0.05% y Tween[®] 0.05%) se adicionó 50 μL de solución reveladora (3,3', 5,5'-Tetrametilbencidina solución A y solución B) la que se dejó actuar por 60 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 25 μL de HCl 0.25 M y la medición de la absorbancia a 450 nm (Abs450nm) se obtuvieron en la unidad ELISA OSYS MR DINEX.

3.5. Cálculo de Parámetros Inmunodiagnósticos

El umbral de reactividad de los antígenos se calculó de la siguiente forma:

- La adición de tres desviaciones estándar de la media aritmética de la reactividad Abs450nm obtenida de las 20 muestras de individuos sanos.
- Cálculo a través de la curva COR (Característica operativa del receptor) utilizando el programa SPSS 23 (IBM), que compara los valores de Abs450nm de muestras de pacientes con malaria comprobada y plasma de individuos sanos más otras enfermedades, seleccionando la mayor área bajo la curva.

Los datos de ELISA fueron sometidos a análisis estadístico ANOVA, calculado por el programa SPSS 23(IBM). Las diferencias se consideraron significativas cuando la diferencia fue $p < 0.05$.

IV. RESULTADOS

4.1. Evaluación de los parámetros inmunodiagnósticos de los ESAs

Después de caracterizar las condiciones óptimas de obtención de los ESAs y la técnica de ELISA (Anexo 8 – 16), se procedió con lo siguiente

4.1.1. Cálculo del Umbral de Reactividad

El umbral de reactividad (UR) para cada antígeno fue calculado por dos métodos:

1. Media aritmética (Abs_{450nm}) de las muestras de controles negativos más tres desviaciones estándar ($\Sigma Abs_{450nm} + 3SD$).
2. Curva COR.

Los UR de los ESAs calculados por la adición de tres desviaciones estándar de la media aritmética obtenida de 20 controles negativos ($\Sigma Abs_{450nm} + 3SD$), fueron semejantes de 0.098 para Anillos (A), 0.097 para Trofozoito – Esquizonte (TE) y 0.098 para mezcla de estadios (ME) (Figura 10), (Tabla 1). No siendo detectadas diferencias estadísticamente significativas entre los UR.

Los UR de los ESAs calculados con el método de curva COR, fueron obtenidos por el análisis de 82 muestras de plasma correspondientes a: 20 controles negativos, 22 otras enfermedades malaria vivax (n=5), leishmaniasis (n=3), lepra (n=1), VIH (n=2), toxoplasmosis (n=3), hepatitis B (n=2), ascariasis (n=1), sífilis (n=2), tuberculosis (n=2) y herpes (n=1) y 40 casos positivos de malaria falciparum.

De acuerdo al análisis de la curva COR, el antígeno con mejor desempeño con un punto de corte de 0.280 fue para la mezcla de estadios (Figura 6), seguido de 0.240 para anillos (Figura 7) y 0.223 para trofozoitos – esquizontes (Figura 8).

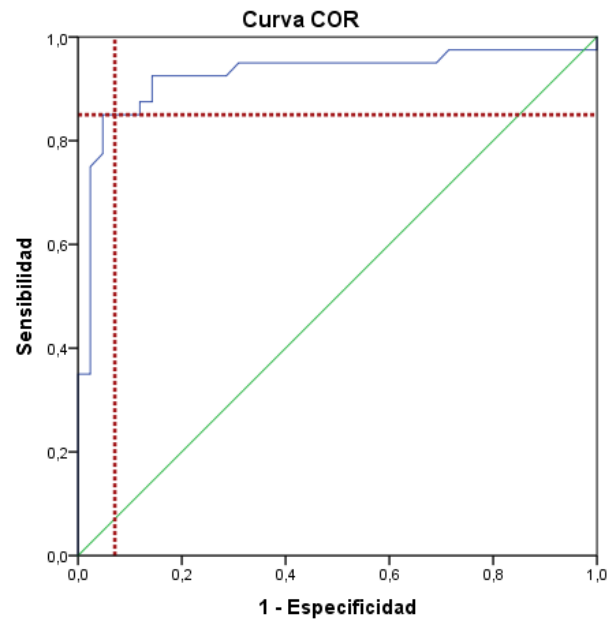


Figura 6 - Cálculo del umbral de reactividad de ESAs – ME por la curva COR, la intersección de las líneas indica el punto de corte de 0.280.

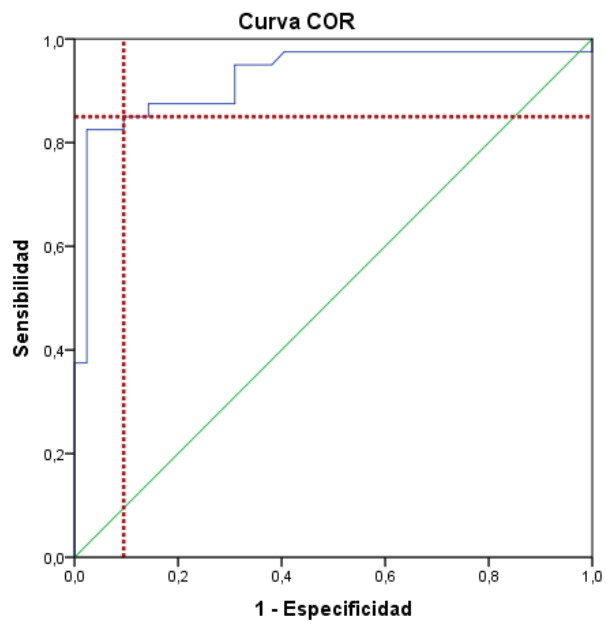


Figura 7 - Cálculo del umbral de reactividad de ESAs – A por la curva COR, la intersección de las líneas indica el punto de corte de 0.240.

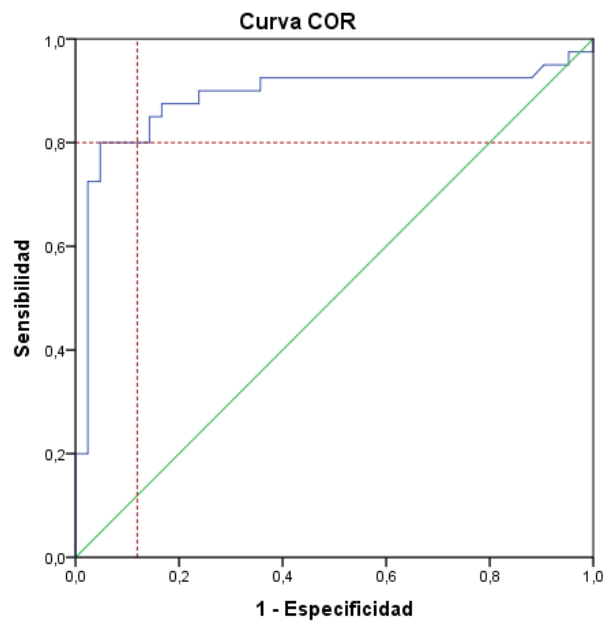


Figura 8 - Cálculo del umbral de reactividad de ESAs – TE por la curva COR, la intersección de las líneas indica el punto de corte de 0.223.

Los UR obtenidos mediante la curva COR dependen de la preparación del antígeno (Tabla 1), (Figura 9).

Tabla 1 - Umbral de reactividad de ESAs – AT, ESAs – TE y ESAs – ME obtenidas por la $\Sigma \text{Abs}_{450\text{nm}} + 3\text{SD}$ y curva COR.

UMBRAL DE REACTIVIDAD	ESAS - A	ESAS – TE	ESAS - ME
UR = ($\Sigma \text{ABS}_{450\text{NM}} + 3\text{SD}$)	0.098	0.097	0.098
UR = COR	0.240	0.223	0.280

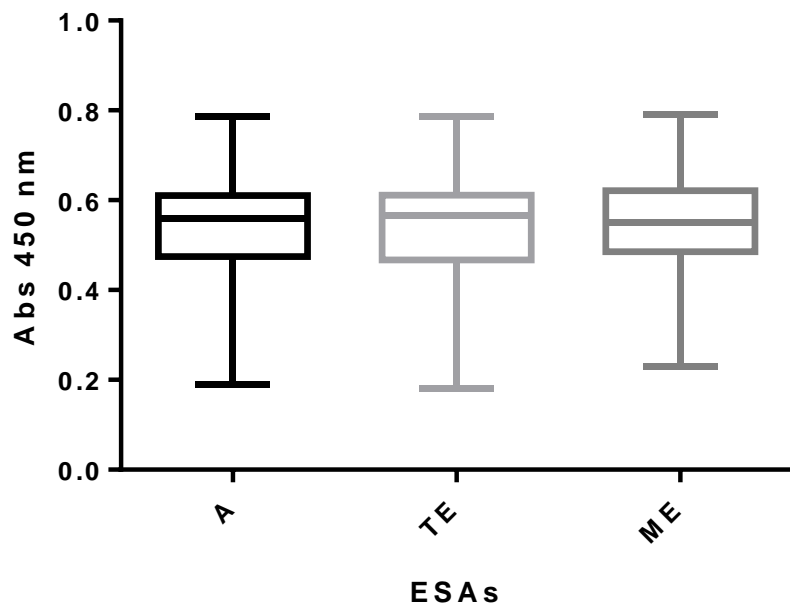


Figura 9 – Distribución de la reactividad de los diferentes antígenos evaluados ($P > 0.05$).

4.1.2. Sensibilidad en pacientes positivos a malaria

La sensibilidad fue calculado por el análisis de 40 muestras de plasma de individuos positivos por gota gruesa y PCR a malaria falciparum, clasificados clínicamente como 24 asintomáticos y 16 sintomáticos.

Calculada según la $\Sigma \text{Abs}_{450\text{nm}} + 3\text{SD}$ en 100% para los 3 exoantígenos y según la curva COR de 85% para los antígenos ESAS – A y ESAS – ME, mientras que del 80% para ESAS – TE (Tabla 2).

Tabla 2 - Porcentaje de sensibilidad de ESAs – A, ESAs – TE y ESAs – ME calculada por la $\Sigma \text{Abs}_{450\text{nm}} + 3\text{SD}$ y curva COR de plasma de pacientes positivos a malaria falciparum.

