

**Evaluación del perfil de citoquinas de monocitos, Th1 y Treg en malaria complicada por
*Plasmodium vivax***

Catalina Tovar Acero

**Tesis presentada de conformidad con los requisitos para optar por el grado de Doctor en
Medicina Tropical**

**Sistemas de Universidades Estatales del Caribe Colombiano
Doctorado en Medicina Tropical**

2021

**Evaluación del perfil de citoquinas de monocitos, Th1 y Treg en malaria complicada por
*Plasmodium vivax***

Catalina Tovar Acero

**Tesis presentada de conformidad con los requisitos para optar por el grado de Doctor en
Medicina Tropical**

**Directora de tesis
María Fernanda Yasnot Acosta
PhD Ciencias Básicas Biomédicas**

**Sistemas de Universidades Estatales del Caribe Colombiano
Doctorado en Medicina Tropical**

2021

RESUMEN

En el contexto fisiopatológico de las infecciones mediadas por *Plasmodium* se ha documentado que la respuesta mediada por citoquinas proinflamatorias o antiinflamatorias contribuyen a la eliminación del parásito; sin embargo, una respuesta inmunológica exacerbada que puede favorecer el desarrollo de cuadros complicados de la enfermedad. En los últimos años ha sido estudiado el papel de las citoquinas en la patogénesis de la malaria, así como su rol como biomarcadores capaces de pronosticar el desarrollo una complicación en pacientes que padecen esta enfermedad. Disponer de un biomarcador con estas características, es un insumo para generar herramientas diagnósticas que permitan de manera temprana dar un mejor enfoque clínico y terapéutico al paciente, por otra parte, es importante generar información que contribuya al conocimiento de la fisiopatología en las infecciones por *Plasmodium vivax*. Este estudio tuvo como finalidad evaluar del perfil de citoquinas de monocitos, linfocitos Th1 y linfocitos Treg en la malaria complicada por *Plasmodium vivax* en una zona endémica para la enfermedad en el noreste de Colombia. Se vincularon 156 individuos, conformando tres grupos de estudio, pacientes con malaria complicada, malaria no complicada y controles sanos. La trombocitopenia, la hipoglicemia, la disfunción hepática y renal fueron las complicaciones más frecuentes observadas en la malaria por *P. vivax* en la población de estudio. La evaluación de las citoquinas derivadas de los monocitos, Th1 y Treg, permitió identificar que la concentración plasmática de IL-6, IL-10 y IFN- γ marca un perfil diferenciador entre pacientes complicados y no complicados, la concentración aumentada de estas citoquinas mostró correlaciones con manifestaciones complicadas como la trombocitopenia severa, hipoglicemia, alteraciones hepáticas y renales. Adicionalmente, IL-6 mostró potencial para pronosticar el desarrollo de complicaciones en pacientes con infección por *P. vivax*. El TGF- β se postula como una citoquina moduladora de la inflamación en la infección por *P. vivax*, se encontró una mayor concentración de esta citoquina en el grupo control y en pacientes no complicados; sin embargo, las células Treg parecen estar suprimidas en pacientes complicados favoreciendo un ambiente proinflamatorio de citoquinas como IFN- γ e IL-6, que media las complicaciones observadas en los

pacientes. El papel de la IL-10 parece estar asociado al desarrollo de complicaciones en la malaria por *P. vivax*, fue la citoquina con mayor concentración plasmática en pacientes con malaria complicada, y postulamos que la fuente de esta citoquina en el curso de esta infección proviene de fuentes celulares diferentes a Treg. Este es el primer estudio en Colombia que se realiza comparando grupos de pacientes con malaria vivax con diferentes formas clínicas y evalúa el comportamiento de las citoquinas en el curso de las infecciones, estas aproximaciones generan conocimiento de la inmunopatogénesis de este parásito que puede ser explorado en pronóstico de complicaciones o en blancos terapéuticos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Doctora María Fernanda Yasnot, por su papel como directora de tesis, por su apoyo, enseñanzas y dedicación a mi proceso de formación durante estos años.

A mis compañeras María Camila, Dina, Paula y Lorena, por la colaboración que me brindaron estos años en el desarrollo de la tesis.

A la doctora Ana Rodríguez y el doctor Juan Rivera, por recibirme y apoyarme en la ejecución de la pasantía en la Universidad de New York.

A los miembros del Grupo de Investigaciones Microbiológicas y Biomédicas de Córdoba (GIMBIC), por su apoyo en este proceso.

A mis compañeros del Laboratorio de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Sinú, que me ayudaron al final del proceso para que yo tuviera el tiempo para completar este proceso.

A mis amigas Lina y Nubia, que desde la distancia han sido un soporte invaluable para la recarga de ánimo y energía para seguir adelante.

A mi hija, a mi madre, a mi familia por ser el motor de mi fortaleza para culminar este proceso.

DEDICATORIA

A mi hija y a mi madre, por ser el motor de mi vida

TABLA DE CONTENIDO

Lista de tablas-----	10
Lista de figuras -----	11
Difusión del trabajo derivado de esta tesis	13
CAPITULO I-----	16
INTRODUCCIÓN-----	16
1.1 Generalidades de la Malaria-----	16
1.1.1 Epidemiología de la malaria-----	16
1.1.2 <i>Plasmodium</i>-----	17
1.1.3 Ciclo de vida-----	17
1.1.4 Patogenia de la infección por <i>Plasmodium spp</i>-----	19
1.1.5 Respuesta inmune frente a la infección por <i>Plasmodium</i>-----	19
1.1.6 Características de la enfermedad-----	23
1.2 Linfocitos T colaboradores tipo 1 (Th1)-----	27
1.1.7 Perfil de citoquinas de células Th1-----	28
1.3 Linfocitos T reguladores (Treg)-----	30
1.1.8 Perfil de citoquinas de Linfocitos Treg-----	30
1.4 Monocitos-----	32
1.1.9 Perfil de citoquinas de monocitos-----	32
1.5 Biomarcadores-----	34
Bibliografía-----	37
CAPITULO II-----	45
PERFIL EPIDEMIOLÓGICO Y CLÍNICO DE PACIENTES CON MALARIA COMPLICADA Y NO COMPLICADA POR <i>PLASMODIUM VIVAX</i>.	45
2.1 RESUMEN-----	45
2.1.1 Introducción-----	45
2.1.2 Métodos-----	45
2.1.3 Resultado-----	45
2.1.4 Conclusiones-----	46
2.2 INTRODUCCIÓN-----	47
2.3 METODOLOGÍA-----	49
2.3.1 Participantes del estudio, diseño del estudio y colección de datos-----	49
2.3.2 Consideraciones éticas-----	51
2.3.3 Análisis de datos-----	51
2.4 RESULTADOS-----	53
2.4.1 Características sociodemográficas de la población estudiada.-----	53
2.4.2 Características clínicas, hematológicas y bioquímicas de la población estudiada-----	53
2.4.3 Asociación entre variables clínicas de pacientes con malaria complicada y no complicada por <i>P. vivax</i>.-----	58

2.5	Discusión	61
2.6	Conclusiones	67
	Bibliografía	68
	CAPITULO III	72
	efecto de la infección de <i>P. vivax</i> sobre la concentración plasmática de citoquinas de perfil de monocitos, Th1 y treg	72
3.1	RESUMEN	72
3.1.1	introducción	72
3.1.2	Métodos	72
3.1.3	Resultados	72
3.1.4	Conclusiones	73
3.2	INTRODUCCIÓN	74
3.3	MÉTODOS	76
3.3.1	Obtención de plasma	76
3.3.2	Cuantificación plasmática de citoquinas y quimiocinas	76
3.3.3	Análisis de datos	79
3.4	RESULTADOS	81
3.4.1	Concentración plasmática de citoquinas del perfil de monocitos, Th1 y Treg en pacientes con malaria por <i>P. vivax</i>	81
3.4.2	Análisis de correlación de citoquinas del perfil monocitos, Th1 y Treg durante la infección por <i>P. vivax</i>	83
	A)	83
3.4.4	Evaluación de citoquinas como predictores de complicaciones en infecciones por <i>P. vivax</i>	86
3.5	DISCUSIÓN	88
3.6	CONCLUSIONES	92
	Bibliografía	93
	CAPITULO IV	97
	MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DE CITOQUINAS DE LOS PERFILES DE MONOCITOS, TH1 Y TREG EN PACIENTES CON MALARIA COMPLICADA Y NO COMPLICADA.	97
4.1	RESUMEN	97
4.1.1	Introducción	97
4.1.2.	Métodos	97
4.1.3	Resultados	98
4.1.4	Conclusiones	98
4.2	INTRODUCCIÓN	99
4.3	METODOLOGÍA	101
4.3.1	Población del estudio	101
4.3.2	Obtención de células	101
4.3.3	Extracción de RNA	101
4.3.4	Obtención de cDNA	102
4.3.5	Expresión génica por el método comparativo de C_T ($2^{-\Delta\Delta C_T}$)	102

4.3.6 Análisis de datos -----	103
4.4 RESULTADOS-----	105
4.4.1 Expresión de citoquinas de perfil de monocitos, Th1 y Treg en paciente con malaria complicada y no complicada por <i>P. vivax</i> -----	105
4.4.2 Modulación de la expresión génica de citoquinas del perfil de monocitos, Th1 y Treg en la infección por <i>P. vivax</i> -----	106
4.4.2 Análisis de correlación de la expresión génica de citoquinas de perfil de monocitos, Th1 y Treg en pacientes no complicados y complicados con malaria por <i>P. vivax</i> -----	107
4.5 DISCUSIÓN-----	109
4.6 CONCLUSIONES -----	112
Bibliografía -----	113
CAPITULO V.....	115
INFLUENCIA DE LA EXPRESIÓN GENICA Y LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE CITOQUINAS DEL PERFIL DE MONOCITOS, TH1 y TREG EN EL DESENLACE CLÍNICO DE LA MALARIA POR <i>P. VIVAX</i>	115
5.1 RESUMEN -----	115
5.1.1 Introducción-----	115
5.1.2. Métodos-----	115
5.1.3 Resultados-----	115
5.1.4 Conclusiones -----	116
5.2 Introducción -----	117
5.3 Metodología-----	119
5.4 Resultados -----	120
5.4.1 Concentración de citoquinas del perfil de monocitos, Th1 y Treg y su relación con características demográficas-----	120
5.4.2 Correlaciones entre la concentración y expresión de citoquinas del perfil de monocitos, Th1 y Treg con parámetros de laboratorios asociados a malaria complicada. -----	123
5.4.3 Análisis de la concentración de citoquinas con parámetros de laboratorio estratificados en pacientes con malaria complicada por <i>P. vivax</i> -----	126
5.5 discusión-----	128
5.6 conclusiones -----	132
Bibliografía -----	133

Lista de tablas

1.1 Criterios de clasificación de malaria complicada por <i>P. falciparum</i>	25
1.2 Criterios de clasificación de malaria complicada por <i>P. vivax</i> y <i>P. knowlesi</i>	26
1.2. Criterios clínicos y de laboratorio para malaria complicada	27
2.1 Criterios de clasificación para pacientes con Malaria Complicada por <i>P. vivax</i> .	54
2.2 Características demográficas de la población estudiada.	57
2.3 Características clínicas de pacientes con malaria complicada y no complicada por <i>P. vivax</i> .	58
2.4 Perfil hematológico y bioquímico de pacientes con malaria complicada y no complicada por <i>P. vivax</i>	59
2.5 Caracterización clínica de pacientes con malaria complicada.	61
3.1. Concentración de los estándares de la curva de calibración	82
3.2. Sensibilidad de detección de cada analito en el Kit Human Essential Immune Response Panel (13-plex) catalogo No. 740930	82
3.3. Concentración plasmática de citoquinas del perfil Th1 y Treg en pacientes con malaria por <i>P. vivax</i> y grupo control	85
3.4. Concentración plasmática de citoquinas del perfil monocitos, Th1 y Treg en pacientes complicados y no complicados con malaria por <i>P. vivax</i>	86
4.1 Componente de la mezcla de reacción para la cuantificación de la expresión génica de citoquinas.	107
4.2 Correlación de la expresión génica de citoquinas del perfil de monocitos, Th1 y Treg en pacientes no complicados y complicados con malaria por <i>P. vivax</i> .	112

Lista de figuras

1.1 Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i>	19
2.1. Distribución geográfica de casos de malaria complicada y no complicada por <i>P. vivax</i> en la zona de estudio.	53
2.2 Concentración de plaquetas vs número de episodios previos de malaria en pacientes con malaria por <i>P. vivax</i> .	60
2.3 Análisis de la relación de variables epidemiológicas, hematológicas y bioquímicas por grupos de estudio A) Pacientes con malaria no complicada, B) Pacientes con malaria complicada.	63
3.1. Procedimiento para la cuantificación de citoquinas y quimiocinas por perlas magnéticas.	81
3.2. Gráficos de las curvas de estándar para las cuantificaciones de citoquinas y quimiocinas.	83
3.3. Concentración diferencial de IFN γ , IL-6 y IL-10 pacientes con malaria complicada y no complicada con infección por <i>P. vivax</i>	86
3.4. Correlación de citoquinas con la infección por <i>P. vivax</i> .	87 - 88
3.5 Concentración de citoquinas y su relación con episodios previos de la enfermedad	88
3.6. Correlación entre citoquinas de perfil monocitos, Th1 y Treg en malaria complicada y no complicada por <i>P. vivax</i> .	89
3.7. Capacidad de IFN- γ , IL-6, IL-10 como predictores de complicaciones en malaria por <i>P. vivax</i>	90
3.8 Modulación de citoquinas plasmáticas en la infección complicada por <i>P. vivax</i> .	91
4.1 Comparación de la expresión génica de citoquinas del perfil de monocitos, Th1 y Treg en pacientes con malaria complicada y no complicada por <i>P. vivax</i>	109
4.2 Correlación entre la expresión génica de citoquinas del perfil de monocitos, Th1 y Treg y la parasitemia en pacientes con malaria complicada y no complicada por <i>P. vivax</i>	110
5.1 Distribución de la concentración de citoquinas por género.	124
5.2. Distribución de las citoquinas por grupos etarios.	126
5.3 A. Correlaciones entre concentración de citoquinas, expresión génica y variables de laboratorio en pacientes con malaria complicada por <i>P. vivax</i> .	128
5.3 B. Correlaciones entre concentración de citoquinas, expresión génica y variables de laboratorio en pacientes con malaria no complicada por <i>P. vivax</i> .	129
5.4 Concentración de citoquinas y su relación con parámetros de laboratorio en pacientes con malaria complicada con <i>P. vivax</i>	131
6.1. Laminas 1-4 construidas para el rotafolio en las cuales se incluyó información general de los proyectos e información general sobre la enfermedad	144

