



**UNAP**



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**TESIS**

**NIVELES DE INMUNOGLOBULINAS M Y G CONTRA LA PROTEÍNA DE  
SUPERFICIE DEL MEROZOITO 1- 19kDa DE *Plasmodium falciparum* EN  
MALARIA SINTOMÁTICA Y ASINTOMÁTICA**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIOLOGO**

**PRESENTADO POR:**

**KATTY MADELEINE ARISTA FLORES**

**ÍTALO JAVIER CHÁVEZ DEL RÍO**

**ASESORES:**

**Blgo. JORGE LUIS MARAPARA DEL AGUILA, Dr.**

**Blga. CLAUDIA JEANNETE SILVA MORENO, M.Sc.**

**IQUITOS, PERÚ  
2019**



**UNAP**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS N° 001-CGT-UNAP-2019**

En Iquitos, en el auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas al primer día del mes de octubre de 2019, a horas 17:00 se dió inicio a la sustentación pública de la Tesis titulada: "NIVELES DE INMUNOGLOBULINAS M Y G CONTRA LA PROTEÍNA DE SUPERFICIE DEL MEROZOÍTO 1-19kDa DE *Plasmodium falciparum* EN MALARIA SINTÓMATICA Y ASINTOMÁTICA", aprobado con RESOLUCIÓN DECANAL N° 220-2019-FCB-UNAP, presentado por los Bachilleres KATTY MADELEINE ARISTA FLORES e ÍTALO JAVIER CHÁVEZ DEL RÍO, para optar el Título Profesional de BIÓLOGO/A, que otorga la UNAP de acuerdo a Ley 30220 y su Estatuto.

El Jurado Calificador y dictaminador designado mediante RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 142-2014-DEFP-B-FCB-UNAP de fecha 26 de junio de 2014, está integrado por:


- Biga. BLANCA MARÍA DÍAZ BARDALES, Dra. - Presidenta
- Biga. CARMEN TERESA REATEGUI BARDALES, Mgr. - Miembro
- Bigo. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ, Dr. - Miembro

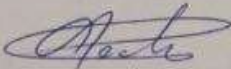
Luego de haber escuchado con atención y formulado las preguntas, las cuales fueron respondidas: en su mayoría de forma satisfactoria

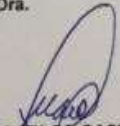
El jurado después de las deliberaciones correspondientes, llegó a las siguientes conclusiones:


La sustentación pública y la Tesis ha sido aprobada con la calificación de Buena, estando los Bachilleres aptos para obtener el Título Profesional de BIÓLOGO/A.

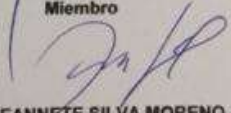
Siendo las 19:00 horas se dió por terminado el acto de sustentación.

  
Biga. BLANCA MARÍA DÍAZ BARDALES, Dra.  
Presidenta

  
Biga. CARMEN TERESA REATEGUI BARDALES, Mgr.  
Miembro

  
Bigo. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ, Dr.  
Miembro

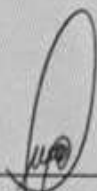
  
Bigo. JORGE LUIS MARAPARA DEL ÁGUILA, Dr.  
Asesor

  
Biga. CLAUDIA JEANNETE SILVA MORENO, M.Sc.  
Asesora

## JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR



Blga. Blanca María Díaz Bardales, Dra.  
**Presidente**



Blgo. Juan Carlos Castro Gómez, Dr.  
**Miembro**



Blga. Carmen Reátegui Bardales, M.Sc.  
**Miembro**

## ASESORES



---

Blgo. Jorge Marapara Del Aguila, Dr.  
**Asesor**



---

Blga. Claudia Jeannette Silva Moreno, M.Sc.  
**Co-asesor**

## **DEDICATORIA**

*A mi querida madre, Juana Flores de Arista por darme la vida, por su sacrificio y su lucha constante en mi crianza y mi educación, al igual que la de mis hermanos. A mi hermana mayor Rosa Natalia, por sus consejos y por todo el apoyo brindado, poniéndose muchas veces en el papel de madre. A estas valerosas mujeres, que con su esfuerzo me enseñan a superar los desafíos del día a día.*

### **Arista Flores, Katty Madeleine**

*A mi esposa Claudia y a mi hijo Jacobo quienes me apoyaron y alentaron para continuar, cuando parecía que me iba a rendir. A mi madre y familia en general por sus consejos. A mis maestros quienes nunca desistieron al enseñarme y continuaron depositando su esperanza en mí. A todos los que me apoyaron para escribir y concluir esta tesis.*

### **Chávez Ríos, Ítalo Javier**

## **AGRADECIMIENTO**

De forma especial queremos agradecer al Dr. Jorge Marapara Del Águila, por su asesoramiento, por las enseñanzas, la dedicación y el tiempo brindado a este trabajo y por ser un docente que viene contribuyendo a la generación de nuevos profesionales.

Agradecemos también de un modo especial a la Blga. Claudia Jannette Silva Moreno, que como asesora nos brindó su apoyo incondicional, disponibilidad y paciencia en el desarrollo de este estudio que representa nuestra tesis.

Agradecemos al Centro de Investigación de Recursos Naturales de la Amazonía- CIRNA, quien fuera representado por la Dra. Lastenia Ruiz Mesía, por concedernos los ambientes del laboratorio de Biología Molecular e Inmunología, de la Unidad Especializada LIPNAA- Laboratorios de Investigación de Productos Antiparasitarios de la Amazonia para la realización de las evaluaciones del presente estudio.

Nuestro más sincero agradecimiento a la Dra. Oralea H. Branch, quien fuese Director General del Proyecto MALARIA IMMUNOLOGY AND GENETICS IN THE AMAZON- MIGIA, por permitirnos utilizar parte de las muestras colectadas durante muchos años de estudio, a su equipo profesional y técnico por el arduo trabajo realizado en la captación de las muestras y a los habitantes de las comunidades de Zungarococha, Puerto Almendras, Ninarumi y Llanchara por la accesibilidad y colaboración en el desarrollo del proyecto mencionado.

## INDICE DE CONTENIDO

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N° 001 .....	ii
JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR .....	iii
ASESORES .....	iv
DEDICATORIA .....	v
AGRADECIMIENTO .....	vi
INDICE DE CONTENIDO .....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE ANEXOS .....	xii
RESUMEN.....	xiii
INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO.....	3
1.1. Antecedentes .....	3
1.2. Bases teóricas.....	8
1.2.1. Generalidades de la malaria.....	8
1.2.2. Ubicación taxonómica .....	10
1.2.3. Epidemiología de la malaria .....	10
1.2.4. Ciclo de vida de <i>Plasmodium sp.</i> .....	15
1.2.5. Determinantes patogénicos de la malaria .....	17
1.2.6. Proteína de superficie del merozoito 1-19KDa (MSP 1-19 KDa) de <i>P. falciparum</i> .....	20
1.2.7. Respuesta inmune a malaria.....	22

1.2.8. Respuesta inmunitario humoral .....	24
1.2.9. Malaria asintomática.....	27
<b>CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES .....</b>	<b>29</b>
2.1. Formulación de hipótesis.....	29
2.1.1. Hipótesis 1.....	29
2.1.2. Hipótesis 2.....	29
2.2. Variables.....	30
2.2.1. Variable independiente.....	30
2.2.2. Variable dependiente.....	30
<b>CAPÍTULO III: METODOLOGÍA .....</b>	<b>31</b>
3.1. Materiales .....	31
3.1.1. Material biológico.....	31
3.1.2. Soluciones y reactivos .....	31
3.1.3. Equipos.....	32
3.1.4. Otros.....	32
3.2. Metodología.....	33
3.2.1. Área de estudio.....	33
3.2.2. Tipo y diseño de investigación.....	34
3.2.3. Criterios de selección.....	35
3.2.4. Procedimientos para la recolección de los datos.....	35
3.2.4.1. Obtención y selección de la muestra .....	36
3.2.4.2. Diagnóstico microscópico para la determinación de la densidad parasitaria .....	36



<b>3.2.4.3. Medición de IgM e IgG: Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)</b> .....	38
<b>3.2.5. Procesamiento de los datos y análisis estadístico</b> .....	43
<b>3.2.6. Declaraciones éticas</b> .....	44
<b>CAPÍTULO IV: RESULTADOS</b> .....	45
<b>4.1. Niveles de Inmunoglobulinas M y G contra la Proteína de Superficie del Merozoito 1-19kDa de <i>P. falciparum</i> de infecciones por malaria sintomáticas y asintomáticas, los días 0, 14 y 45 a 60 de seguimiento</b> .....	45
<b>4.2. Relación entre los niveles de densidades ópticas de Inmunoglobulinas G y M contra la proteína de superficie del merozoito 1 -19kDa <i>P. falciparum</i> y las densidades parasitarias de infecciones por sintomática y asintomática</b> .....	47
<b>CAPITULO V: DISCUSIÓN</b> .....	50
<b>CAPITULO VI: CONCLUSIONES</b> .....	52
<b>CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES</b> .....	53
<b>FUENTES DE INFORMACIÓN</b> .....	54
<b>ANEXOS</b> .....	71

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Países con transmisión activa a malaria entre los años 2000 y 2016.....	11
<b>Figura 2.</b> Distribución de la malaria en la Región de las Américas, 2016.....	13
<b>Figura 3.</b> Incidencia de malaria por distritos del Perú, 2018.....	155
<b>Figura 4.</b> Ciclo biológico de parásitos del género <i>Plasmodium</i> . ....	17
<b>Figura 5.</b> Principales antígenos expresados en el estadio merozoito del <i>P. falciparum</i> .....	19
<b>Figura 6.</b> Proceso de invasión del merozoíto al eritrocito.....	20
<b>Figura 7.</b> Organización genética y procesamiento proteolítico de la proteína de superficie del merozoito MSP1.....	22
<b>Figura 8.</b> Estructura esquemática de una molécula de anticuerpos.....	25
<b>Figura 9.</b> Curva de la respuesta inmune por anticuerpos IgM e IgG ante una infección.....	26
<b>Figura 10.</b> Esquema de las comunidades del estudio.....	34
<b>Figura 11.</b> Niveles de IgM contra la Proteína de Superficie del Merozoito 1-19kda de <i>P. falciparum</i> de infecciones por malaria sintomática y asintomática, los días 0, 14 y 45 a 60 de seguimiento.....	45
<b>Figura 12.</b> Niveles de IgG contra la Proteína de Superficie del Merozoito 1-19kda de <i>P. falciparum</i> de infecciones por malaria sintomática y asintomática, los días 0, 14 y 45 - 60 de seguimiento. ....	46
<b>Figura 13.</b> Tendencia de los niveles de IgM e IgG contra la proteína de	

superficie del merozoito 1-19kDa de *P. falciparum* de infecciones por malaria sintomática y asintomática, en los días 0, 14 y 45-60 días de seguimiento..... 46

**Figura 14.** Determinación de la relación entre los niveles de densidades ópticas de IgM contra la proteína de superficie del merozoito 1 -19kDa *P. falciparum* y las densidades parasitarias de infecciones por malaria sintomática..... 47

**Figura 15.** Determinación de la relación entre los niveles de densidades ópticas de IgG contra la proteína de superficie del merozoito 1 -19kDa *P. falciparum* y las densidades parasitarias de infecciones por malaria sintomática.....48

**Figura 16.** Determinación de la relación entre los niveles de densidades ópticas de IgM contra la proteína de superficie del merozoito 1 -19kDa *P. falciparum* y las densidades parasitarias de infecciones por malaria asintomática.....48

**Figura 17.** Determinación de la relación entre los niveles de densidades ópticas de IgG contra la proteína de superficie del merozoito 1 -19kDa *P. falciparum* y las densidades parasitarias de infecciones por malaria asintomática.....49

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Formulario de consentimiento informado, Comité de Ética Instituto Nacional de Salud. ....	71
<b>Anexo 2.</b> Flujograma del Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA). ....	77
<b>Anexo 3.</b> Preparación de soluciones del ELISA Anexo .....	77
<b>Anexo 4.</b> Cálculo del Umbral de Reactividad (UR) mediante la curva ROC. ....	80
<b>Anexo 5.</b> Niveles de IgM e IgG contra la Proteína de Superficie del Merozoito 1-19kDa de <i>P. falciparum</i> de infecciones por malaria sintomáticas y asintomáticas, los días 0, 14 y 45 a 60 de seguimiento.....	81
<b>Anexo 6.</b> Relación entre los niveles de densidades ópticas de IgM e IgG contra la proteína de superficie del merozoito 1 -19kDa <i>P. falciparum</i> y las densidades parasitarias de infecciones por sintomática y asintomática.....	82

## RESUMEN

La malaria asintomática y las bajas densidades parasitarias constituyen obstáculos para el control y la eliminación de esta infección, a esto se suma la compleja e insuficientemente comprendida respuesta inmunitaria que se genera, por lo que, los mecanismos de inmunidad protectora a malaria mediante los estudios de la respuesta inmune mediada por anticuerpos contra antígenos de *Plasmodium* son la clave para su entendimiento. Por ello, el presente estudio evaluó los niveles de inmunoglobulinas M (IgM) e IgG como respuesta inmune contra la proteína de superficie del merozoito 1-19kDa (MSP1- 19 kDa) de *Plasmodium falciparum* y su relación con las densidades parasitarias de infecciones por malaria sintomática, y asintomática en cuatro comunidades cercanas al sur de Iquitos (Zungarococha, Puerto Almendra, Ninarumi y Lanchama). Un total de 135 muestras de plasma de la cohorte del proyecto MIGIA, divididas en infecciones sintomáticas y asintomáticas a malaria los días 0, 14 y 45- 60, fueron analizadas por el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Se observaron diferencias entre los grupos de malaria sintomática y asintomática en el día 0 de la infección para la respuesta de IgG ( $p < 0.05$ ), además, Los niveles de IgM y las densidades parasitarias en individuos con malaria sintomática por *P. falciparum* presentaron una correlación positiva moderada fuerte estadísticamente significativa ( $Rho = 0,546$ ;  $p < 0.05$ ), indicando que al aumentar los niveles de IgM aumentan las densidades parasitarias o viceversa. Los niveles de IgG son muchos más altos en pacientes asintomáticos confiriendo una protección clínica.

**Palabras claves:** ELISA, Inmunoglobulina M, Inmunoglobulina G, infecciones asintomáticas, malaria, parasitemia, *Plasmodium falciparum*.

## INTRODUCCIÓN

Malaria también llamada paludismo, es la enfermedad parasitaria más importante que afecta al ser humano, pues expone a 3200 millones de personas que habitan áreas tropicales y subtropicales en el mundo, y que ocasionó 219 millones de casos y 435 000 muertes en el año 2017<sup>1</sup>. En América, alrededor de 109 millones de personas viven en zonas con riesgo de transmisión a malaria, así mismo, existe una proporción de que por cada 100 personas; seis de ellas se encuentran habitando zonas consideradas de alto riesgo (> 10 casos / 1,000 habitantes)<sup>2</sup>. En Perú, es considerada un problema de salud pública, donde el 30% de la población están expuestas o viven en áreas de riesgo que favorecen la transmisión y están determinados por factores ecológicos, asociados a zonas tropicales y de desierto con riego en la costa norte, en la región montañosa del noroeste, la selva en la región sudoeste central y en la selva tropical baja de la región amazónica<sup>3, 4</sup>, principalmente en el departamento de Loreto, que en los últimos años sigue concentrando el mayor número de infecciones reportadas, de tal forma que para el año 2018, se notificaron 42 862 casos (96.5%) por malaria a nivel nacional<sup>5</sup>.

Así mismo, a este escenario se le suma la presencia de infecciones con baja densidad parasitaria y ausencia de sintomatología, que presentan mayor prevalencia en áreas endémicas y que se ven asociados con la inmunidad que adquiere el individuo después de continuas infecciones a la que se ha visto expuesto<sup>6</sup>, a todo ello, los esfuerzos desplegados para

lidar contra esta enfermedad mediante las estrategias clásicas para su control y eliminación continúan fallando, considerando prioritario nuevos métodos para combatirla, siendo así, que las inmunizaciones a través de las vacunas son el método más poderoso para prevenir enfermedades infecciosas, pero lamentablemente para el caso de malaria, que a pesar de que existan algunos resultados prometedores, hasta la actualidad no se ha podido conseguir una vacuna eficaz capaz de contrarrestarla, esto puede deberse a la falta del conocimiento del tipo de respuesta inmune necesaria para la protección contra la enfermedad<sup>7, 8</sup>.

Es así que este problema ha llevado a la búsqueda de nuevos conocimientos en cuanto a la respuesta inmunitaria, que en el caso de malaria es algo compleja e insuficientemente entendida<sup>9</sup>, por lo que la clave para la comprensión de los mecanismos de inmunidad protectora, son los estudios de la respuesta inmune mediada por anticuerpos contra antígenos de *Plasmodium*, que a su vez, fueron demostrados en investigaciones previas, en donde se observaron que los niveles de anticuerpos del paciente infectado frente a proteínas conservadas de la superficie de merozoito desarrollan una respuesta, la cual, podrían reducir la densidad de parásitos o incluso bloquear la infección<sup>10</sup>.

Por consiguiente, el presente estudio propuso evaluar los niveles de IgM e IgG como respuesta inmune contra la proteína de superficie del merozoito 1-19kDa de *P. falciparum* y su relación con las densidades parasitarias de infecciones por malaria sintomática y asintomática.

## CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

### 1.1. Antecedentes

En el 2018, se realizó un estudio donde se observaron las respuesta de subclases de Inmunoglobulina G a antígenos secretados y excretados de *Plasmodium falciparum* en áreas de baja transmisión de malaria de la Amazonia Peruana, determinaron que en pacientes asintomáticos la correlación entre IgG1 y IgG3 fue mayor que los pacientes sintomáticos en los cuales la correlación entre Ig2 e IgG fue mayor; observaron también, que la densidad parasitaria fue mayor en pacientes sintomáticos que en pacientes asintomáticos<sup>11</sup>.

En 2017, se desarrolló un estudio en Kedogou (sudeste de Senegal), donde se evidenció una sorprendente prevalencia alta de la respuesta inmune de IgG contra *P. vivax* MSP1, presentando así de una cohorte de 48 niños el 53% de muestras positivas y el 77% *P. falciparum*. El estudio se realizó en dos estaciones lluviosos y seca, mostrando que la prevalencia de la respuesta no difería en función de esta. De esta manera los niveles de anticuerpos contra *P. falciparum* tuvo un aumento significativo entre la estación seca y lluviosa ( $P < 0.05$ ), a diferencia de la respuesta a *P. vivax*. Así también hubo una relación recíproca significativa ( $P < 10^{-3}$ ) entre las respuestas de anticuerpos a diferentes antígenos, pero con un coeficiente de correlación débil (Rho de aproximadamente 0,3), lo que sugiere un perfil variable a nivel individual<sup>12</sup>.