UR	N	ESAS – A	ESAS – TE	ESAS – ME
$\Sigma \text{ABS}_{450\text{NM}} + 3\text{SD}$	40	100 %	100 %	100 %
COR	40	85%	80%	85%

La evaluación de la sensibilidad por $\Sigma \text{Abs}_{450\text{nm}} + 3\text{SD}$ de acuerdo a las manifestaciones clínicas (asintomáticos y sintomáticos), fue de 100% para ambos grupos (Tabla 3). A diferencia de la sensibilidad por la curva COR fue de 87.5% para el grupo de asintomáticos para ESAs – A y ESAs – ME; mientras que fue del 83.3% para ESAs - TE (Tabla 3), (Figura 10) con títulos medios de

0.563; 0.564 y 0.570 respectivamente, sin diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$).

Sensibilidad de 93.5% fue para el grupo de sintomáticos para los antígenos ESAs – A, ESAs – ME y ESAS – TE (Tabla 3), con títulos medios de 0.475; 0.474 y 0.487 respectivamente, sin diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$).

Se observaron diferencias significativas entre los OD de asintomáticos y sintomáticos para los antígenos ($P < 0.05$).

Tabla 3 - Porcentaje de sensibilidad relativa de ESAs –A, ESAs – TE y ESAs – ME de acuerdo con el cuadro clínico de los 40 pacientes positivos a malaria falciparum

CLÍNICA	N	ESAS – A	ESAS – TE	ESAS – ME
ASINTOMÁTICOS	24	87.5%	83.3%	87.5%
SINTOMÁTICOS	16	93.5%	93.5%	93.5%

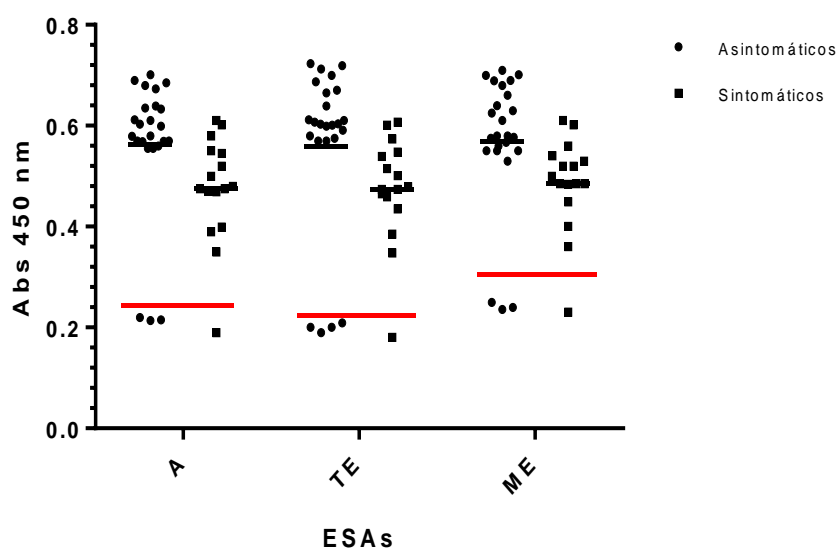


Figura 10- Distribución de la reactividad de plasmas positivos a *P. falciparum* (asintomáticos y sintomáticos ($P < 0.05$)) para los tres antígenos. La línea roja horizontal indica el punto de corte.

4.1.3. Especificidad

El índice de especificidad o reactividad cruzada por ELISA fue calculado por el análisis del plasma de 20 controles negativos y 22 infecciones diferentes a malaria falciparum, tales como malaria vivax, leishmaniasis, lepra, VIH, toxoplasmosis, hepatitis B, ascariasis, sífilis, tuberculosis y herpes)

La reactividad cruzada para los antígenos fue del 10% para ESAs – A, 12% ESAs – TE y 8% para ESAs - ME (Tabla 4), (Figura 11) la reactividad cruzada fue principalmente con plasma de pacientes con malaria vivax (n=2) y toxoplasmosis (n=1) para ESAs – ME, malaria vivax (n=3) y toxoplasmosis (n=1) para ESAs – A; y malaria vivax (n=3), toxoplasmosis (n=1) y hepatitis B (n=1) para ESAs – TE.

Tabla 4 - Porcentaje de especificidad de ESAs – A, ESAs –TE y ESAs – ME obtenidas por dos análisis del cálculo UR.

UR	N	ESAS - AT	ESAS – TE	ESAS – ME
$\Sigma ABS_{450NM} + 3SD$	42	66%	62%	70%
COR	42	90.5%	88.1%	92.9%

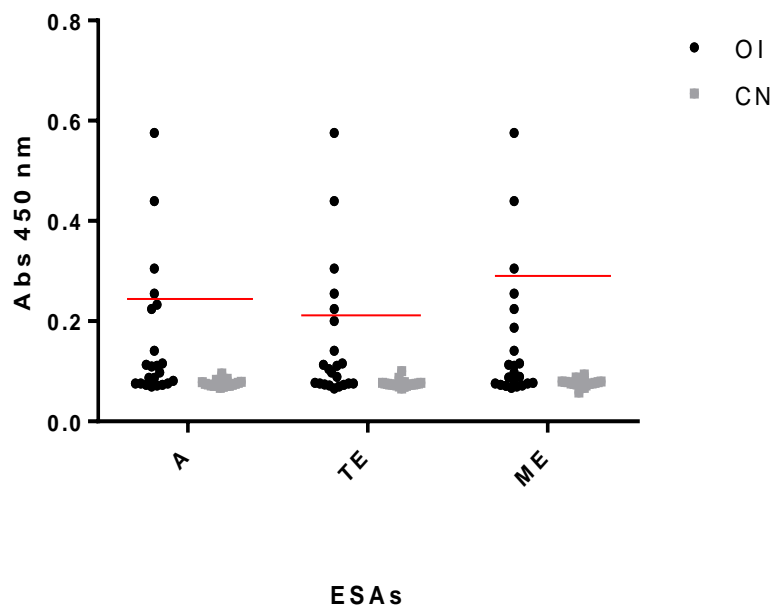


Figura 11- Distribución de la reactividad de controles negativos (CN) y otras infecciones (OI) para los tres antígenos. La línea roja horizontal indica el punto de corte.

V. DISCUSIÓN

Malaria es una enfermedad que pone en riesgo a la mitad de la población mundial, de las cuales 20 millones habitan en el continente americano, causando morbilidad y mortalidad principalmente en mujeres embarazadas y niños menores de cinco años en muchos países en desarrollo, generando un lastre económico por el costo de los programas de fumigación, control, diagnóstico y tratamiento, los cuales se estiman en al menos 12 millones de dólares al año⁽²⁾, mermando estas economías en desarrollo.

En zonas hipoendémicas, como es el caso de la Amazonía Peruana, personas asintomáticas son los responsables de la mayoría de infecciones, siendo principales contribuyentes de la propagación de la enfermedad y formando parte de la gran piedra que evita llegar al control y erradicación de malaria en la región Loreto y en el país^(6-15; 108-109).

Así como se asocian los exoantígenos de *Plasmodium* con las complicaciones y el desarrollo de la enfermedad, en otras parasitosis se ha venido estudiando la implicación de estos en el diagnóstico^(35, 39, 40, 44, 45, 48, 110-111), tratamiento⁽³²⁾ e inmunización^(34, 37,121), llegando incluso a señalarse como biomarcadores de infección⁽⁴⁹⁾ con la utilidad de diferenciar entre una infección crónica de una aguda^(112, 113).

La sensibilidad de los ESAs fue de 93.5% para sintomáticos y 87.5% para asintomáticos. Cuatro muestras no fueron reconocidas, podría deberse a la baja

concentración de anticuerpos IgG en los pacientes, que se refuerza al observar negatividad frente al antígeno recombinante *Pf*MSP1—19kDa.

Los títulos medios de reactividad de los fueron significativamente diferentes entre sintomáticos y asintomáticos para los 3 antígenos (ESAs-A, ESAs-ME y ESAs-TE) ($p=0.019$); revalidando que los asintomáticos presentan una mayor respuesta de anticuerpos IgG frente a los ESAs. Estos mayores títulos de anticuerpos serían los encargados de brindar protección frente a los síntomas clínicos y complicaciones de malaria, de tal forma como se observó en otras investigaciones^(22, 50-53, 55, 57-67, 94, 96, 97).

Comparando nuestros resultados con investigaciones^(123.124) que evaluaron antígenos aislados del medio de cultivo *in vitro* (GLP-1) y antígenos totales de *Pf* (parásito lizado). Se observó que cepas nativas favorecen los índices de sensibilidad y especificidad⁹⁴. Por ejemplo Mya *et al.* 2002^(123,124) empleó la cepa nativa PSJ-M-India frente a plasma de pacientes de la misma región donde se distribuye esta cepa, logrando sensibilidad del 88% para GLP-1 y 77% para antígenos totales. Además la antigenicidad de los ESAs varía en su composición⁸⁶, observando que no todos las moléculas de esta mezcla antigénica presentan la misma reactividad, comprobado por Thelu *et al.*, 1982⁵⁰ y Thelu *et al.*, 1985⁵⁵ quienes al purificar los ESAs por cromatografía, observaron que solo una elución (Antígeno-S) presentó antigenicidad. La reactividad cruzada frente a *Toxoplasma gondii* y *P. vivax* puede deberse a que estos parásitos pertenecen como *Pf* al grupo de Apicomplexos.

Los niveles de sensibilidad y especificidad se incrementarán al purificar nuestra mezcla antigénica y al emplear otras técnicas inmunológicas, tales como LIA (laser immuno

assay) que emplearon Mya *et al.*, 2002¹²³ y Mya *et al.*, 2002¹²⁴, reportando especificidad del 100% para GLP-1 y 94% para antígenos totales.

El estudio de la ausencia de síntomas clínicos de malaria sigue siendo un reto para los investigadores. A pesar de los grandes avances en la comprensión de estos casos, aún queda mucho camino por recorrer para agilizar la detección de estos reservorios de la enfermedad. Que son el principal problema para el control y la eliminación de malaria en la Amazonía peruana. Los resultados con los ESAs-ME son prometedores y es necesario profundizar en su investigación, ya que estos podrían ser una herramienta importante en la detección de pacientes asintomáticos, que al emplear otras técnicas inmunológicas nos permitiría conocer que antígenos sería los responsables de la respuesta inmune del huésped.

Los ESAs de *P. falciparum* son capaces de generar respuesta antígeno anticuerpo sin la necesidad de ser sometidos a procesos de purificación o concentración. El uso de medio incompleto (MI) y temperaturas de 37°C brindan mayor respuesta antígeno – anticuerpo. Parasitemias del 20%, 5% de hematocrito y tiempos de incubación de 24 horas generan mayor antigenicidad.