6.2. Láminas 5-8 construidas para el rotafolio en las cuales se incluyó información acerca de la transmisión de la malaria.	145
6.3 Láminas 9-12 construidas para el rotafolio en las cuales se incluyó información acerca de los síntomas y el diagnóstico de la malaria	146
6.4 Láminas 13-16 construidas para el rotafolio en las cuales se incluyó información acerca del tratamiento de la malaria.	147
6.5 Láminas 17-20 construidas para el rotafolio en las cuales se incluyó información acerca del control de la malaria	148
6.6 Encuesta de conocimientos previos de malaria	149
6.7 Encuesta realizada posterior a la actividad con el rotafolio	151
6.8 Características demográficas de la población estudio. A) Distribución por edad, B) Distribución por edad	152
6.9. Saber previos de estudiantes de básica primaria con respecto a la malaria	153
6.10. Saberes sobre malaria de estudiantes de básica primaria con respecto a la malaria	154

Difusión del trabajo derivado de esta tesis

Rivera-Correa J, Yasnot-Acosta MF, **Tovar NC**, Velasco-Pareja MC, Easton A, et al. (2020) Atypical memory B-cells and autoantibodies correlate with anemia during *Plasmodium vivax* complicated infections. PLOS Neglected Tropical Diseases 14(7): e0008466. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008466>

Tovar-Acero, C., Velasco, M. C., Avilés-Vergara, P. A., Ricardo-Caldera, D. M., Alvis, E. M., Ramirez-Montoya, J., & Acosta, M. F. Y. (Dembic). Liver and kidney dysfunction, hypoglycemia, and thrombocytopenia in *Plasmodium vivax* malaria patients at a Colombian Northwest region. Parasite Epidemiology and Control, 13, e00203. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405673121000040>

Tovar Acero NC, Yasnot Acosta MF. Biomarcadores en malaria complicada. En: Vera Lizcano O, editora científica. *Plasmodium*, Trypanosoma y Salmonella: Marcadores moleculares. Cali, Colombia: Editorial Universidad Santiago de Cali; 2020. p. 61-100. https://www.researchgate.net/publication/349179352_Biomarcadores_en_malaria_complicada

Catalina Tovar-Acero, María Camila Velasco, Paula Andrea Avilés-Vergara, Dina Marcela Ricardo-Caldera, María Fernanda Yasnot. F2_Evaluación de citoquinas proinflamatorias y reguladoras como candidatas a biomarcador pronóstico de complicaciones en pacientes con infección por *Plasmodium vivax*. Grupo Investigaciones microbiológicas y biomédicas de Córdoba, GIMBIC Grupo de Enfermedades Tropicales y Resistencia Bacteriana, Universidad del Sinú, Montería -Colombia. Poster – Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical 2019. Biomédica 2019;39(Supl.4):34-171. <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/download/5318/4441/>

Catalina Tovar Acero, Javier Ramírez-Montoya, María Camila Velasco, Paula Avilés, Dina Ricardo-Caldera, Gustavo Quintero, Myriam Elena Cantero, Juan Rivera-Correa, Ana Rodríguez, María Fernanda Yasnot-Acosta. IL-4, IL-10, CCL2 and TGF- β as potential biomarkers for severe prognosis in *Plasmodium vivax* malaria. En proceso de sometimiento

Abreviaciones

AMA-1	Apical Membrane Antigen 1
Ang-1	Angiopoyatina 1
Ang-2	Angiopoyatina 2
ALT	Alanino aminotransferasa
APCs	Antigen-presenting cells
AST	Aspartato aminotransferasa
CD4 ⁺	Cluster of differentiation antigen 4
CD8 ⁺	Cluster of differentiation antigen 8
CD25 ⁺	Cluster of differentiation antigen 25
CD36	Cluster of Differentiation 36
CCR5 C-C	Quimiocina receptora de tipo 5
cDNA	complementary DNA
CS	Controles Sanos
CSA	Chondroitin Sulfate A protein
CSP	Circumsporozoite CMH Complejo mayor de histocompatibilidad
CXCR3	Chemokine receptor CXCR3
DAMPs	Damage-Associated Molecular Patterns
DCs	Dendritic cells
DNA	Deoxyribonucleic Acid
Foxp3	Forkhead box P3
HSPGs	Heparan sulfate proteoglycans
IFN- γ	Interferon-gamma
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IgG	Inmunoglobulina G
IL	Interleuquina
INS	Instituto Nacional de Salud
IQR	Rango intercuartílicos (del inglés: Interquartile range)
JAKs	Janus kinases
KDa	kilodaltons
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MC	Malaria complicada
MNC	Malaria no complicada
MSP-1	Merozoite Surface Protein-1

NF- κ B	Nuclear factor kappa B (}
NK	Natural Killer
NKT	Natural Killer T
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés polymerase chain reaction)
RQ	cuantificación relativa (<i>en inglés: Relative Quantification</i>)
Pg/ml	Picogramos/mililitro
RNA	Ribonucleic acid
RMP	Revoluciones por minuto
STAT	Signal transducer and activator of transcription proteins
TGF- β 1	Factor de crecimiento transformante β 1
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
Treg	T reguladoras
U/L	Unidades internacionales/Litro

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES DE LA MALARIA

1.1.1 Epidemiología de la malaria

La malaria es uno de los principales problemas de salud alrededor del mundo, esta enfermedad es producida por parásitos pertenecientes al género *Plasmodium*, los cuales son capaces de infectar reptiles, aves y mamíferos. En el ser humano las especies responsables de causar infección son: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi*, los cuales son transmitidos por la picadura de mosquitos hembra pertenecientes al género *Anopheles* (Antinori, 2012).

De acuerdo con la información reportada por la Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS) para el año 2019 se presentaron 229 millones de casos de malaria en el mundo. Aproximadamente el 90% de los casos se encuentran concentrados en África, seguido con el 7% en la Región de Asia sudoriental y 2% en la Región del Mediterráneo oriental. El número de casos atribuidos a *P. vivax* en el mundo equivale alrededor del 3%; sin embargo, en la Región de las Américas es la especie predominante, responsable del 64% de los casos, en Asia sudoriental se le atribuyen el 58%, Mediterráneo oriental 21% y en África el 10% de los casos. Pese a los esfuerzos gubernamentales históricos liderados por la OMS para controlar la malaria, a partir del 2015 se presentó un incremento en el número de casos por *P. vivax* en las Américas principalmente en países como Venezuela Brasil, Colombia, Guyana, Nicaragua y Panamá. Se estima que 2019 sucedieron 409.000 muertes en el mundo por esta parasitosis, el 91% de estos reportes ocurrieron en África; el 51% de estos casos sucedieron en República Democrática del Congo, Burkina Faso e India. En las Américas para el 2018 se calcularon alrededor de 350 muertes, aproximadamente la mitad del año anterior. (OPS/OMS, 2019; WHO, 2020).

En Colombia, la malaria continúa siendo un grave problema de salud pública, en el año 2020 fueron notificados 42.396 casos de malaria no complicada y 702 casos de malaria complicada; el 90,5% de los casos de malaria no complicada procedían de los municipios de Chocó, Nariño, Antioquia, Córdoba, Norte de Santander y Cauca, mientras que casos complicados se

notificaron principalmente en los municipios de Chocó, Nariño, Antioquia y Córdoba; las principales complicaciones reportadas fueron hematológicas (70.1%), hepáticas (16,5%) y el 17,3% reportaron complicaciones renales, pulmonares o cerebrales. Del total de casos a nivel nacional *P. vivax* fue el responsable del 49,8% (38.288) casos, *P. falciparum* del 49,4% (38.017), y un 0,8% (653) fueron infecciones mixtas (*P. falciparum* y *P. vivax*) (INS, 2020).

El departamento de Córdoba hace parte de uno de los tres macrofocos de transmisión activa de malaria en Colombia, junto con la región de Urabá y Bajo Cauca. En los últimos 4 años se ha encontrado dentro de los 5 departamentos con mayor número de notificaciones; en la semana epidemiológica 53 de 2020 registró 6.949 casos, siendo uno de los 4 departamentos en situación de alerta para malaria en el país para ese año, atribuido a la situación de brote que se registra para el municipio de Tierralta. En el departamento el 84 % de los casos son causados por *P. vivax* (INS, 2020).

1.1.2 Plasmodium

La malaria es causada por parásitos intracelulares obligados que pertenecen al phylum Apicomplexa, orden Haemosporidia y género *Plasmodium*. Cerca de 200 especies del género *Plasmodium* han sido descritas, e infectan diversos hospederos. Todos los miembros de este phylum se caracterizan por un conjunto de organelos ubicados en el extremo apical (roptrias, micronemas y gránulos densos), los cuales son fundamentales durante el proceso de adherencia, reorientación e invasión de los parásitos al eritrocito (A. F. Cowman, Berry, & Baum, 2012). Actualmente, las especies asociadas a cuadros clínicos en humanos son *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium knowlesi* y *Plasmodium simium* (Antinori, 2012).

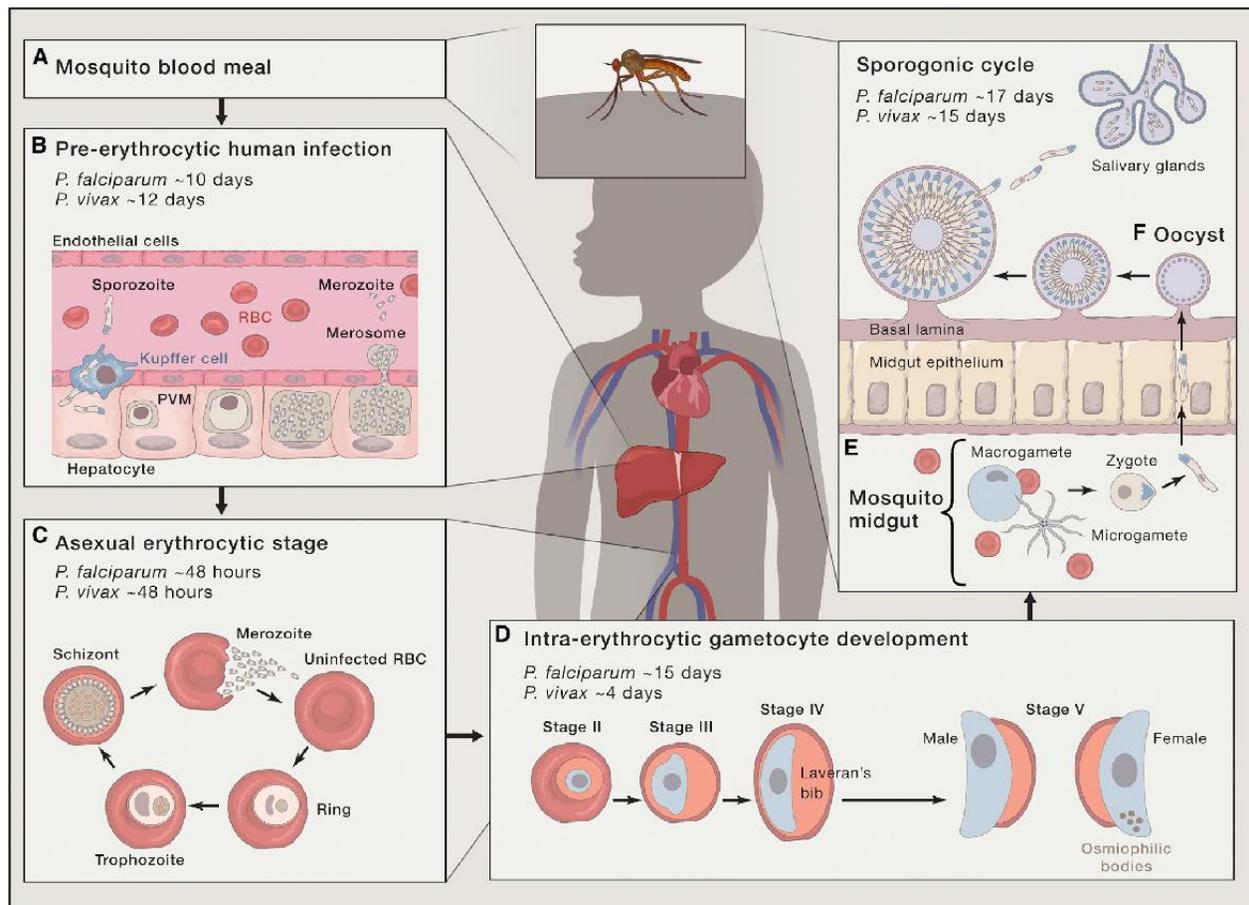
1.1.3 Ciclo de vida

El ciclo de vida de este parásito involucra dos hospederos uno vertebrado (humano) y otro invertebrado (vectores del género *Anopheles*). En el humano se desarrolla el ciclo esquizogónico que se divide en dos fases, una hepática (o pre-ereitrocítica) y otra eritrocítica; la primera inicia en el momento en que los esporozoítos son depositados en el torrente sanguíneo por el vector, quienes en poco tiempo invaden células hepáticas que tras diferentes estadios y por un proceso de reproducción asexual permite la generación de merozoítos, forma

responsable del proceso de invasión a células eritrocitarias, resultando en la fase eritrocítica que mantiene en circulación las formas parasitarias intracelulares y precede a la generación de formas presexuales del parásito (microgameto y macrogameto). El tiempo estimado del ciclo eritrocitario depende de la especie que parasita y oscila entre 48 a 72 horas (Alan F. Cowman, 2016) (Figura 1.1).

Los insectos vectores de esta parasitosis pertenecen al género *Anopheles*. La ingestión de las formas presexuales del parásito, se desarrolla en ellos el ciclo esporogónico, que por un proceso de reproducción sexual da origen a los esporozoítos, formas que se albergan en las glándulas salivares hasta ser liberados en el torrente sanguíneo de un hospedero humano (Ashley, 2018).

Figura 1.1 Ciclo de vida de *Plasmodium*



Tomado de: (Alan F. Cowman, 2016)

1.1.4 Patogenia de la infección por *Plasmodium spp*

Los signos y síntomas clínicos en la malaria, o paludismo, son la expresión del daño ocasionado en diversos órganos y sistemas, estos se exacerban durante el período de multiplicación del parásito en el eritrocito, mientras que el estadio hepático y la presencia de gametocitos tradicionalmente no se han asociado con la sintomatología. La malaria causa lesiones estructurales, alteraciones funcionales y metabólicas, cuya presentación clínica está en función factores asociados al hospedero como la edad, el estado inmunitario y características genéticas, y factores relacionados con el parásito como la especie, el genotipo y la virulencia (B. B. Andrade & Barral-Netto, 2011).

Diferentes estudios han demostrado que uno de los principales mecanismos patogénicos son las alteraciones estructurales y funcionales de las células eritrocitarias, dentro de las cuales se destaca la destrucción, aumento en la citoadherencia y el secuestro de glóbulos rojos parasitados que generan obstrucciones en el endotelio capilar de diferentes órganos como el cerebro, pulmón, corazón, intestino, médula ósea y riñón; los receptores del hospedero humano más estudiados y de quienes se ha dilucidado su participación en este proceso son CD36 (*Cluster of Differentiation 36*) y la molécula 1 de adhesión intercelular (*Intercellular Adhesion Molecule 1, ICAM-1*) en el endotelio y el sulfato A de condroitina (*Chondroitin Sulfate A, CSA*) en la placenta. Los glóbulos rojos parasitados tienen la capacidad de desencadenar una respuesta inflamatoria, que conlleva a la producción de diferentes moléculas tipo citoquinas, quimiocinas y moléculas de adhesión endotelial, respuesta inflamatoria en principio permite la remoción de parásitos y el control de la infección, pero su cronicidad o producción desequilibrada se ha asociado a complicaciones cerebrales, y alteración en otros órganos como hígado, riñón y pulmones (Vásquez & Tobón, 2012).