En 2012, investigadores realizaron una investigación titulada “*Plasmodium falciparum* en la Amazonia Peruana, una región de baja transmisión que está asociada con la memoria inmunológica” y que tuvo como objetivo el evaluar varios antígenos que son candidatos a vacuna contra *P. falciparum*, entre los que destacan el antígeno de membrana apical 1 (AMA-1), la proteína circumsporozoito (CSP), el antígeno de unión a eritrocitos 175 (EBA-175) y la región de 19 kDa de la proteína de superficie del merozoíto 1 (MSP- 1 19kDa), observando una respuesta a anticuerpos más amplio para MSP-1 19kDa, por lo que, posteriormente evaluaron la magnitud y la longevidad de las respuestas de IgG específicas para este antígeno en adultos y niños de Zungarococha, antes, durante y después de la infección por *P. falciparum*, y encontraron que en esta zona de baja transmisión, una infección previa reportada es suficiente para producir una respuesta positiva anti-IgG MSP1-19kD durante > 5 meses en ausencia de reinfección<sup>10</sup>.

En el 2010, un estudio titulado: “*Plasmodium sp.* en pobladores asintomáticos, en el Valle Hondo, Municipio de Sifontes, Estado de Bolívar, que ocupa uno de los primeros lugares como zona endémica para malaria en Venezuela, buscaba determinar la prevalencia de malaria asintomática en esta comunidad minera, para ello, contaron con la participación de 114 pobladores que no estaban recibiendo tratamiento antimalárico y que no presentaban síntomas de malaria, a los que se realizaron exámenes de gota gruesa, extendido y hematología completa siendo la prevalencia de *Plasmodium sp.* de 14,04%, la especie más

prevalente fue *P. vivax* con un 87,50%, seguido de infección por *P. falciparum* con un 6,25%; y de infección mixta de *P. vivax* y *P. falciparum* el 6,25%. Los índices parasitarios o el nivel de parasitemia encontrado en esta investigación fue de infección leve de 81,25% en la mayoría de los casos, concluyendo que la malaria asintomática es una característica común en zonas endémicas<sup>13</sup>.

En el año 2012, realizaron un estudio titulado: “Respuestas de anticuerpos IgG contra antígenos de merozoito de *P. falciparum*, en niños de Kenia”, en el que se monitorizaron las respuestas de subtipos de IgG a cinco antígenos recombinantes de merozoito de *P. falciparum* (MSP-1 19, MSP-2 tipo A y B, AMA-1 y EBA-175 región II) mediante la prueba de ELISA, durante 12 semanas después de un episodio agudo de malaria, obteniendo como resultado que, las respuestas inmunes Antígeno-anticuerpos, alcanzan niveles máximos de anticuerpos en la semana 1 y luego se deterioraron rápidamente a niveles muy bajos dentro de las 6 semanas, manifestando que los anticuerpos contra los antígenos de merozoitos tienen periodos muy cortos de existencia y esto debe tenerse en cuenta al diseñar estudios serológicos y vacunas basadas en los antígenos<sup>14</sup>.

En el 2010, desarrollaron una investigación denominada “Respuesta de anticuerpos a la Proteína de Superficie del Merozoíto-1 19 kDa de *P. falciparum* en la Amazonia Peruana, dirigido principalmente a los sitios compartidos no específicos de alelos de este antígeno”, de tal forma,

tuvieron como objetivo, investigar el potencial de polimorfismo específicos del alelo Pf MSP1-19KDa de la población de Zungarococha y la especificidad del alelo en las respuestas de anticuerpos IgG a Pf MSP1-19kDa. Fue así que, para probar si la diversidad genética de Pf MSP1-19kDa tenía algún impacto en las respuestas de anticuerpos, realizaron pruebas ELISA de respuesta de anticuerpos IgG en 160 infecciones a malaria por *P. falciparum*, utilizando los cuatro tipos de alelos de Pf MSP1-19KD (E-KNG, Q-KNG, Q-TSR Y E-TSR). Por consiguiente, obtuvieron como resultado que las respuestas de anticuerpos en 105 infecciones mostraron que los alelos Q-KNG y Q-TSR generaron las respuestas inmunitarias más fuertes, mientras que las respuestas Q-KNG y E-KNG fueron más concordantes entre sí que con las de Q-TSR y E-TSR, y viceversa. En tal sentido, concluyeron que, una respuesta de anticuerpo no específica de alelo en PfMSP1-19kDa puede explicar por qué otras formas alélicas no se han mantenido o evolucionado en esta población, siendo posible que los peruanos de esta zona hayan aumentado las respuestas de anticuerpos a los sitios compartidos de PfMSP1-19kDa, ya sea debido a las características de exposición/parásito o debido a una predisposición genético humano<sup>15</sup>.

En el 2008, investigadores realizaron un estudio en la Amazonia Peruana, denominado “Dinámica de la respuesta de anticuerpos al antígeno conservado candidato a vacuna, Proteína de Superficie del Merozoíto-1 C-terminal 19kDa, en peruanos expuestos a transmisión hipoendémica de malaria, que tuvo como objetivo el evaluar la respuesta inmune por

anticuerpos al antígeno MSP1-19kDa de *P. falciparum*, en adultos y niños de las comunidades de Zungarococha, a los que se le realizaron detección activa de casos en marzo del 2003, además de, febrero y agosto del 2004, así mismo, realizaron detección pasiva de casos durante esos dos años. Ante los resultados obtenidos, concluyeron que, los individuos en áreas de baja transmisión pueden desarrollar y mantener rápidamente las respuestas por MSP1-19kD IgG por >4 meses a diferencia de las respuestas reportadas en áreas de estudios con alta transmisión. Es posible que una mayor capacidad inmunológica contribuya a las frecuentes infecciones asintomáticas por *P. falciparum* en esta población peruana<sup>16</sup>.

En el año 2008, se desarrolló una investigación en Gambia, titulada “Duración de la respuesta de anticuerpos adquiridos naturalmente contra antígenos específicos de *P. falciparum* de estadio sanguíneo” y que tuvo como fin el examinar los determinantes de la longevidad de la respuesta de la inmunoglobulina G (IgG) a varios antígenos de *P. falciparum* que son candidatos a vacuna, en dos cohortes de niños menores de 6 años, durante la temporada seca de diciembre del 2002 a junio del 2003 (cohorte 1) y la temporada seca de febrero a mayo del 2004 (cohorte 2). Los anticuerpos contra la mayoría de los antígenos disminuyeron más lentamente en los niños del grupo de edad más avanzada (> 5 años) y más rápidamente en los niños del grupo más joven (<3 años). Las diferencias específicas por edad y antígeno específico, no se explicaron por diferentes perfiles de respuesta de la subclase IgG, lo

que indica la probable importancia de las longevidades diferenciales de las poblaciones de células plasmáticas en lugar de las moléculas de anticuerpo. Es probable que los niños pequeños tengan en su mayoría células plasmáticas de vida corta y experimenten así una rápida disminución de los niveles de anticuerpos, pero que los niños mayores tengan respuestas de anticuerpos de mayor duración que dependen de células plasmáticas de larga vida<sup>17</sup>.

## **1.2. Bases teóricas**

### **1.2.1. Generalidades de la malaria**

El término malaria surge del italiano medieval “malaria”, que quiere decir “mal aire”, haciendo relación a la enfermedad con los malos olores de los pantanos, también es llamada paludismo, “palud” que proviene del latín, que significa cenagoso, pantanoso<sup>18,19</sup>. Así mismo, esta enfermedad es conocida desde tiempos remotos, pues existen escrituras del antiguo Egipto que hacen alusión de su presencia en sus poblaciones, además, registros chinos que datan del 2700 a.C., en los cuales, se describieron varios síntomas característicos de esta dolencia. Además, la malaria fue extensamente conocida en el año 400 a.C. en Grecia, causando pérdidas en sus poblaciones citadinas y rurales, también descrita en el *Susruta*, un tratado médico sánscrito, que es una lengua India de los siglos XV y V a. C., en donde mencionaban los síntomas febriles por malaria y que eran atribuidos a

las picaduras de ciertos insectos<sup>19</sup>.

A su vez, esta enfermedad transmisible tiene como agente etiológico a parásitos del género *Plasmodium*, que fueron identificados por el investigador francés Alphonse Laveran en 1880<sup>20</sup> y posteriormente en 1897; el oficial británico Ronald Ross, demostró que el mosquito del género *Anopheles* es el vector transmisor de este parásito<sup>21</sup>. Así mismo, esta infección es producida por cinco especies de *Plasmodium* que infectan al ser humano, las cuales, cuatro de estas son antroponóticas, entre ellas *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, y *P. ovale*<sup>22</sup>, describiéndose recientemente para esta última, dos subespecies genéticamente diferentes *P. ovale curtisi* y *P. ovale wallikeri*<sup>23</sup>. Además, existe una forma de malaria, *P. knowlesi*, que es zoonótica, pero potencialmente fatal en los humanos, la cual, se creía que afectaba solo a simios<sup>24</sup>.

Cabe recalcar que al inicio la sintomatología de la malaria puede ser inespecífica, pudiendo confundirse con una infección viral sistémica de menor gravedad, dentro de los que destacan el de dolor de cabeza, fatiga, dolor abdominal, muscular y articular, además de un cuadro febril agudo que viene acompañado de escalofríos, sudoración, todas las especies de *Plasmodium* que provocan la malaria ocasionan un cuadro febril agudo, con presencia de dolor de cabeza, escalofríos y vómitos, que aparecen a los 7 días o más (generalmente entre los 10 y los 15 días) de la picadura del mosquito infectado<sup>25</sup>. Si no se trata en

las primeras 24 horas de iniciarse la aparición de síntomas, la malaria producida por *P. falciparum* puede agravarse, llevando a menudo a la muerte. Por otro lado, los casos de malaria por *P. vivax* o *P. ovale* pueden producir recaídas clínicas semanas o meses después de la infección inicial, aunque el paciente haya abandonado la zona palúdica. Estos nuevos episodios se deben a la presencia de formas hepáticas "durmientes" del parásito, llamados hipnozoitos y para lograr la curación completa es obligatorio un tratamiento especial dirigido contra esas formas hepáticas<sup>25, 26</sup>.

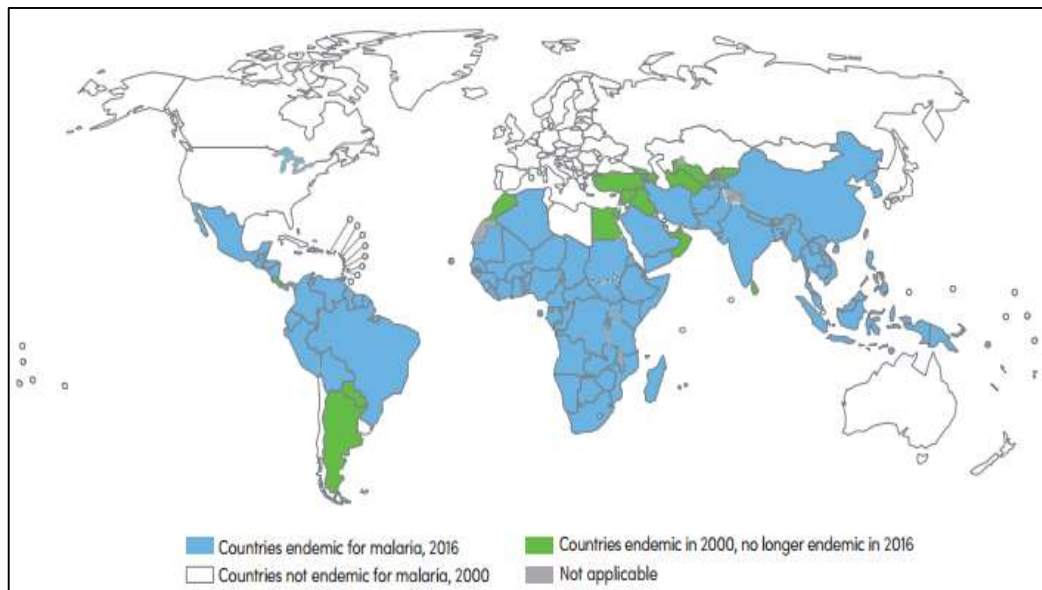
### **1.2.2. Ubicación taxonómica**

Super Reino	: Eucariota
Reino	: Protista
Superphylum	: Alveolata
Phylum	: Apicomplexa
Clase	: Aconoidasida
Orden	: Haemosporida
Familia	: Plasmodiidae
Género	: <i>Plasmodium</i>
Especie	: <i>Plasmodium falciparum</i>

### **1.2.3. Epidemiología de la malaria**

La malaria se encuentra ampliamente diseminada en el mundo y actualmente la distribución de especies de *Plasmodium* que son patógenas para el hombre se encuentra de la siguiente manera: la

predominancia de *P. falciparum* en se muestra en África tropical, por lo contrario, *P. vivax* tiene mayor prevalencia frente a *P. falciparum* en América del Sur, mientras que en el sureste de Asia y el oeste del Pacífico tanto *P. falciparum* como *P. vivax* prevalecen por igual, sin embargo, una infección por *P. malariae* puede darse en todas las zonas donde existe malaria y su prevalencia es usualmente baja. En África tropical, pueden a veces encontrarse coinfecciones entre *P. falciparum* y *P. malariae*, además, en esta zona se encuentra principalmente extendido *P. ovale*, por otro lado, las infecciones por *P. knowlesi* solo se encuentran distribuidas en determinadas zonas boscosas del sudeste de Asia<sup>27</sup>.



**Figura 1.** Países con transmisión activa a malaria entre los años 2000 y 2016. (Fuente: Resumen del informe mundial sobre el paludismo, 2016)<sup>28</sup>.

En el continente americano son veintiuno los países endémicos que se ven afectados por la transmisión de malaria y muchos de ellos comparten la selva amazónica como Bolivia, Brasil, Colombia,



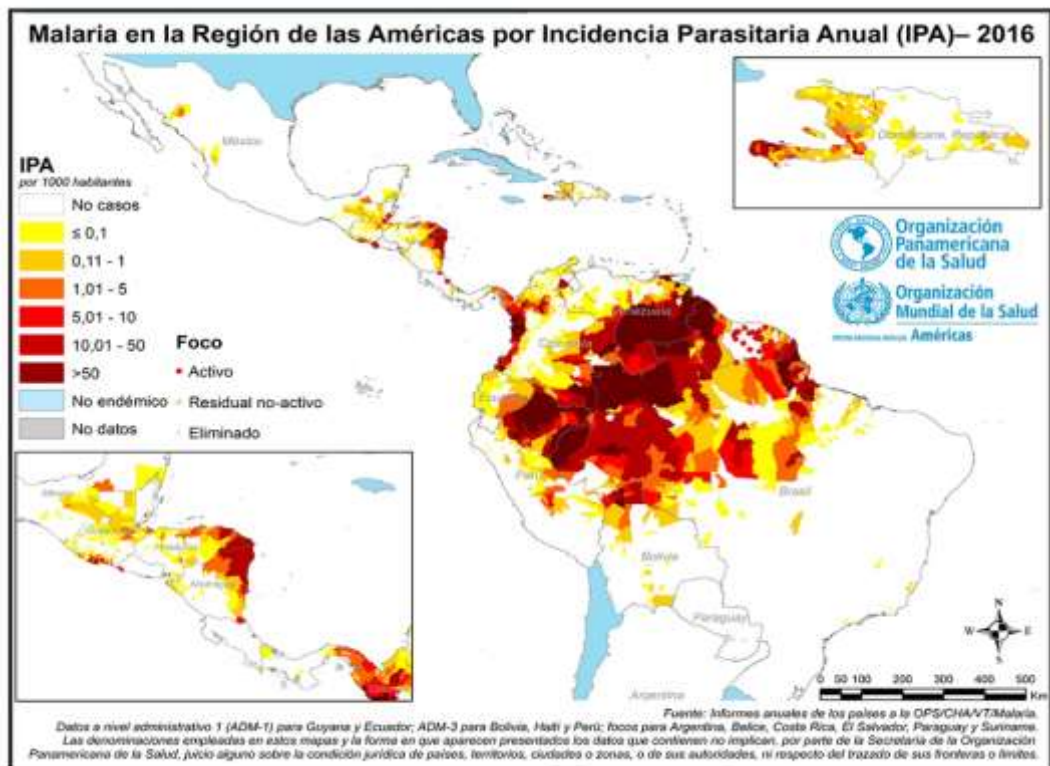
Ecuador, Guyana Francesa, Perú, Surinam y Venezuela, además, países de América Central y del Caribe: Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Panamá, México, Haití y República Dominicana, también Argentina y Paraguay alguna vez han presentado un pequeño número de casos de malaria<sup>29</sup>.

Así mismo, en América se produjo una disminución de casos entre los años 2010 y 2016, en que el número de casos de malaria se redujo en un 16% (677, 297 a 568, 283 casos). No obstante, hubo un aumento de 116 mil casos más que el año 2015. Además, entre los años 2010 y 2016, se mitigó a un 11% la proporción de personas viviendo en zonas de riesgo de transmisión de esta infección. En ese mismo periodo las muertes causadas por malaria crecieron en un 33%, de 171 a 228 muertes<sup>29</sup>.

Al mismo tiempo, Entre el 2010 y el 2016, diecisiete de los veintiún países endémicos en América, mostraron un descenso de casos de malaria <sup>29</sup>, seis de ellos (Belice, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, México y Surinam) tienen potencial de eliminar la malaria para 2020 de acuerdo con un análisis de la OMS presentado en el informe "Eliminando la malaria" publicado en 2016<sup>29, 31</sup>. Por otro lado, en Paraguay y Argentina, no hubo notificación de casos oriundos desde el 2011 y 2012, respectivamente, por lo que, en el 2015 han solicitado oficialmente a la Organización Mundial de la Salud (OMS) iniciar el proceso de certificación de la eliminación de la malaria<sup>1,28</sup>. A su vez,

durante el período 2010-2015 se pudieron observar notables cambios que incluyeron una disminución de los casos en Haití, mientras que, se aprecia aumentos en Panamá, Nicaragua, Venezuela y Perú. En consecuencia, Perú y Venezuela, en el 2016 los casos aumentaron a 0.8 y 4.3 veces, respectivamente, siendo las áreas más preocupantes de estos dos países, las que se encuentran dentro del bosque amazónico<sup>28</sup>.

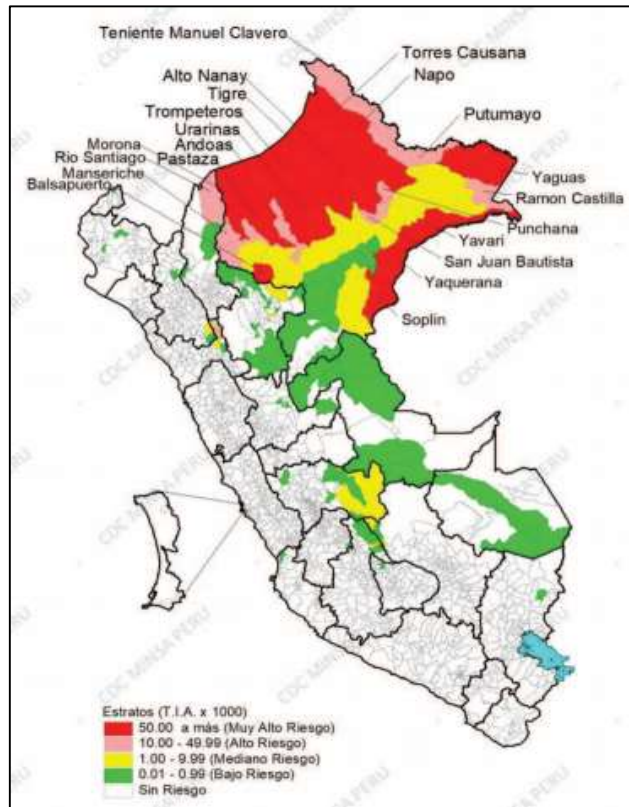
**Figura 2.** Distribución de la malaria en la Región de las Américas, 2016. (Fuente:



Informes anuales OPS/CHAT/VT/Malaria<sup>30</sup>).