Concentraciones proteicas mayores a 131 µg/mL para ESAs - A y 139 µg/mL para ESAs – TE son indicadas para mostrar reactividad frente a plasma de pacientes positivos a malaria mediante prueba de ELISA.

VI. CONCLUSIONES

El empleo de la curva COR para la detección del UR de los antígenos mejoró la sensibilidad y especificidad. El antígeno ESAs – ME presentó la mejor sensibilidad y especificidad (85% y 92.9%), siendo en el grupo de positivos a malaria, mayor en los pacientes sintomáticos (93.5%) que en los asintomáticos (87.5%). Y con títulos mayores de anticuerpos IgG en los casos asintomáticos de malaria.

Los ESAs de *P. falciparum* demostraron ser capaces de generar respuesta inmune en pacientes infectados por malaria, demostrando ser una mezcla antigénica prometedora para la comprensión de los casos asintomáticos con miras al desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico y una vacuna para malaria.

VII. RECOMENDACIONES

Se recomienda seguir las buenas prácticas de laboratorio durante el cultivo *in vitro* de *P. falciparum*, para así evitar la contaminación bacteriana y/o fúngica. Para ello todo medio de cultivo a usarse debe ser filtrado.

El monitoreo constante de la parasitemia y el nivel de sincronización del cultivo es otro factor importante a tomar en consideración, ya que facilitará lograr los objetivos de una forma más rápida.

Se recomienda medir los pH de las soluciones tampón empleadas en la preparación del TMB, un pH diferente al indicado (5.00) dará falsas lecturas de absorbancia.

Usar de cepas nativas de *P. falciparum* para continuar con la evaluación de la respuesta inmune humoral y el empleo de otras técnicas inmunológicas que puedan aumentar la sensibilidad de los casos asintomáticos.

Evaluar la respuesta inmune de las subclases de anticuerpos IgG y medir la duración de estos.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. World Malaria Report: 2015. Geneva: WHO. Library cataloguing in Publication Data 2013.
2. Center of Disease Control and Prevention. Impact of Malaria. [En línea]; 2014 [citado 20 Oct 2015] Disponible en <http://www.cdc.gov/malaria/malariaworldwide/impact.html>
3. Red Nacional de Epidemiología (RENACE) – DGE – MINSA – CASOS DE MALARIA POR DEPARTAMENTOS – 2016 *Hasta S1. 2016
4. Rosas-Aguirre A, Speybroek N, Llanos-Cuentas A, Rosanas-Urgell A, Carrasco-Escobar G, Rodriguez H *et al.* **Hotspots of malaria transmission in the Peruvian Amazon: Rapid assesment through a parasitological and serological survey.** PLoS One. 2015. DOI: 10.1371
5. Hijar G, Quina H, Padilla C, Montoya Y, **Variabilidad genética de *Plasmodium falciparum* en pacientes con malaria grave y malaria no complicada en Iquitos – Perú.** Rev. Peru. Med. Exp. Salud pública. 2002; 19(3).
6. Roshanravn B, Kani E, Gilman RH, Cabrera L, Metcalfe J *et al.* **Endemic malaria in the Peruvian Amazon region of Iquitos.** Am. J. Trop. Med. Hyg. 2003; 69(1): 45-52.
7. Tada MS, Marques RP, Mesquita E, Mastha RC, Rodriguez JA, Neves Costa *et al.* **Urban malaria in the Brazilian Western Amazon Region I. High prevalence of asymptomatic carriers is associated with high level of clinical malaria.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2007; 102(3): 263-269.

8. Laishram DU, Sutton PL, Nanda N, Sharma VL, Sobti RC, Carlton JM *et al.* **The complexities of malaria disease manifestations with a focus on asymptomatic malaria.** *Malar J.* 2012. 11:29.
9. Hopkins H, Gonzáles IJ, Polley SD, Angutoko P, Ategeka J, Asiimwe C *et al.* **Highly sensitive detection of malaria parasitemia in malaria – endemic setting: performance of a new loop – mediated isothermal amplification kit in a remote clinic in Ugand.** *J Infect Dis.* 2013; 208(4):645 – 52.
10. Morris U, Khamis M, Aydiin – Schmidt B, Abass AK, Msellem MI, Nassor MH *et al.* **Field deployment of loop – mediated isothermal amplification for centralized mass – screening of asymptomatic malaria in Zanzibar: a pre – elimination setting.** *Malar J.* 2015; 14:205.
11. Oriero EC, Okebe J, Jacobs J, Van Geertruyden JP, Nwakanma D, D’Alessandro U. **Diagnostic performance of a novel loop – mediated isothermal amplification (LAMP) assay targetting the apicoplast genome for malaria diagnosis in a field setting in sub – Saharan Africa.** *Malar J.* 2015; 14:396.
12. Vallejo AF, Martínez NL, Gonzáles IJ, Arévalo – Herrera M, Herrera S. **Evaluation of the loop mediated isothermal DNA amplification (LAMP) kit for the malaria diagnosis in *P. vivax* endemic settings of Colombia.** *PLoS Negl Trop Dis.* 2015; 9(1):e3453.
13. Vitor R de Mendonça, Manoel Barral – Netto. **Immunoregulation in human malaria: the challenge of understanding asymptomatic infection.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015; 110(8): 945 – 55.

14. Nzobo BJ, Ngasala BE, Kihamia CM. **Prevalence of asymptomatic malaria infection and use of different malaria control measures among primary school children in Morogoro Municipality, Tanzania.** Malar J. 2015; 14:491.
15. Lo E, Zhou G, Oo W, Afrane Y, Githeko A, Yan G. **Low parasitemia in submicroscopic infections significantly impacts malaria diagnostic sensitivity in the highlands of Western Kenya.** PLoS One. 2015; 10(3):e0121763.
16. Ariel F, Hommel D, Le Scanf C, Duchemin JB, Peneau C, Hulin A *et al.* **Association of severe malaria with a specific *Plasmodium falciparum* genotype in French Guiana.** J Infect Dis. 2001; 184(2):237 – 41.
17. Touré FS, Bisseye C, Mavoungou E. **Imbalanced distribution of *Plasmodium falciparum* EBA – 175 genotypes related to clinical status in children from Bakoumba, Gabon.** Clin Med Res. 2006; 4(1): 7 – 11.
18. Coura JR, Suárez – Mutis M, Ladeia – Andrade S. **A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection – a review.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006; 101(3):229 – 37.
19. Wu L, van der Hoogen LL, Slater H, Walker PG, Ghani AC, Drakeley CJ. **Comparison of diagnostics for the detection of asymptomatic *Plasmodium falciparum* infections to inform control and elimination strategies.** Nature. 2015;528(7580):S86 – 93.
20. Costa JD, Zanchi FB, Rodrigues FL, Honda ER, Katsuragawa TH, Pereira DB *et al.* **Cross – reactive anti – PfCLAG9 antibodies in the sera of asymptomatic parasite of *Plasmodium vivax*.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108(1):98 – 105.

21. Park YH, Shi YP, Liang B, Medrion CA, Jeon YH, Torres E *et al.* **High – resolution metabolomics to discover potential parasite – specific biomarkers in *Plasmodium falciparum* erythrocytic stage culture system.** *Malar J.* 2015; 14:122.
22. Chumpitazi BF, Lepers JP, Simon J, Deloron P. **IgG1 and IgG2 responses to *Plasmodium falciparum* exoantigens correlate inversely and positively, respectively, to the number of malaria attacks.** *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1996; 14(2-3):151-8.
23. Augustin KD, Kleemann R, Thompson J, Kooistra T, Crawford CE, Reece SE *et al.* **Functional characterisation of the *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghe* homologues of macrophage migration inhibitory factor.** *Infect Immun.* 2007; 75(3): 1116-28.
24. Cordery DV, Kishore U, Kyes S, Shafi MJ, Watkins KR, Williams TN *et al.* **Characterisation of *Plasmodium falciparum* macrophage migration inhibitory factor homologue.** *J Infect Dis.* 2007; 195(6): 905-12.
25. Ho M, Hoang HL, Lee KM, Liu N, MacRae T, Flatt CL *et al.* **Ectophosphorylation of CD36 regulates cytoadherence of *Plasmodium falciparum* to microvascular endothelium under flow conditions.** *Infect Immun.* 2005; 73(12): 8179-87.
26. Hisaeda H, Tetsutani K, Moriya C, Tu L, Hamano S, Duan X *et al.* **Malaria parasites require TLR9 signaling for immune evasion by activating regulatory T cells.** *J Immunol.* 2008; 180(4): 2496 – 503.

27. Smith JD, Chitnis CE, Craig AG, Roberts DJ., Hudson – Taylor DE., Peterson DS. **et al. Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes.** Cell. 1995; 82(1): 101-10.
28. Grover M, Chaubey S, Ranade S, Tatu U. **Identification of an exported heat shock protein 70 in *Plasmodium falciparum*.** Parasite. 2013; 20:2.
29. Jakobsen PH, Grellier P, Theander TG, Behrendt N, Torii M, Aikawa M *et al.* **Identification and localization of a soluble antigen, Ag2, of 136 kDa from *Plasmodium falciparum* in vitro cultures.** APMIS. 1991; 99(2): 155-62.
30. Smith RD, James MA, Ristic M, Aikawa M, Vega y Murquia CA. **Bovine babesiosis: protection of cattle with culture – derived soluble *Babesia bovis* antigen.** Science. 1981; 212 (4492): 335-8.
31. Smith RD, Carpenter J, Cabrera A, Gravely SM, Erp EE, Osorno M *et al.* **Bovine babesiosis: vaccination against tick – borne challenge exposure with culture – derived *Babesia bovis* immunogens.** Am J Vet Res. 1979; 40(12): 1678 – 82.
32. Marsland BJ, Camberis M, Le Gros G. **Secretory products from infective forms of *Nippostrongylus brasiliensis* induce a rapid allergic airway inflammatory response.** Immunol Cell Biol. 2005; 83(1):40 – 7.
33. Yatsuda AP, Krijgsveld J, Cornelissen AW, Heck AJ, de Vries E. **Comprehensive analysis of the secreted proteins of the parasite *Haemonchus contortus* reveals extensive sequence variation and differential immune recognition.** J Biol Chem. 2003; 278(19): 16941 – 51.