1.1.5 Respuesta inmune frente a la infección por *Plasmodium*

La respuesta inmunológica que se desencadena frente a una infección por *Plasmodium* es el resultado de una interacción multifactorial, cuya complejidad tiene relación con los estadios del parásito, la alta variación antigénica y la respuesta inmunológica (B. B. Andrade & Barral-Netto, 2011).

La respuesta inmune frente a *Plasmodium* comienza en una fase temprana de la infección por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs del inglés *Pathogen-Associated Molecular Patterns*), para este caso componentes derivados del parásito como la hemozoína, el glicofosfatidil inositol, ADN o RNA; algunos detectados tempranamente con la capacidad de activar la respuesta inmune innata por la interacción con receptores tipo Toll (TLRs del inglés *Toll-like receptor*) o receptores de manosa presentes en macrófagos, células dendríticas, células asesinas (NK del inglés Natural killer) y NKT (Natural Killer T) que secretan citoquinas proinflamatorias tipo TNF, IL-1 β e IFN tipo I, entre otras (Gazzinelli, Kalantari, Fitzgerald, & Golenbock, 2014; Hafalla, Silvie, & Matuschewski, 2011; Krishnegowda et al., 2005). Así mismo, patrones moleculares asociados al daño (DAMPs del Inglés *Damage-Associated Molecular Patterns*) como la circulación de DNA en cantidades elevadas, cristales de urato, microvesículas y el grupo hemo, que son moléculas derivadas del hospedero liberadas durante el proceso infeccioso, tienen la capacidad de estimular células del sistema inmune innato a través del contacto con receptores tipo Toll y desencadenar una respuesta de citoquinas proinflamatorias (Gazzinelli et al., 2014).

Por otro lado, los esporozoítos depositados por el vector en la dermis, pueden permanecer por un tiempo en el sitio de inoculación en constante movimiento, algunos se desplazan por circulación hacia células hepáticas, mientras que otros son arrastrados hacia los ganglios linfáticos más próximos donde pueden ser degradados por células dendríticas (DCs del inglés *Dendritic cells*) residentes; estudios experimentales en ratones han mostrado que en un tiempo alrededor de 12 horas estas DCs pueden presentar antígenos específicos del esporozoíto a linfocitos CD8⁺; los que una vez activados realizan su acción efectora en el hígado favoreciendo la remoción de hepatocitos infectados (Amino et al., 2006; Cockburn & Zavala, 2016); ; sin embargo, en modelos de ratones C57BL/6 infectados con *P. berghei*, se ha descrito que los linfocitos T CD8⁺ se acumulan en el cerebro estimulados por el IFN- γ secretado por linfocitos T CD4⁺, lo cual puede favorecer el desarrollo de malaria cerebral (Shaw et al., 2015; Villegas-Mendez et al., 2012).

Los esporozoítos logran cruzar el espacio sinusoidal y llegar a los hepatocitos por el proceso de transmigración celular, durante este recorrido los esporozoítos entran en contacto con las células de Kupffer, que secretan proteoglicanos de heparán sulfato (HSPGs, del inglés *heparan sulfate proteoglycans*) que se une a la proteína circumsporozoito (CSP del inglés *circumsporozoite protein*), interacción que podría resultar en la remoción de algunos parásitos por este tipo de células (Baer et al., 2007; Zheng, Tan, & Xu, 2014). Durante la invasión a los

hepatocitos, el parásito induce la expresión de genes que codifican para IFN tipo I, mecanismo que atrae células NK y NKT, que secretan IFN γ , óxido nítrico y otros componentes tóxicos, esta respuesta inmune innata parece interferir en el desarrollo del ciclo hepático del parásito y contribuir en la inhibición del ciclo eritrocítico (Miller, Sack, Baldwin, Vaughan, & Kappe, 2014).

Pese a la respuesta inmune que se desencadena frente las formas pre-eritrocíticas del parásito, parece no ser suficiente para controlar y eliminar la carga parasitaria dentro del hospedador resultando en la continuidad del ciclo hacia la fase eritrocítica. La respuesta frente a los estadios sanguíneos del parásito implica mecanismos de la respuesta inmune adaptativa humoral y celular. Evidencias experimentales indican que los glóbulos rojos infectados son reconocidos por células dendríticas esplénicas, quienes realizan presentación a linfocitos CD4+, con la posterior liberación de IL-12, IFN- γ , TNF, IL-21 (Osii, Otto, Garside, Ndungu, & Brewer, 2020). IFN y TNF están involucrados en la inducción de la producción de especies reactivas de nitrógeno y del oxígeno contribuyendo a la reducción de la parasitemia; adicionalmente, el IFN- γ lidera otras funciones como la activación de macrófagos y células dendríticas, producción de IL-12 que favorece la diferenciación de la subpoblación Th1 y el cambio de isotipo en los linfocitos B con llevando a su activación (McCall & Sauerwein, 2010). El IFN- γ puede ser secretado por otras células del sistema inmunológico entre ellas NK, que estimulan la acción efectora de CD4+ y la subpoblación Th1, y la subsecuente producción de IFN- γ e IL-2 entre otras citoquinas (Gazzinelli et al., 2014). La liberación de citoquinas por las células efectoras resulta en una cascada de reacciones sinérgicas entre la respuesta adaptativa y celular ampliando la respuesta inmune para controlar el proceso infeccioso. Si bien, existen evidencias del papel fundamental del IFN- γ en el control de la infección por *Plasmodium*, también ha sido documentado su relación con el desarrollo de complicaciones como la malaria cerebral (Nasr, Allam, Hamid, & Al-Ghamdi, 2014; Villegas-Mendez et al., 2012).

La activación de las células plasmáticas permite una respuesta específica a través de anticuerpos específicos contra proteínas del parásito, por una parte, los anticuerpos permiten la opsonización de las células infectadas y de estadios sanguíneos del parásito potenciando su fagocitosis, estimulan una respuesta nociva mediada por complemento y previenen la invasión de glóbulos rojos por bloqueo de los sitios de unión (Marsh & Kinyanjui, 2006). ; sin embargo, en respuesta a la interacción de las células opsonizadas y células efectoras se produce TNF que puede causar lesiones tóxicas contra los parásitos, pero también alteraciones tisulares en el individuo; concentraciones aumentadas de TNF han sido

documentadas en pacientes y modelos experimentales que presentan cuadros de malaria complicada (Dunst, Kamena, & Matuschewski, 2017a). En la respuesta humoral se ha documentado la producción contra diferentes proteínas del parásito, por ejemplo, anticuerpos contra la proteína del circunsporozoíto en animales experimentales son capaces de proteger al hospedero del desarrollo del ciclo eritrocito (Dups, Pepper, & Cockburn, 2014). Por otra parte, el papel efector de los linfocitos Thc1 a través de la IL-12 estimula el cambio de isotipo de IgG2c relacionado con la producción de anticuerpos contra proteínas del merozoíto como las proteínas de superficie del merozoíto (MSP-1 del inglés Merozoite Surface Protein-1) (Su & Stevenson, 2002) o el antígeno apical de membrana (AMA-1 del inglés Apical Membrane Antigen 1) (Polley et al., 2004), estudios *in vivo* en ratones y monos, junto con la evidencia de circulación de estos anticuerpos en humanos, indican que estas inmunoglobulinas pueden tener un papel protector frente a la invasión de glóbulos rojos por el parásito (Yazdani, Mukherjee, Chauhan, & Chitnis, 2006).

Algunas evidencias sugieren que residentes de zonas endémicas que habitan estos lugares durante años y con exposición repetida al contacto con el parásito, pueden desarrollar una inmunidad protectora a través de anticuerpos contra proteínas del circunsporozoíto y proteínas de membrana del merozoíto, que si bien no protegen de padecer nuevas infecciones por *Plasmodium*, son personas que resultan con infecciones con bajas parasitemias, cursos asintomáticos y poca evolución hacia cuadros complicados (Offeddu, Thathy, Marsh, & Matuschewski, 2012; Riley & Stewart, 2013).

1.1.6 Características de la enfermedad

1.1.6.1 Malaria no complicada

El periodo de incubación varía de acuerdo con diversos factores como la especie del parásito, la vía de transmisión y factores inherentes al hospedero como la respuesta inmunológica y la edad, factores que en conjunto influyen en la presentación clínica de la enfermedad. Los primeros síntomas son inespecíficos propios de un síndrome febril agudo como malestar general, dolor de cabeza, mialgias, mareos, náuseas, vómito, sudoración y fiebre; esta última puede presentarse de forma irregular, alternando con episodios de sudoración y escalofríos (WHO, 2015).

1.1.6.2 Malaria complicada

La malaria complicada es un problema de interés en salud pública para los países en vía de desarrollo, siendo responsable de hasta 3 millones de muertes al año y altos costos para el sistema de salud (Naing, Whittaker, Nyunt Wai, & Mak, 2014). En la India las infecciones por *P. vivax* se asocian con cuadros complicados representan aproximadamente el 23,9% de los casos, encontrando manifestaciones como malaria cerebral, daño renal, anemia severa y daño hepático, y que aproximadamente el 32% de estas personas fallecen (Rishikesh Kumar & Saravu, 2017).

La OMS define malaria complicada como la presencia en sangre de formas asexuadas de *P. falciparum*, acompañada de hallazgos clínicos o de laboratorio que no sean explicados por otra causa; sin embargo la malaria complicada también puede ser causada por *Plasmodium vivax*, recientemente se han reportado complicaciones y muertes asociadas a *Plasmodium knowlesi* (Cox-Singh *et al.*, 2010) (Ver tabla 1.1 y 1.2); las manifestaciones complicadas incluyen anemia grave, malaria cerebral, síndrome de dificultad respiratoria aguda, falla renal e insuficiencia hepática. (WHO, 2015)

En la patogenia de la malaria complicada por *P. falciparum* se han estudiado ampliamente los mecanismos implicados en la malaria cerebral y la anemia grave, síndromes que pueden explicarse a partir de dos mecanismos fundamentales: la obstrucción vascular causada por glóbulos rojos parasitados y la destrucción de eritrocitos; la interacción entre los eritrocitos parasitados y el endotelio conlleva a un proceso de activación y estrés endotelial que amplifica la respuesta inflamatoria, la cual contribuye a la lesión de órganos como el cerebro, el pulmón, el riñón y el hígado, y conducen a un compromiso multisistémico (Andrade & al", 2011). En el

caso de *P. vivax* hasta el momento no se conocen claramente los mecanismos fisiopatológicos relacionados con las manifestaciones clínicas graves, se cree que existe una relación estrecha con la respuesta inmunitaria del huésped, que media un proceso proinflamatorio, mayor que lo observado en infecciones por *P. falciparum*, (Anstey, Russell, Yeo, & Price, 2009), se ha propuesto también que existe una diseritropoyesis relacionada con la actividad de citoquinas proceso que explicaría la fragilidad celular observada en eritrocitos parasitados y no parasitados contribuyendo a la anemia (Wickramasinghe, Looareesuwan, Nagachinta, & White, 1989), en los estudios de síndrome de distrés respiratorio agudo por esta especie se documenta una posible relación entre el incremento de las citoquinas y el deterioro progresivo de la función alveolar (Tan, Yacoub, Scott, Bhagani, & Jacobs, 2008), por otra parte, se ha encontrado una mayor prevalencia de trombocitopenia severa con algunos desordenes de coagulación en pacientes con infecciones por esta especie (Oliveira-Ferreira et al., 2010).

La fisiopatología de malaria grave por *P. Knowlesi* es menos conocida, y se sugiere que la hiperparasitemia, el secuestro y la adhesión endotelial de glóbulos rojos parasitados están involucrados en este desenlace clínico; sin embargo, se requiere de estudios más detallados (Cox-Singh et al., 2010)

Tabla 3.1 Criterios de clasificación de malaria complicada por *P. falciparum*

<ul style="list-style-type: none"> • Alteración de la conciencia: escala de coma de Glasgow < a 11 para adultos o escala de coma Blantyre < de 3 para niños • Postración: Debilidad generalizada que le impide a una persona sentarse, pararse o caminar sin asistencia. • Convulsiones múltiples: más de dos episodios en 24 horas • Acidosis: un déficit de base > 8 mEq/L o, si este parámetro no es viable, nivel plasmático de bicarbonato < 15 mmol/L o lactato > 5 mmol/l. Acidosis metabólica manifiesta como distrés respiratorio (Respiración profunda, dificultad respiratoria). • Hipoglicemia (glucosa en sangre < 40 mg/dl) • Anemia severa: concentración de hemoglobina ≤ 5 g/dL o un hematocrito ≤ 15% en niños < de 12 años (<7 g/dL y 20% respectivamente en adultos) con un conteo de parásitos > 10.000/μl. • Falla renal: creatinina sérica > 3 mg/dL, con un conteo de parásitos >100.000/μl. • Edema pulmonar: Radiológicamente confirmado o saturación de oxígeno < 92% con el aire del ambiente con una tasa respiratoria > 30/minutos, a menudo con tiraje en el pecho y crepitaciones en la auscultación. • Sangrado significativo: incluye sangrado recurrente o prolongado de la nariz, encías o sitios de venopunción, hematemesis o melenas. • Choque: choque compensado se define como relleno capilar ≥ 3 segundos o gradiente de temperatura en la pierna (extremidad media a proximal), pero no hipotensión. El shock descompensación se define como presión arterial sistólica en niños de < 70 mm Hg y < 80 mm

Hg en adultos, con evidencia de perfusión alterada (extremidades frías o llenado capilar prolongado).

- Hiperparasitemia: Densidad de parásitos > 4% (~ 200.000/μl). En pacientes con *P. falciparum* densidades > 10% de glóbulos rojos parasitados.

Tomado de: Guidelines for the treatment of malaria 3RD Edition. (WHO, 2015)

Tabla 1.4 Criterios de clasificación de malaria complicada por *P. vivax* y *P. knowlesi*

- La malaria severa por *P. vivax* se define bajo los mismos parámetros de malaria severa por *P. falciparum*, pero con niveles de parasitemia diferentes.
- La malaria severa por *P. knowlesi* se define bajo los mismos parámetros de malaria severa por *P. falciparum*, pero con dos diferencias.
- *P. knowlesi* hiperparasitemia: densidad de parásitos > 100.000/μl
- Presencia de ictericia y densidad parasitaria > 20.000/μl

Tomado de: Guidelines for the treatment of malaria 3RD Edition. (WHO, 2015)

En los últimos años, algunos autores han sugerido que los parámetros de severidad establecidos por la OMS requieren un reajuste basado en las modificaciones epidemiológicas de la enfermedad, debido a que algunos de los parámetros tienen una débil relación con el desenlace fatal (Sypniewska et al., 2017). En el caso de Colombia el Ministerio de la Protección Social y el Instituto Nacional de Salud de acuerdo con las condiciones epidemiológicas del país realizó un ajuste de algunos criterios de complicación para los pacientes que padecen malaria, los cuales presentan variaciones en los valores de referencia de algunos parámetros de laboratorio (Ver tabla 1.3) (INS, 2010a).