En el Perú, la malaria tiene un patrón de comportamiento temporal y estacional, asociada geográfica y ecológicamente a zonas tropicales y desérticas irrigadas de la costa norte, selva montañosa, selva central y suroriental y la cuenca amazónica oriental del país<sup>32 y 33</sup>, por lo que, la

mayoría de los casos se muestran en los departamentos de Loreto, Piura, Tumbes, San Martín, Junín y Madre de Dios<sup>34</sup>, siendo Loreto el departamento que concentra el mayor número de casos notificados a malaria, con un (96.52%) (de estos para el año 2018 y que estuvieron distribuidos en diecisiete distritos, en los que el 80% de los casos estuvieron contenidos en los distritos de San Juan, Punchana, Ato Nanay, Andoas, El Tigre, Napo, Torres Causana, Urarinas y Trompeteros, siendo los Andoas y San Juan quienes presentaron los mayores porcentajes de casos, 16.67% (n= 71.48) y 11.98% (n= 5134) respectivamente<sup>5</sup>. Así mismo, del total de los casos reportados a nivel nacional para ese mismo año, 9 207 (100%) de estos fueron causadas por *P. falciparum*, siendo el departamento de Loreto quien contuvo el 99.78% (n= 9 187) de los casos registrados para esta especie causante de malaria<sup>5</sup>.



**Figura 3.** Incidencia de malaria por distritos del Perú, 2018. (**Fuente:** Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades- MINSA, 2018<sup>5</sup>).

#### 1.2.4. Ciclo de vida de *Plasmodium sp.*

Las especies causantes de malaria presentan ciclos biológicos similares (Figura 4), los cuales están comprendidos por tres fases:

##### ➤ **Ciclo sexual o esporogonio**

Se produce cuando un mosquito hembra del género *Anopheles* pica a un huésped infectado de malaria (ser humano), adquiere los gametocitos del *Plasmodium* (macho y hembra), los que ingresan al tubo digestivo del mosquito y luego de la fecundación se reproducen

en la pared de este hasta adquirir la forma infectante denominada esporozoíto. Estos esporozoítos son fusiformes, poseen un núcleo alargado y están desprovistos de pigmento malárico. Los esporozoítos pasan por todo el cuerpo del insecto y llegan a las glándulas salivales, para ser transmitidos a otro huésped sano en el momento de la picadura. La forma infectante del *Plasmodium* (esporozoíto) ingresa a la vía sanguínea del huésped, en donde permanecen aproximadamente horas antes de penetrar células hepáticas. Esta fase dura de 14 a 20 días, dependiendo de los factores ambientales<sup>34</sup>.

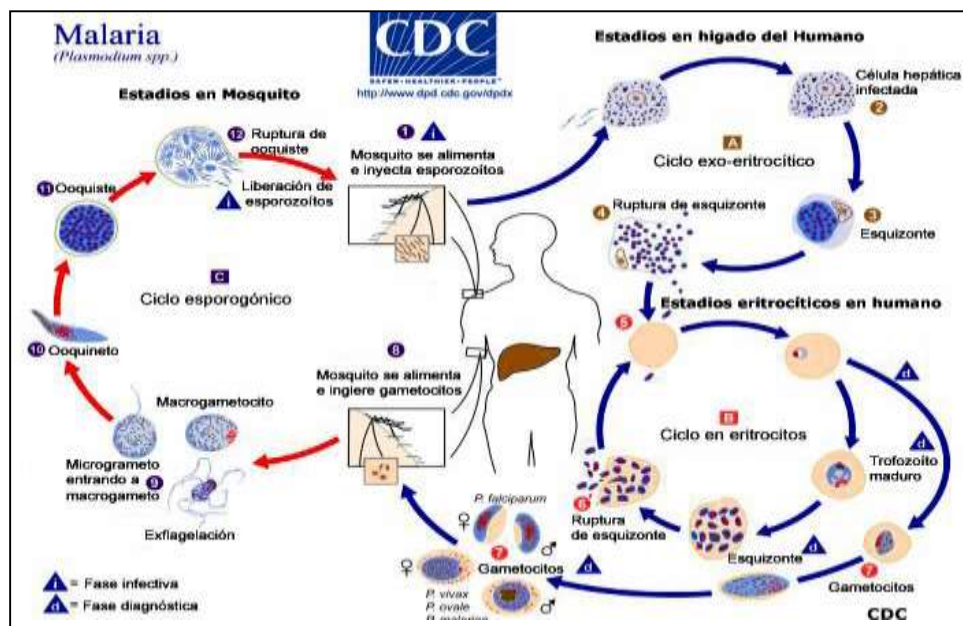
➤ **Ciclo exoeritrocítico**

También conocido como estadio hepático, el cual se inicia en los hepatocitos, donde los esporozoítos se reproducen en grandes cantidades hasta asumir la forma capaz de invadir los glóbulos rojos. En el segundo día de esta fase, en el interior de los hepatocitos, se encuentran esquizontes tisulares que aumentan de volumen y se dividen para formar millares de minúsculos merozoítos. Esta fase tiene duración promedio de 12 días y es de carácter asintomático<sup>8, 34</sup>.

➤ **Ciclo eritrocítico**

Esto ocurre cuando los merozoítos se liberan del hígado, sufren una serie de cambios adoptando una forma de “anillo” llamada trofozoíto, este entra en división esquizogónica dando lugar a esquizontes inmaduros que al madurar liberan nuevos merozoítos y pasan en grandes cantidades a la sangre e invaden los glóbulos rojos

produciendo su destrucción. Después de varios ciclos eritrocíticos, algunos merozoitos se transforman en macrogametocitos (femeninos) y microgametocitos (masculinos) sexuales. Ello ocurre en 48 horas en *P. vivax*, *P. falciparum* y *P. ovale*, 72 horas *P. malariae*<sup>8 y 34</sup> y 24 horas *P. knowlesi*. Esto quiere decir que cada 24, 48 ó 72 horas se inicia un ciclo eritrocítico; trofozoíto- esquizonte- trofozoíto<sup>35</sup>.



**Figura 4.** Ciclo biológico de parásitos del género *Plasmodium*. (Fuente: Centro para el Control y Prevención de Enfermedades, CDC<sup>19</sup>).

### 1.2.5. Determinantes patogénicos de la malaria

Siendo el merozoito la forma invasiva del parásito, este presenta ciertos determinantes de patogenicidad que lo hacen tan complejo (Figura 5)<sup>36</sup>, dentro de ellos destacan los siguientes:

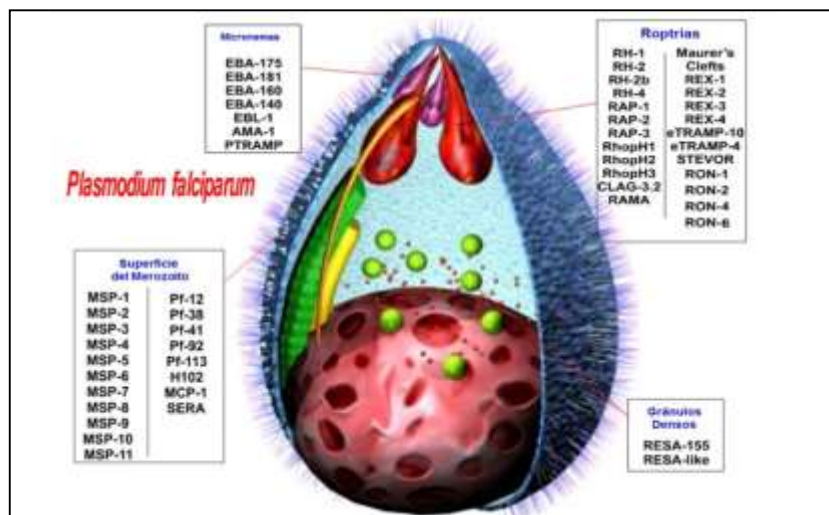
- **Capacidad de adherencia:** en la superficie del hematíe parasitado

se expresan adhesinas microbianas que favorecen la adherencia de éste a los receptores de las células del endotelio capilar, como la trombospondina. Así mismo, se produce un secuestro de hematíes parasitados en la microcirculación que desencadena hipoxia en los tejidos afectados. Las lesiones en la microcirculación van a estar favorecidas por el factor de necrosis tumoral (TNF), la interleukina-1 y otras citoquinas que se producen por la hemólisis y liberación de los merozoítos al torrente circulatorio<sup>37 y 38</sup>.

- **Organelas especializadas:** es el caso de las rhoptrias y los micronemas y los gránulos densos, son las encargadas de facilitar la invasión intracelular expresando diferentes proteínas como la TRAP (thrombospondin related adhesive protein)<sup>37</sup>.
- **Neoexpresión de antígenos parasitarios:** cuando el parásito invade los eritrocitos, les transfiere proteínas que expresan en su membrana y que confieren adherencia multifactorial al endotelio vascular. Así, la proteína MSP1 presenta adherencia por diversas moléculas: ICAM-1 “Molécula de adhesión Intercelular-1”, CD-36 “Grupo de diferenciación 36”, TSP “Trombospondina”, CSA “Condroitín Sulfato A”<sup>37 y 38</sup>.
- **Liberación de productos microbianos** como, por ejemplo, el pigmento palúdico (pigmento palúdico; gránulos Shuffner para *P. vivax*, gránulos James para *P. ovale*, gránulos de Ziemann para *P. malariae*, gránulos de Maurer para *P. falciparum* y gránulos de Siton y Mulligan en *P. knowlesi*) que actúa como pirógeno y que al ser

fagocitado por los macrófagos produce aumento del tamaño del bazo e hígado<sup>37 y 38</sup>.

- **Exoantígenos:** son los responsables de la isquemia metabólica, la vasodilatación, malaria cerebral, así como de la anoxia anémica y tisular<sup>37</sup>.
- **Variación antigénica:** las especies de *Plasmodium* que son altamente virulentas, emplean este mecanismo para alterar proteínas de sus superficies y evitar la respuesta inmunitaria del huésped<sup>38</sup>.



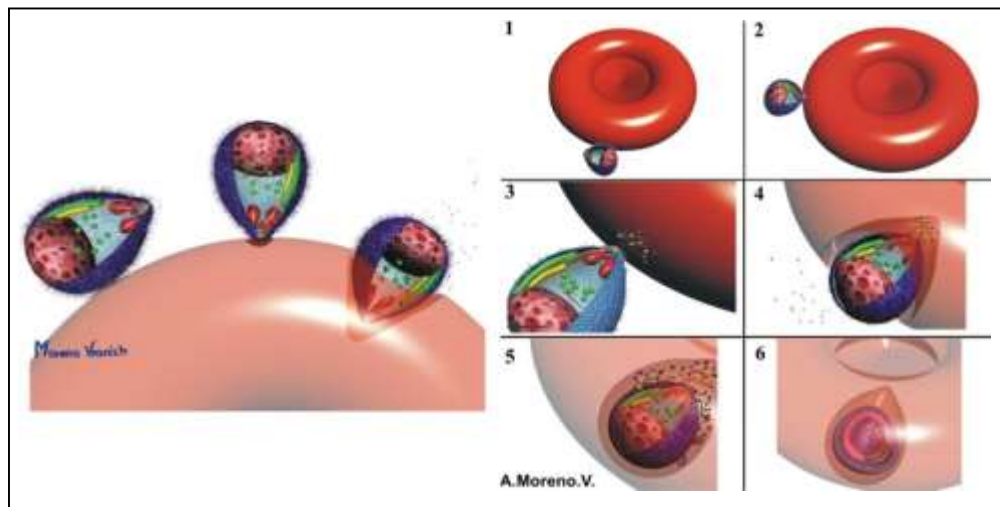
**Figura 5.** Principales antígenos expresados en el estadio merozoito del *P. falciparum*.

(Fuente: Patarroyo, Patarroyo. 2008<sup>36</sup>).

Así mismo, los eventos llevados a cabo durante el proceso de invasión del parásito de la malaria a sus células blanco parecen ser muy similares para todas las especies del *Plasmodium*<sup>39</sup>, para la cual, el parásito utiliza determinados receptores en el glóbulo rojo para poder unirse y llevar a cabo el proceso de reorientación apical, la unión y



posteriormente desencadena la señalización molecular que permite la viabilidad del mismo, el parásito induce una vacuola en la célula hospedera luego de estar dentro de ella<sup>36</sup>, para ello el parásito cuenta con tres organelos celulares del terminal apical: las roptrias, los micronemas y los gránulos densos que definen al parásito como el phylum Apicomplexa y que de acuerdo a la ubicación estratégica de los ligandos en los organelos mencionados, probablemente sirva como un mecanismo evasor que protege al parásito del ataque neutralizador de los anticuerpos generados por el hospedero, hasta que estas moléculas se liberen desde los organelos apicales, después del contacto con los glóbulos rojos<sup>40</sup>.

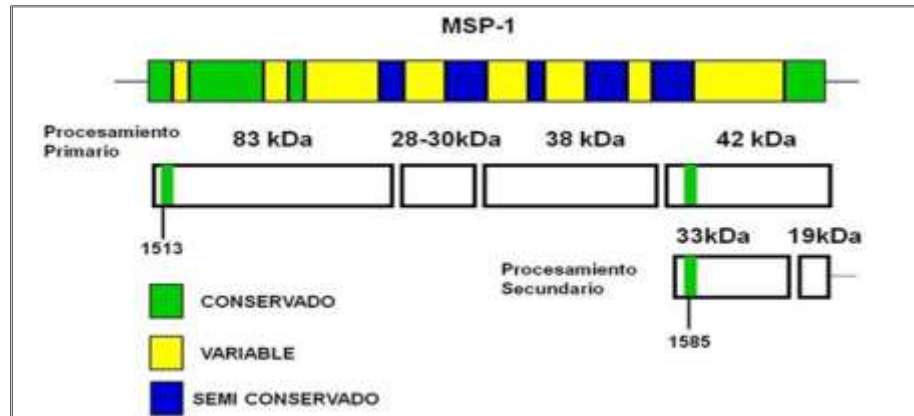


**Figura 6.** Proceso de invasión del merozoito al eritrocito. (Fuente: Patarroyo, Patarroyo. 2008<sup>36</sup>).

#### 1.2.6. Proteína de superficie del merozoito 1-19kDa (MSP 1-19 kDa) de *Plasmodium falciparum*

La MSP1 es la proteína más abundante que se encuentra expresada en la superficie del merozoito, tanto en la fase hepática como en la

eritrocítica y tiene como principal función la unión al eritrocito a través del anclaje por glicosilfosfatidilinositol Carboxilo-terminal (GPI), promoviendo la invasión del merozoito<sup>41</sup>. Esta proteína es una estructura primaria de 200 kDa, que puede ser dividido en 17 bloques, basados en la secuencia de los aminoácidos derivados de diversos clones en sus regiones conservadas, semiconservadas y variables<sup>42-45</sup>. Además, MSP1 sufre un procesamiento proteolítico principal de larga duración justo antes de la ruptura de los esquizontes para producir un complejo de cuatro fragmentos de 83 kDa, 30 kDa, 38 kDa y 42 kDa. El fragmento de MSP1- 42 kDa adicionalmente produce una división en MSP1-33 kDa y MSP1-19 kDa **Carboxilo-terminal** (Figura 7)<sup>41 y 42, 46</sup>. A su vez, MSP1-19 kDa C-terminal de *P. falciparum* es un objetivo conocido de la inmunidad humoral adquirida de forma natural y un candidato vacuna contra la malaria. MSP1-19 kDa es codificada por el bloque 17, que incluye 98 aminoácidos altamente conservados, que al parecer han evolucionado con el fin de evadir el sistema inmunológico humano y se encuentran en seis conocidas regiones: 1644 (E / Q), 1691 ( K / T), 1699 ( N / S ) , 1700 ( N / S ) , 1701 ( R / G) y 1716 ( F / L), dando lugar a los principales haplotipos; ETSR (tipo PNG-MAD20), EKNG (tipo Uganda-PA), QKNG (tipo Wellcome) y QTSR (tipo Indo)<sup>43, 47 y 48</sup>.



**Figura 7.** Organización genética y procesamiento proteolítico de la proteína de superficie del merozoito MSP1. **(Fuente:** Lesmes, 2011<sup>46</sup>).

a proteína de superficie del merozoito 1- 19kDa (MSP1-19kDa) es uno de los candidatos a la vacuna contra malaria mejor analizado y a la que se le ha venido confiriendo mediante estudios de infecciones experimentales, *in vitro* y de modelo animal; la asociación con los anticuerpos y que genera una protección contra una infección clínica<sup>10</sup>.

### 1.2.7. Respuesta inmune a malaria

El cuerpo humano ha desarrollado mecanismos que lo protegen contra agentes infecciosos, mediante la participación de células, tales como linfocitos T, macrófagos, linfocitos B, células NK, etc. y factores humorales como anticuerpos, complemento, etc, que juntos, constituyen el sistema inmunitario<sup>49</sup>. Por otro lado, a lo largo de la historia muchas infecciones causadas por virus, bacterias y algunos protozoarios, que han sido ampliamente estudiados, alcanzaron la comprensión en cuanto a la respuesta que genera el organismo, a

diferencia de la respuesta inmune al parásito de la malaria que es compleja y poco comprendida, sin embargo, se cree que tanto la inmunidad humoral y celular están involucrados en la respuesta inmune a malaria, y que cada una tiene una importancia relativa en la protección contra esta infección, que aún no están bien establecidas. En particular la mayor parte de los datos sobre la inmunidad a malaria viene de modelos animales. No obstante, muchos de estos animales son pobres modelos de la malaria humana. Así mismo, los datos de las distintas especies animales y entre las diferentes cepas de una misma especie a menudo varían considerablemente haciendo difícil generar conclusión definitiva con respecto a los mecanismos efectores inmunes en la malaria<sup>15</sup>. Sin embargo, la mayoría de las investigaciones concuerdan que la inmunidad en malaria se establece bajo condiciones naturales de forma muy lenta, ya que la inmunidad es adquirida debido a las continuas exposiciones que sufre ante el agente infectante de la malaria a lo largo de su vida, ante constantes infecciones, logrando una inmunidad parcial, y generalmente cuando el individuo llega a la edad adulta<sup>10</sup>. Este estado de protección es de corta duración y el cual desaparece seis meses después si el individuo ya no es expuesto al contacto con el parásito. En zonas donde la malaria es estable, los niños de aproximadamente seis meses de edad presentan menor riesgo de desarrollar malaria, ya que los anticuerpos recibidos de forma pasiva por la madre durante la gestación les confieren protección, capaces de neutralizar al parásito e impedir la manifestación de síntomas<sup>38, 50</sup>, pero a medida que estos anticuerpos se van perdiendo,

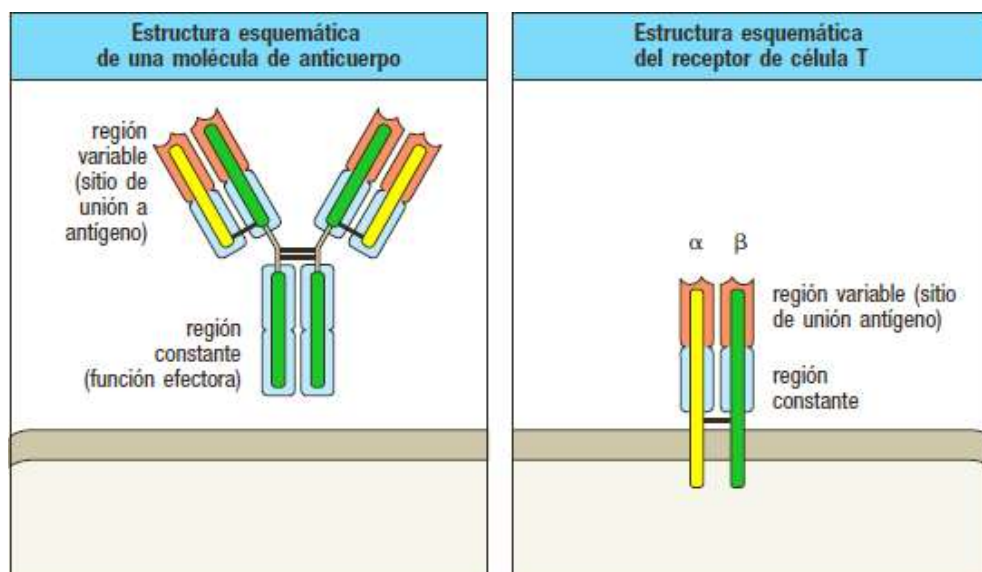
los niños se vuelven vulnerables a la infección a causa de un sistema inmune insuficientemente desarrollado<sup>51</sup>.