34. Wang Y., Zhang D., Wang G., Ying H., Wang M. **Immunization with excreted – secreted antigens reduces tissue cyst formation in pigs.** Parasitol Res. 2013; 112(11): 3835 – 42.
35. Abdollahi SH, Ayoobi F, Khorramdelazad H, Hassanshahi G, Ahmadabadi BN, Rezayati M. *et al.* **Interleukin – 10 serum levels after vaccination with *in vivo* prepared *Toxoplasma gondii* excreted/secreted antigens.** Oman Med J. 2013; 28(2): 112 – 5.
36. Costa – Silva TA, Borges MM, Galhardo CS, Pereira – Chioccola VL. **Immunization with excreted/secreted proteins in AS/n mice activating celular and humoral response against *Toxoplasma gondii* infection.** Acta Trop. 2012; 124(3): 203-9.
37. Lemesre JL, Holzmuller P, Cavaleyra M, Gonçalves RB, Hottin G, Papierok G. **Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigens of *Leishmania infantum* promastigotes.** Vaccine. 2005; 23(22): 2825 – 40.
38. Petitdidier E, Pagniez J, Papierok G, Vincendeau P, Lemesre JL, Bras – Gonçalves R. **Recombinant forms of *Leishmania amazonensis* excreted/secreted promastigote Surface antigen (PSA) induce protective immune responses in dogs.** PLoS Negl Trop Dis. 2016; 10(5):e0004616.
39. Pinedo – Cancino V, Kesper N, Barbiéri CL, Lindoso JA, Umezawa ES. **The efficacy of *L. (L.) chagasi* excreted – secreted antigens (ESAs) for visceral leishmaniasis diagnosis is due to low levels of cross – reactivity.** Am J Trop Med Hyg. 2013; 88(3): 559 – 65.

40. Pinedo – Cancino V, Laurenti MD, Kesper N, Umezawa ES. **Evaluation of *Leishmania (Leishmania) infantum* excreted – secreted antigens for detection of canine leishmaniasis.** Acta Trop. 2016; 161: 41-3.
41. Daryani A, Sharif M, Kalani H, Rafiel A, Kalani F, Ahmadpour E. **Electrophoretic patterns of *Toxoplasma gondii* excreted/secreted antigens and their role in induction of the humoral immune response.** Jundishapur J Microbiol. 2014; 7(4): e9525.
42. Antilupa I, Quispe W, Mayo J, Valverde F, Sanchez E. **Purification of antigenic fraction 27 – 28 kDa from the metabolomic antigen form metabolic secreted – excreted from *Fasciola hepatica*.** Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2014; 31(2): 288 – 91.
43. Escalante H, Davelois K, Ortiz P, Rodriguez H, Díaz E, Jara C. **Western blot technique standarization of the diagnosis of human fasciolosis using *Fasciola hepatica* excreted – secreted antigens.** Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2011; 28(3). 454 – 61.
44. Berrizbeitia M, Ndao M, Bubis J, Gottschalk M, Aché A, Lacouture S. **Purified excreted – secreted antigens from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes as tools for diagnosis of chaga’s disease.** J Clin Microbiol. 2006; 44(2): 291 – 296.
45. Zarate – Blades CR, Bladés N, Nascimento MS, da Silveira JF, Umezawa ES. **Diagnostic performance of tests base don *Trypanosoma cruzi* excreted – secreted antigens in an endemic area for Chagas’ disease in Bolivia.** Diagn Microbiol Infect Dis. 2007; 57(2): 229 – 32.

46. Jiménez JC, Morelle W, Michalsky JC, Dei – Cas E. **Excreted/secreted glycoproteins of *G. intestinalis* play an essential role in the antibody response.** Parasitol Res. 2007; 100(4): 715 – 720.
47. Wang L, Wang ZQ, Hu DD, Cui J. **Proteomic analysis of *Trichinella spiralis* muscle larval excretory – secretory proteins recognized by early infection sera.** Biomed Res Int. 2013; 2013:139745.
48. Umezawa ES, Nascimento MS, Stolf AM. **Enzyme – linked immunosorbent assay with *Trypanosoma cruzi* excreted – secreted antigens (TESA – ELISA) for serodiagnosis of acute and chronic Chagas’ disease.** Diagn Microbiol Infect Dis. 2010; 29(3): 169 – 76.
49. Araújo PR, Ferreira AW. **Avidity of IgG antibodies against excreted/secreted antigens of *Toxoplasma gondii*: immunological marker for acute recent toxoplasmosis.** Rev Soc Bras Med Trop. 2008; 41(2): 142 – 7.
50. Thelu J, Ambroise – Thomas P, Kupka P. **Antigens excreted – secreted by *Plasmodium falciparum* in *in vitro* culture. Comparative study with somatic antigens and whole parasite antigens.** Bull World Health Organ. 1982; 60(5): 761 – 6.
51. Rodriguez Da Silva L, Loche M, Dayali R, Perrin LH. ***Plasmodium falciparum* polypeptides released during *in vitro* cultivation.** Bull World Health Organ. 1983; 61(1): 105 – 12.
52. Gabrielsen AA Jr, Jensen JB, Boland MT. **Identification and partial characterization of exoantigens derived from médium used to culture *Plasmodium falciparum*.** Am J Trop Med Hyg. 1983; 32(4): 671 – 4.

53. Sing M, Mukherjee P, Narayanasamy K, Arora R, Sen SD, Gupta S. *et al.*
Proteome analysis of *Plasmodium falciparum* extracellular secretory antigens at asexual blood stages reveals a cohort of proteins with possible role in immune modulation signaling. *Mol Cell Proteomics*. 2009; 8(9): 2102 – 2118.
54. Shamqunwky LM, Liu HY, Hager LP, Ristic M. **Purification and characterization of culture – derived exoantigens of *Plasmodium falciparum*.** *Mol Biochem Parasitol*. 1985; 17(3): 299 – 310.
55. Thelu J, Ambroise – Thomas P, Chumpitazi B, Kupka P. **Purification and immunochemical study of *Plasmodium falciparum* exoantigens.** *J Parasitol*. 1985; 71 (5): 542 – 6.
56. Siddiqui WA, Kan SC, Richmond – Crum SM. ***In vitro* production and partial purification of *Plasmodium falciparum* antigen.** *Bull World Health Organ*. 1979; 57 (1): 75 – 82.
57. James MA, Kakoma I, Ristic M, Cagnard M. **Induction of protective immunity to *Plasmodium falciparum* in *Saimiri sciureus* monkeys with partially purified exoantigens.** *Infect Immun*. 1985; 49(3): 476 – 80.
58. Bate CA, Taverne J, Davé A, Playfair JH. **Malaria exoantigens induce T – independent antibody that blocks their ability to induce TNF.** *Immunology*. 1990; 70(3): 315 – 20.
59. Bate CA, Taverne J, Karunaweera ND, Mendis KN, Kwiatkowski D, Playfair JH. **Serological relationship of tumor necrosis factor – inducing exoantigens of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*.** *Infect Immun*. 1992; 60(3): 1241 – 1243.

60. Cruz Cubas AB, Gentilini M, Danis M, Monjour L. **Soluble antigens of intra – erythrocyte stages of *Plasmodium falciparum*: diagnostic and vaccinal value.** Pathol Biol (Paris). 1993; 41(5): 495 – 9.
61. Ferreira MU, Kimura ES, Camargo LM, Alexandre CO, da Silva LH, Katzin AM. **Antibody response against *Plasmodium falciparum* exoantigens and somatic antigens: a longitudinal survey in a rural community in Rondônia, western Brazilian Amazon.** Acta Trop. 1994; 57(1): 35 – 46.
62. James MA. **Application of exoantigens of Babesia and Plasmodium in vaccine development.** Trans R Soc Trop Med Hyg. 1989; 83: 67 – 72.
63. Chumpitazi B, Lepers JP, Rason M, Meunier A, Boudin C, Ambroise – Thomas P. **Circulating stable antigens at higher levels down – regulate antibody responses to *Plasmodium falciparum*.** Parasitol Res. 1993; 79(2): 163 – 7.
64. Abdalla SH, Wickramasinghe SN. **Human monocyte activation by supernatants from continuous cultures of *Plasmodium falciparum*.** Trans R Soc Trop Med Hyg. 1985; 79(5): 657 – 62.
65. James MA, Fajfar – Whetstone CJ, Kakoma I, Buese MM, Clabaugh GW, Hansen R. *et al.* **Immunogenicity and protective efficacy of affinity – purified *Plasmodium falciparum* exoantigens in *Aotus nancymai* monkeys.** Trop Med Parasitol. 1991; 42(1): 49 – 54.
66. Jakobsen PH, Hviid L, Theander TG, Riley EM, Grellier P, Bruun LS *et al.* **Isolation and characterization of a soluble antigen complex of *Plasmodium falciparum* with pyrogenic properties.** APMIS. 1991; 99(1): 21 – 9.

67. Ramos MI, Omata Y, Igarashi M, Nakabayashi T. *Plasmodium falciparum*: **characterization of a 33 – kDa soluble antigen**. Exp Parasitol. 1989; 68(3): 297 – 307.
68. Center of Disease Control and Prevention. The History of Malaria an Ancient Disease [En línea]; 2012 [Consultado el 10 de mayo de 2016]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/malaria/about/history/>.
69. Center of Disease Control and Prevention. Laveran and the discovery of the malaria parasite [En línea]; 2012 [Consultado 12 de mayo de 2016]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/malaria/about/history/laveran.html>.
70. Pan American Health Organization. Neglected, Tropical and Vector Borne Diseases. Malaria Program [En línea]; 2015 [Consultado 12 de mayo de 2016]. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=33&Itemid=40757.
71. Pan American Health Organization. Malaria Program. 2015.
72. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria. 3ra Edición. 2015.
73. Griffing SM, Gamboa D, Udhayakumar V. **The history of 20th century malaria control in Peru**. Malar J. 2013; 12:303.
74. Cueto M. **Identidad regional y malaria en el Perú del siglo veinte**. Lima, Perú: Instituto de Estudios Peruanos; Talleres de Tarea Asociación Gráfica Educativa; 1997. Pp. 127 – 72. (El regreso de las epidemias: salud y sociedad en el Perú del siglo XX).