Tabla 1.5. Criterios clínicos y de laboratorio para malaria complicada

Criterio de gravedad	Criterios OMS (1)	Criterios sugeridos con base en experiencias nacionales (2)
Malaria cerebral	Coma (Glasgow<10, Blantyre <3) Convulsiones generalizadas (2 ó 1 en 24 h)	Coma (Glasgow<10, Blantyre <3) Convulsiones (al menos 1 en 24 H)
Hemoglobinuria	Orina roja oscura o negra con prueba de orina positiva para hemoglobina y mioglobina	
Complicación renal	< 12ml/kg en 24 h niños, con creatinina elevada para la edad Creatinina sérica >3 mg/dl con eliminación urinaria <400 ml en 24h	Creatinina> 1.5 mg/dL BUN >20mg%
Complicación hepática	No está definida. Ictericia clínica bilirrubina >3 mg/Dl. Aminotransferasas 3 veces encima del valor normal	Bilirrubina total > 1.5 mg/dL Transaminasas >40 U.I.
Complicación pulmonar	Edema pulmonar agudo dx con RX y SDRA	Taquipnea o Disnea, con evidencia por RX de SDRA o edema pulmonar: infiltrado alveolar bilateral, infiltrado Perihiliar, infiltrado o edema intersticial, edema generalizado
Acidosis metabólica	Bicarbonato plasmático <15 mmol/L Exceso de bases >-10 Acidemia: Ph arterial <7.35 Lactato >5 mmol/L	Bicarbonato plasmático <15 mmol/L Exceso de bases >-10 Acidemia: Ph arterial <7.35 Lactato >5 mmol/L
Shock: T.A. sistólica en decúbito supino y signos asociados	< 80mm Hg adultos <50mm Hg niños	< 80mm Hg adultos <50mm Hg niños
Anemia grave: hemoglobina	< 5 gr/dl	Hemoglobina < 7 grs/dl
Trombocitopenia grave: recuento de plaquetas	<20.000 plaquetas/ μ l	<50.000 plaquetas/ μ l
Hipoglicemia: glicemia	< 40 mg/dl	Glicemia < 60 mg/dl;
Hiperpirexia	>39-40° C	
Hiperparasitemia	>5% grp en baja endemia	

Tomado de: Instituto Nacional de Salud. Guía para Atención Clínica Integral del paciente con malaria. 2010 (INS, 2010b)

1.2 LINFOCITOS T COLABORADORES TIPO 1 (TH1)

Los linfocitos CD4⁺ son una subpoblación celular de linfocitos restringidos al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II. La diferenciación de células CD4⁺ hacia la subpoblación celular CD4⁺ Th1, esta mediada por diferentes factores entre los que se consideran las características del antígeno, la presencia de señales coestimuladoras de las células presentadores de antígeno (*del inglés*: Antigen-presenting cells (APCs)), y señales recibidas por citoquinas; principalmente la IL-12 y el IFN- γ . La liberación de IL-12 por macrófagos o células dendríticas activas, induce sobre los linfocitos CD4⁺ el estímulo para la producción de IFN- γ por la vía de señalización STAT4, que induce directamente la producción de IFN- γ y la expresión del IL-12R β , a su vez el IFN- γ promueve la diferenciación de las células Th1 por la activación del transductor de señal y el activador de la transcripción 1 (STAT1); STAT1 regula la expresión del factor de transcripción T-bet, un factor fundamental que actúa sobre el promotor del gen IFN- γ . Th1 (Carty, Riese, & Koretzky, 2018).

Dentro de las funciones de las células Th1 se relaciona la erradicación de patógenos (bacterias, hongos y protozoos) y tumores intracelulares, a través de la activación efectora potente de macrófagos, células NK y células T CD8⁺, estimulan el cambio de clase de inmunoglobulina en las células B para la síntesis de inmunoglobulina G2a (IgG2a). Las células Th1 contribuyen a la eliminación de virus, toda vez que el IFN- γ y TNF secretado por estas células, activa las células T citotóxicas CD8⁺. Recientemente se ha descrito un subgrupo de células Th1 denominadas como células Th1 no clásicas, que se originan a partir de células Th17 en focos inflamatorios, bajo la acción de citoquinas como IL-12, IL-1 y TNF, al parecer con un rol importante en procesos inflamatorios crónicos (Annunziato & Romagnani, 2016).

Citoquinas

Las citoquinas son proteínas o glicoproteínas de aproximadamente 30 KDa, estas son producidas en respuesta a un estímulo como un trauma o una infección; median interacciones complejas entre una diversidad de células, dentro de las funciones de la citoquinas se destaca su papel en la defensa contra infecciones, en la regulación de la inmunidad, comunicación entre células, migración de celular, regulación del crecimiento y desarrollo del tejidos embrionarios, Una vez son secretadas las citoquinas pueden desencadenar su efecto por una actividad autocrina, endocrina o paracrina (J.-M. Zhang & An, 2007).

La señalización que induce la síntesis de una citoquina tiene lugar por dos vías principalmente JAK-STAT y NF- κ B; cuando un ligando de citoquina se une a un receptor de la vía JAK-STAT, el receptor se dimeriza lo que conduce a la fosforilación de los residuos de tirosina por parte de las Janus quinasas (JAK), favoreciendo la aparición de sitios de unión SH2 para las proteínas STAT (*del inglés: Signal Transducer and Activator of Transcription*), estas proteínas son activadas por fosforilación, forman un dímero que se transloca al núcleo, allí se unen a elementos promotores del A que inducen la transcripción génica (Dembic, 2015a).

Existen alrededor de 45 citoquinas de acuerdo a su actividad funcional pueden ser clasificadas en citoquinas del tipo I, citoquinas del tipo II, citoquinas de la superfamilia del TNF, citoquinas de la familia de la IL-1 y otras citoquinas (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2015)

1.1.7 Perfil de citoquinas de células Th1

Las células Th1 se caracterizan por secreción de citoquinas como IFN γ , IL-2, IL-12, linfotaxina, TNF- β y α , y la expresión de receptores CCR5 and CXCR3 para las quimiocinas (Raphael, Nalawade, Eagar, & Forsthuber, 2015; Romagnani, 2014).

1.1.7.1 Interferón- γ (IFN- γ)

Es una proteína compuesta por dos cadenas polipeptídicas asociadas de forma antiparalela con un peso de 34 kDa. Los principales productores de IFN- γ incluyen células T, células NK, células NKT, APC profesionales como macrófagos, células dendríticas (DC) y células B. El receptor para el IFN- γ está formado por una subunidad α y β , la unión de la molécula con su receptor activa a JAK1 y JAK2, que a su vez activan al factor STAT1 y la posterior activación del factor de transcripción T-bet (Kak, Raza, & Tiwari, 2018).

El IFN- γ es una citoquina con funciones antivirales, antitumorales e inmunomoduladoras, participa en la respuesta inmunitaria innata y adaptativa. Una de sus principales funciones es la activación de los macrófagos, donde induce la síntesis de mediadores inflamatorios, especies reactivas del oxígeno y nitrógeno. Esta citoquina aumenta la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) para facilitar la presentación antigénica. (Griffin, 2008). El IFN- γ activa las células NK, estimulando su actividad antitumoral, junto a la granzima B y la perforina juega un papel citotóxico en el cual inician la apoptosis de las células tumorales, y permiten la síntesis de moléculas inhibitoras de puntos de control (Jorgovanovic, Song, Wang, & Zhang, 2020). Esta citoquina facilita el crecimiento y maduración de diferentes células y la migración de leucocitos (Kak et al., 2018).

1.1.7.2 Interleuquina 2 (IL-2)

La IL-2 humana está formada por 133 aminoácidos que forma cuatro hélices α , es secretada por linfocitos Th1 y células CD8+, y por algunas células dendríticas en presencia de IL-15. El receptor de la IL-2 está conformado por tres subunidades, que se puede encontrar en la superficie de linfocitos T, B, NK, en algunos macrófagos, monocitos y neutrófilos de manera temporal o permanente (Dembic, 2015b).

Esta citoquina tiene un papel inmunoregulador, es necesaria para la supervivencia y las funciones supresoras de las células T Foxp3 +, la ausencia de IL-2 o señalización por su receptor, produce una deficiencia numérica y/o funcional de células Treg, y lo cual está asociada al desarrollo de autoinmunidad. (Ross & Cantrell, 2018). Participa estimulando la proliferación y diferenciación de las células T, células NK, células linfoides innatas. Sobre las células B la IL-2 estimula la secreción de IgM, y sobre macrófagos estimula la producción de TGF- β (Abbas, Trotta, Simeonov, Marson, & Bluestone, 2018).

1.1.7.3 Factor de necrosis tumoral α (*del inglés: Tumor necrosis factor - TNF- α*)

El TNF- α humano es una proteína conformada por 233 aminoácidos y un peso molecular de 27 kDa, es producida por células del linaje monocito como macrófagos, astroglia, microglía, células de Langerhans, células de Kupper y macrófagos alveolares principalmente, pero también es secretada por linfocitos y células endoteliales. Su acción se ejerce a través de la interacción con los receptores 1 y 2 de TNF, el primero expresado en tejidos mamíferos y el segundo en células del sistema inmunológico, dependiendo de la unión a un receptor particular esta interacción media la activación intracelular de diferentes vías, entre ellas: señalización NF- κ B, señalización MAPK / C-Jun y señalización caspasa / apoptótica, activación de PI3K / Akt y rutas proangiogénicas; efectos posteriores, que incluyen apoptosis, activación celular, supervivencia y proliferación (Calzascia et al., 2007; Parameswaran & Patial, 2010; Urschel & Cicha, 2015).

Esta citoquina potencia la activación de linfocitos T y B, macrófagos, células NK y células presentadores de antígeno, favorece el reclutamiento de linfocitos y neutrófilos, así como el reconocimiento de antígeno; en los tejidos estimula la remodelación y recuperación, tiene la capacidad de desencadenar la producción de prostaglandinas por lo que es considerado uno de los principales pirógenos, promueve la liberación de las proteínas de la fase de inflamación aguda (Silva et al., 2019).

1.3 LINFOCITOS T REGULADORES (TREG)

Esta subpoblación celular hace parte de linfocitos T, se caracteriza por la expresión del factor de transcripción Foxp3, y los receptores de membrana CD25+ y CD4+, estas células se pueden generar en el timo o en la periferia, complementario a la señalización de TCR se requiere del factor regulador de interferón 4 (IRF4) y Blimp1 para inducir su función efectora (Wei et al., 2017); con una función principalmente supresora, dentro de los cuales se describen mecanismos que conllevan a la producción de citoquinas antiinflamatorias, expresión de receptores inhibidores y la privación de citoquinas, que contribuyen al mantenimiento de la autotolerancia inmunológica (Guzmán Flores & Portales Pérez, 2013; Hori, 2014). Otras funciones asociadas a las Tregs es la destrucción directa de otras células por la secreción de perforina y granzima, y la síntesis y liberación de adenosina fosfato cíclico para interferir con el metabolismo de otras células (C. Li, Jiang, Wei, Xu, & Wang, 2020).

Las células Treg son fundamentales en la prevención de enfermedades autoinmunes, como la diabetes tipo 1 y en el control de enfermedades inflamatorias crónicas, como el asma y la enfermedad inflamatoria intestinal, ; sin embargo, puede bloquear mecanismos que contribuyen a la esterilización de patógenos y que limitan la inmunidad antitumoral (Vignali, Collison, & Workman, 2008).

1.1.8 PERFIL DE CITOQUINAS DE LINFOCITOS TREG

La subpoblación celular de linfocitos Treg se caracteriza por la secreción de IL-10, TGF- β y IL-35 (Wei et al., 2017).

1.1.8.1 Interleuquina 10 (IL-10)

La IL-10 es un polipéptido de 18 kDa, es producida por linfocitos Th2, linfocitos Treg, Th17, células CD4+, CD8+, células B, mastocitos, macrófagos y algunas células dendríticas, en la actualidad se acepta que la IL-10 puede ser secretada por diferentes tipos de células del sistema inmune innato y adaptativo (Mosser & Zhang, 2008; Saraiva & O'garra, 2010).

La señalización intracelular que deriva de la unión de la IL-10 y su receptor dimérico generan cambios en la señalización de la vía JAK/STAT, conduciendo a la interrupción de funciones efectoras en diferentes células, por ejemplo en macrófagos suprimen la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II y de coestimuladores involucrados en la presentación antígenos como CD80 y CD86 expresados en la membrana, inhibe la producción

de especies reactivas del nitrógeno y oxígeno, inhibe la diferenciación y maduración de células dendríticas, la acción que ejerce la IL-10 sobre macrófagos y células dendríticas resulta en una potente inhibición de la presentación antigénica (Cyktor & Turner, 2011; Mosser & Zhang, 2008). La IL-10 tiene la capacidad de inhibir la producción de citoquinas de las células Th1, NK y macrófago, suprime la función de algunas quimiocinas inflamatorias. Por otra parte, tiene un efecto inhibitorio de la subpoblación células Th17 y Th2, y promueve la sobrevivencia de las células Treg. ; sin embargo, esta citoquina puede desencadenar efectos estimulantes, sobre las células B favorece la proliferación y diferenciación, al igual que en las NK y en la producción de algunas citoquinas (Mosser & Zhang, 2008) . La producción alterada de esta citoquina, aumento o disminución ha sido relacionado con enfermedades crónicas o manifestaciones complicadas (Ouyang & O'Garra, 2019).

1.1.8.2 Factor de crecimiento transformante β (del inglés transforming growth factor - TGF- β 1)

La TGF- β 1 es una de las tres isoformas del TGF- β , es su forma inactiva es un homodímero de 25 kDa (Yoshinaga et al., 2008), es secretada en estado latente y requiere de activadores, que pueden ser proteasas, trombospondina-1, integrinas y especies reactivas del oxígeno, y es la más abundante de las tres isoformas (Horiguchi, Ota, & Rifkin, 2012). Es producida por macrófagos, linfocitos principalmente Treg, células endoteliales, plaquetas y células estromales (M. O. Li & Flavell, 2008).

Su principal función es ejercer una acción antiinflamatoria e inmunosupresora. En macrófagos y monocitos inhibe la proliferación celular, e interfiere en la producción de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno. Esta citoquina media la regulación de factores de crecimiento intracelulares que intervienen en la diferenciación celular, puede modular la expresión de citoquinas en monocitos, es quimioatrayente de neutrófilos, monocitos y fibroblastos. En estudios in vitro, ha mostrado un efecto para estimular la producción de IgA, inhibir la secreción de inmunoglobulinas como la IgM e IgG, e inhibir la proliferación de diferentes tipos de células como linfocitos, células endoteliales, hepatocitos, queratinocitos y algunas células malignas (Peralta-Zaragoza, Lagunas-Martínez, & Madrid-Marina, 2001) Induce la diferenciación de la subpoblación Th17, su principal función está relacionada con la tolerancia inmunológica (Oh & Li, 2013).