A su vez, la escasa protección contra la infección, se debe a la existencia de diferentes cepas del parásito, a la complejidad de su ciclo de vida, puesto que el sistema inmune se enfrenta a diferentes estadios de diferenciación de *Plasmodium*: esporozoítos libres, parásitos intra-hepáticos e intra-eritrocíticos, además de los diferentes antígenos que estos generan <sup>49, 52</sup>. Cabe mencionar que la inmunidad es específica al estadio del parásito, esto quiere decir, que una respuesta inmune protectora contra esporozoítos no protege contra la infección de formas sanguíneas. De la misma manera, la inmunidad es específica de la especie del parásito, de modo que la resistencia adquirida contra *P. falciparum* no protege contra infecciones por *P. vivax* y viceversa<sup>52</sup>.

#### **1.2.8. Respuesta inmunitario humoral**

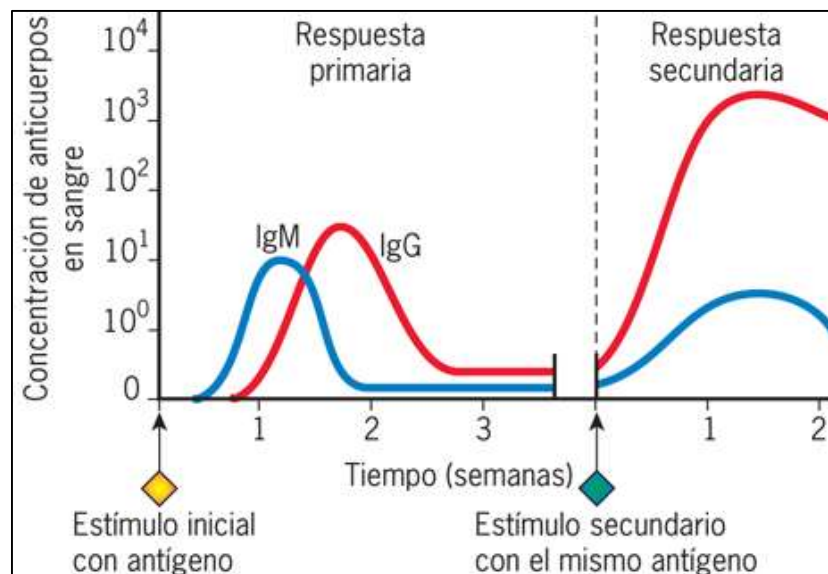
Es el principal mecanismo de defensa contra los microorganismos y sus toxinas, es mediada especialmente por moléculas multivalentes, producidas por las células B, conocidas como anticuerpos o inmunoglobulinas, constituidas por dos cadenas pesadas (H) de masa relativa entre 55 a 55 kDa y dos cadenas livianas que pesan de 20-25 kDa, unidas entre sí por puentes disulfuro, presentando dos clases de cadenas ligeras  $\kappa$  y  $\lambda$  y cinco clases de cadenas pesadas  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\mu$  que pertenecen a los diferentes isotipos de las inmunoglobulinas IgA,

IgG, IgD, IgE e IgM respectivamente. Existen, además, pequeñas variaciones de dentro de las moléculas de los isotipos IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) e IgA (IgA1 e IgA2) diferenciándolas en subclases<sup>53, 54</sup>. Las inmunoglobulinas están constituidas por tres fragmentos, que fueron por primera vez demostrados por Porter en 1959<sup>55</sup>, dos fragmentos Fab (fragmento de unión al antígeno) que está compuesto por una cadena liviana y una pesada, que participan en el sitio de unión al antígeno y un fragmento cristalizable Fc que a su vez está conformado por las dos cadenas pesadas restantes, además, presenta sitios de unión para el sistema del complemento. En la región Fc es donde se observan las diferencias entre los isotipos y subtipos de inmunoglobulinas. Los dos fragmentos Fab permanecen unidos al fragmento Fc por una región de bisagra que varía en longitud y flexibilidad de acuerdo con el isotipo y subclase del anticuerpo (Figura 8)<sup>49</sup>.



**Figura 8.** Estructura esquemática de una molécula de anticuerpos. (Fuente: Murphy, et al.2009<sup>49</sup>).

Cuando se da una infección aguda en nuestro organismo, los anticuerpos IgM se producen inmediatamente después de la exposición, mientras que la IgG se muestra una respuesta más tardía, que generalmente, confiere inmunidad a un paciente, por lo que respecto a esa enfermedad en particular (Figura 9)<sup>55</sup>. Siendo IgG el anticuerpo más abundantemente en el cuerpo humano que está presente en todos los fluidos corporales, por otra parte, IgM se encuentra principalmente en el líquido linfático y sangre. Normalmente, son medidas juntas en pruebas serológicas, ya que brindan una mejor idea sobre el funcionamiento del sistema inmunológico<sup>49, 55</sup>.



**Figura 9.** Curva de la respuesta inmune por anticuerpos IgM e IgG ante una infección. (Fuente: Gerald Karp, Biología celular y molecular: conceptos y experimentos<sup>58</sup>).

La producción de anticuerpos es muy importante en la respuesta inmune contra malaria, pues estos neutralizan las propiedades invasivas del merozoito extracelular, facilitan la opsonización de eritrocitos infectados para su fagocitación, bloquean la maduración

intracelular temprana del parásito, ayudan a aumentar la efectividad de la respuesta inmune celular, además pueden neutralizar el efecto tóxico previniendo la ruptura de los esquizontes, que ocasionan la aparición violenta de los síntomas, tales como escalofríos y fiebre<sup>57</sup>.

### **1.2.9. Malaria asintomática**

La ausencia de síntomas en malaria puede ser generada por cualquiera de las especies que infectan al hombre y se presenta cuando el nivel de la parasitemia asexual es controlado por la respuesta inmune, impidiendo que se desarrollen los síntomas, a pesar de la presencia de parásitos circulantes<sup>58, 59</sup>. Este tipo de malaria es prevalente en zonas con alta y moderada frecuencia malárica, siendo África y Latinoamérica los de mayor incidencia<sup>60</sup>.

Investigadores refieren que la malaria asintomática se asocia con la inmunidad que adquiere el individuo después de las continuas infecciones a la que se ha visto expuesto, por ello la malaria asintomática es más frecuente en adultos que en niños, debido a que estos últimos han tenido menos contacto con la infección y no han adquirido suficiente inmunidad<sup>58, 59</sup>.

En los últimos años se ha aceptado a malaria asintomática como un obstáculo importante para la eliminación de esta infección, afectando tanto al individuo portador del parásito como en la comunidad en la que



vive, ya que, al no manifestarse los síntomas, las personas infectadas no reciben tratamiento oportuno que pueda erradicar las formas sexuales del parásito volviéndolos reservorios silenciosos, los cuales perpetúan la transmisión de la infección<sup>58, 59, 61</sup>.

## CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES

### 2.1. Formulación de hipótesis

#### 2.1.1. Hipótesis 1

“Los niveles de Inmunoglobulinas M y G anti- PfMSP1 en personas con malaria sintomática y asintomática por *P. falciparum* presentan diferencias en los días 0, 14 y 45 a 60 de infección”

➤ **Hipótesis nula (H0):** No existen diferencias en los niveles de inmunoglobulinas M e G anti-PfMSP1 en personas con malaria sintomática y asintomática por *P. falciparum* en los días 0, 14 y 45 a 60 de infección.

➤ **Hipótesis alterna (H1):** Existen diferencias en los niveles de inmunoglobulinas M e G anti-MSP1 en personas con malaria sintomática y asintomática por *P. falciparum* en los días 0, 14 y 45 a 60 de infección.

#### 2.1.2. Hipótesis 2

“Las personas con malaria asintomática presentan niveles altos de anticuerpos IgM e IgG anti MSP1y densidades parasitarias bajas, a diferencia de las personas con malaria sintomática, en las que los niveles de anticuerpos IgM e IgG anti-MSP1 son bajos con densidades altas de parásitos.”

- **Hipótesis nula (H0):** No existe una relación entre los niveles de anticuerpos IgM e IgG anti-MSP1 y la densidad parasitaria en personas con malaria asintomática y sintomática.
  
- **Hipótesis alterna (H1):** Existe una relación entre los niveles de anticuerpos IgM e IgG anti-MSP1 y la densidad parasitaria en personas con malaria asintomática y sintomática.

## **2.2. Variables**

### **2.2.1. Variable independiente**

- Tipo de malaria: asintomática o sintomática

### **2.2.2. Variable dependiente**

- Niveles de anticuerpos IgM e IgG anti-MSP1
- Densidad parasitaria

## CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

### 3.1. Materiales

#### 3.1.1. Material biológico

- Plasma sanguíneo

#### 3.1.2. Soluciones y reactivos

- Antígeno de *P. falciparum* (MSP1- 19KDa variante Q-TSR).
- Solución tamponada salina con ácido bórico (BBS) 1X, TEKNOVA.
- Solución tamponada salina con fosfato (PBS) 10X, SIGMA.
- Tween® 20, FISHER SCIENTIFIC
- Tetrametilbencidina (TMB), BD OptEIA.
- Suero fetal bovino (AlbuMAX™ II BSA), GIBCO.
- Leche descremada en polvo, Shop Rite®
- Agua de Grado Molecular, CELLGRO.
- Fosfato de Sodio dibásico Anhidro ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), AMRESCO
- Fosfato de Sodio monobásico ( $\text{NaHPO}_4$ ), FISHER SCIENTIFIC.
- Ácido Clorhídrico 37% (HCl)
- Cloruro de sodio (NaCl), FISHER SCIENTIFIC
- Anticuerpos secundarios conjugados de cabra Anti-Humano IgG e IgM marcado con la enzima Peroxidasa de Rábano Picante (HRP) (Southern Biotech).
- Alcohol 70°
- Agua destilada
- Hidróxido de Sodio (NaOH) 10%

### 3.1.3. Equipos

- Autoclave, VWR-YAMATO SM510
- Lector de microplacas de ELISA 96 pozos, OPSYS MR DINEX.
- Impresora, EPSON FX-880+
- Mini Vórtex VWR
- Balanza Analítica, SARTORIUS
- Refrigerador, LG 4°C/ -20°C
- Digital Orbital Shaker, HEATHROW SCIENTIFIC.
- Agitador Magnético, THERMO SCIENTIFIC.
- Pastillas magnéticas
- Potenciómetro, FISHER SCIENCE EDUCATION
- Mini Vórtex, IKA.

### 3.1.4. Otros

- Placas de fondo plano con 96 micropocillos, de poliestireno, COSTAR
- Cubetas de plástico 50mL, VISTALAB TECHNOLOGIES
- Parafilm "M", PECHINEY
- Micropipeta multicanal (8 canales) 20-200
- Micropipetas 0,5 - 10µL, 2 - 20µL, 20 - 200µL y 100 - 1000µL, EPPENDORF
- Tips 10µL, 200µL y 1000µL, USA SCIENTIFIC
- Posi-Click Tubos 0,6mL 1,7mL, DENVILLE.
- Papel toalla, ELITE.
- Probetas graduadas 50mL, 100mLy 1000mL, NORMAX.

- Fiola de 100mL, NORMAX.
- Frascos de vidrio 100mL, 500mL y 1L, BOECO.
- Gradillas para criotubos
- Tubos cónicos 50mL, FALCÓN.
- Calculadora CASSIO

## **3.2. Metodología**

### **3.2.1. Área de estudio**

La comunidad de Zungarococha se encuentra situado a unos cinco kilómetros al sur de la ciudad de Iquitos (Departamento de Loreto, Provincia de Maynas), comprendida por cuatro pueblos: Zungarococha (18 M 6830379576887), Puerto Almendra (18 M 6800749576248), Ninarumi (18 M 6789309574868) y Llanchama (18 M 6757819573583), conectadas por un camino de tierra y separadas entre sí por dos kilómetros. Se caracteriza por presentar una curva constante de infecciones por *P. falciparum* y *P. vivax*, aunque la proporción es poca comparada con otras poblaciones de alta endemicidad. Presenta una temperatura media anual de 26.5°C y precipitaciones de alrededor de 2835 mm al año<sup>62</sup>. Los casos por malaria son detectados en su mayoría en la temporada de lluvia que dura de enero a julio<sup>63</sup>. Está compuesta por una población aproximada de 2,000 habitantes étnico-mestizo, con un nivel de ingreso bajo, sin embargo, no se ve afectado por la pobreza

extrema, contando con acceso a atención sanitaria gracias a un centro de salud otorgado por el MINSA<sup>63</sup>.



Figura 10. Esquema de las comunidades del estudio (Fuente: Arana AA, Pinedo VV, Tresierra AB<sup>64</sup>).

### 3.2.2. Tipo y diseño de investigación

- **Tipo de investigación:** este estudio fue de tipo cuantitativo, porque el procesamiento y análisis de los datos nos permitió emplear pruebas estadísticas para comprobar las hipótesis que se han planteado, así mismo, dieron respuesta al problema de la investigación. También fue de tipo observacional ya que no fue posible la manipulación de las variables de estudio.
- **Diseño de investigación:** en cuanto a la cronología de las investigaciones fue retrospectivo, puesto que la recolección de los datos se desarrolló con anterioridad, con respecto al

número de mediciones es longitudinal, pues la recolección de los datos fue continua, Además, es correlacional porque permitió probar asociaciones entre las variables.

### **3.2.3. Criterios de selección**

- **Criterios de inclusión**

- Muestras biológicas (plasma sanguíneo) de individuos perteneciente a la cohorte del Proyecto MIGIA (Malaria Immunology and Genetics in the Amazon) entre los años 2007 y 2015.
- Muestras de biológicas de Individuos con diagnóstico microscópico positivo a malaria por *P. falciparum*.
- Muestras biológicas de individuos que cuenten con consentimiento informado para ser enrolados en el Proyecto MIGIA, además del uso futuro de sus muestras.

- **Criterio de exclusión**

- Muestras de individuos con diagnóstico positivo que no cuenten con densidades parasitarias en sus resultados de microscopia.
- Muestras biológicas de individuos positivos a malaria que no cuenten con seguimiento los días 0 14 y 45 a 60.



### **3.2.4. Procedimientos para la recolección de los datos**

#### **3.2.4.1. Obtención y selección de la muestra**

Las muestras utilizadas fueron obtenidas entre los años 2007 y 2014, en un estudio de cohorte del Proyecto Inmunología y Genética de la Malaria en la Amazonia (MIGIA), mediante detecciones activas de casos (DAC) y detecciones pasivas de casos (DPC). donde los miembros de la cohorte fueron seguidos activamente por barridos y visitas regulares, en la que incluía un breve examen clínico, la colecta de muestra sanguínea mediante punción capilar aproximadamente 0,5 mL de sangre en microtubos de 1,5mL estériles conteniendo 40µL de anticoagulante (EDTA 0,05M), además de, extensiones en láminas de frotis y gota gruesa. Así mismo, se seleccionaron por conveniencia ciento treinta y cinco muestras de individuos separados en quince infecciones asintomáticas (ausencia de fiebre, dolor de cabeza, escalofríos, dolor corporal o náuseas y/o vómitos en las últimas 48 horas) y treinta sintomáticas, que contaban con muestras de plasma disponibles en el día 0 (día en que se le encontró con la infección), día 14 y 45- 60 días después de la infección por *P. falciparum*.

#### **3.2.4.2. Diagnóstico microscópico para la determinación de la densidad parasitaria**

Microscopistas altamente calificados realizaron la tinción con colorante Giensa de las láminas con los extendidos y gota gruesa, para su posterior lectura con aceite de inmersión, empleando dos

métodos para establecer la densidad parasitaria<sup>4</sup>:

**a) Método simple (semicuantitativo) o sistema de cruces (+)**

Permitió determinar el número de parásitos presentes por microlitro de sangre mediante la suma total de parásitos en 100 campos, en el que un número inferior a 40 parásitos en 100 campos se escribió el número encontrado en la lectura, al observar más de 40 parásitos, usaron la siguiente escala:

+/2 De 40 a 60 parásitos en 100 campos

+ Un parásito por campo en 100 campos

++ De 2 a 20 parásito por campo en 100 campos

+++ De 21 a 200 parásitos por campo en 100 campos

++++ Más de 200 parásitos por campo en 100 campos

**b) Método del número de parásitos por microlitro de sangre**

Compararon el número de parásitos asexuados (forma anillada) con el número de leucocitos en la gota gruesa basándose en un recuento de 6000 leucocitos por microlitro de sangre. Cuando detectaron 10 ó más parásitos después de contar 200 leucocitos, anotaron los resultados en términos de número de parásitos por 200µL. Al encontrar menos de 10 parásitos después de contar 200 leucocitos, continuaron con el recuento hasta llegar a 500 leucocitos. En caso de parasitemia alta, efectuaron un recuento mínimo de 500 parásitos, registrando la cantidad de leucocitos encontrados. Para la

detección de la parasitemia con este método emplearon la siguiente formula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de parásitos} \times 6000 / \text{N}^{\circ} \text{ de leucocitos} = \text{Parásitos}/\mu\text{L}$$

### **3.2.4.3. Medición de IgM e IgG: Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)**

Los ensayos de inmuno absorción ligados a enzimas (ELISAs) se realizaron en el Área de Biología Molecular e Inmunología, que pertenece a la Unidad Especializada LIPNAA - Laboratorio de Investigación de Productos Naturales Antiparasitarios de la Amazonía, del Centro de Investigación de Recursos Naturales - CIRNA, de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, ubicado en el pasaje Los Paujiles s/n, AA. HH. Nuevo San Lorenzo, distrito de San Juan Bautista, provincia de Maynas.