75. Branch OL, Casapia WM, Gamboa DV, Hernandez JN, Alava FF, Roncal N *et al.*
Clustered local transmission and asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malari infections in a recently emerged, hypoendemic Peruvian Amazon community. Malar J. 2005; 4:27.
76. NCBI. *Plasmodium falciparum* 3D7 [En línea] 2015; [Consultado el 20 de mayo de 2016] Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Br>
77. Zilversmit M, Perkins S. Tree of life web Project. Plasmodium: Malaria parasite [En línea] 2015; [Consultado el 25 de mayo de 2016] Disponible en: <http://tolweb.org/Plasmodium/68071>.
78. Perkins SL, Schall JJ. **A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences.** J Parasitol. 2002. 88(5): 972-8.
79. Botero D, Restrepo M. **Parasitosis Humana.** 4ta Edición Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2003. p. 506.
80. Nature. Box 1: The life cycle of *Plasmodium falciparum* [En línea] 2014; [Consultado el 30 de mayo de 2016] Disponible en: <file:///C:/Users/Rafael%20Saavedra/Desktop/Resoluci%C3%B3n%20RSL/ESAs%20Proteins/Life%20cycle%20Pf/IAMGEN.html>.
81. Bousema T, Okell L, Drakeley C. **Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance.** Nat Rev Microbiol. 2014; 12(12): 833 – 40.
82. Porter RR. **The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain.** Biochem J. 1959; 73: 119 – 26.

83. Murphy K, Travers P, Walport M. **Inmunología de Janeway**. 7ma edición. México: McGraw – Hill InterAmérica Editores, S.A. 2009.
84. Universidad de Talca. **Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica**. 5ta Edición. Santiago de Chile: Iván Palomo, Arturo Ferreira, Cecilia Sepúlveda. 2012.
85. Santarém N, Silvestre R, Tavares J, Silva M, Cabral M, Maciel J *et al*. **Immune response regulation by leishmania secreted and non secreted antigens**. J Biomed Biotechnol. 2007; 2007(6):85154.
86. Jakobsen PH. **Plasmodium falciparum malaria parasite exoantigens: their role in disease and in immunity**. Dan Med Bull. 1995; 42(1): 22 – 39.
87. Amoah LE, Abankwa J, Oppong A. **Plasmodium falciparum histidine rich protein – 2 diversity and the implications for PfHRP 2: based malaria rapid diagnostic tests in Ghana**. Malar J. 2016; 15:101.
88. Moss DK, Remarque EJ, Faber BW, Cavanagh DR, Amot DE, Thomas AW *et al*. **Plasmodium falciparum 19 – kilodalton merozoite surface protein 1 (MSP1) – specific antibodies that interfere with parasite growth in vitro can inhibit MSP1 processing, merozoite invasion, and intracellular parasite development**. Infect Immun. 2012; 80(3): 1280 – 7.
89. Nyasa RR, Kimbi HK, Zofou D, DeBarry JD, Kissinger JC, Titanji VPK. **An evolutionary approach to identify potentially protective B cell epitopes involved in naturally acquired immunity to malaria and the role of EBA – 175 in protection amongst denizens of Bolifamba, Cameroon**. Malar J 2016; 15:281.

90. Malaguarnera L, Musumeci S. **The immune response to *Plasmodium falciparum* malaria.** Lancet Infect Dis. 2002; 2(8): 472 – 8.
91. McGuire W, Hill AV, Allsopp CE, Greenwood BM, Kwiatkowski D. **Variation in the TNF – alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria.** Nature. 1994; 371:508 – 10.
92. Luty AJ, Perkins DJ, Lell B. **Low interleukin – 12 activity in severe *Plasmodium falciparum* malaria.** Infect Immun. 2000; 68: 3909 – 3915.
93. Schofield L, Tachado SD. **Regulation of host cell function by glycosylphosphatidylinositols of the parasitic protozoa.** Immunol Cell Biol. 1996; 74: 555 – 63.
94. Anders RF, Brown GV, Edwards A. **Characterization of an S antigen synthesized by several isolates of *Plasmodium falciparum*.** Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1983; 80(21): 6652 – 6.
95. James MA, Montenegro – James S, Fajfar – Whetstone C, Montealegre F, Erickson J, Ristic M. **Antigenic relationship between *Plasmodium falciparum* and *Babesia bovis*: reactivity with antibodies to culture – derived soluble exoantigens.** J Protozool. 1987; 34(3): 328 – 32
96. Taverne J, Bate CA, Kwiatkowski D, Jakobsen PH, Playfair JH. **Two soluble antigens of *Plasmodium falciparum* induce tumor necrosis factor release from macrophages.** Infect Immun. 1990; 58(9): 2923 – 8,
97. Ramsey JM, Tello A, Contreras CO, Ordoñez R, Chirino N, Rojo J *et al.* ***Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocyte – specific**

- exoantigens stimulate proliferation of TCR gammadelta+ lymphocytes.** J Parasitol. 2002; 88(1): 59 – 68.
98. Greenhouse B, Ho B, Hubbard A, Njama – Meya D, Narum DL, Lanar DE *et al.* **Antibodies to *Plasmodium falciparum* antigens predict a higher risk of malaria but protection from symptoms once parasitemic.** J Infect Dis. 2011; 204(1): 19 – 26.
99. Clark EH, Silva CJ, Weiss GE, Padilla C, Crompton PD, Hernandez JN *et al.* ***Plasmodium falciparum* malaria in the Peruvian Amazon, a region of low transmission, is associated with immunologic memory.** Infect Immun. 2012; 80(4): 1583 – 92.
100. Ahmed Ismail H, Ribacke U, Reiling L, Normark J, Egwang T, Kironde F *et al.* **Acquired antibodies to merozoite antigens in children from Uganda with uncomplicated or severe *Plasmodium falciparum* malaria.** Clin Vaccine Immunol. 2013; 20(8): 1170 – 80.
101. Rono J, Osier FH, Olsson D, Montgomery S, Mhoja L, Rooth I *et al.* **Breadth of anti – merozoite antibody responses is associated with the genetic diversity of asymptomatic *Plasmodium falciparum* infections and protection against clinical malaria.** Clin Infect Dis. 2013; 57(10): 1409 – 16.
102. Gomes LR, Totino PR, Sanchez MC, Daniel EP, Macedo CS, Fortes F *et al.* **Asymptomatic infection in individuals from the municipality of Barcelos (Brazilian Amazon) is not associated with the anti – *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositol antibody response.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013; 108(6): 796 – 800.

103. Nhabomba AJ, Guinovart C, Jiménez A, Manaca MN, Quintó L, Cisteró P *et al.* **Impact of age of first exposure to *Plasmodium falciparum* on antibody responses to malaria in children: a randomized, controlled trial in Mozambique.** *Malar J.* 2014; 13:121.
104. Guiyedi V, Bécavin C, Herbert F, Gray J, Cazenave PA, Kombila M, *et al.* **Asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection in children is associated with increased auto – antibody production, high IL – 10 plasma levels and antibodies to merozoite surface protein 3.** *Malar J.* 2015; 14:162.
105. Baum E, Sattabongkot J, Sirichaisinthop J, Kiattibutr K, Davies DH, Jain A, *et al.* **Submicroscopic and asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections are common in eastern Thailand – molecular and serological evidence.** *Malar J.* 2015; 14:95.
106. Noland GS, Jansen P, Vulule JM, Park GS, Ondigo BN, Kazura JW *et al.* **Effect of transmission intensity and age on subclass antibody responses to *Plasmodium falciparum* pre – erythrocytic and blood – stage antigens.** *Acta Trop.* 2015; 142: 47 – 56.
107. Bradford MM. **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding.** *Anal Biochem.* 1976; 72:248 – 54.
108. Barbosa S, Gozze AB, Lima NF, Batista CL, Bastos Mda S, Nicolete VC, *et al.* **Epidemiology of disappearing *Plasmodium vivax* malaria: a case study in rural Amazonia.** *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8(8): e3109.