El papel del TGF- β 1 como biomarcador en diferentes tipos de cáncer ha sido evaluado, sin embargo su comportamiento es diferente, en algunos en el cáncer de ovario la expresión baja

de esta citoquina se relaciona con un mejor pronóstico, en cáncer urogenital la concentración de esta citoquinas es directamente relacionado con fenotipos agresivos de la enfermedad (Kubiczkova, Sedlarikova, Hajek, & Sevcikova, 2012).

1.4 MONOCITOS

Los monocitos son células derivadas de la médula ósea, hacen parte de las células de la respuesta inmune innata y desempeñan un papel importante en la regulación de la homeostasis celular, especialmente frente a procesos asociados con la infección e inflamación. Representan aproximadamente el 5% de las células nucleadas circulantes en la sangre de una persona adulta con buen estado de salud; su vida media oscila entre uno a tres días (Espinoza & Emmady, 2020).

Estas células son de naturaleza heterogénea y exhiben una alta plasticidad. Los monocitos han sido clasificados en tres subconjuntos de acuerdo con la expresión relativa de CD14 [coreceptor del receptor 4 tipo toll (TLR4) y media en la señalización de lipopolisacáridos (LPS)] y CD16 (receptor IIIa de Fc gamma). El fenotipado por citometría de flujo ha identificado tres poblaciones diferentes de monocitos, a saber, clásico (CD14 ++, CD16 -), intermedio (CD14 + , CD16 +) y no clásico (CD14 + , CD16)++) monocitos (Sampath, Moideen, Ranganathan, & Bethunaickan, 2018).

1.1.9 PERFIL DE CITOQUINAS DE MONOCITOS

Los monocitos clásicos secretan citoquinas proinflamatorias como IL-6, los monocitos intermedios secretan TNF- α , IL-1 β , e IL-6 tras la estimulación de TLR y los no clásicos se les ha asociado con la producción de TNF- α (Kapellos et al., 2019).

1.1.9.1 Interleuquina 6 (IL- 6)

La IL-6 es una proteína compuesta por 184 aminoácidos que forman cuatro hélices, que se une al receptor de citoquinas tipo I, el cual puede estar unido a la membrana (señalización clásica) o encontrarse de forma soluble (señalización trans). Hepatocitos, células epiteliales y algunos leucocitos expresan en su membrana IL-6R, lo que aumenta el espectro de acción de esta citoquina. Esta citoquina es producida por células inmunes activadas, células estromales, células T, macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y hepatocitos (Choy & Rose-John, 2017).

La IL-6 es una citoquina con una gran variedad de funciones, si su expresión resulta de la señalización clásica su función se orienta a un papel homeostático y antiinflamatorio, mientras que la regulación trans media procesos proinflamatorios (Baran et al., 2018; Rose-John, 2012) . Dentro de las funciones de la IL-6 se destaca su función regulada de la respuesta inmune e inflamación. La estimulación de los hepatocitos por la IL-6 estimula la producción de proteínas de fase aguda; durante la inflamación aguda, los monocitos, macrófagos y células endoteliales producen IL-6, lo que lleva al reclutamiento de neutrófilos mediante la activación de un subconjunto de quimiocinas y moléculas de adhesión por parte de células endoteliales, células de músculo liso y fibroblastos. La IL-6 promueve la diferenciación de las células plasmáticas y la producción de anticuerpos, y en conjunto con TGF- β promueve la diferenciación de la subpoblación de células Th17 (Harbour et al., 2020).

La actividad de la IL-6 está relacionada con procesos como la producción de fiebre, anemia en enfermedades crónicas, estimulación de células del sistema nervioso central, sistema inmune, tejido óseo, tejido muscular y tejido del endotelio vascular (Ramírez, Duque, & Naranjo, 2011). Concentraciones elevadas de IL-6 son asociados con enfermedades que conllevan procesos inflamatorios crónicos, tanto así, que el bloqueo de la señalización de esta citoquina es utilizado con fines terapéuticos (Martínez-Morillo, Grados, Tejera, & Marqués, 2011).

1.1.9.2 Interleuquina 1 β (IL -1 β)

La IL-1 β se expresa en el citoplasma como una proforma de 31 kDa, se procesa y se libera tras la acción de la caspasa-1, en su forma activa es de 17 kDa. Su función se ejerce por la señalización que deriva de su interacción con el receptor IL-1 tipo I (Krumm, Xiang, & Deng, 2014). es una citoquina secretada por macrófagos, monocitos, neutrófilos, células NK, células dendríticas, linfocitos B, su expresión se induce por estimulación señales inflamatorias.

Esta citoquina tiene principalmente funciones proinflamatorias, sus acciones están relacionadas con procesos como la fiebre, migración de leucocitos, producción de cortisol, participa en la proliferación, diferenciación y apoptosis celular, regulación de la inflamación, inductor de componentes de la fase aguda y factor de activación de linfocitos. El aumento de la concentración de IL-1 β está asociada a síndromes autoinflamatorios (Kaneko, Kurata, Yamamoto, Morikawa, & Masumoto, 2019). Inhibe la proliferación de células mieloides, mesenquimales, epiteliales, linfoides, epiteliales e incluso de células malignas; sin embargo, tiene la capacidad de estimular la producción de fibroblastos, células no epiteliales y ciertas poblaciones de células mesenquimales.

1.5 BIOMARCADORES

Un biomarcador es una sustancia o una característica que puede ser medida y evaluada objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patológicos o como respuesta a una intervención terapéutica. Los biomarcadores se han utilizado para diagnosticar y pronosticar la evolución y el resultado de muchas enfermedades. Pueden ser utilizados para: 1) el diagnóstico de una enfermedad, 2) identificar riesgo de las personas, 3) para clasificar a los pacientes en función de la gravedad de la enfermedad, 4) para proporcionar el pronóstico de la enfermedad, 5) para evaluar la gravedad de la enfermedad, 6) para proporcionar alguna orientación en el tratamiento y en el manejo de una enfermedad y, finalmente, 7) para identificar el riesgo de complicación a largo plazo de los pacientes después de la manifestación de una enfermedad en particular. Los biomarcadores se pueden encontrar en diferentes fluidos biológicos tales como suero, plasma, orina, células o pueden ser productos biológicos en forma de metabolitos, citoquinas o marcadores genéticos (N. W. Lucchi et al., 2011).

Ante la necesidad e importancia de la prevención de las complicaciones de las enfermedades infecciosas, especialmente en áreas con alta tasa de morbi-mortalidad, en la última década se han incrementado el número de estudios enfocados en la búsqueda de biomarcadores que ayuden a pronosticar complicaciones de la enfermedad. Las investigaciones sobre la patogénesis de las diferentes enfermedades infecciosas han implicado un avance en la comprensión de la enfermedad.

La respuesta inflamatoria hace parte de una respuesta natural y temprana del cuerpo frente a procesos infecciosos; sin embargo, se cree que la desregulación de la respuesta inflamatoria y la activación endotelial son los procesos centrales en la patogénesis de la severidad de diversas etiologías infecciosas y que la cuantificación plasmática de esas moléculas puede pronosticar los efectos clínicos (van der Heyde HC, et al, 2006; Clark IA et al, 2004; Faille D, et al. 2009). Por ejemplo, en casos de sepsis y shock séptico se ha identificado una elevación transitoria (aproximadamente por 72 horas) de moléculas como el receptor antagonista de la IL-1, proteína C reactiva, procalcitonina, ICAM-1, TNF, IL-8 y la Caspasa 3, sugiriéndolos en diferentes publicaciones como biomarcadores de gravedad para estos cuadros clínicos (Rivers. et al., 2007), en el caso de infecciones virales como el Dengue se ha descrito que IL-7, IL-8, IL-10, TGF- β , VEGFR2 y Ang-2 tienen una expresión diferencial en los cuadros de fiebre por dengue y

dengue grave, postulándose como potenciales biomarcadores de pronóstico para la forma grave de esta enfermedad (Figuerola, Gélvez, & Niederbacher, 2016; Soo et al., 2017), en pacientes con leptospirosis que presentan alteraciones multiorgánicas la concentración de IL-6, IL-8 and IL-10 está elevada comparado con pacientes con leptospirosis sin compromiso orgánico (Chirathaworn, Supputtamongkol, Lertmaharit, & Poovorawan, 2016), por otra parte, TNF- α e IL-12 han presentado niveles diferenciadores con otros síndromes febriles (Srinath et al., 2017).

En pacientes con malaria se han realizado investigaciones con el fin de aclarar el papel de las citoquinas y otras moléculas derivadas de la respuesta inmune en la fisiopatología de la enfermedad, lo que ha permitido evaluar las concentraciones de estas moléculas en los diferentes desenlaces clínicos. Una de las moléculas más documentadas es el IFN- γ , comparaciones realizadas en grupos de pacientes con malaria no complicada y complicada encuentran que los niveles de IFN- γ están aumentados en pacientes con malaria cerebral o anemia severa, esto es concordante con hallazgos en modelos de ratones (Ong'echa, Davenport, Vulule, Hittner, & Perkins, 2011; Raballah et al., 2017; Villegas-Mendez et al., 2012).

En algunos estudios realizados en niños de Ghana se encontraron altos niveles de ICAM-1 soluble en plasma, los cuales están asociados con el desarrollo de MC, estos niveles pueden reflejar la regulación por incremento de ICAM-1 en la microvasculatura cerebral, pudiendo ser pronóstico en un cuadro de malaria cerebral (Adukpo et al., 2013), en esta vía el aumento de la concentración moléculas como sVCAM-1, sELAM-1, TNF- α se ha descrito en niños con malaria complicada, comparados con individuos no complicados; si bien, este tipo de moléculas pueden tener una implicación significativa en la patogénesis de la enfermedad, eventualmente su cuantificación puede ser útil en el pronóstico de pacientes con malaria que se pueden complicar (Tchinda et al., 2007).

Por otro lado, se conoce que las Angiopoyetina 1 y 2 (Ang-1 y Ang-2) son reguladores críticos de la activación y la integridad endotelial. La Ang-2 se expresa en las células endoteliales y se almacena como gránulos especializados, para la liberación rápida a estímulos inflamatorios, actuando principalmente como antagonista de Ang-1, promueve la permeabilidad vascular y facilita la inflamación mediante la sensibilización de células endoteliales por TNF y regulación de ICAM 1, sus niveles también han sido descritos como biomarcadores fiables de MC. En modelos experimentales se ha documentado que la inhibición de la quimiocina IP-10 conlleva a una disminución de la carga parasitaria y control de la infección, en caso contrario

concentraciones aumentadas de esta molécula se asocian con el desarrollo de malaria cerebral (Nie et al., 2009).

Investigaciones realizadas en África, Asia, India y Brasil involucran la cuantificación plasmática de moléculas como IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17^a, IL-18, Galectin-9, IFN- α 2, TNF, IFN- γ , IL-1Ra, sCD40L, G-CSF, GM-CSF, EGF, FGF-2, VEGF, TGF- α , IP-10, MIP-1 α , MIP-1 β , Ang-1, Ang-2, MCP-1, Eotaxin, RANTES, TGF- β y Foxp3, en grupos de individuos con diferentes presentaciones clínicas de la malaria por *P. falciparum*. Dentro de los hallazgos con un número mayor de evidencias se encuentra el IFN- γ , TNF- α y Ang-2, cuyos niveles plasmáticos son mayores en personas con malaria complicada en comparación con pacientes con malaria no complicada o controles sanos, en este sentido, se ha descrito que la concentración disminuida de IL-10 está asociada con cuadros clínicos complicados ((Raza et al., 2013; Yeo et al., 2008)).

En infecciones por *P. vivax* el número de investigaciones con este tipo de población es menor, algunos estudios realizados en Brasil, Tailandia y Pakistan han comparado poblaciones con diferentes cursos clínicos de la enfermedad; se ha encontrado que las concentraciones plasmáticas de TNF α , IFN- γ IL-10, fueron mayores en el grupo de pacientes con malaria severa correlacionado con la presentación de manifestaciones clínicas como la anemia severa, falla respiratoria, insuficiencia renal, y concentración superior de parásitos (Hojo-Souza et al., 2017; Raza et al., 2013). En Colombia existe un reporte de Gómez y colaboradores en el 2013 evaluando la diferencia en los niveles séricos de IL-10 e IFN γ , donde comparan grupos con primo infección y reinfección por *P. vivax*; sin embargo, no se evidencia una correlación entre los niveles séricos de estas moléculas y manifestaciones clínicas de la enfermedad (Gómez Marrugo & Moneriz Pretell, 2013).

Bibliografía

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2015). *Inmunología celular y molecular*. Elsevier.
- Abbas, A. K., Trotta, E., Simeonov, D. R., Marson, A., & Bluestone, J. A. (2018). Revisiting IL-2: biology and therapeutic prospects. *Science immunology*, 3(25).
- Adukpo, S., Kusi, K. A., Ofori, M. F., Tetteh, J. K., Amoako-Sakyi, D., Goka, B. Q., . . . Doodoo, D. (2013). High plasma levels of soluble intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 are associated with cerebral malaria. *PLoS ONE*, 8(12), e84181. doi:10.1371/journal.pone.0084181
- Amino, R., Thiberge, S., Martin, B., Celli, S., Shorte, S., Frischknecht, F., & Ménard, R. (2006). Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nature medicine*, 12(2), 220.
- Andrade, B. B., & Barral-Netto, M. (2011). Biomarkers for susceptibility to infection and disease severity in human malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 106 Suppl 1, 70-78.
- Annunziato, F., & Romagnani, S. (2016). Th1 Cells. In M. J. H. Ratcliffe (Ed.), *Encyclopedia of Immunobiology* (pp. 287-293). Oxford: Academic Press.
- Anstey, N. M., Russell, B., Yeo, T. W., & Price, R. N. (2009). The pathophysiology of vivax malaria. *Trends Parasitol*, 25(5), 220-227. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.02.003>
- Antinori, S., Galimberti, L., Milazzo, L., & Corbellino, M. (2012). Biology of human malaria plasmodia including *Plasmodium knowlesi*. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*, 4(1), e2012013-e2012013. doi:10.4084/MJHID.2012.013
- Ashley, E. A., Phyo, A. P., & Woodrow, C. J. (2018). Malaria. *The Lancet*, 391(10130), 1608-1621.
- Baer, K., Roosevelt, M., Clarkson Jr, A. B., Van Rooijen, N., Schnieder, T., & Frevert, U. (2007). Kupffer cells are obligatory for *Plasmodium yoelii* sporozoite infection of the liver. *Cellular microbiology*, 9(2), 397-412.
- Baran, P., Hansen, S., Waetzig, G. H., Akbarzadeh, M., Lamertz, L., Huber, H. J., . . . Scheller, J. (2018). The balance of interleukin (IL)-6, IL-6-soluble IL-6 receptor (sIL-6R), and IL-6·sIL-6R·sgp130 complexes allows simultaneous classic and trans-signaling. *The Journal of biological chemistry*, 293(18), 6762-6775. doi:10.1074/jbc.RA117.001163
- Calzascia, T., Pellegrini, M., Hall, H., Sabbagh, L., Ono, N., Elford, A. R., . . . Ohashi, P. S. (2007). TNF- α is critical for antitumor but not antiviral T cell immunity in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(12), 3833-3845. doi:10.1172/JCI32567
- Carty, S. A., Riese, M. J., & Koretzky, G. A. (2018). Chapter 21 - T-Cell Immunity. In R. Hoffman, E. J. Benz, L. E. Silberstein, H. E. Heslop, J. I. Weitz, J. Anastasi, M. E. Salama, & S. A. Abutalib (Eds.), *Hematology (Seventh Edition)* (pp. 221-239): Elsevier.
- Cowman, A. F., Berry, D., & Baum, J. (2012). The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *J Cell Biol*, 198(6), 961-971. doi:10.1083/jcb.201206112
- Cowman, A. F., Healer, J., Marapana, D., & Marsh, K. (2016). Malaria: Biology and Disease. *Cell*, 167(3), 610-624. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.055>