El antígeno MSP-1 19kDa recombinante de *P. falciparum*, corresponde a la cepa tipo Indo, haplotipo Q-TSR, que fue expresado en *Sacharomyces cerevisiae* y suministrado por la división MR4 de ATCC. En una investigación anterior realizada en el área de estudio, en la que evaluaron la respuesta de anticuerpos IgG a cuatro tipos de alelos de Pf MSP1-19kDa (E-KNG, Q-KNG, Q-TSR Y E-TSR) encontrando que los haplotipos Q-KNG y Q-TSR generan respuestas inmunitarias más fuertes<sup>15</sup>, por lo que para esta tesis se creyó conveniente el utilizar Q-TSR como antígeno para el ELISA.

Las muestras de plasma sanguíneo seleccionadas fueron examinadas con la técnica del ELISA indirecto, protocolo modificado Clark, 2012<sup>10</sup> (Anexo 2), el cual nos permitió detectar la respuesta anti MSP- 1 19kDa de los anticuerpos IgM e Ig G presentes en las muestras, con los siguientes pasos:

**a) Impregnación del antígeno en las placas**

Preparamos la solución del antígeno en solución tamponada salina con ácido bórico (BBS), a una concentración de 1 ug/mL MSP-1 19kDa. Rotulamos las placas con el nombre del antígeno y la fecha. Luego agregamos 50 µL de la dilución de antígeno a cada pozo y posteriormente cubrimos las placas con Parafilm "M" PECHINEY y dejamos incubar a 4 °C durante la noche.

Una vez incubados toda la noche con el antígeno, las placas fueron lavadas 1 vez con PBS-Tween (Preparación de solución en Anexo 3.1), agregamos 200µL de la solución a cada micropocillo, dimos pequeños golpecitos a la placa con la mano, por 60 segundos aproximadamente y a continuación vaciamos el contenido de la placa por inversión sobre un fregadero. Seguidamente tocamos la placa invertida en contra de algunas capas de papel toalla para eliminar el líquido residual.

**b) Bloqueo de espacios vacíos.**

Agregamos 200µL de solución bloqueadora (Preparación de solución en Anexo 3.2) en cada micropocillo, cubrimos las placas

con Parafilm. Dejamos incubando las placas por 1 hora a temperatura ambiente en el DIGITAL ORBITAL SHAKER. Luego lavamos las placas tres veces del mismo modo que en el paso anterior.

**c) Adición de las muestras problema, controles positivos y negativos.**

Los sueros de los pacientes y los controles (positivos y negativos) se diluyeron a 1:200 en la solución de dilución de muestras "SDB" (Preparación de solución en Anexo 3.4). Para obtener una curva estándar de control, el pool positivo se diluyó a 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800, 1:25600, 1:51200 y 1:102400 en SDB. Posteriormente, agregamos 50  $\mu$ L a cada micropocillo de la placa, cabe mencionar que cada muestra fue colocada en la placa por duplicado, a excepción de las diluciones para la curva estándar y su ubicación en la placa se puede apreciar en el Anexo 3.6. Luego incubamos las placas ya cubiertas a temperatura ambiente por 1 hora, en el DIGITAL ORBITAL SHAKER. Terminado el tiempo de incubación se lavaron las placas cuatro veces con la solución de lavado AB (Preparación de la solución en Anexo 2.3), incubando por un minuto cada vez y sacando el líquido con fuerza, teniendo cuidado de no contaminar.

**d) Adición del anticuerpo secundario marcado con la enzima.**

Minutos antes de terminado el tiempo de incubación; reparamos el conjugado cabra Anti-Humano IgG-HRP (1:6000) y Anti- Humano

IgM-HRP (1:4000) diluyéndolo en solución de lavado AB. Agregamos 50µL de la dilución a cada micropocillo y dejamos incubando las placas en el DIGITAL ORBITAL SHAKER, por 1 hora a temperatura ambiente, cubrimos la placa con Parafilm. Terminado la hora de incubación se lavaron las placas tres veces con la solución de lavado AB, incubando por un minuto cada vez y sacando el líquido con fuerza, tratando de eliminar la solución residual.

**e) Adición del sustrato.**

Media hora antes que se cumpla el tiempo de incubación, pusimos los tubos con alícuotas de TMB (Tetrametilbencidina base) Peroxidase Substrate y Peroxidase Solution B a temperatura ambiente, además encendimos el lector de microplacas de ELISA OPSYS MR DINEX y la impresora EPSON FX-880+ y dejamos que se actualicen los parámetros. Una vez atemperadas las soluciones, procedimos a preparar la solución reveladora mezclando las soluciones en volúmenes iguales (1:1). Llegado al tiempo de incubación y después de los lavados, agregamos 50µL de solución reveladora a cada micropocillo de la placa.

**f) Unión del sustrato a la enzima y detección: color de la reacción.**

Dejamos incubar las placas con el sustrato aproximadamente 60 minutos, hasta que un color adecuado se desarrolló (azul intenso).

Para el punto final del ensayo, detuvimos la reacción agregando 25µL de HCl 0,25M (Preparación de la solución en Anexo 3.5) a cada micropocillo de la placa.

**g) Lectura de las placas**

Efectuamos la lectura de los resultados a través de la parte inferior de la placa de los micropocillos, usando un ELISA OPSYS MR DINEX a 450nm (Abs450).

**h) Cálculos de los parámetros de inmunodiagnósticos para la interpretación de los datos**

Para la interpretación de los datos obtenidos, tuvimos que determinar el umbral de reactividad (UR) del antígeno MSP-1 19 kDa, para establecer el “cut off” o punto de corte por cada anticuerpo (IgM e IgG) y se calculó a través del método de la curva ROC, de sus siglas traducidas al español “Característica operativa del receptor”, con la ayuda del programa SPSS 21.0 (IBM) (Anexo 4), que comparó los valores de Abs450nm de 110 muestras de plasma, que correspondieron a 45 pacientes con malaria comprobada por *P. falciparum*, 39 de individuos sanos locales, nacionales y extranjeros, provenientes de zonas no endémicas y 26 individuos más con otras enfermedades, tales como sífilis (n=2), tuberculosis (n=3), leishmaniasis (n= 3), toxoplasmosis (n=4), gonorrea (n=1), herpes (n=1), herpes/ HIV (n=1), HIV (n=2), lepra (n=1), hepatitis B (n=2), zika (n=1), ascariasis (n=1) y malaria por *P. vivax* (n=4).

Las muestras que presentaron una OD. (Densidad óptica) mayor o igual al valor del “cut off” se consideraron positivas. El grupo positivo se dividió en “Bajo”, “Medio” y “Alto”, donde una OD mayor de 2 veces el límite negativo se consideró como “Medio Positivo” y como “Alto Positivo” cuando su OD fue mayor 3 veces el límite negativo.

### **3.2.5. Procesamiento de los datos y análisis estadístico**

Los datos obtenidos en los ELISAs fueron ingresados y ordenados en tablas de Microsoft Office Excel (versión 2016); donde la información se procesó mediante el uso de tablas dinámicas, ordenando la información para el posterior análisis estadístico haciendo uso de los siguientes programas: R (versión 3.4.1 – 2017/06/30), PAST (versión 3.16).

Teniendo evidencia en contra de la normalidad de las variables: IgG, IgM y Densidad parasitaria; todos los análisis estadísticos fueron procesados con la estadística no paramétrica. Para ello, el análisis descriptivo se utilizó como tendencia central a la mediana y como medida de dispersión se utilizó el rango intercuartílico y el coeficiente de variación (CV). También se utilizó los gráficos de diagrama de caja (Box Plot) y diagramas de dispersión. En el diagrama de caja, la localización está representada en la línea que corta la caja y representa la mediana (que está dentro de la caja), la dispersión está dada por la



altura de la caja (tercer cuartil y el primer cuartil de los datos. El sesgo se observa en la desviación que exista entre la línea de la mediana con relación al centro de la caja, y también la relación entre las longitudes de los bigotes. Así mismo, para la comparación de los valores de IgM/IgG entre los tipos de enfermedad (sintomáticos y asintomáticos) con los días de seguimiento, se utilizó el análisis de U de Mann Whitney con un nivel de significancia del 95% ( $p < 0,05$ ). Por último, para determinar la relación entre los valores de IgM/IgG y la densidad parasitaria, se utilizó el análisis de correlación de Spearman con un nivel de significancia del 95% ( $p < 0,05$ ).

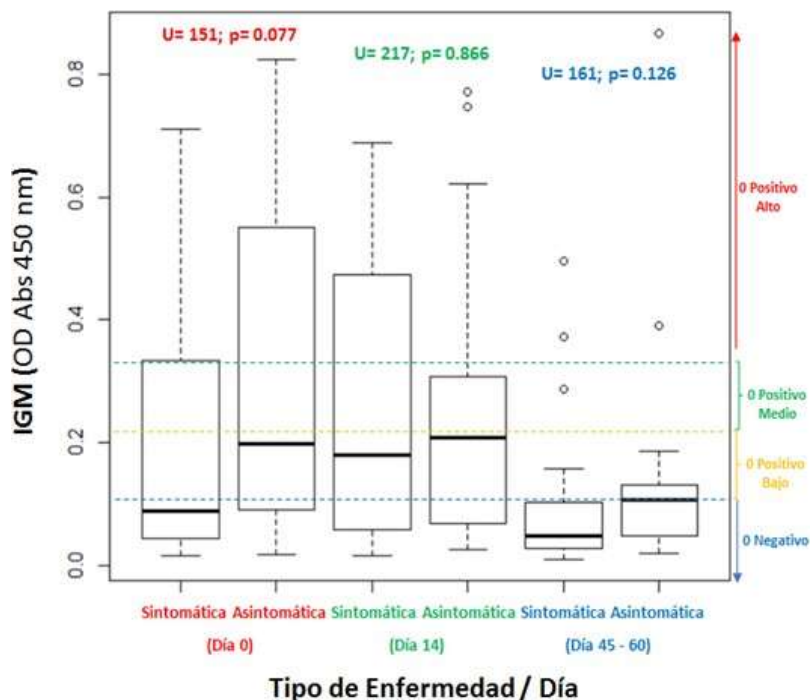
### **3.2.6. Declaraciones éticas**

Las muestras empleadas fueron colectadas bajo protocolos aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Alabama en Birmingham, la Universidad de Nueva York y el Ministerio de Salud (MINSA, Lima, Perú). Así mismo, el consentimiento informado y el uso futuro de las muestras se obtuvieron de todos los participantes del estudio o sus tutores (Anexo 1).

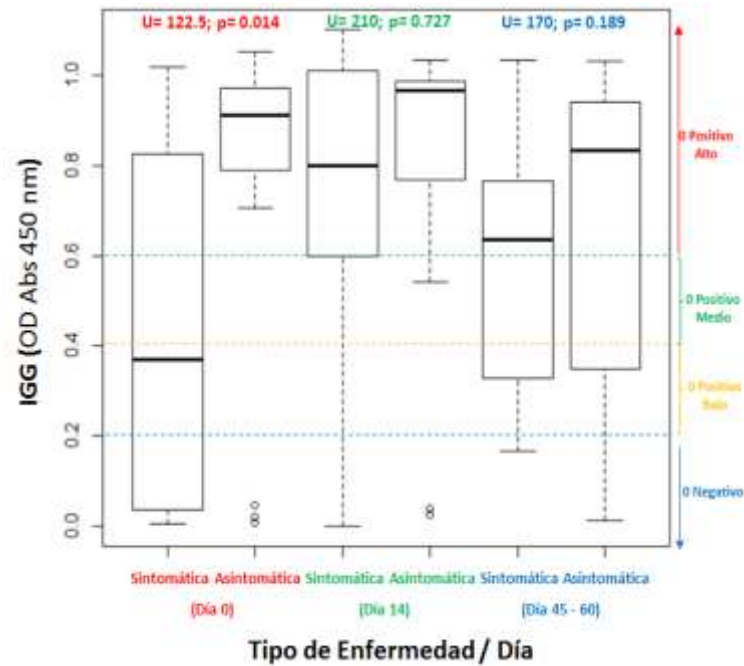
## CAPÍTULO IV: RESULTADOS

### 4.1. Niveles de Inmunoglobulinas M y G contra la Proteína de Superficie del Merozoito 1-19kDa de *P. falciparum* de infecciones por malaria sintomática y asintomática, los días 0, 14 y 45 a 60 de seguimiento.

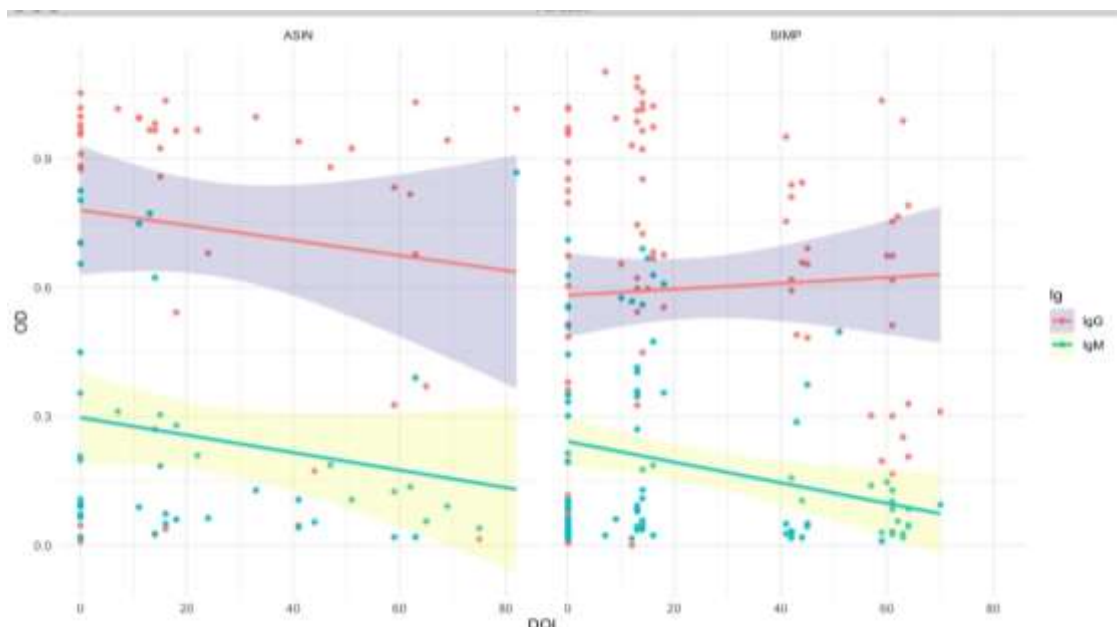
La respuesta inmune en los niveles de IgM e IgG contra MSP1-19kDa en infecciones de malaria sintomática y asintomática por *P. falciparum*, solo presentó diferencia significativa en los niveles de IgG anti-PfMSP1 entre individuos con malaria sintomática y asintomática en el día 0 de seguimiento (U= 12,51; **p= 0.014**) (Figura 12).



**Figura 11.** Niveles de IgM contra la Proteína de Superficie del Merozoito 1-19kda de *P. falciparum* de infecciones por malaria sintomática y asintomática, los días 0, 14 y 45 a 60 de seguimiento.



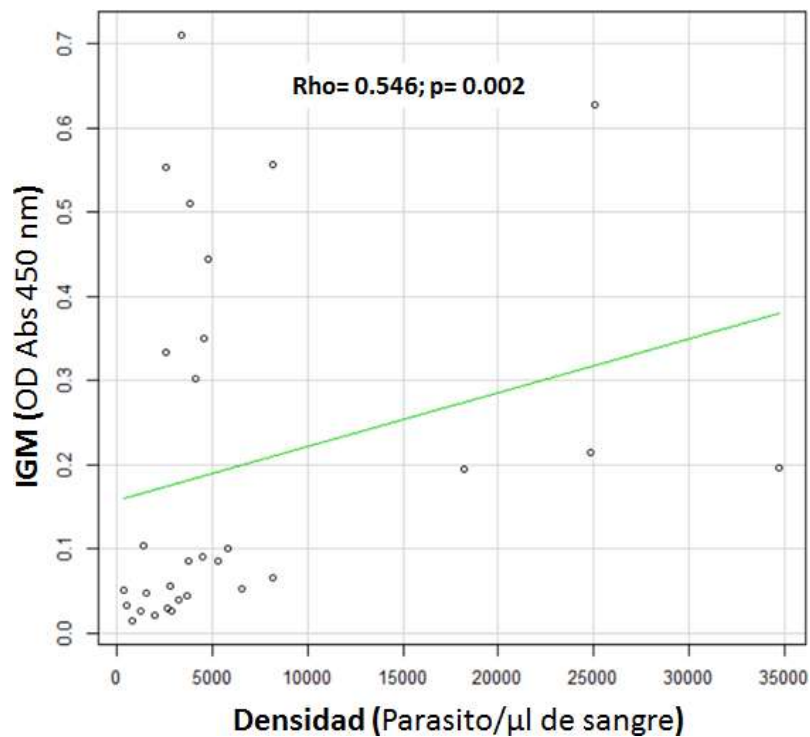
**Figura 12.** Niveles de IgG contra la Proteína de Superficie del Merozoito 1-19kda de *P. falciparum* de infecciones por malaria sintomática y asintomática, los días 0, 14 y 45 - 60 de seguimiento.



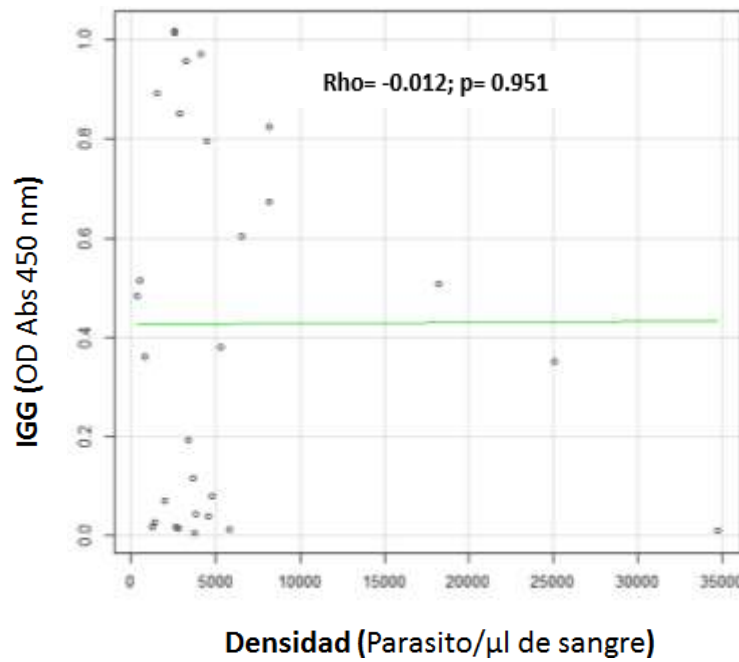
**Figura 13.** Tendencia en los niveles de IgM e IgG contra la proteína de superficie del merozoito 1-19kDa de *P. falciparum* de infecciones por malaria sintomática y asintomática, en los días 0, 14 y 45-60 días de seguimiento.

#### 4.2. Relación entre los niveles Inmunoglobulinas G y M contra la proteína de superficie del merozoito 1 -19kDa *P. falciparum* y las densidades parasitarias de infecciones por sintomática y asintomática.