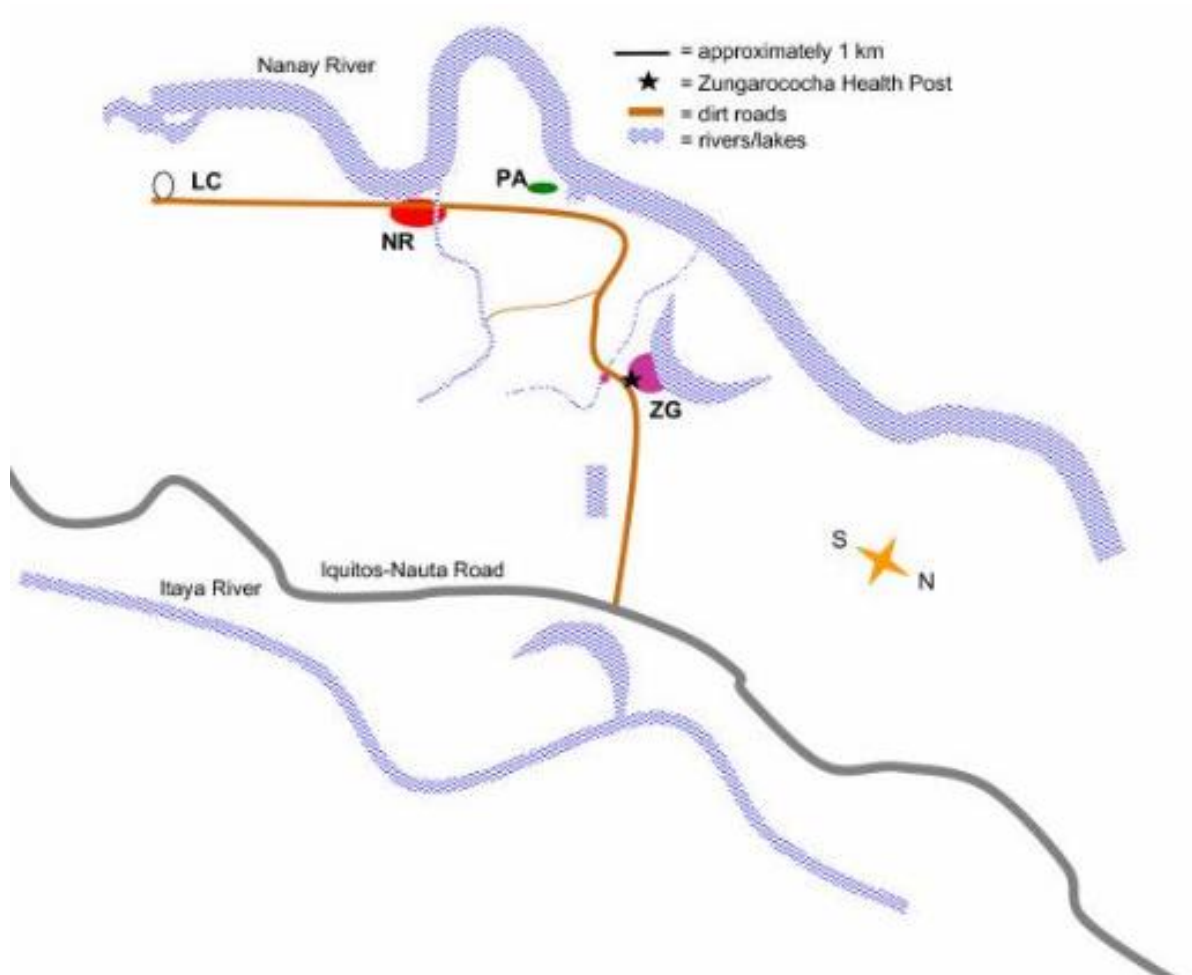
109. da Silva – Nunes M, Moreno M, Conn JE, Gamboa D, Abeles S, Vinetz JM, *et al.* **Amazonian malaria: asymptomatic human reservoirs, diagnostic challenges, environmentally driven changes in mosquito vector populations, and the mandate for sustainable control strategies.** *Acta Trop.* 2012; 121(3): 281 – 91.
110. Caballero ZC, Sousa OE, Marques WP, Saez – Alquezar A, Umezawa ES. **Evaluation of serological tests to identify *Trypanozoma cruzi* infection in humans and determine cross – reactivity with *Toxoplasma rangeli* and *Leishmania spp.*** *Clin Vaccine Immunol.* 2007; 14(8): 1045 – 9.
111. Choi MH, Park IC, Li S, Hong ST. **Excretory – secretory antigen is better than crude antigen for the serodiagnosis of clonorchiasis by ELISA.** *Korean J Parasitol.* 2003; 41 (1): 35 – 9.
112. Longoni SS, López – Cespedes A, Sánchez – Moreno M, Bolio – Gonzalez ME, Sauri – Arceo CH, Rodríguez – Vivas RI *et al.* **Detection of different *Leishmanis spp* and *Trypanosoma cruzi* antibodies in cats from the Yucatan Peninsula (Mexico) using an iron superoxide dismutase excreted as antigen.** *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2012; 35(5): 469 – 76.
113. Hiemstra IH, Klaver EJ, Vrijland K, Krigel H, Andreasen A, Bouma G *et al.* **Excreted/secreted *Trichuris suis* products reduce barrier function and suppress inflammatory cytokine production of intestinal epithelial cells.** *Mol Immunol.* 2014; 60(1): 1-7.
114. Meira CS, Costa – Silva TA, Vidal JE, Ferreira IM, Hiramoto RM, Pereira – Chioccola VL. **Use of the serum reactivity against *Txoplasma gondii***

- excreted – secreted antigens in cerebral toxoplasmosis diagnosis in human immunodeficiency virus – infected patients.** J Med Microbiol. 2008; 57(Pt 7): 845 – 50.
115. Meira CS, Vidal JE, Costa – Silva TA, Frazatii – Gallina N, Pereira – Chioccola VL. **Immunodiagnosis in cerebrospinal fluid of cerebral toxoplasmosis and HIV – infected patients using *Toxoplasma gondii* excreted/secreted antigens.** Diagn Microbiol Infect Dis. 2011; 71(3): 279 – 85.
116. Daryani A, Hosseini AZ, Dalimi A. **Immune responses against excreted/secreted antigens of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in the murine model.** Vet Parasitol. 2003; 113(2): 123 – 34.
117. Assoussou O, Besson F, Rouault JP, Persat F, Ferrandiz J, Mayeçon M, *et al.* **Characterization of an excreted/secreted antigen form of 14-3-3 protein in *Toxoplasma gondii* tachyzoites.** FEMS Microbiol Lett. 2004; 234(1): 19 -25.
118. Oakley MS, Kumar S, Anantharaman V, Zheng H, Mahajan B, Haynes JD *et al.* **Molecular factors and biochemical pathways induced by febrile temperatura in intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* parasites.** Infect Immun. 2007; 75(4): 2012 – 25.
119. Torres KJ, Clark EH, Hernandez JN, Soto-Cornejo KE, Gamboa D, Branch OH. **Antibody response dynamics to the *Plasmodium falciparum* conserved vaccine candidate antigen merozoite Surface protein – 1 C- terminal 19 kD (MSP1-19kD), in peruvian´s exposed to hypoendemic malaria transmission.** Malar J. 2008; 7:173.

120. Fratus AS, Cabra FJ, Fotoran WL, Medeiros MM, Carlos BC, Martha Rd *et al.* **Antibody recognition of *Plasmodium falciparum* infected red blood cells by symptomatic and asymptomatic individuals in the Brazilian Amazon.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014; 109(5): 598-601
121. Medeiros MM, Fotoran WL, dalla Martha RC, Katsuragawa TH, Pereira da Silva LH, Wunderlich G. **Natural antibody response to *Plasmodium falciparum* merozoite antigens MSP5, MSP9 and EBA 175 is associated to clinical protection in the brazilian amazon.** BMC Infect Dis. 2013; 13:608
122. Galatas B, Bassat Q, Mayor A. **Malaria parasites in the asymptomatic: looking for the hay in the haystack.** Trends Parasitol. 2016; 32(4):296-308
123. Mya MM, Roy A, Saxena RK, Roy KB. **Isolation, part characterization, immunogenicity and specificity study of *Plasmodium falciparum* culture supernatant.** Jpn J Infect Dis. 2002; 55(5):150-6.
124. Mya MM, Saxena RK, Roy A. **Sensitivity and specificity of isolated antigen from *Plasmodium falciparum* culture supernatant.** Indian J Clin Biochem. 2002; 17(1):75-82.

IX. ANEXOS

Anexo 1 - Mapa Comunidad de Zungarococha



Distribución de las villas de la Comunidad de Zungarococha: Llanchama (LC), Puerto Almendra (PA), Nina Rumi (NR) y Zungarococha (ZG)⁽⁷⁵⁾.

Anexo 2 - Consentimiento informado Comité de ética University of New York

IRB-401 04/23/2013 NYU IRB 13B 0000

 School of Medicine Institutional Review Board
 550 First Avenue, 11th Floor, New York, NY 10010
 Phone: (212) 264-2200 Fax: (212) 264-2200
 Email: irb@med.nyu.edu

Dra. Ora Lee Branch, Universidad de Nueva York (NYU) Facultad de Medicina
 Dr. Nicolás Sibuincha, Universidad Nacional de la Amazonia Peruana y Ministerio de Salud

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO Y AUTORIZACIÓN PARA PARTICIPAR EN UNA INVESTIGACIÓN

TÍTULO DE LA INVESTIGACIÓN:
 Malaria: Respuesta de la Respuesta Antígeno Inerte

A. PROPOSITO DEL ESTUDIO:
 Su participación en este estudio es voluntaria. El propósito principal de este estudio es determinar la cantidad de infecciones y tipo de malaria en su comunidad. La Malaria es una enfermedad causada por un parásito llamado Plasmodium, el cual se transmite por la picadura de un mosquito. Observaremos las variaciones de Plasmodium falciparum y P. vivax circulando en esta comunidad. Esto requiere tomar muestras de sangre y hacer algunas preguntas. Esclareceremos el propósito y los procedimientos de ser incluido que lo puedan proteger contra la infección y desarrollar la enfermedad. La meta de este estudio es proveer información de cómo prevenir y controlar recurrencias contra la malaria.
 EL PUESTO DE SALUD CONTIGUA SERÁ EL PRIMER LUGAR DONDE DEBE ACUDIR PARA SU ATENCIÓN MÉDICA SI ESTA ENFERMO, POR FAVOR ACUDA AL PUESTO DE SALUD.

B. SUJETOS PARTICIPANTES:
 Existencia que participará en este estudio en siguiente número de personas en la DETECCIÓN ACTIVA DE LA COMUNIDAD:
 En este lugar: 2,000 sujetos. Total en todos los lugares: 2,000
SUJETOS PARTICIPANTES:
 Pacientes internados
 Pacientes ambulatorios
 Otros: Miembros de la comunidad viviendo cerca donde hubo malaria.
 Su participación consistirá de 6 visitas en su casa, que se llevarán a cabo durante el tiempo que existan mosquitos de malaria. Cada una de estas visitas tomará aproximadamente 30 minutos.

C. DESCRIPCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN:
 Examinaremos su sangre para determinar el tipo de parásitos de malaria que usted tiene. Los análisis que hacemos nos ayudarán a identificar las causas donde viven personas que están en riesgo de contraer malaria. Los análisis de sangre nos ayudarán a determinar cómo su organismo combatirá la malaria lo cual hace que su enfermedad sea más curable. Esto incluye determinar qué nos ayuda a vencer a la malaria la habilidad de combatir a la malaria de forma diferente que otras personas. Observaremos las proteínas y genes necesarios que hacen los parásitos más capaces de infectar a usted. Asimismo las proteínas y genes que usted tiene que lo hacen resistente contra la malaria u otras infecciones.

Nombre del participante: _____ Fecha: _____

Yo, el/la Sr/a de abajo:
 Soy el/la responsable de la aprobación de este estudio por parte de la Universidad de Nueva York
 (Soy el/la responsable de la aprobación de este estudio por parte de la Universidad de Nueva York)
 Aprobado por: _____ Fecha: _____

SE DEBE CUMPLIR CON ESTOS REQUISITOS PARA PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO. Página 1 de 1


 INSTITUCIONAL REVIEW BOARD
 02 MAY 2013
 APROBADO
 FIRMADO

En cada visita le tomaremos aproximadamente 1 ml. de sangre (menos de 20 gotas). Podemos tomar la muestra de sangre de su dedo o de la vena de su brazo usando una pequeña aguja. Si le hacen algunos preguntas como su dirección, fecha de nacimiento, el lugar y de su familia, así como si ha estado enfermo, medicamentos y alimentación. Como parte de su examen físico, su médico puede tomar un hisopado de su garganta y solicitar una muestra de orina para determinar el estado de salud. Toda esta información será confidencial.

La principal razón de las visitas es llevarle pruebas de análisis en su sangre, que podría tener en presente síntomas.