- Cox-Singh, J., Hiu, J., Lucas, S. B., Divis, P. C., Zulkarnaen, M., Chandran, P., . . . Krishna, S. (2010). Severe malaria - a case of fatal *Plasmodium knowlesi* infection with post-mortem findings: a case report. *Malar J*, 9, 10. doi:10.1186/1475-2875-9-10
- Cyktor, J. C., & Turner, J. (2011). Interleukin-10 and immunity against prokaryotic and eukaryotic intracellular pathogens. *Infection and immunity*, 79(8), 2964-2973.
- Choy, E., & Rose-John, S. (2017). Interleukin-6 as a multifunctional regulator: inflammation, immune response, and fibrosis. *Journal of Scleroderma and Related Disorders*, 2(2_suppl), S1-S5.
- Dembic, Z. (2015a). Chapter 1 - Introduction—Common Features About Cytokines. In Z. Dembic (Ed.), *The Cytokines of the Immune System* (pp. 1-16). Amsterdam: Academic Press.
- Dembic, Z. (2015b). Chapter 6 Cytokines of the Immune System Interleukins *The Cytokines of the Immune System* (pp. 143-239).
- Dunst, J., Kamena, F., & Matuschewski, K. (2017b). Cytokines and Chemokines in Cerebral Malaria Pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 324-324. doi:10.3389/fcimb.2017.00324
- Dups, J. N., Pepper, M., & Cockburn, I. A. (2014). Antibody and B cell responses to *Plasmodium* sporozoites. *Front Microbiol*, 5, 625. doi:10.3389/fmicb.2014.00625
- Espinoza, V. E., & Emmady, P. D. (2020). Histology, Monocytes. *StatPearls [Internet]*.
- Gómez Marrugo, D. C., & Moneriz Pretell, C. E. (2013). *Perfil de citoquinas y anticuerpos en respuesta a la infección por Plasmodium vivax en una población del sur de Bolívar, Colombia*. Universidad de Cartagena.
- Griffin, D. E. (2008). Cytokines and Chemokines. In B. W. J. Mahy & M. H. V. Van Regenmortel (Eds.), *Encyclopedia of Virology (Third Edition)* (pp. 620-624). Oxford: Academic Press.
- Guzmán Flores, J. M., & Portales Pérez, D. P. (2013). Mecanismos de supresión de las células T reguladoras (Treg).
- Harbour, S. N., DiToro, D. F., Witte, S. J., Zindl, C. L., Gao, M., Schoeb, T. R., . . . Weaver, C. T. (2020). TH17 cells require ongoing classic IL-6 receptor signaling to retain transcriptional and functional identity. *Sci Immunol*, 5(49), eaaw2262.
- Hojó-Souza, N. S., Pereira, D. B., de Souza, F. S. H., de Oliveira Mendes, T. A., Cardoso, M. S., Tada, M. S., . . . Bueno, L. L. (2017). On the cytokine/chemokine network during *Plasmodium vivax* malaria: new insights to understand the disease. *Malaria journal*, 16(1), 1-10.
- Hori, S. (2014). Lineage stability and phenotypic plasticity of Foxp3+ regulatory T cells. *Immunol Rev*, 259(1), 159-172.
- Horiguchi, M., Ota, M., & Rifkin, D. B. (2012). Matrix control of transforming growth factor- β function. *The Journal of Biochemistry*, 152(4), 321-329. doi:10.1093/jb/mvs089
- INS. (2010b). Guía para Atención Clínica Integral del paciente con malaria. Bogotá.
- INS. (2020). *Semana epidemiológica 53, 27 de dic. de 2020 al 2 de enero de 2021*. Retrieved from https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2020_Boletin_epidemiologico_semana_53.pdf
- Jorgovanovic, D., Song, M., Wang, L., & Zhang, Y. (2020). Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. *Biomarker Research*, 8(1), 49. doi:10.1186/s40364-020-00228-x

- Kak, G., Raza, M., & Tiwari, B. K. (2018). Interferon-gamma (IFN- γ): exploring its implications in infectious diseases. *Biomolecular concepts*, 9(1), 64-79.
- Kaneko, N., Kurata, M., Yamamoto, T., Morikawa, S., & Masumoto, J. (2019). The role of interleukin-1 in general pathology. *Inflammation and regeneration*, 39(1), 1-16.
- Kapellos, T. S., Bonaguro, L., Gemünd, I., Reusch, N., Saglam, A., Hinkley, E. R., & Schultze, J. L. (2019). Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. *Frontiers in Immunology*, 10(2035). doi:10.3389/fimmu.2019.02035
- Krishnegowda, G., Hajjar, A. M., Zhu, J., Douglass, E. J., Uematsu, S., Akira, S., . . . Gowda, D. C. (2005). Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum* cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *Journal of Biological Chemistry*, 280(9), 8606-8616.
- Krumm, B., Xiang, Y., & Deng, J. (2014). Structural biology of the IL-1 superfamily: key cytokines in the regulation of immune and inflammatory responses. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 23(5), 526-538. doi:10.1002/pro.2441
- Kubiczkova, L., Sedlarikova, L., Hajek, R., & Sevcikova, S. (2012). TGF- β —an excellent servant but a bad master. *Journal of translational medicine*, 10(1), 1-24.
- Kumar, R., & Saravu, K. (2017). Severe vivax malaria: a prospective exploration at a tertiary healthcare centre in Southwestern India. *Pathogens and global health*, 111(3), 148-160. doi:10.1080/20477724.2017.1309342
- Li, C., Jiang, P., Wei, S., Xu, X., & Wang, J. (2020). Regulatory T cells in tumor microenvironment: new mechanisms, potential therapeutic strategies and future prospects. *Molecular Cancer*, 19(1), 116. doi:10.1186/s12943-020-01234-1
- Li, M. O., & Flavell, R. A. (2008). TGF- β : a master of all T cell trades. *Cell*, 134(3), 392-404.
- Marsh, K., & Kinyanjui, S. (2006). Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunol*, 28(1-2), 51-60. doi:10.1111/j.1365-3024.2006.00808.x
- Martínez-Morillo, M., Grados, D., Tejera, B., & Marqués, A. O. (2011). Inhibidor del receptor de la interleucina-6 en el tratamiento de la artritis reumatoide: seguridad y dosificación del tocilizumab. *Seminarios de la Fundación Española de Reumatología*, 12(2), 57-60.
- Miller, J. L., Sack, B. K., Baldwin, M., Vaughan, A. M., & Kappe, S. H. (2014). Interferon-mediated innate immune responses against malaria parasite liver stages. *Cell reports*, 7(2), 436-447.
- Mosser, D. M., & Zhang, X. (2008). Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev*, 226, 205-218. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00706.x
- Naing, C., Whittaker, M. A., Nyunt Wai, V., & Mak, J. W. (2014). Is *Plasmodium vivax* Malaria a Severe Malaria?: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(8), e3071. doi:10.1371/journal.pntd.0003071
- Nie, C. Q., Bernard, N. J., Norman, M. U., Amante, F. H., Lundie, R. J., Crabb, B. S., . . . Schofield, L. (2009). IP-10-mediated T cell homing promotes cerebral inflammation over splenic immunity to malaria infection. *PLoS pathogens*, 5(4), e1000369.

- Offeddu, V., Thathy, V., Marsh, K., & Matuschewski, K. (2012). Naturally acquired immune responses against *Plasmodium falciparum* sporozoites and liver infection. *International Journal for Parasitology*, 42(6), 535-548.
- Oh, S. A., & Li, M. O. (2013). TGF- β : guardian of T cell function. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 191(8), 3973-3979. doi:10.4049/jimmunol.1301843
- Oliveira-Ferreira, J., Lacerda, M. V. G., Brasil, P., Ladislau, J. L. B., Tauil, P. L., & Daniel-Ribeiro, C. T. (2010). Malaria in Brazil: an overview. *Malaria journal*, 9(1), 115. doi:10.1186/1475-2875-9-115
- Ong'echa, J. M., Davenport, G. C., Vulule, J. M., Hittner, J. B., & Perkins, D. J. (2011). Identification of inflammatory biomarkers for pediatric malarial anemia severity using novel statistical methods. *Infect Immun*, 79(11), 4674-4680. doi:10.1128/IAI.05161-11
- OPS/OMS. (2019). Actualización Epidemiológica: Aumento de malaria en las Américas, 18 de noviembre de 2019, Washington, D.C.
- Osii, R. S., Otto, T. D., Garside, P., Ndungu, F. M., & Brewer, J. M. (2020). The Impact of Malaria Parasites on Dendritic Cell–T Cell Interaction. *Frontiers in Immunology*, 11, 1597.
- Ouyang, W., & O'Garra, A. (2019). IL-10 family cytokines IL-10 and IL-22: from basic science to clinical translation. *Immunity*, 50(4), 871-891.
- Parameswaran, N., & Patial, S. (2010). Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, 20(2), 87-103. doi:10.1615/critrevukargeneexpr.v20.i2.10
- Peralta-Zaragoza, O., Lagunas-Martínez, A., & Madrid-Marina, V. (2001). Factor de crecimiento transformante beta-1: estructura, función y mecanismos de regulación en cáncer. *Salud Pública de México*, 43, 340-351.
- Polley, S. D., Mwangi, T., Kocken, C. H., Thomas, A. W., Dutta, S., Lanar, D. E., . . . Mwambingu, G. (2004). Human antibodies to recombinant protein constructs of *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen 1 (AMA1) and their associations with protection from malaria. *Vaccine*, 23(5), 718-728.
- Raballah, E., Kempaiah, P., Karim, Z., Orinda, G. O., Otieno, M. F., Perkins, D. J., & Ong'echa, J. M. (2017). CD4 T-cell expression of IFN-gamma and IL-17 in pediatric malarial anemia. *PLoS ONE*, 12(4), e0175864. doi:10.1371/journal.pone.0175864
- Raphael, I., Nalawade, S., Eagar, T. N., & Forsthuber, T. G. (2015). T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*, 74(1), 5-17. doi:10.1016/j.cyto.2014.09.011
- Raza, A., Ghanchi, N. K., Sarwar Zubairi, A., Raheem, A., Nizami, S., & Beg, M. A. (2013). Tumor necrosis factor - α , interleukin-10, intercellular and vascular adhesion molecules are possible biomarkers of disease severity in complicated *Plasmodium vivax* isolates from Pakistan. *PloS one*, 8(12), e81363. doi:10.1371/journal.pone.0081363
- Riley, E. M., & Stewart, V. A. (2013). Immune mechanisms in malaria: new insights in vaccine development. *Nature medicine*, 19(2), 168.
- Romagnani, S. (2014). T cell subpopulations *History of Allergy* (Vol. 100, pp. 155-164): Karger Publishers.

- Rose-John, S. (2012). IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *International journal of biological sciences*, 8(9), 1237-1247. doi:10.7150/ijbs.4989
- Ross, S. H., & Cantrell, D. A. (2018). Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes. *Annual Review of Immunology*, 36(1), 411-433. doi:10.1146/annurev-immunol-042617-053352
- Sampath, P., Moideen, K., Ranganathan, U. D., & Bethunaickan, R. (2018). Monocyte subsets: phenotypes and function in tuberculosis infection. *Frontiers in Immunology*, 9, 1726.
- Saraiva, M., & O'garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature reviews immunology*, 10(3), 170-181.
- Shaw, T. N., Stewart-Hutchinson, P. J., Strangward, P., Dandamudi, D. B., Coles, J. A., Villegas-Mendez, A., . . . Dustin, M. L. (2015). Perivascular Arrest of CD8+ T Cells Is a Signature of Experimental Cerebral Malaria. *PLoS pathogens*, 11(11), e1005210. doi:10.1371/journal.ppat.1005210
- Silva, L. B., dos Santos Neto, A. P., Maia, S. M., dos Santos Guimarães, C., Quidute, I. L., Carvalho, A. d. A., . . . Leão, J. C. (2019). The Role of TNF- α as a Proinflammatory Cytokine in Pathological Processes. *The Open Dentistry Journal*, 13(1).
- Su, Z., & Stevenson, M. M. (2002). IL-12 is required for antibody-mediated protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS malaria infection in mice. *The Journal of Immunology*, 168(3), 1348-1355.
- Sypniewska, P., Duda, J. F., Locatelli, I., Althaus, C. R., Althaus, F., & Genton, B. (2017). Clinical and laboratory predictors of death in African children with features of severe malaria: a systematic review and meta-analysis. *BMC Medicine*, 15(1), 147. doi:10.1186/s12916-017-0906-5
- Tchinda, V. H., Tadem, A. D., Tako, E. A., Tene, G., Fogako, J., Nyonglema, P., . . . Leke, R. G. (2007). Severe malaria in Cameroonian children: correlation between plasma levels of three soluble inducible adhesion molecules and TNF-alpha. *Acta Trop*, 102(1), 20-28. doi:10.1016/j.actatropica.2007.02.011
- Urschel, K., & Cicha, I. (2015). TNF- α in the cardiovascular system: from physiology to therapy. *Internat J Interferon Cytokine Med Res*, 7, 9-25.
- Vásquez, A. M., & Tobón, A. (2012). Mecanismos de patogenia en la malaria por *Plasmodium falciparum*. *Biomédica*, 32, 106-120.
- Vignali, D. A., Collison, L. W., & Workman, C. J. (2008). How regulatory T cells work. *Nature reviews immunology*, 8(7), 523-532.
- Villegas-Mendez, A., Greig, R., Shaw, T. N., de Souza, J. B., Gwyer Findlay, E., Stumhofer, J. S., . . . Couper, K. N. (2012). IFN-gamma-producing CD4+ T cells promote experimental cerebral malaria by modulating CD8+ T cell accumulation within the brain. *J Immunol*, 189(2), 968-979. doi:10.4049/jimmunol.1200688
- Wei, X., Zhang, J., Gu, Q., Huang, M., Zhang, W., Guo, J., & Zhou, X. (2017). Reciprocal Expression of IL-35 and IL-10 Defines Two Distinct Effector Treg Subsets that Are Required for Maintenance of Immune Tolerance. *Cell Reports*, 21(7), 1853-1869. doi:<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.090>
- WHO. (2015). *Guidelines for the treatment of malaria*: World Health Organization.
- WHO. (2020). World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges.