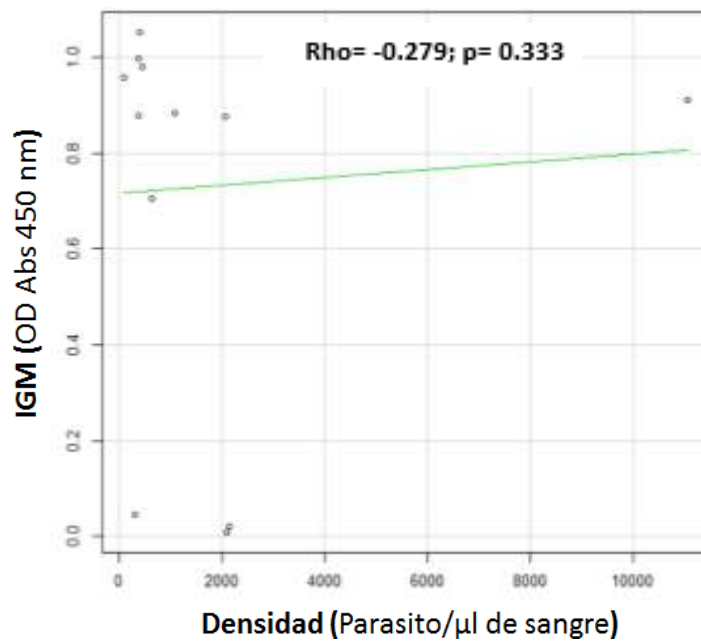
Los niveles de IgM y las densidades parasitarias en individuos con malaria sintomática por *P. falciparum* presentaron una correlación positiva moderada fuerte estadísticamente significativa (**Rho= 0,546; p= 0,002**) (Figura 14), que quiere decir, que al aumentar los niveles de IgM aumentan las densidades parasitarias o viceversa.



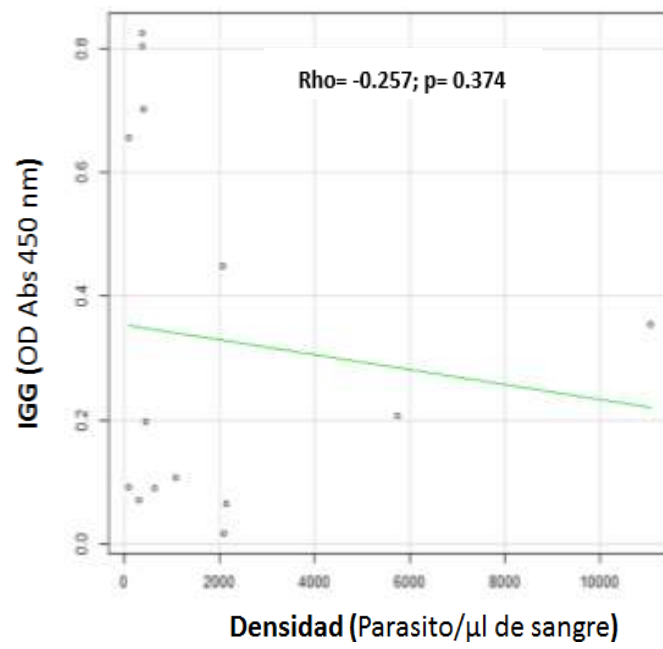
**Figura 14.** Determinación de la relación entre los niveles de IgM contra la proteína de superficie del merozoito 1 -19kDa *P. falciparum* y las densidades parasitarias de infecciones por malaria sintomática.



**Figura 15.** Determinación de la relación entre los niveles de IgG contra la proteína de superficie del merozoito 1 -19kDa *P. falciparum* y las densidades parasitarias de infecciones por malaria sintomática.



**Figura 16.** Determinación de la relación entre los niveles de IgM contra la proteína de superficie del merozoito 1 -19kDa *P. falciparum* y las densidades parasitarias de infecciones por malaria asintomática.



**Figura 17.** Determinación de la relación entre los niveles de IgG contra la proteína de superficie del merozoito 1 -19kDa *P. falciparum* y las densidades parasitarias de infecciones por malaria asintomática.

## CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

En este estudio nosotros evaluamos los niveles de inmunoglobulinas M y G anti- MSP1 19kDa de *P. falciparum* tanto en individuos sintomáticos y asintomáticos a malaria en los días 0, 14 y 45 a 60 días de seguimiento de la infección, demostrando una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en el día 0 de seguimiento entre portadores sintomáticos y asintomáticos para IgG. Así mismo, estos resultados indican que los niveles de IgG son mucho más altos en asintomáticos, hallazgo similar a los resultados mostrados en otros estudios<sup>10, 11, 66</sup>, donde los altos niveles de este tipo de inmunoglobulinas confieren una protección clínica.

Por otro lado, la tendencia en los niveles de Inmunoglobulinas M y G anti-MSP1 de *P. falciparum* en asintomáticos y sintomáticos los días 0, 14 y 45 a 60 días de seguimiento de la infección malárica, muestra una ligera tendencia ascendente en los niveles de IgG en portadores sintomáticos a lo largo del tiempo, contrastando los resultados mostrados en otros estudios<sup>17, 67</sup> en los que indican una fuerte respuesta y la permanencia en los niveles de inmunoglobulinas en infecciones sin manifestaciones clínicas. Así mismo, los individuos sintomáticos, más aún con primoinfecciones, van disminuyendo la protección de la inmunidad reflejándose una reducción en los niveles de anticuerpos lo largo de la infección, así como también después de la misma.

Por su parte, los niveles de IgM anti-MSP1 19kDa de *P. falciparum* y las

densidades parasitaria en infecciones por malaria sintomática presentan una correlación positiva moderada fuerte estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ), mostrando que a mayores densidades parasitarias aumentarían los niveles de este anticuerpo o viceversa, resultado similar con otros estudios<sup>67, 68</sup> que confirman que los anticuerpos antimaláricos desempeñan un rol importante en el apoyo en la respuesta del tratamiento durante la malaria aguda por *P. falciparum*. Por el contrario, los niveles de IgG en individuos sintomáticos y los niveles de IgM e IgG en asintomáticos frente a las densidades parasitarias presentaron una correlación negativa moderadamente fuerte ( $Rho = -0,012; -0,279; -0,257$ ) representando que, al aumentar los niveles de IgG e IgM las densidades parasitarias decrecen y viceversa, pero que no fueron estadísticamente significativos ( $p > 0,05$ ) (Figuras 15, 16 y 17) , por lo que, no pudo probarse la relación con la protección clínica, que en contraste, con lo reportado por Soe, *et al.*<sup>66</sup> en la que los altos niveles de anticuerpos IgG anti-MSP1 están relacionados a parasitemias bajas desarrollando inmunidad clínica ante esta infección.

Cabe recalcar, la principal limitación del estudio fue el número de muestras, pero que, a pesar de ello, los resultados demostraron que las inmunoglobulinas cumplen un papel fundamental en la respuesta inmune contra la Proteína de Superficie del Merozoito en la protección ante infecciones sintomáticas y asintomáticas a malaria por *P. falciparum* y se necesitará de la ampliación de nuestro tamaño muestral para obtener resultados con mayor fuerza estadística.



## CAPITULO VI: CONCLUSIONES

- Los niveles de inmunoglobulinas G contra la MSP1- 19kDa en infecciones por malaria sintomática y asintomática por *P. falciparum* presentan diferencia estadísticamente significativa el día 0 de seguimiento (**p=0,004**).
- Los niveles de IgM y las densidades parasitarias en individuos con malarias sintomática por *P. falciparum* presentaron una correlación positiva moderada fuerte estadísticamente significativa (**Rho= 0,546; p= 0,002**) indicando que al aumentar los niveles de IgM aumentan las densidades parasitarias o viceversa.

## **CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES**

- Para obtener resultados muchos más representativos, estadísticamente significativos, en próximos estudios recomendamos aumentar el tamaño del n muestral de infecciones sintomáticas y asintomáticas, de esta forma también reduciríamos un posible sesgo.
- Tomar en consideración las variables sociodemográficas como edad y sexo en infecciones sintomáticas y asintomáticas permitiendo tener un panorama más claro en la respuesta inmune mediada por anticuerpos en la población estudiada.

## FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Organización Mundial de la Salud, OMS. Reporte mundial de malaria 2018. [En línea]. [Fecha de acceso 15 abril del 2019]. Disponible en <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259492/9789241565523-eng.pdf?sequence=1>
2. Organización Panamericana de la Salud, OPS. Situación de la malaria en la región de las Américas, 2000-2016. [En línea]. [Fecha de acceso 05 abril del 2019]. Disponible en: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&view=download&category\\_slug=statistics-data-maps-8109&alias=45344-situation-malaria-region-americas-2000-2016-344&Itemid=270&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=statistics-data-maps-8109&alias=45344-situation-malaria-region-americas-2000-2016-344&Itemid=270&lang=es)
3. Portal de Salud Perú. [En línea]. [Fecha de acceso 05 abril del 2019] Disponible en: <http://www.saludglobalperu.org>
4. Instituto Nacional de Salud, INS. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de malaria. Serie de Normas Técnicas N° 39, 2003. [En línea]. [Fecha de acceso 05 abril del 2019]. Disponible en: [http://bvs.minsa.gob.pe/local/INS/163\\_malaria.pdf](http://bvs.minsa.gob.pe/local/INS/163_malaria.pdf)

5. Dirección General de Epidemiología, DGE. Número de casos de malaria en Perú 2013-2018. [En línea]. [Fecha de acceso 05 abril del 2019]. Disponible en: <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2018/SE52/malaria.pdf>
6. Laishram DD, Sutton PL, Nanda N, Sharma VL, Sobti RC, Carlton JM *et al.* Las complejidades de las manifestaciones de la malaria con un enfoque en la malaria asintomática. *Malar J.* 2012 Jan 31;11:29. [En línea]. [Fecha de acceso 01 abril del 2019]. Disponible en: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-11-29>
7. Organización Mundial de la Salud, OMS. Reporte mundial de malaria 2010. [En línea]. [Fecha de acceso 15 abril del 2019]. Disponible en: [http://www.who.int/malaria/world\\_malaria\\_report\\_2010/worldmalaria-report2010.pdf?ua=1](http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2010/worldmalaria-report2010.pdf?ua=1)
8. Suzarte E, Fando R. En busca de una vacuna anti-malárica. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, Vol. 40, No. 2, 2009. [En línea]. [Fecha de acceso 01 abril del 2019] Disponible en: <https://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/articulos/en-busca-de-una-vacuna-anti-mal%C3%A1rica>

9. Taylor V, Velásquez C, Burgos L, Carmona J, Correa A, *et al.* Retinol, estado del hierro, malaria y parásitos intestinales: relación por medio de las citocinas TH1/TH2. [En línea]. [Fecha de acceso 15 abril del 2019]. Disponible en: <https://www.semanticscholar.org/paper/Retinol%2C-estado-del-hierro%2C-malaria-y-par%3%A1sitos-por-Taylor-Vel%3%A1squez/9a52419646d0b55048e931501e0e3c6cbc0a93f>
10. 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. [En línea]. [Fecha de acceso 15 abril del 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3318420/>
11. Saaverdra-Langer R, Marapara J, Valle-Campos A, Durand S, Vasquez-Chasnamote M, Silva H, Cansino V. IgG subclass responses to excreted-secreted antigens of *Plasmodium falciparum*, in a low-transmission malaria area of the Peruvian Amazonian. *Malarial Journal*- 2018, 17:328. [En línea]. [Fecha de acceso 15 abril del 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6131892/>
12. Niang M, Diop F, Niang O, Sadio B, Sow A, Faye O, Diallo M, *et. al.*

Unexpected high circulation of *Plasmodium vivax* in asymptomatic children from Kedougou, southern Senegal. *Malaria Journal* 2017; 16:497. [En línea]. [Fecha de acceso 15 abril del 2019]. Disponible en:

[https://www.researchgate.net/publication/322125708\\_Unexpected\\_high\\_circulation\\_of\\_Plasmodium\\_vivax\\_in\\_asymptomatic\\_children\\_from\\_Kedougou\\_southeastern\\_Senegal](https://www.researchgate.net/publication/322125708_Unexpected_high_circulation_of_Plasmodium_vivax_in_asymptomatic_children_from_Kedougou_southeastern_Senegal)

13. Brito SM, Hernández NJ. *Plasmodium sp.* en pobladores asintomáticos, Valle Hondo, Municipio Sifontes, Estado de Bolívar. [Tesis] Bolívar: Universidad de Oriente Núcleo de Bolívar. Facultad de Ciencias de la Salud; 2010. [En línea]. [Fecha de acceso 15 abril del 2019]. Disponible en: [http://ri.bib.udo.edu.ve/handle/123456789/6/browse?type=dateissued&sort\\_by=2&order=ASC&rpp=40&etal=5&offset=80](http://ri.bib.udo.edu.ve/handle/123456789/6/browse?type=dateissued&sort_by=2&order=ASC&rpp=40&etal=5&offset=80)
14. Kinyanjui SM. *The Immunology of Malaria* 2012. [En línea]. [Fecha de acceso 15 abril del 2019]. Disponible en: <http://cdn.intechopen.com/pdfs/34364.pdf>
15. Sutton PL, Clarck EH, Silva C, Branch OH. The *Plasmodium falciparum* merozoite Surface protein-1 19 KD antibody response in the Peruvian Amazon predominantñy targets the no-allele specific, shared sites of this antigen. [En línea]. [Fecha de acceso 15 abril del 2019]. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2818648/>

16. Torres KJ, Clark EH, Hernandez JN, Soto KE, Gamboa D, Branch OH. Antibody response dynamics to the *Plasmodium falciparum* conserved vaccine candidate antigen, merozoite surface protein-1 C-terminal 19kD (MSP1-19kD), in Peruvians exposed to hypoendemic malaria transmission. *Malaria Journal*. 2008; 7:173. [En línea]. [Fecha de acceso 15 abril del 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2557017/>
17. Akpogheneta O, Duah A, Tetteh K, Dunyo S, Lanar E, *et al.* Duration of Naturally Acquired Antibody Responses to Blood-Stage *Plasmodium falciparum* Is Age Dependent and Antigen Specific. *Infection and Immunity*, Apr. 2008, p. 1748-1755. [En línea]. [Fecha de acceso 15 abril del 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2292892/>
18. Botero D, Restrepo M. *Parasitosis Humana*. 4ta Ed. Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2003. p. 506
19. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Laveran and the Discovery of the Malaria Parasite. Department of Health and Human Services. 2005. [En línea]. [Fecha de acceso 15 abril del 2019]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/Malaria/history/laveran.htm>

20. López JA. Alphonse Laveran, Charles, Louis, Ross, Ronald. 2005. [En línea]. [Fecha de acceso 15 abril del 2019]. Disponible en: [http://bvs.sld.cu/revistas/his/vol\\_2\\_99/his15299.pdf](http://bvs.sld.cu/revistas/his/vol_2_99/his15299.pdf)
21. Organización Mundial de la Salud, OMS. Reporte mundial de malaria 2009. [En línea]. [Fecha de acceso 15 abril del 2019]. Disponible en: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241563901/en/>
22. Organización Mundial de la Salud, OMS. Guidelines for the treatment of malaria. 3ra Edición. 2015. [En línea]. [Fecha de acceso 15 abril del 2019]. Disponible en: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/162441/1/9789241549127\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/162441/1/9789241549127_eng.pdf)
23. Sutherland CJ, Tanomsing N, Nolder D, et al. Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite *Plasmodium ovale* occur globally. *J Infect Dis* 2010; 201: 1544-1550. [En línea]. [Fecha de acceso 15 abril del 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20380562>
24. La malaria por *Plasmodium knowlesi* en humanos está ampliamente distribuida y es potencialmente mortal. *Clin Infect Dis*. 2008;46:165-71. [En línea]. [Fecha de acceso 17 de abril del 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2533694/>



25. Organización Mundial de la Salud, OMS. Pautas para el tratamiento de malaria. Tercera ed.; 2015. [En línea]. [Fecha de acceso 17 de abril del 2019]. Disponible en: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/162441/9789241549127\\_eng.pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/162441/9789241549127_eng.pdf?sequence=1)
26. Organización Mundial de la Salud, OMS. Reporte mundial de malaria 2010. [En línea]. [Fecha de acceso 17 abril del 2019]. Disponible en: [http://www.who.int/malaria/world\\_malaria\\_report\\_2010/worldmalaria\\_report2010.pdf?ua=1](http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2010/worldmalaria_report2010.pdf?ua=1)
27. Autino B, Noris A, Russo R, Castelli. Epidemiología de la malaria en áreas endémicas. 2012. *Mediterr J Hematol Infect Dis* . 2012; 4 (1): e2012060. [En línea]. [Fecha de acceso 17 de abril del 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3499992/>
28. Organización Mundial de la Salud, OMS. Reporte mundial de malaria 2016. [En línea]. [Fecha de acceso 17 de abril del 2019]. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/254912/1/WHO-HTM-GMP-2017.4-eng.pdf?ua=1>
29. Organización Panamericana de la Salud, OPS. Situación de la malaria en la región de las Américas, 2000-2016. [En línea]. [Fecha de acceso 05 abril del 2019]. Disponible en:

[https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&view=download&category\\_slug=statistics-data-maps-8109&alias=45344-situation-malaria-region-americas-2000-2016-344&Itemid=270&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=statistics-data-maps-8109&alias=45344-situation-malaria-region-americas-2000-2016-344&Itemid=270&lang=es)

30. Organización Panamericana de la Salud, OPS. Informes anuales OPS/CHAT/VT/Malaria. [En línea]. [Fecha de acceso 05 abril del 2019]. Disponible en: <http://www.paho.org/hq/images/stories/AD/CHA/malaria/malaria-americas-ipa-2016-web.jpg?ua=1>
31. Organización Mundial de la Salud, OMS. Reporte mundial de malaria 2017. [En línea]. [Fecha de acceso 17 de abril del 2019]. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259492/9789241565523-eng.pdf?sequence=1>
32. Vargas J. Prevención y control de la malaria y otras enfermedades transmitidas por vectores en el Perú. *Revista peruana de epidemiología* 2003; 11(1): 1-18. [En línea]. [Fecha de acceso 17 de abril del 2019]. Disponible en: [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/epidemiologia/v11\\_n1/Pdf/a05.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/epidemiologia/v11_n1/Pdf/a05.pdf)
33. Rodriguez UC, Rivera JM, Rebaza IH. Factores de riesgo para

malaria por *Plasmodium vivax* en una población rural de Trujillo, Perú. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2007; 24(1):3-9. [En línea]. [Fecha de acceso 17 de abril del 2019]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/237206282\\_Factores\\_de\\_riesgo\\_para\\_malaria\\_por\\_Plasmodium\\_vivax\\_en\\_una\\_poblacion\\_rural\\_de\\_Trujillo\\_Peru](https://www.researchgate.net/publication/237206282_Factores_de_riesgo_para_malaria_por_Plasmodium_vivax_en_una_poblacion_rural_de_Trujillo_Peru)