Visita 1

Existen visitas todas las semanas en su residencia y proporciono por su participación en el estudio. La participación en este estudio es voluntaria.

Visita 2, 3, 4 y 5

Entre una semana y cuatro meses después, usted puede ser seleccionado para ser visitado semanalmente por un mes. Para determinar las personas que visitaremos semanalmente, seleccionaremos 10 casos alrededor de la casa donde ha sido malaria en el último mes. Esto significa que nosotros no sabemos cuándo o quienes serán seleccionados para las visitas semanales. En los siguientes meses, las casas para las visitas semanales serán seleccionadas usando un programa de computadora de los datos que se encuentran en riesgo de contagio y alerta. Usted puede elegir si participa en las siguientes semanas o puede interrumpir las visitas por la razón que usted crea conveniente.

Visita 6

Al final de la estación de malaria, regresaremos a sus casas para realizar la última visita. Si usted tuvo la primera visita de las 6 semanas, esta debe ser su Visita 6.

Durante todas las visitas, las personas que tengan fiebre de las hará una prueba de sangre el mismo día para ver si tienen malaria. Si las personas no tienen fiebre, los hisopos serán hechas en el transcurso de la semana, y los resultados serán entregados por el doctor en su próxima visita. Si su muestra no requiere que la limpió sea hecha inmediatamente por estar enfermo, usted podría tener malaria causada por parásitos y también puede manifestar fiebre de nuestra visita. En la siguiente visita, le entregaremos los resultados de la anterior visita y le daremos una nueva muestra. En el caso que usted tenga malaria, el tratamiento será otorgado sin costo por el Ministerio de Salud en el transcurso del día.

Si usted tiene malaria, se lo invitara a participar en el estudio clínico. Si usted no desea participar en el estudio de malaria, recibirá tratamiento de malaria por el Ministerio de Salud sin costo alguno en el transcurso del día.

Yo sé que he leído el siguiente método de toma de muestra: Fiebre de día Vespertino

D. COSTOS / REEMBOLSOS:

Todos los costos relacionados con la inclusión de usted en este estudio serán pagados por Subvenciones Beas. No cuesta nada la participación en este estudio.

E. POSIBLES RIESGOS E INCOMODIDADES:

Su participación en este estudio podría involucrar los siguientes riesgos o molestias:

La toma de sangre con una pequeña aguja puede causar un poco de dolor. Puede producir un moretón leve pero desaparecerá en los próximos días.

Los hisopos no causaran dolor.

Inicials del participante _____ Date _____

NYU-NIH IRB Form

This Consent Document is approved for use by the New York University Institutional Review Board

IRB: 01-01-08 (revised approval) 01/22/12

Approved: Site: _____ Date: _____ (to be used by form after the 01/22/12)

06-002 (01/22/12) www.consentform.com 01/22/12 (revised) Form 2 of 2



No existen efectos adversos de estos procedimientos. No hay problemas adicionales de mujeres embarazadas en la participación.

F. POSIBLES BENEFICIOS

Este estudio de investigación incluye procedimientos que informamos. Para asegurarnos de saber si tiene malaria, le vamos a pedir que tome una muestra de sangre. Si usted tiene síntomas de malaria o si deficiencias que es necesario, usted podría experimentar con la malaria de forma gratuita por parte del Ministerio de Salud. Además el cuidado de su bebé, y su muestra presentará un análisis informativo sobre usted y su comunidad y al mismo tiempo tomará medidas de reducir la malaria y mejorar la salud de las personas. Además, se le mostrarán cualquier resultado cuando el médico le diga el resultado, siendo entregados los resultados específicamente a usted en caso que no quiera participar.

G. ALTERNATIVAS A LA PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

Siempre existe una alternativa a la participación en este estudio, la misma es que usted no tiene que participar en este estudio. De lo que puede hacer la prueba de sangre y ser tratado para la malaria por el Ministerio de Salud aunque no desea participar en este estudio.

H. CONFIDENCIALIDAD

Información privada sobre usted que se divulgue solo debe usarse o compartirse por los fines de este estudio de investigación. Esta sección del formulario de consentimiento/autorización describe cómo se usará y protegerá su información en este estudio, y la manera de la cual la NYU Escuela de Medicina protegerá su privacidad y confidencialidad.

Si usted está de acuerdo de participar en este programa de investigación, su DPO de trabajo y el equipo de investigación le pedirá ciertos análisis para determinar si usted tiene una infección dentro el embarazo en qué manera esto podría afectar al crecimiento de su bebé. Algunos de estos análisis se realizarán como parte de su cuidado de salud normal. Ellos usarán los resultados de estos exámenes para darle feedback a usted como para completar esta investigación. Los resultados de estos exámenes serán guardados en un sistema seguro y se entregarán al Ministerio de Salud del Perú. Los resultados de exámenes y estudios efectuados solamente para este estudio de investigación y no como parte de su cuidado de salud regular no se incluirán en su historia clínica.

Es posible que otras personas y organizaciones, incluyendo co-investigadores, agencias federales o reguladoras del estado y el (OS) (IRB) supervisando la investigación reciban su información durante el desarrollo de este estudio.

Excepto si mandado por la ley, la información del estudio compartida con personas y organizaciones fuera de la Escuela de Medicina de la Universidad de Nueva York (NYU) no le identificará con su nombre, número de seguro social, dirección, número de teléfono, o información personal.

Cuando su información del estudio se divulgue fuera de la NYU como parte de la investigación, se eliminará la información que pueda identificarle en un nivel visible y se asignará un número de código único a su análisis. La NYU no revelará la clave del código, salvo el caso que la ley lo requiera.

Confidencialidad de Su Registro de Médico

La historia clínica será guardada de acuerdo a las leyes estatales y federales acerca de la privacidad y confidencialidad de información médica. Si su participación en este estudio es por motivo de tratamiento o diagnóstico, la información acerca usted es tratado como paciente de freely un formulario de consentimiento firmado aparte para los procedimientos específicos a este estudio, y este formulario de consentimiento

Nombre del participante _____ Fecha _____

IRB Official Use Only

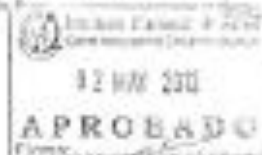
This Consent Document is approved in favor of the New York University Institutional Review Board

NYU IRB Form Approved Form IRB-00000001

Approved Date _____ Exp. Date _____ (do not use this form after the expiration date)

IRB-00000001, Revised and Issued 04/20/2012, Version 1.000

Page 3 of 6



Información podrá incluirse en la historia clínica de este estudio. La confidencialidad de su información también está protegida por las regulaciones federales de privacidad, según se describe a continuación.

Confidencialidad de su información del estudio

Su información de estudio incluye información que lo identifica y que está guardada en los archivos de la investigación. Nos esforzamos por mantener la confidencialidad de esta información, pero no podemos garantizarlo. Si se publicara o presentara una copia de este estudio, vamos a eliminar primero la información que lo identifica.

Retención de su información del estudio

Los resultados de este estudio serán guardados en su archivo del estudio durante un periodo de 6 años o después que se termine el estudio, lo que sea más largo. En ese momento o se destruirá la información de la investigación que aún no se encuentra en su historia clínica, o se eliminará la información que lo identifica de los archivos del estudio en NYU. Cualquier información de la investigación que se encuentra en su historia clínica será guardada independientemente.

Su autorización de HIPAA

Una nueva regulación federal, el Reglamento Federal de Privacidad Médico ha tomado efecto según mandado por la Ley de Portabilidad y Continuidad de Seguro de Salud (HIPAA). Bajo este reglamento de privacidad de la HIPAA de los casos debemos conseguir su consentimiento en escrito para usar o revelar información estadística de salud sobre usted que incluye nombre o número ("su información protegida de salud") en conexión con la investigación que involucra su interés de participar en el estudio. Este consentimiento se hace una autorización.

El usted firma esta formulario, está dando su autorización para el uso y compartir su información protegida de salud descrita abajo. Tiene el derecho de negarse a firmar este formulario. Si no firma el formulario, puede ser que usted no está en el programa de investigación, pero la negativa a firmar no afectará al cuidado de su salud (o los pagos para su atención médica) fuera de este estudio.

Esta autorización no caducará o vencerá que usted la retire en algún momento. Tiene el derecho de retirar su autorización en cualquier momento, o cuando NYU ya se apoyó en ella a fin de usar o revelar su información para completar los análisis de datos o para reportar datos para este estudio. El procedimiento para revisar su autorización se describe en la sección 6.

Al firmar este formulario usted autoriza el uso y la revelación de la siguiente información para esta investigación:

- Su Historia Clínica
- Su archivo del estudio
- Resultados de análisis de laboratorio
- Observaciones clínicas y de investigación hechas durante su participación en el estudio.

Al firmar este formulario usted autoriza a las siguientes personas y organizaciones de recibir su información protegida de salud para fines relacionados con esta investigación:

- Cada uno de la investigación, incluyendo este hospital, y incluyendo al personal médico de cada uno
- Cada proveedor de atención médica que brinda su servicio a usted en conexión con este estudio
- Las agencias regulatorias de la investigación de los Estados Unidos y otras agencias regulatorias extranjeras

Nombre del participante _____ Fecha _____

NYU O Bona Fide (Yes)

This document is approved for use by the New York University's Institutional Review Board

NYU O Bona Fide (Yes) and may be used.

Approved Date: _____ Exp: _____ (Do not use this form after the exp. date.)

NY 10000422 revision form 04-23-2014 Revised: JWA Page 4 of 4

NYU Form 802 HHSO
 4/23/2014
 APROBADO

datos de la investigación. Si usted recibe su asignación para el uso de muestras biológicas guardadas tiene que ponerse en contacto sobre este asunto inmediatamente en escrito.

La investigadora principal o otro miembro del equipo del estudio conversará con usted sobre cualquier limitación en vista de la reevaluación de su participación en este estudio. Le informaremos cómo se puede retirar del estudio y es posible que le pidamos de volver para una nueva visita.

El doctor del estudio también puede decidir de retirar a usted del estudio por ciertos razones. Podría hacerlo para retirar un sujeto del estudio porque del deterioramiento de la salud u otras condiciones que puedan hacerle difícil para venir. Es posible que el estudio se interrumpa o se cancela debido a la pérdida de dinero para el estudio por las subvenciones y fondos.