- Wickramasinghe, S. N., Looareesuwan, S., Nagachinta, B., & White, N. J. (1989). Dyserythropoiesis and ineffective erythropoiesis in *Plasmodium vivax* malaria. *Br J Haematol*, 72(1), 91-99.
- Yazdani, S. S., Mukherjee, P., Chauhan, V. S., & Chitnis, C. E. (2006). Immune responses to asexual blood-stages of malaria parasites. *Curr Mol Med*, 6(2), 187-203. doi:10.2174/156652406776055212
- Yoshinaga, K., Obata, H., Jurukovski, V., Mazzieri, R., Chen, Y., Zilberberg, L., . . . Todorovic, V. (2008). Perturbation of transforming growth factor (TGF)- β 1 association with latent TGF- β binding protein yields inflammation and tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(48), 18758-18763.
- Zhang, J.-M., & An, J. (2007). Cytokines, inflammation, and pain. *International anesthesiology clinics*, 45(2), 27-37. doi:10.1097/AIA.0b013e318034194e
- Zheng, H., Tan, Z., & Xu, W. (2014). Immune Evasion Strategies of Pre-Erythrocytic Malaria Parasites. *Mediators of Inflammation*, 2014, 6. doi:10.1155/2014/362605
- stance, and pathophysiology of *Plasmodium vivax* malaria. *Journal of vector borne diseases*, 55(1), 1.
- Dhangadamajhi, G., Panigrahi, S., Roy, S., & Tripathy, S. (2019). Effect of *Plasmodium falciparum* infection on blood parameters and their association with clinical severity in adults of Odisha, India. *Acta tropica*, 190, 1-8.
- Douglas, N. M., Anstey, N. M., Buffet, P. A., Poespoprodjo, J. R., Yeo, T. W., White, N. J., & Price, R. N. (2012). The anaemia of *Plasmodium vivax* malaria. *Malaria journal*, 11(1), 135.
- Fazil, A., Vernekar, P. V., Geriani, D., Pant, S., Senthilkumaran, S., Anwar, N., . . . Menezes, R. G. (2013). Clinical profile and complication of malaria hepatopathy. *Journal of Infection and Public Health*, 6(5), 383-388.
- Howes, R. E., Battle, K. E., Mendis, K. N., Smith, D. L., Cibulskis, R. E., Baird, J. K., & Hay, S. I. (2016). Global epidemiology of *Plasmodium vivax*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 95(6_Suppl), 15-34.
- Kumar, B., Mitra, J. K., Rao, R., Kumar, A., Kumar, M., & Kumar, A. (2017). A Study on Incidence, Clinical Profile and Prognosis of *Falciparum* Malaria in Jharkhand. *International Journal of Contemporary Medical Research*, 4(7).
- Lacerda, M. V., Fragoso, S. C., Alecrim, M. G., Alexandre, M. A., Magalhaes, B. M., Siqueira, A. M., . . . Bassat, Q. (2012). Postmortem characterization of patients with clinical diagnosis of *Plasmodium vivax* malaria: to what extent does this parasite kill? *Clin Infect Dis*, 55(8), e67-74. doi:10.1093/cid/cis615
- Lacerda, M. V. G., Mourão, M. P. G., Coelho, H. C. C., & Santos, J. B. (2011). Thrombocytopenia in malaria: who cares? *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106, 52-63.
- Lampah, D. A., Yeo, T. W., Malloy, M., Kenangalem, E., Douglas, N. M., Ronaldo, D., . . . Price, R. N. (2014). Severe Malarial Thrombocytopenia: A Risk Factor for Mortality in Papua, Indonesia. *The Journal of infectious diseases*, 211(4), 623-634. doi:10.1093/infdis/jiu487
- Madrid, L., Lanaspá, M., Maculúve, S. A., & Bassat, Q. (2015). Malaria-associated hypoglycaemia in children. *Expert review of anti-infective therapy*, 13(2), 267-277.
- Martínez-Salazar, E. L., & Tobón-Castaño, A. (2014). Platelet profile is associated with clinical complications in patients with vivax and *falciparum* malaria in Colombia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 47, 341-349.

- Milner, D. A., Jr. (2018). Malaria Pathogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 8(1), a025569. doi:10.1101/cshperspect.a025569
- Miranda-Arboleda, A. F., Martínez-Salazar, E. L., & Tobón-Castano, A. (2014). El riñón en la malaria: de la patogénesis a las manifestaciones clínicas. *Infectio*, 18(3), 120-128.
- Mukhtar, M. M., Eisawi, O. A., Amanfo, S. A., Elamin, E. M., Imam, Z. S., Osman, F. M., & Hamed, M. E. (2019). *Plasmodium vivax* cerebral malaria in an adult patient in Sudan. *Malaria journal*, 18(1), 1-3.
- Naqvi, R. (2015). *Plasmodium vivax* causing acute kidney injury: a foe less addressed. *Pakistan journal of medical sciences*, 31(6), 1472.
- Pinzon, M. A., Pineda, J. C., Rosso, F., Shinchi, M., & Bonilla-Abadia, F. (2013). *Plasmodium vivax* cerebral malaria complicated with venous sinus thrombosis in Colombia. *Asian Pac J Trop Med*, 6(5), 413-415. doi:10.1016/s1995-7645(13)60050-4
- Poles, N., Virga, E., Variego, M., Arosio, A., Baldomá, F., Siccardi, M., . . . Cera, D. (2012). Ictericia y colestasis.
- Pulford, J., Hetzel, M. W., Bryant, M., Siba, P. M., & Mueller, I. (2011). Reported reasons for not using a mosquito net when one is available: a review of the published literature. *Malaria journal*, 10(1), 83. doi:10.1186/1475-2875-10-83
- Punnath, K., Dayanand, K. K., Chandrashekar, V. N., Achur, R. N., Kakkilaya, S. B., Ghosh, S. K., . . . Gowda, D. (2019). Association between Inflammatory Cytokine Levels and Thrombocytopenia during *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* Infections in South-Western Coastal Region of India. *Malaria research and treatment*, 2019.
- Rahimi, B. A., Thakkinstian, A., White, N. J., Sirivichayakul, C., Dondorp, A. M., & Chokejindachai, W. (2014). Severe vivax malaria: a systematic review and meta-analysis of clinical studies since 1900. *Malaria journal*, 13(1), 481. doi:10.1186/1475-2875-13-481
- Rivera-Correa, J., Conroy, A. L., Opoka, R. O., Batte, A., Namazzi, R., Ouma, B., . . . Rodriguez, A. (2019). Autoantibody levels are associated with acute kidney injury, anemia and post-discharge morbidity and mortality in Ugandan children with severe malaria. *Scientific Reports*, 9(1), 14940. doi:10.1038/s41598-019-51426-z
- Rivera-Correa, J., Pardo-Ruge, M., Gonzalez, S., & Rodriguez, A. (2017). Autoreactive T-bet+ B-cells promote pathological anemia during infection: Am Assoc Immunol.
- Rivera-Correa, J., Yasnot-Acosta, M. F., Tovar, N. C., Velasco-Pareja, M. C., Easton, A., & Rodriguez, A. (2020). Atypical memory B-cells and autoantibodies correlate with anemia during *Plasmodium vivax* complicated infections. *PLoS neglected tropical diseases*, 14(7), e0008466.
- Rodríguez, J. C. P., Uribe, G. Á., Araújo, R. M., Narváez, P. C., & Valencia, S. H. (2011). Epidemiology and control of malaria in Colombia. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106 Suppl 1(Suppl 1), 114-122.
- Sarkar, S., & Bhattacharya, P. (2008). Cerebral malaria caused by *Plasmodium vivax* in adult subjects. *Indian J Crit Care Med*, 12(4), 204-205. doi:10.4103/0972-5229.45084
- Shwetha, M. (2014). Correlation of bilirubin with liver enzymes in patients of vivax malaria. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*, 3(60), 13402-13407.

- Sinha, A., Singh, G., Bhat, A. S., Mohapatra, S., Gulati, A., Hari, P., . . . Bagga, A. (2013). Thrombotic microangiopathy and acute kidney injury following vivax malaria. *Clinical and experimental nephrology*, 17(1), 66-72.
- Valecha, N., Pinto, R. G., Turner, G. D., Kumar, A., Rodrigues, S., Dubhashi, N. G., . . . Baird, J. K. (2009). Histopathology of fatal respiratory distress caused by *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg*, 81(5), 758-762. doi:10.4269/ajtmh.2009.09-0348
- Wassmer, S. C., Taylor, T. E., Rathod, P. K., Mishra, S. K., Mohanty, S., Arevalo-Herrera, M., . . . Smith, J. D. (2015). Investigating the Pathogenesis of Severe Malaria: A Multidisciplinary and Cross-Geographical Approach. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 93(3 Suppl), 42-56. doi:10.4269/ajtmh.14-0841
- WHO. (2017). *World malaria report 2017*. Geneva: World Health Organization. Retrieved from <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/259492/1/9789241565523-eng.pdf?ua=1>
- WHO. (2019). *World malaria report 2019*.
- Yeo, T. W., Lampah, D. A., Tjitra, E., Piera, K., Gitawati, R., Kenangalem, E., . . . Anstey, N. M. (2010). Greater endothelial activation, Weibel-Palade body release and host inflammatory response to *Plasmodium vivax*, compared with *Plasmodium falciparum*: a prospective study in Papua, Indonesia. *The Journal of infectious diseases*, 202(1), 109-112.

CAPITULO II

PERFIL EPIDEMIOLÓGICO Y CLÍNICO DE PACIENTES CON MALARIA COMPLICADA Y NO COMPLICADA POR *PLASMODIUM VIVAX*.

2.1 RESUMEN

2.1.1 Introducción

Plasmodium vivax tiene una alta morbilidad, es la especie de *Plasmodium* con mayor distribución mundial, actualmente se reconoce su capacidad para desencadenar cuadros complicados. El presente estudio tiene como objetivo comparar las características clínicas y epidemiológicas de pacientes con malaria por *P. vivax* con y sin criterios de complicación en un área endémica para la transmisión de malaria en el noroeste de Colombia.

2.1.2 Métodos

Se realizó un estudio descriptivo de corte trasversal entre 2017 - 2019, se incluyeron pacientes con malaria complicada por *P. vivax* (n=50), malaria no complicada (n= 56) y controles sanos (n= 50). Características sociodemográficas, clínicas, hematológicas y bioquímicas fueron descritas. El análisis estadístico se realizó en GraphPad Prism, las variables categóricas se analizaron por la prueba de Chi cuadrado, las comparaciones de variables entre los tres grupos se realizaron por test de Kruskal-Wallis y comparación entre dos grupos por el test de Mann-Whitney. La relación entre variables se realizó por un análisis de correspondencia múltiple con el software R.

2.1.3 Resultado

Un total de 156 individuos fueron vinculados al estudio, 76 mujeres y 80 hombres, entre 3-71 años. El 50 % de los pacientes no tenían antecedentes de malaria, el 42% de los pacientes complicados requirió hospitalización, frente al 7,1% de los pacientes no complicados. La densidad parasitaria fue similar en ambos grupos clínicos; sin embargo, el 10% de los pacientes complicados presentaron parasitemias entre 20.000-135.000 parásitos/ μ l. La característica clínica más frecuente en pacientes con malaria complicada fue la trombocitopenia severa en el 54% de los casos, seguido de hipoglicemia (48%) y disfunción hepática y renal (30%).

2.1.4 Conclusiones

La trombocitopenia, hipoglicemia y la disfunción hepática y renal fueron las complicaciones más encontradas en la malaria por *P. vivax* en este estudio. La concentración de hemoglobina y el conteo de parásitos no presentaron diferencias en relación con la condición clínica. La trombocitopenia fue el hallazgo más frecuente en pacientes con malaria y su gravedad estuvo relacionada con menos episodios de la enfermedad.

2.2 INTRODUCCIÓN

Malaria es la parasitosis más prevalente en el mundo; el más reciente reporte de la OMS estima que en el año 2019 se presentaron 229 millones de casos y aproximadamente 409.000 muertes en el mundo (WHO, 2019). En las Américas se notificaron 976.000 casos; Venezuela, Brasil y Colombia aportan el 83% de los casos para la región, de los cuales el 74,1% son atribuidos a *P. vivax*. En Colombia en los últimos 5 años se han presentado en promedio 60,121 casos de malaria no complicada y 930 casos de malaria complicada, con un aumento en el 14 % y 15% de notificaciones para cada clasificación clínica en el 2018 con respecto al año anterior (INS, 2020).

Plasmodium vivax es prevalente en el Sudeste Asiático y América del Sur (Dayananda, Achur, & Gowda, 2018). En las Américas es responsable de 64% de los casos de malaria (WHO, 2017), porcentaje que históricamente asciende alrededor del 70% en Colombia; (Rodríguez, Uribe, Araújo, Narváez, & Valencia, 2011); ; sin embargo, en los últimos tres años se han presentado cambios epidemiológicos, que muestran un comportamiento similar de *P. falciparum* y *P. vivax* en el número de casos.

Durante décadas *P. vivax* fue considerada como una especie clínicamente benigna, en la actualidad existen evidencias que describen complicaciones neurológicas, hematológicas como anemia y trombocitopenia severa, compromiso respiratorio, renal y hepático (Castro-Gomes et al., 2014; Douglas et al., 2012; Howes et al., 2016; B. Kumar et al., 2017; Sarkar & Bhattacharya, 2008).

La anemia severa es la complicación reportada con mayor frecuencia en Asia y en algunos países de América del Sur, afecta tanto a niños, adultos y mujeres embarazadas, su relación con diferentes comorbilidades ha sido estudiada, en cuyo caso la anemia puede ser aún más severa. El distrés respiratorio o compromiso pulmonar, se ha reportado en monoinfecciones por *P. vivax*, diferentes estudios post-mortem en la India y Brasil, identificaron por métodos moleculares la presencia del parásito en los tejidos (M. V. Lacerda et al., 2012; Valecha et al., 2009).

Los reportes de malaria cerebral por *P. vivax* son muy poco frecuentes siendo el coma y alteraciones de conciencia las manifestaciones encontradas. Las implicaciones hacia *P. vivax* como responsable de estos cuadros clínicos complicados obedecen en principio a la identificación de ADN del parásito en los diferentes tejidos, observación de infiltrados celulares

en monoinfecciones confirmadas, y en casos puntuales, el hallazgo de formas de parásitos en cortes histológicos en estudios post mortem (M. V. Lacerda et al., 2012; Valecha et al., 2009).

Los reportes de malaria cerebral por *P. vivax* son poco frecuentes; coma, convulsiones y alteración de la conciencia son las manifestaciones más frecuentes, en estos pacientes se informan hallazgos de inflamación localizada. En casos de malaria cerebral causada por esta especie, la infección ha sido confirmada por microscopía o biología molecular, descartando otro tipo de microorganismo (Mukhtar et al., 2019; Pinzon, Pineda, Rosso, Shinci, & Bonilla-Abadia, 2013).