34. Instituto Nacional de Salud, INS. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de malaria. Serie de Normas Técnicas N° 39, 2003. [En línea]. [Fecha de acceso 17 de abril del 2019]. Disponible en: [http://bvs.minsa.gob.pe/local/INS/163\\_malaria.pdf](http://bvs.minsa.gob.pe/local/INS/163_malaria.pdf)
35. Martínez E, Tobón A, Blain S. Malaria en humanos por infección natural con *Plasmodium knowlesi*. Biomédica 2012;32 (Supl.):121-30. [En línea]. [Fecha de acceso 17 de abril del 2019]. Disponible en: <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/583>
36. Patarroyo, ME., Patarroyo, MA. Emerging rules for subunit-based, multiantigenic, multistage chemically synthesized vaccines. Acc Chem Res 41(3):377-86. [En línea]. [Fecha de acceso 17 de abril del 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18266328>

37. Becerra FA. Fenómenos de citoadherencia asociados al paudismo falciparum, 2015. [En línea]. [Fecha de acceso 17 de abril del 2019]. Disponible en: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/FEDERICO%20MIGUEL%20BECERRA%20APARICIO.pdf>
38. Granda S, Jiménez M. Paludismo el Desarrollo de una vacuna. [En línea]. [Fecha de acceso 17 de abril del 2019]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/parasitologia/VacuMal.pdf>
39. Richie TL, Saul A. Progress and challenges for malaria vaccines. *Nature*. 2002; 415(6872):694-701. [En línea]. [Fecha de acceso 17 de abril del 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11832958>
40. Sherman IW. *Malaria Parasite Biology, Pathogenesis, and protection*. American Society for Microbiology, 1998. [En línea]. [Fecha de acceso 17 de abril del 2019]. Disponible en: <https://www.amazon.es/Malaria-Parasite-Biology-Pathogenesis-Protection/dp/1555811310>
41. Blackman MJ. Proteases involved in erythrocyte invasion by the malaria parasite: function and potential as chemotherapeutic targets. *Curr Drug Targets*. [En línea]. [Fecha de acceso 17 de abril del

2019]. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11475536>

42. Holder AA, Blackman MJ, Burghaus PA, Chappel JA, Ling IT, Mccallum-Deighton N, Shai S. A malaria merozoite surface protein (MSP1)-structure, processing and function. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992, 87(Suppl 3):37-42. [En línea]. [Fecha de acceso 17 de abril del 2019]. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1343716>

43. Udhayakumar V, Anyona D, Kariuki S, Shi YP, Bloland PB, et al. Identification of T and B cell epitopes recognized by humans in the C-terminal 42-kDa domain of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein (MSP)-1. *J Immunol* 1995, 154:6022-6030. [En línea]. [Fecha de acceso 17 de abril del 2019]. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7538540>

44. Tanabe K, Mackay M, Goman M, Scaife JG. Allelic dimorphism in a surface antigen of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Mol Biol* 1987, 195:273-287. [En línea]. [Fecha de acceso 17 de abril del 2019]. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3079521>

45. Miller LH, Roberts T, Shahabuddin M, McCutchan TF. Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1). *Mol Biochem Parasitol* 1993, 59:1-14. [En línea]. [Fecha de acceso 17 de abril del 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8515771>
46. Lesmes L. Evaluación de la respuesta funcional de anticuerpos inducidos por pseudopéptidos y su impacto en el desarrollo de potenciales nuevos medicamentos para la malaria. [Tesis] Bogota: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, posgrado Interfacultades de Microbiología;2011. [En línea]. [Fecha de acceso 17 de abril del 2019]. Disponible en: <http://bdigital.unal.edu.co/4364/>
47. Conway DJ, Cavanagh DR, Tanabe K, Roper C, Mikes ZS, et al. A principal target of human immunity to malaria identified by molecular population genetic and immunological analyses. *Nat Med* 2000, 6:689-692. [En línea]. [Fecha de acceso 17 de abril del 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10835687>
48. Lee EA, Flanagan KL., Odhiambo K., Reece WH, Potter C, et al. Identification of frequently recognized dimorphic T-cell epitopes in *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in West and East Africans: lack of correlation of immune recognition and allelic prevalence. *Am J Trop Med Hyg* 2001, 64:194-203. [En línea].

[Fecha de acceso 17 de abril del 2019]. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11442217>

49. Murphy K., Travers P., Walport M. Inmunología de Janeway. 7ma edición. Mexico: McGraw-Hill InterAmérica Editores, S.A. 2009
50. Arlene Dent, et al, Prenatal Malaria Immune Experience Affects Merozoite Surface Protein-1 Invasion Inhibitory Antibodies During Infancy. 2006. Disponible en:  
<http://www.jimmunol.org/content/177/10/7139.full.pdf+html>
51. Simão V. Resposta de anticorpos contra proteínas recombinantes baseadas em antígenos de merozoítos de *Plasmodium vivax* em individuos de uma comunidade rural da Amazônia brasileira. 2011. [En línea]. [Fecha de acceso 17 de abril del 2019]. Disponible en:
52. Toro F. *Respuesta inmune celular contra el Plasmodium falciparum*. Acta méd. Colomb. 1992;17(1):46-50. [En línea]. [Fecha de acceso 17 de abril del 2019]. Disponible en:
53. Regueiro JR, López C, González S, Martínez E. Inmunología; Biología y Patología del Sistema Inmune. 3era Edición. Editorial Médica Panamericana. [En línea]. [Fecha de acceso 17 de abril del 2019]. Disponible en:

54. Porter RR. The hydrolysis of rabbit  $\gamma$ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem J* 73:119-26. 1959. [En línea]. [Fecha de acceso 17 de abril del 2019]. Disponible en:
  
55. Abass AK, Lichtman AH, Pillai S. *Inmunología celular y molecular*. 6ta edición. ELSEVIER.
  
56. Gerald Karp. *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*. Séptima edición. [En línea]. [Fecha de acceso 17 de abril del 2019]. Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2036&sectionid=153038704>
  
57. Good MF, Xu H, Wykes M, Engwerda CR. Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:69-99. [En línea]. [Fecha de acceso 17 de abril del 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15771566>
  
58. Gilles H. Tropical clinical epidemiology- 'a new name for an old art'. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1986;80:353-359. [En línea]. [Fecha de acceso 17 de abril del 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3541307>



59. Roper C, Elhassan I M, hviid L, Giha H, Richardson W, Babiker H, et al. Detection of very low level *Plasmodium falciparum* infections using then ested polymerase chain reaction and a reassessment of the epidemiology of unstable malaria in Sudan. Am J Trop Med Hyg. 2004;54(1):325-31. [En línea]. [Fecha de acceso 17 de abril del 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8615441>
60. Legorreta M, Sánchez P. La respuesta inmune celular contra el *Plasmodium*: agente etiológico de la malaria. Revista Especializada en Ciencias de la Salud, 2(1/2):3-8, 1999. [En línea]. [Fecha de acceso 17 de abril del 2019]. Disponible en: <http://www.revistas.unam.mx/index.php/vertientes/article/view/33051>
61. Laishram DD, SuttonPL, Nanda N, Sharma VL, Sobti RC, et al. The complexities of malaria disease manifestations with a focus on asymptomatic malaria. 2012. [En línea]. [Fecha de acceso 17 de abril del 2019]. Disponible en: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-11-29>
62. Climate – Data.ORG: América del Sur. [En línea]. [Fecha de acceso 19 de agosto del 2016]. Disponible en: <http://es.climate-data.org/location/293936/>

63. Branch O, Casapia M, Gamboa D, Hernandez J, Alava F, *et al.* Clustered local transmission and asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria infections in a recently emerged, hypoendemic Peruvian Amazon community. *Malaria Journal*. 2005;4:27 doi:10.1186/1475-2875-4-27. [En línea]. [Fecha de acceso 17 de abril del 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15975146>
64. Arana AA, Pinedo VV, Tresierra AB. Seroprevalencia y factores de riesgo en individuos que convivieron con pacientes positivos y negativos a *Plasmodium falciparum* en cuatro comunidades situadas al sur de Iquitos. 2018. [En línea]. [Fecha de acceso 06 de setiembre del 2019]. Disponible en: [http://repositorio.unapiquitos.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/6079/Andrei\\_tesis\\_titulo\\_2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unapiquitos.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/6079/Andrei_tesis_titulo_2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
65. Descriptores en Ciencias de la Salud (DeCS). Biblioteca virtual en salud. [En línea]. [Fecha de acceso 06 de setiembre del 2019]. Disponible en: <http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660.exe/decsserver/>
66. Soe S, Theisen M, Roussilhon C, Aye KS, Druilhe P. Asociación entre la protección contra la malaria clínica y los anticuerpos contra los antígenos de superficie de merozoito en un área de hiperendemicidad en Myanmar: complementariedad entre las respuestas a la proteína de superficie de merozoito 3 y la proteína

rica en glutamato de 220 kilodalton. *Infect Immun* . Enero de 2004; 72 (1): 247–252. [En línea]. [Fecha de acceso 06 de setiembre del 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC343946/>

67. Koffi D, Varela ML, Loucobar C, Beourou S, Vigan- Womas I, *et al*. Análisis longitudinal de anticuerpos en casos de malaria sintomática que no reflejan la transmisión de parásitos en un área periurbana de Costa de Marfil entre 2010 y 2013. 2017. *PLoS One* . 2017; 12 (2): e0172899. [En línea]. [Fecha de acceso 27 de setiembre del 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5330500/>

68. Mayxay M, Chotivanich K, Pukrittayakamee S, Newton P, Looareesuwan S, *et al*. Contribución de la inmunidad humoral a la respuesta terapéutica en malaria falciparum. 2001. Diciembre de 2001; 65 (6): 918-23. [En línea]. [Fecha de acceso 27 de setiembre del 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Mayxay+M%2C+Chotivanich+K%2C+Pukrittayakamee+S%2C+Newton+P%2C+Looareesuwan+S%2C+White+NJ>

# ANEXOS

## Anexo 1. Formulario de consentimiento informado, Comité Ética Instituto Nacional de Salud.

08-982	04/23/2012	NYU SoM IRB HRPP
 School of Medicine	<b>Institutional Review Board</b> Veteran's Administration Hospital Physical Address: 423 East 23rd Street   10th Floor, West Wing   NY, NY 10010 Mailing Address: 550 1st Avenue   #VET 10 <sup>th</sup> Floor, West Wing   NY, NY 10016 <a href="http://irb.med.nyu.edu">http://irb.med.nyu.edu</a>	
Dra. Ora Lee Branch, Universidad de Nueva York (NYU) Facultad de Medicina Dr. Moisés Sihuíncha, Universidad Nacional de la Amazonia Peruana y Ministerio de Salud		
<b>FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO Y AUTORIZACIÓN PARA PARTICIPAR EN UNA INVESTIGACIÓN</b>		
<b>TÍTULO DE LA INVESTIGACIÓN:</b>		
Malaria: Competencia de la Respuesta Antígeno Inmune		
<b>A. PROPÓSITO DEL ESTUDIO:</b>		
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 <i>Plasmodium</i> , el cual es transmitido por la picadura de un mosquito. Determinaremos las variedades de <i>Plasmodium falciparum</i> y <i>P. vivax</i> circulantes en esta comunidad. Esto requerirá tomar muestras de sangre y hacer algunas preguntas. Estudiaremos el parásito y las características del ser humano que lo puedan proteger contra la infección y desarrollar la enfermedad. La meta de este estudio es proveer información de cómo prevenir y desarrollar vacunas contra la malaria. EL PUESTO DE SALUD CONTINUA SIENDO EL PRIMER LUGAR DONDE DEBE ACUDIR PARA SU ATENCIÓN MÉDICA SI ESTA ENFERMO, POR FAVOR ACUDA AL PUESTO DE SALUD.		
<b>B. SUJETOS PARTICIPANTES:</b>		
Estimamos que participará en este estudio el siguiente número de personas en la DETECCIÓN ACTIVA EN LA COMUNIDAD: En este lugar: 2,000 cada año      Total en todos los lugares: 2,000		
SUJETOS PARTICIPANTES:		
<input type="checkbox"/> Pacientes internados <input type="checkbox"/> Pacientes ambulatorios <input checked="" type="checkbox"/> Otros: Miembros de la comunidad viviendo cerca donde hubo malaria.		
Su participación constará de 6 visitas en su casa, que se llevarán a cabo durante el tiempo que existen más casos de malaria. Cada una de estas visitas tomará aproximadamente 30 minutos.		
<b>C. DESCRIPCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN:</b>		
Examinaremos su sangre para determinar el tipo de parásitos de malaria que Usted tiene. Las visitas que haremos nos ayudarán a identificar las casas donde viven personas que están en riesgo de contraer malaria. Los exámenes de sangre nos ayudarán a identificar como su organismo combate a la malaria lo cual hace que su comunidad sea más saludable. Esto incluirá exámenes que nos ayudara a ver si Usted tiene la habilidad de combatir a la malaria de forma diferente que otras personas. Observaremos las proteínas y genes necesarios que tienen los parásitos para poderlo infectar a Usted. Asimismo las proteínas y genes que usted tiene para que lo haga resistente contra la malaria u otras infecciones.		
Iniciales del participante: _____ Date: _____		
<small>(IRB Official Use Only) This Consent Document is approved for use by the New York University's Institutional Review Board (IRB). Only the IRB-stamped approved form may be used. Approved: Start: _____ End: _____ (do not use this form after the End date)</small>		
<small>08-562 ORALEE new consent form 04-23-2012 Revised.docx      Página 1 de 2</small>		
		

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

**F. POSIBLES BENEFICIOS:**

Este estudio de investigación incluye procedimientos que adicionales. Será examinado para saber si tiene malaria, lo cual requerirá tomar una muestra de sangre. Si Usted tiene síntomas de malaria o si determinamos que es necesario, Usted recibirá tratamiento contra la malaria de forma gratuita por parte del Ministerio de Salud. Asimismo el cuidado de su salud, y su muestra proveerá de valiosa información para ayudar a su comunidad y al mundo a desarrollar formas de prevenir la malaria y mejorar la salud de las personas. Además, se le realizaran exámenes auxiliares cuando el Médico lo crea conveniente, siendo entregados los resultados explicándole a Usted en caso que requiera prescripción.

**G. ALTERNATIVAS A LA PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO**

Siempre existe una alternativa a la participación en este estudio, tal como: Usted no tiene que participar en este estudio. Se lo puede hacer la prueba de sangre y ser tratado para la malaria por el Ministerio de Salud aunque no desee participar en este estudio.

**H. CONFIDENCIALIDAD:**

Información privada sobre usted que le identifica 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 compartirá su información en esta investigación, 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, la Dra. OraLee Branch y su equipo de investigación le pedirán ciertos análisis para determinar si usted tiene una infección durante el embarazo y 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. Ella usará los resultados de estos exámenes para darle tratamiento a usted como para completar esta investigación. Los resultados de estos exámenes serán guardados en su historia clínica 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 control de salud regular no se incluirán en su historia clínica.

Es posible que otras personas y organizaciones, incluyendo co-investigadores, agencias federales y reguladores del estado y el (los) IRB(s) supervisando la investigación reciban su información durante el transcurso 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 (NYUSM) no le identificará con su nombre, número de seguro social, dirección, número de teléfono, u información personal.

Cuando su información del estudio se revelará fuera de la NYUSM como parte de la investigación, se eliminará la información que pueda identificarla enumerada arriba y se asignará un número de código único a su archivo. La NYUSM no revelará la clave del código, salvo el caso que la ley lo requiera.

**Confidencialidad de Su Expediente Médico**

Su 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 diagnóstica, la institución donde usted es tratado podría pedirle de firmar un formulario de consentimiento informado aparte para los procedimientos específicos a este estudio, y este formulario de consentimiento

Iniciales del participante: \_\_\_\_\_ Date: \_\_\_\_\_

(IRB Official Use Only)

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

(IRB). Only the IRB-stamped approved form may be used.

Approved: Start: \_\_\_\_\_ End: \_\_\_\_\_ (do not use this form after the End date)

08-982 ORALEE new consent form 04-23-2012 Revised .docx

Página 3 de 7



informado podría incluirse en la historia clínica de esta institución. La confidencialidad de su información también está protegida por las regulaciones federales de privacidad, según descrito arriba.

#### Confidencialidad de su Información del Estudio

Su información del estudio incluye información que la identifica y que está guardada en los archivos de la investigación. Nosotros intentaremos de mantener la confidencialidad de esta información, pero no podemos garantizarlo. Si se publicarán o presentarán unos datos de este estudio, vamos a eliminar primero la información que la identifica.

#### Retención de su Información del Estudio

Los resultados de este estudio serán guardados en su archivo del estudio durante un mínimo de 5 años o después que se termina el estudio, lo que sea más tiempo. En este momento o se destruirá la información de la investigación que aún no se encuentra en su historia clínica, o se eliminará la información que le identifica de los resultados del estudio en NYU. Cualquier información de la investigación que se encuentra en su historia clínica será guardada indefinidamente.

#### Su autorización de HIPAA

Una nueva regulación federal, el Reglamento Federal de Privacidad Médica ha tomado efecto según requerido por la Ley de Portabilidad y Contabilidad de Seguros de Salud (HIPAA). Bajo este reglamento de privacidad, en la mayoría de los casos debemos conseguir su consentimiento en escrito para usar o revelar información identificable de salud sobre usted que nosotros usamos o creamos ["su información protegida de salud"] en conexión con la investigación que involucro su tratamiento o expediente médico. Este consentimiento se llama una Autorización.

Si usted firma este formulario, está dando su autorización para el usar 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 esté en el programa de investigación, pero la negación a firmar no afectará al cuidado de su salud (o los pagos para su atención médica) fuera de este estudio.

Esta autorización no caducará a menos que usted la retire en escrito. Tiene el derecho de retirar su autorización en cualquier momento, a menos que NYU ya se apoyó en ella o tiene que seguir usando su información para completar los análisis de datos o para reportar datos para este estudio. El procedimiento para revocar su autorización se describe en Sección K.

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

Iniciales del participante: \_\_\_\_\_ Date: \_\_\_\_\_

(IRB Official Use Only)

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

(IRB). Only the IRB-stamped approved form may be used.

Approved: Start: \_\_\_\_\_ End: \_\_\_\_\_ (do not use this form after the End date)

08-982 ORALEE new consent form 04-23-2012 Revised: dloca

Página 4 de 7



- Investigadores principales: Dra. OraLee Branch y Dr. Moises Sihuíncha
- Coordinador del estudio: Dr. Jean Hernández
- Organización de Investigación de Contrato: Ministerio de Salud del Perú.

Si una de las instituciones enumeradas arriba se fusiona o se vende en el transcurso de esta investigación, su Autorización comprende el uso y la revelación de su información protegida de salud a la nueva compañía o institución que asume la responsabilidad para la investigación.

Le pedimos que sea advertido que una vez que su información protegida de salud se revela a una persona u organización no abarcada por el Reglamento Federal de Privacidad Médica, la información ya no está protegida por el Reglamento de Privacidad y puede ser sujeto a una divulgación posterior por el recipiente.

#### I. COMPENSACIÓN / TRATAMIENTO EN CASO DE DAÑO O LESIÓN:

Toda forma de diagnóstico médico y tratamiento involucra algún riesgo de daño. Adicionalmente, es posible que haya riesgos asociados con este estudio de los cuales no sabemos. A pesar de todas las precauciones, es posible que usted desarrolle complicaciones médicas de su participación en este estudio. Si usted sufre algún daño en el transcurso de este estudio o experimenta algún efecto adverso a un medicamento o procedimiento del estudio, por favor contacte al Coordinador del Estudio Dr. Hernández en el siguiente número de teléfono 065-965-940025 y/o la investigadora principal Dra. OraLee Branch en 001-212-2634364. Si ocurren semejantes complicaciones, el doctor del estudio le asistirá para que obtenga el tratamiento médico apropiado pero este estudio no provee asistencia económica para costos médicos o costos relacionados al daño. Usted no pierde ningún derecho de intentar conseguir el pago para daños personales al firmar este formulario.