L. PERMISO PARA CONTACTARNOS CON USTED RESPECTO A FUTURAS INVESTIGACIONES:

Yo autorizo a la investigadora principal y sus co-investigadores de contactarme sobre investigaciones en el futuro sobre Malaria: Respuesta de la Respuesta Antígeno Inmune en la NYU Escuela de Medicina, Departamento de Microbiología, la Universidad Arzobispo Parsonsi (NAP) y el Ministerio de Salud del Perú, siempre que esta investigación en el futuro está aprobada por el organismo de registro y que el investigador principal y el co-investigador sean afiliados al proceso de investigación.

Si me surge de acuerdo, alguien del personal de investigación de Dr. Duilio Bronson podría contactarme en el futuro y le pedirá me informo sobre un estudio de investigación. Entonces tendrá la conformidad de contacta al investigador para hacer una cita para recibir la información completa acerca del proyecto de investigación.

Estoy de acuerdo que se contacten conmigo sólo investigadora principal o los co-investigadores del estudio de investigación "Malaria: Respuesta de la Respuesta Antígeno Inmune".

No quiero que se contacten conmigo sólo a investigadora principal o los co-investigadores del estudio de investigación "Malaria: Respuesta de la Respuesta Antígeno Inmune".

Firma del participante o del representante legal

MAY 09, 2012
Fecha (mm/dd/yyyy)

Le agradeceríamos mucho su consentimiento o permisos o contactara sobre investigaciones en el futuro, pero esto es completamente voluntario. Si usted opta por no permitirnos que lo contactemos, esto no afecta a cuidado de usted o su bebé. Le pedimos que entienda que si eso de el permiso de hacer esto, sería solamente para el fin de ayudarnos a identificar sujetos que podrían calificar para una de nuestras investigaciones en el futuro. Esto no significa que usted o su niño tiene que participar en algún estudio.

M. PERSONAS DE CONTACTO

Si Ud. (o su hijo) tiene alguna pregunta acerca del estudio o preguntas sobre dato alguno relacionada con el estudio, por favor contactarse con el Dr. Juan Hernández (986-940023) y/o al Dr. María Sánchez (986-940015). Si Ud. tiene cualquier pregunta acerca de sus derechos como participante en el estudio, Ud. puede comunicarse con los Drs. mencionados anteriormente o con el Comité Institucional de Ética del Hospital Nacional de Salud, Perú, Dr. Duilio Fuentes Delgado: 51-0176200 Anexo 2175 o 2179. También puede comunicarse con los Investigadores Asociados de la Universidad de Nueva York de los Estados Unidos al Teléfono No 001-212-203-4110.

ACUERDO DE PARTICIPAR Y AUTORIZACIÓN PARA EL USO O LA REVELACIÓN DE INFORMACIÓN PROTEGIDA DE SALUD

Inicial del participante _____ Fecha _____

IRB 09021-09-0002
This Consent Document is approved by you by the New York University Institutional Review Board
09021-09-0002 Approved for you by the Institutional Review Board
Approved Date _____ Date _____ (mm/dd/yyyy)

IRB NO 09021-09-0002 Form 05/20/2012 8/2009-2011

Página 8 de 8



Una parte del proceso de consentimiento incluye su autorización para el uso de información protegida de salud antes las fechas de este estudio, según describe arriba. Si no desea dar su autorización para el uso de esta información protegida de salud, no debería consentir en su participación en este programa de investigación.

He leído este consentimiento o He leído la versión _____
 Cualquier pregunta que tuvo fue respondida por _____ que es un profesional capacitado en este tema. No estoy participando en otro proyecto de investigación de este momento.

Yo consiento voluntariamente en mi participación en este programa de investigación.
 Yo entiendo que tengo derecho a y recibiré una copia de este Formulario de Consentimiento/ Autorización Inicial.
 Al firmar este Formulario de Consentimiento/Autorización, yo doy mi afirmación para las usas y revelaciones de mi información protegida de salud según describe arriba.

CUANDO EL PACIENTE ES UN ADULTO Y CUANDO ES REQUERIDO EL PERMISO DEL PARIENTE

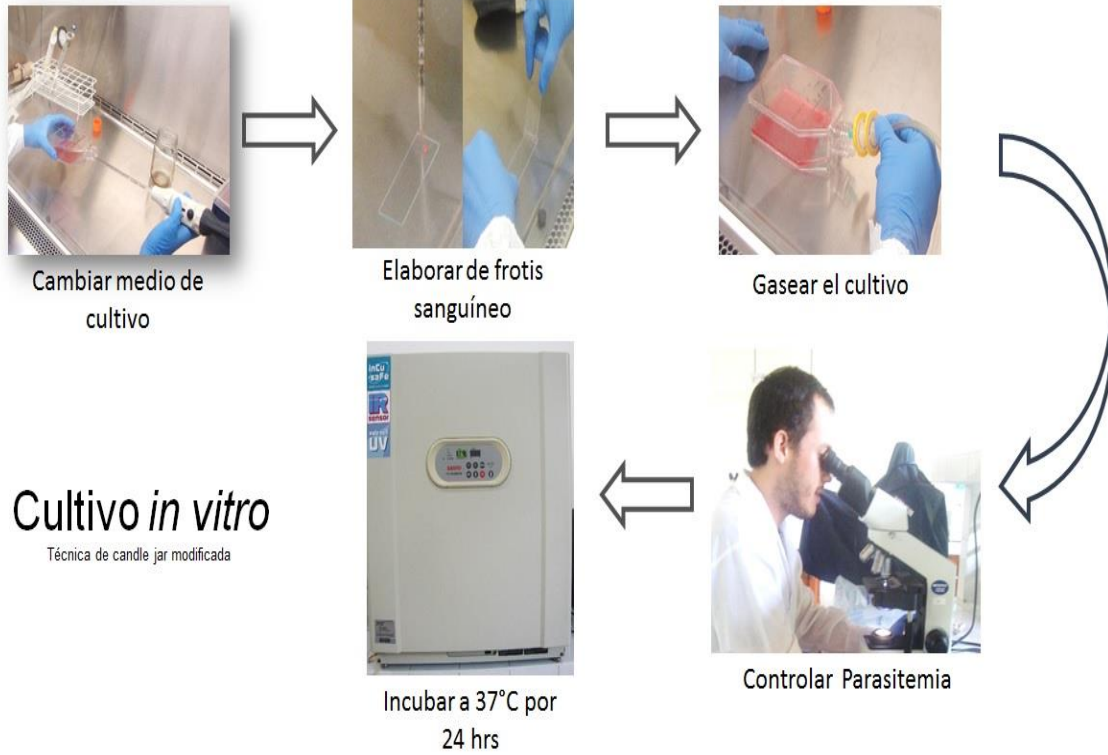
Nombre del participante o representante legal*	Firma del participante o representante legal*	Fecha (mes/año/día)
Nombre de la persona que obtiene el consentimiento	Firma de la persona que obtiene el consentimiento	Fecha (mes/año/día)
Nombre del testigo	Firma del testigo	Fecha (mes/año/día)

* Cuando los elementos del consentimiento informado son presentados únicamente al participante o representante, se requerirá un testigo de la presentación del.

Revisado por el participante _____
 2010 (FORM 144-0-002)
 This Consent Document is approved for use by the New York University Institutional Review Board (IRB). Only the IRB approved approval form may be used.
 Approval Form _____
 04/23/2012 (FORM 144-0-002) (Rev. 04/23/2012) Page 1 of 1

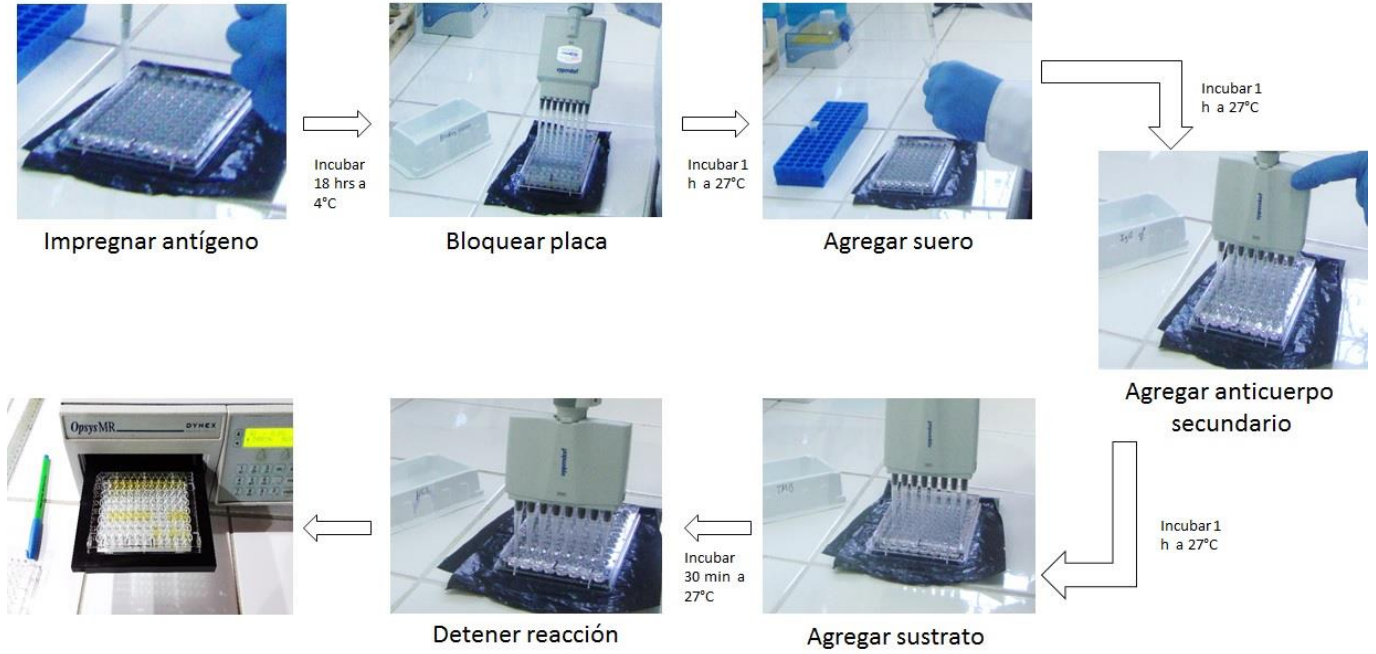


Anexo 3 - Flujograma de Cultivo *in vitro* de *P. falciparum*



Anexo 4- Flujograma prueba de ELISA

ELISA



Clarck, *et al.*, (2012), modificado