#### J. PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA Y AUTORIZACIÓN:

Su decisión de participar o no en este estudio es completamente voluntaria (su libre voluntad). Si usted decide no participar en este estudio, esto no afectará al cuidado que usted recibirá y no resultará en ninguna pérdida de beneficios a los cuales tiene derecho.

Usted será informado de cualquier descubrimiento significativo desarrollado en el transcurso de este estudio que podría influenciar su buena disposición a continuar de participar en la investigación.

Su decisión de participar o no en este estudio es completamente voluntaria (de su libre voluntad). Usted (o su hijo) no recibirá pago alguno por su participación. Usted (o su hijo) no recibirá derecho legal alguno por su participación o firma del consentimiento de este estudio.

#### K. ABANDONO DEL ESTUDIO Y/O RETIRO DE LA AUTORIZACIÓN:

Si usted decide de participar en este estudio, puede retirar su participación en cualquier momento sin sanción o pérdida de beneficios a los cuales tendrá derecho de otra manera. También puede retirar su autorización para nuestro uso o nuestra revelación de su información protegida de salud para este estudio.

Si usted decide de retirar su consentimiento, le pedimos de contactar a Dr. Hernández (965-940025) y participarle que se está retirando del estudio. Su dirección es Urb. Calvo de Araujo C-9 Pampa Chica San Juan Iquitos- Loreto 065. Si desea retirar su autorización, también debe contactar a Dra. OraLee Branch por escrito a NYU School of Medicine, 342 East 25th Street, New York, NY 10010.

Recuerde que el retiro de su autorización afecta el uso y la compartición de información solamente después que se ha recibido su solicitud en escrito, y no es posible retirar su autorización para los usos o revelaciones que hemos realizado previamente o tenemos que seguir realizando para completar los análisis o reportar

Iniciales del participante: \_\_\_\_\_ Date: \_\_\_\_\_

(IRB Official Use Only)  
This Consent Document is approved for use by the New York University's Institutional Review Board  
(IRB). Only the IRB-stamped approved form may be used.  
Approved: Start \_\_\_\_\_ End: \_\_\_\_\_ (do not use this form after the End date)

08-982 ORALEE new consent form 04-23-2012 Revised.docx

Página 5 de 7



datos de la investigación. Si usted retire su autorización para el uso de muestras biológicas guardadas tiene que ponerse en contacto sobre este asunto directamente en escrito.

La investigadora principal u otro miembro del equipo del estudio conversarán con usted sobre cualquier consideración acerca de la discontinuación de su participación en este estudio. Le instruiremos cómo se puede retirar del estudio y es posible que la pedimos de volver para una examen final.

El doctor del estudio también puede decidir de retirarle a usted del estudio por ciertas razones. Posibles razones para retirar un sujeto del estudio podrían ser el empeoramiento de la salud u otras condiciones que puedan hacerlo dañino para usted. Es posible que el estudio se detenga o se cancela debido a la pérdida de dinero para el estudio por las subvenciones y becas.

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

Yo autorizo el/la investigador/a principal y sus co-investigadores de contactarme sobre investigaciones en el futuro sobre Malaria: Competencia de la Respuesta Antígeno Inmune en la NYU Escuela de Medicina, Departamento de Microbiología, la Universidad Amazonia Peruana (UNAP) y el Ministerio de Salud del Perú, siempre que esta investigación en el futuro esté aprobada por el original IRB de registro y que el investigador principal y el co-investigador sean afiliados al protocolo de investigación.

Si me pongo de acuerdo, alguien del personal de investigación de Dra. OraLee Branch podría contactarme en el futuro y la persona me informará sobre un estudio de investigación. Entonces tendrá la oportunidad de contactar al investigador para hacer una cita para recibir la información completa acerca del proyecto de investigación.

Estoy de acuerdo que se contacten conmigo el/la investigador/a principal o los co-investigadores del estudio de investigación "Malaria: Competencia de la Respuesta Antígeno Inmune".

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

Dra. Lee  
Firma del participante o del representante legal

MAR 09, 2013  
Fecha (mes/día/año)

Le agradeceríamos mucho su consentimiento a permitirnos a contactarle sobre investigaciones en el futuro pero esto es completamente voluntario. Si usted opta por no permitirnos que le contactemos, esto no afectará a cuidado de usted o su bebé. Le pedimos que entienda que si nos da 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) tuviera alguna pregunta acerca del estudio o preguntas sobre daño alguno relacionado con el estudio, por favor contactarse con el Dr. Jean Hernández (965-940025) y/o al Dr. Moisés Sihuíncha (965-921615). Si Ud. tiene cualquier pregunta acerca de sus derechos como participante en el estudio, Ud. puede contactarse con los Drs. mencionados anteriormente o con el Comité Institucional de Ética del Instituto Nacional de Salud, Perú, Dr. Duilio Fuentes Delgado: 01-6176296 Anexo 2175 ó 2179. También puede comunicarse con los Investigadores Asociados de la Universidad de Nueva York de los Estados Unidos al Teléfono No 001-212-263-4110.

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

Iniciales del participante: \_\_\_\_\_ Date: \_\_\_\_\_

(IRB Official Use Only)

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

(IRB). Only the IRB-stamped approved form may be used.

Approved: Start: \_\_\_\_\_ End: \_\_\_\_\_ (do not use this form after the End date)

08-982 ORALEE new consent form 04-23-2012 Revised.docx

Página 6 de 7





Una parte del proceso de consentimiento incluye su autorización para el uso de información protegida de salud para los fines de este estudio, según descrito 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  Me lo ha leído: \_\_\_\_\_  
Cualquier pregunta que tuve fue respondida por: \_\_\_\_\_ (persona que obtuvo el consentimiento)

Estoy  No estoy  participando en otro proyecto de investigación en este momento.

Yo consiento voluntariamente en mi participación en este programa de investigación.  
Yo entiendo que tengo derecho a y recibirá una copia de este Formulario de Consentimiento/Autorización firmado.

Al firmar este Formulario de Consentimiento/Autorización, yo doy mi autorización para los usos y revelaciones de mi información protegida de salud según descrito 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/día/año)

Nombre de la persona que obtiene el consentimiento

Firma de la persona que obtiene el consentimiento

Fecha (mes/día/año)

Nombre del testigo

Firma del testigo

Fecha (mes/día/año)

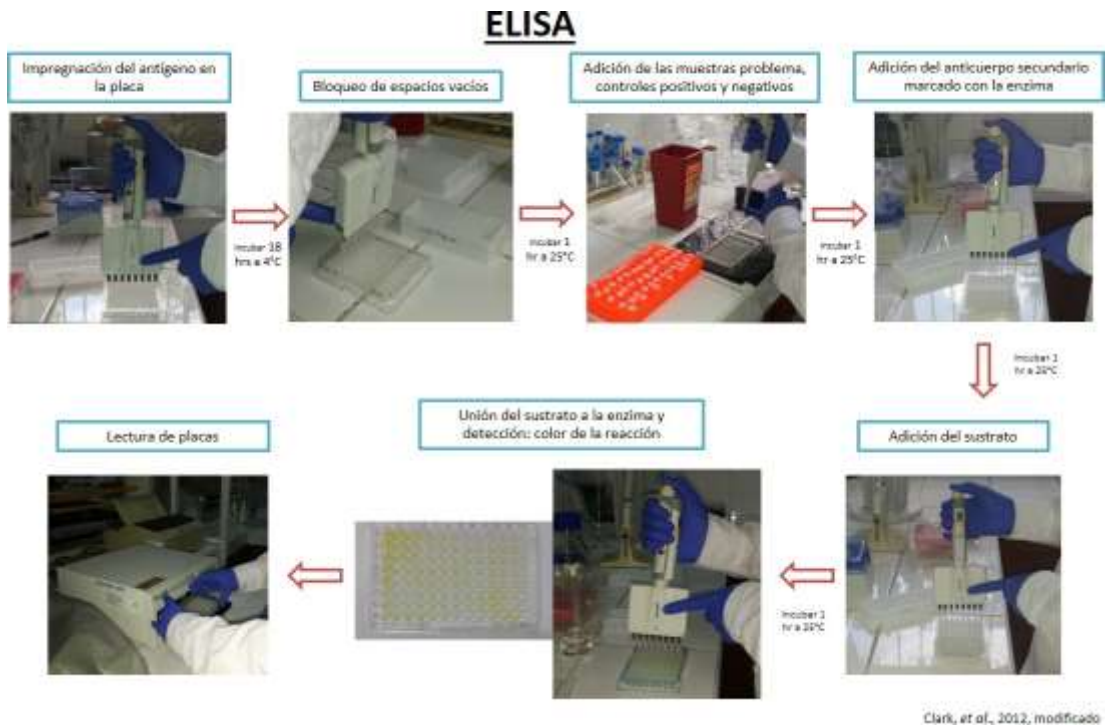
\* Cuando los elementos del consentimiento informado son presentados oralmente al participante o representante, se requerirá un testigo de la presentación oral.

Iniciales del participante: \_\_\_\_\_ Date: \_\_\_\_\_

(IRB Official Use Only)  
This Consent Document is approved for use by the New York University's Institutional Review Board  
(IRB). Only the IRB-stamped approved form may be used.  
Approved: Start \_\_\_\_\_ End: \_\_\_\_\_ (do not use this form after the End date)



**Anexo 2.** Flujograma del Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA).



**Anexo 3.** Preparación de soluciones del ELISA Anexo

Anexo 3.1. Preparación de la solución PBS-Tween.

solución PBS-Tween			
Reactivos	1 placa	2 placas	4 placas
H2O Bidestilada	90 mL	180 mL	360 mL
PBS 10X	10 mL	20 mL	40 mL
Tween® 20	50 uL	100 uL	200 uL

Anexo 3.2. Preparación de la solución bloqueadora.

Solución Bloqueadora			
Reactivos	1 placa	2 placas	4 placas
PBS 1X	20 mL	40 mL	80 mL
Leche 2%	0.4 g	0.8 g	1.6 g

Anexo 3.3. Preparación de la solución de lavado AB.

Solución A (pH= 4)			
Reactivos	1 placa	2 placas	4 placas
H2O Bidestilada	50 mL	100 mL	200 mL
NaHPO4	0.9 g	1.8 g	3.6 g
Si es necesario ajustar pH con NaOH 10%			

Solución B (pH= 9)			
Reactivos	1 placa	2 placas	4 placas
Agua Bidestilada	150 mL	300 mL	600 mL
Na2HPO4.7H2O	3.195 g	6.39 g	12.78 g
Si es necesario ajustar pH con NaOH 10%			

Solución de Lavado AB (pH= 7.4)			
Reactivos	1 placa	2 placas	4 placas
Solució A	50 mL	100 mL	200 mL
Solución B	150 mL	300 mL	600 mL
NaCl	6.31 g	12.62 g	25.24 g
BSA (0.05%)	0.1075 g	0.215 g	0.430 g
Tween® 20 (0.05%)	100 uL	200 uL	400 uL

Anexo 3.4. Preparación de la solución de dilución muestras SDB.

Solución de dilución de muestras "SDB"		
Reactivos	1 placa	2 placas
Solución de lavado AB	10 mL	20 mL
Leche 1.5%	0.15 g	0.30 g

Anexo 3.5. Preparación del HCl 0.25M

HCL 0.25M			
H2O Bidestilada	50 mL	100mL	200 mL
HCl 37%	1. 035 mL	2. 07 mL	4. 14 mL

### Anexo 3.6. Template y condiciones para el

ELISA. Condiciones:

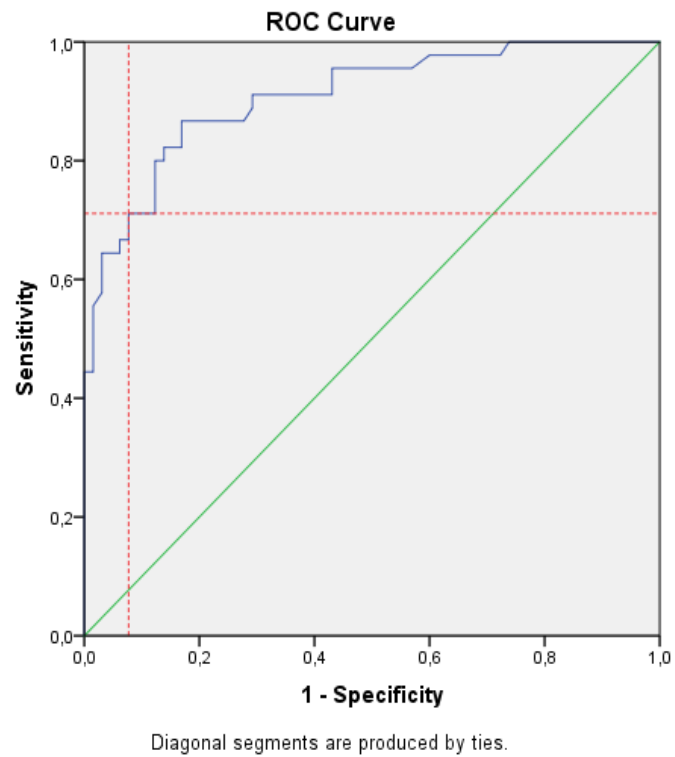
- **[Antígeno]:** MSP1- 19KDa QTSR (1ug/mL)
- **Dilución estándar del pool positivo (STD):** 1/50, 1/100, 1/200, 1/400...
- **Dilución de las muestras y controles (+/-):** 1/200 (50uL) (AB Wash Solution/ Skim Milk 1.5%)
- **Anticuerpo secundario:** Dilución Anti-IgG 1/6000 y Anti-IgM 1/4000 (50uL)
- **Buffer sustrate:** TMB (60min) (50uL)
- **Solution stop:** HCL 0.25M (50uL)
- **Lecture OD:** 450nm

#### Placa:

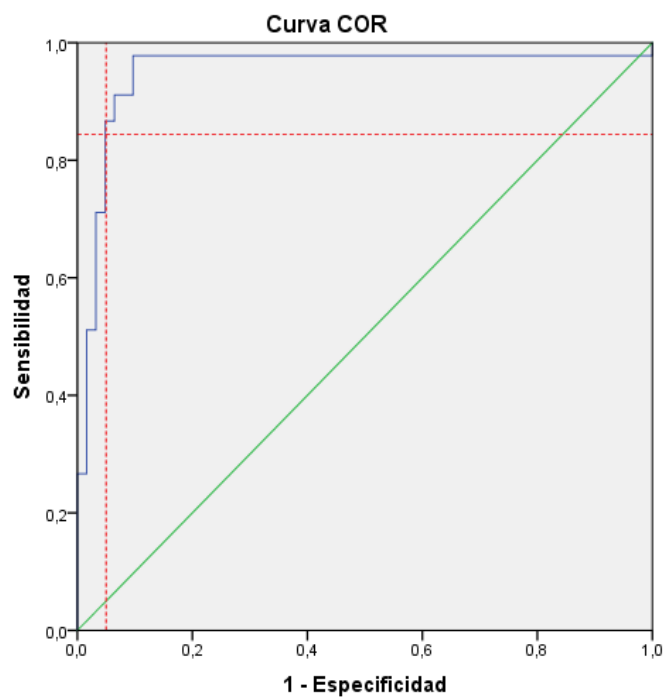
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD 1/50	STD 1/100	STD 1/200	STD 1/400	STD 1/800	STD 1/1600	STD 1/3200	STD 1/6400	STD 1/12800	STD 1/25600	STD 1/51200	STD 1/1024
B	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
C	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
D	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M24
E	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M24
F	M25	M26	M27	M28	M29	M30	M31	M32	M33	M34	M35	M36
G	M25	M26	M27	M28	M29	M30	M31	M32	M33	M34	M35	M36
H	M37	M37	M38	M38	M39	M39	M40	M40		C+	C-	Blank

**Anexo 4.** Cálculo del Umbral de Reactividad (UR) mediante la curva ROC.

Anexo 4.1. Curva ROC con el cálculo umbral MSP1 19kDa - IgM.



Anexo 4.2. Curva ROC con el cálculo umbral MSP1 19kDa - IgG.



Anexo 4.3. Umbral de reactividad estableciendo punto de corte, sensibilidad y especificidad para cada inmunoglobulina.

Antígeno/ Anticuerpo	UR (Abs 450nm)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
MSP1 19 kDa - IgM	0.113	84.4	99.5
MSP1 19 kDa - IgG	0.200	71.1	99.2

**Anexo 5.** Niveles de IgM e IgG contra la Proteína de Superficie del Merozoíto 1-19kDa de *P. falciparum* de infecciones por malaria sintomáticas y asintomáticas, los días 0, 14 y 45 a 60 de seguimiento.

Variable	Día de Evaluación	Tipo de Enfermedad	Estadísticos				Estadístico de Contraste (U de Mann Whitney, p)
			Nº Pacientes (n)	Promedio (Mediana)	Dispersión (Rango Intercuartílico)	Coefficiente de Variación (CV)	
IgM	Día 0	Sintomática	30	0.088	0.281	93.27%	U= 151; p= 0.077
		Asintomática	15	0.198	0.461	106.76%	
	Día 14	Sintomática	30	0.181	0.401	86.75%	U= 217.5; p= 0.866
		Asintomática	15	0.208	0.293	92.89%	
	Día 45 -60	Sintomática	30	0.048	0.075	120.19%	U= 161; p= 0.126
		Asintomática	15	0.106	0.084	137.60%	
IgG	Día 0	Sintomática	30	0.37	0.779	88.87%	<b>U= 122.5; p= 0.014</b>
		Asintomática	15	0.91	0.182	51.22%	
	Día 14	Sintomática	30	0.799	0.403	35.21%	U= 210; p= 0.727
		Asintomática	15	0.966	0.219	42.46%	
	Día 45 -60	Sintomática	30	0.636	0.395	41.72%	U= 170; p= 0.189
		Asintomática	15	0.832	0.593	55.87%	

**Anexo 6.** Relación entre los niveles de densidades ópticas de IgM e IgG contra la proteína de superficie del merozoito 1 -19kDa *P. falciparum* y las densidades parasitarias de infecciones por sintomática y asintomática.

Variable	Tipo de Enfermedad	Estadísticos				
		Nº Pacientes (n)	Promedio (Mediana)	Dispersión (Rango Intercuartílico)	Coefficiente de Variación (CV)	Estadístico de Contraste (Correlación de Spearman, $\rho$ )
IGM	Sintomática	30	0.088	0.281	106.76%	<b>Rho= 0.546; p= 0.002</b>
	Densidad	30	3724.138	3134.124	127.11%	
	Asintomática	14	0.202	0.513	90.19%	Rho= -0.279; p= 0.333
	Densidad	14	532.02	1709.708	157.65%	
IGG	Sintomática	30	0.370	0.779	89.87%	Rho= -0.012; p= 0.951
	Densidad	30	3724.138	3134.124	127.11%	
	Asintomática	14	0.897	0.216	53.52%	Rho= -0.257; p= 0.374
	Densidad	14	532.02	1709.708	157.65%	