Los mecanismos fisiopatológicos que median las diferentes formas clínicas de la malaria por *P. vivax*, son poco conocidos. La baja carga parasitaria que se observa durante la infección, la invasión restrictiva hacia glóbulos rojos jóvenes, las pocas evidencias del secuestro de glóbulos parasitados en órganos, ha llevado a considerar que existen mecanismos diferentes a lo descrito para *P. falciparum* que participan en la patogenia por *P. vivax* (Milner, 2018).

La producción exacerbada de citoquinas pro-inflamatorias, la activación y expresión de moléculas de adhesión endotelial y mecanismos autoinmunes, son algunos de los mecanismos que pueden causar las complicaciones clínicas causadas por esta especie (Barber et al., 2015; Rivera-Correa et al., 2019; Wassmer et al., 2015). No existen criterios de complicación específicos para *P. vivax* por la OMS, las indicaciones actuales sugieren la utilización de los mismos parámetros utilizados para *P. falciparum* (WHO, 2015), a pesar de ser dos especies con características biológicas y epidemiológicas diferentes, lo que sin duda amerita una singularidad en la definición de los criterios por los cuales los pacientes recibirían un determinado manejo terapéutico.

El presente estudio tiene como objetivo comparar las características clínicas y epidemiológicas de pacientes con malaria por *P. vivax* con y sin criterios de complicación en un área endémica para la transmisión de malaria.

2.3 METODOLOGÍA

2.3.1 Participantes del estudio, diseño del estudio y colección de datos

El lugar de estudio fue el departamento de Córdoba, ubicado en la región Caribe al noreste de Colombia, se realizó un estudio descriptivo de corte trasversal. Los participantes del estudio fueron reclutados en el Hospital San Jerónimo de Montería y en el Hospital San José de Tierralta, entre octubre de 2017 y marzo de 2019, se conformaron tres grupos de estudio: pacientes con malaria complicada por *P. vivax* (n=50) (según criterios de la tabla 1.1), malaria no complicada (n= 56) y controles sanos de área endémica (n= 50) (Figura 2.1).

A cada paciente se le tomaron muestras de sangre por punción venosa en EDTA y tubo seco, las muestras se tomaron durante el periodo febril y antes del inicio de tratamiento antimalárico. Se realizó un hemograma automatizado, gota gruesa, extendido de sangre periférica, cuantificación sérica de glucosa, creatinina, bilirrubina total, bilirrubina directa, aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa y confirmación de especie por PCR anidada de acuerdo con lo descrito previamente por Andrade y colaboradores (Bruno Bezerril Andrade et al., 2009).

La clasificación de los pacientes con malaria complicada se realizó de acuerdo con la Guía para el Tratamiento de Malaria de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2015) y la Guía para Atención Clínica Integral del paciente con malaria para Colombia del Instituto Nacional de Salud (INS, 2010b) como se muestra en la tabla 2.1.

El grupo de controles sanos de área endémica, fueron personas afebriles al momento de la toma de la muestra, sin eventos de malaria en los últimos seis meses y reclutados en el municipio de Tierralta. Para todos los grupos fueron excluidos del estudio menores de 2 años, mujeres en embarazo, personas con enfermedades de base, malaria mixta, monoinfecciones por *P. falciparum*, leptospirosis y dengue. Al total de participantes se les realizó una encuesta para coleccionar información sociodemográfica, clínica y epidemiológica.

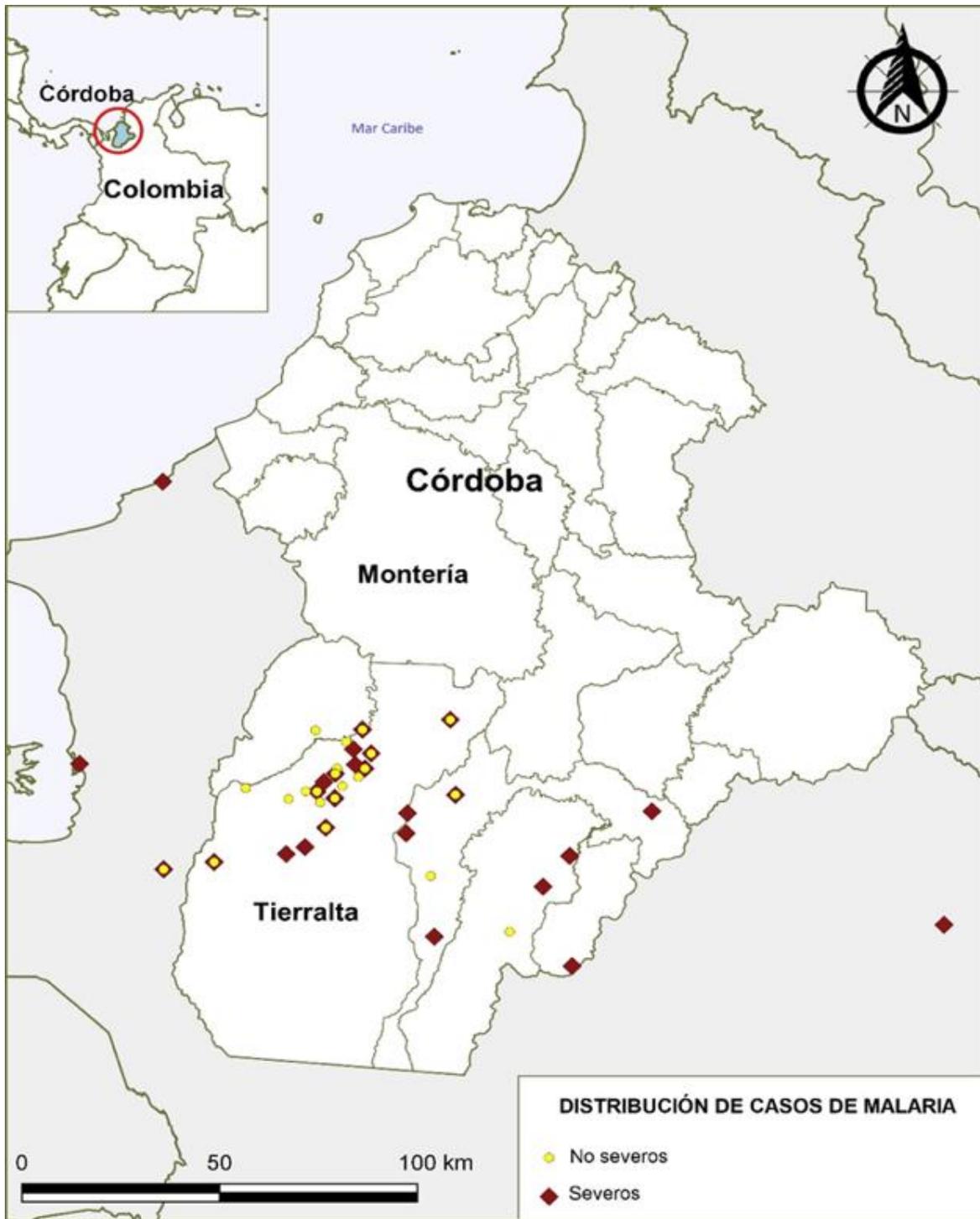


Figura 2.1. Distribución geográfica de casos de malaria complicada y no complicada por *P. vivax* en la zona de estudio

Tabla 2.1 Criterios de clasificación para pacientes con Malaria Complicada por *P. vivax*.

Criterios de clasificación

Recuento de plaquetas \leq 50000/uL

Hipoglicemia \leq 60 mg/dL

Acidosis metabólica (bicarbonato plasmático $<$ 15 mmol/L)

Creatinina sérica \geq 1.5 mg/dL

Hiperlactatemia (lactato $>$ 5 mmol/L)

Bilirrubina Indirecta \geq 1.5 mg/dL

Bilirrubina total \geq 1.5 mg/dL

Transaminasas \geq 40 U.I.

Hemoglobina \leq 7 g/dL

Recuento de parásitos \geq 50.000 parásitos/ μ L

Estado de coma

Convulsiones

Alteraciones del estado de conciencia

Dificultad respiratoria

Edema pulmonar

Hemoglobinuria

2.3.2 Consideraciones éticas

El proceso de inclusión y participación de los sujetos se realizó de manera voluntaria y de conformidad con las pautas nacionales (Resolución N° 008430 del 4 de octubre de 1993, República de Colombia, Ministerio de Salud) e internacionales (Declaración de Helsinki y sus enmiendas, Asociación Médica Mundial (WMA) Edimburgo, Escocia, octubre 2000); los participantes dieron su consentimiento a través de la firma del consentimiento o asentimiento informado de acuerdo con la edad de cada individuo. El proyecto recibió aval ético del Comité de Ética Humana de la Facultad Ciencias de la Salud de la Universidad de Córdoba.

2.3.3 Análisis de datos

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el software GraphPad Prism versión 7.00. Las variables categóricas entre los grupos de analizaron por la prueba de Chi cuadrado, las comparaciones entre variables cuantitativas entre los tres grupos fueron comparadas usando el test de Kruskal-Wallis y para la comparación entre dos grupos se hizo por el test de Mann-Whitney. Para observar la tendencia de asociación entre variables al interior del grupo de

pacientes con malaria no complicada y malaria complicada se realizó un análisis de correspondencia múltiple con el software estadístico R versión 3.6.3. Como parte de un análisis exploratorio de las variables demográficas y clínicas se realizó un análisis de componentes principales (ACP) de manera independiente para el grupo de pacientes con malaria complicada y no complicada.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Características sociodemográficas de la población estudiada.

Un total de 156 individuos fueron vinculados al estudio, 76 mujeres y 80 hombres, entre los 3 y 71 años, la variable edad se comportó de manera similar entre los tres grupos de estudio (p 0.5698 Kruskal-Wallis test). El 90,5 % de los individuos con diagnóstico de malaria procedían del municipio de Tierralta, el porcentaje restante procedía de los municipios de Puerto Libertador y Montelíbano, el total de los individuos del grupo control fueron reclutados en el municipio de Tierralta, el 80,1% de la población habitaban en áreas rurales dispersas y el 83,3% tenía una estancia igual o superior a dos años habitando esa zona. Las principales ocupaciones de las personas fueron estudiante, actividad pecuaria y oficios varios con un 37,8 %, 28,7% y 23,7 % respectivamente. El avistamiento de mosquitos en el área de la vivienda fue notificado por el 94% de los participantes, el uso de toldillos por el 63,5%, la población indicó no usar angeos en las ventanas de las viviendas, ni repelente como medida de protección para la picadura de insectos (Tabla 2.2).

2.4.2 Características clínicas, hematológicas y bioquímicas de la población estudiada

2.4.2.1 Características clínicas

En el grupo de pacientes con malaria complicada el 74 % casos era la primera vez que tenía malaria o había padecido un solo episodio previo de la enfermedad, esta misma situación se presentó en el grupo de malaria no complicada en el 57% de los casos, en el grupo de controles sanos el 60% de las personas indicaron nunca haber enfermado de malaria. Por otra parte, el 42% de los pacientes con malaria complicada requirió hospitalización, mientras que solo el 7,1% de los pacientes con malaria no complicada fue hospitalizado (Tabla 2.2).

Tabla 2.2 Características demográficas de la población estudiada.

Descripción	Complicado	No complicado	Controles sanos	<i>p</i> Kruskal wallis
Genero [n (%)]				
Femenino	24 (48,0)	22 (39,3)	30 (60)	0.6543
Masculino	26 (52,0)	34 (60,7)	20 (40)	0.5321
Edad [(Mediana (IQR))]				
	16 (11-26)	17 (12-35)	20 (12-34)	0.5694
Nº de episodios previos de malaria [n (Guedes, Sanchez, Gomes, & Fontes)]				
0	25 (50)	23 (41)	30 (60)	
≤ 2	18 (36)	23 (41)	17 (34)	
≥ 3	6 (12)	9 (16)	3 (6)	
Hospitalizados [n (%)]				
Yes	21 (42)	4 (7,1)	N/A	
No	29 (58)	52 (92,9)	N/A	
Presencia de mosquitos				
	46 (92)	56 (100)	45 (90)	
Use de angeos en ventanas				
	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Uso de insecticida				
	4 (8)	3 (5,4)	5 (10)	
Uso de repelentes				
	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Uso de toldillo				
	39 (78)	39 (69,6)	21 (42)	
Use de toldillo reimpregnados				
	11 (22)	2 (3,6)	3 (6)	
Fumigación de cultivos				
	13 (26)	1 (1,8)	3 (6)	
Cultivos cerca de la casa				
	35 (70)	54 (96,4)	32 (64)	

IQR = Rango intercuantilico (*del inglés*; Interquartile range), N/A = No Aplica

La fiebre, cefalea y escalofríos fueron las manifestaciones clínicas más frecuentes en el 94% de los pacientes con malaria, ; sin embargo, los pacientes con malaria complicada presentaron mayor diversidad en cuanto a manifestaciones, como dolor abdominal, dolor retrocular, vómito, artralgias, entre otros, con respecto al grupo de pacientes con malaria no complicada (Tabla 2.3).

Tabla 2.3 Características clínicas de pacientes con malaria complicada y no complicada por *P. vivax*.

Manifestaciones clínicas	Complicados n=50	%	No complicados n= 56	%
Fiebre	50	100	55	98,2
Cefalea	49	98	55	98,2
Escalofríos	47	94	53	94,6
Sudoración	0	0	5	8,9
Ictericia	0	0	3	5,3
Artralgias	6	12	3	5,3
Mialgias	3	6	0	0
Somnolencia	2	4	0	0
Nauseas	4	8	0	0
Diarrea	3	6	0	0
Dolor retrocular	6	12	0	0
Dolor abdominal	12	24	1	1,8
Cansancio	2	4	0	0
Pérdida de apetito	8	16	1	1,8
Mareo	5	1	2	3,6
Vómito	17	34	9	16,1

Nota: Los individuos de grupo control fueron asintomáticos

La parasitemia en los dos grupos de pacientes con malaria arrojó una mediana de 2.400 y 2.388, respectivamente, el 10% de los pacientes con malaria complicada y el 3,5% de pacientes no complicados presentaron parasitemias entre 20.000 - 135.000, el conteo de parásitos no presentó diferencias significativas entre estos dos grupos, sugiriendo que el conteo de parásitos no tiene relación con las alteraciones presentadas en diferentes órganos.

2.4.2.2 Características hematológicas

La cantidad de glóbulos rojos y leucocitos fue significativamente más baja en los pacientes con malaria complicada, con respecto a los otros dos grupos de estudio, mientras que la concentración de hemoglobina fue similar entre los pacientes diagnosticados con malaria independiente de su criterio de clasificación, ; sin embargo, la concentración de este parámetro se encontró disminuida en los individuos diagnosticados con malaria, con respecto al grupo de controles sanos. La concentración de hemoglobina en los pacientes con malaria osciló entre los rangos de anemia leve (10,1 – 10,9 gr/dL) y moderada (7,1 - 10,0 gr/dL), solo un paciente presentó hemoglobina de 6,8 gr/dL considerado como anemia severa (7 gr/dL), por lo cual fue incluido en el grupo de pacientes complicados (Ver Tabla 2.4).

Tabla 2.4 Perfil hematológico y bioquímico de pacientes con malaria complicada y no complicada por *P. vivax*

	MC N= 50 Mediana (IQR)	MNC N= 56 Mediana (IQR)	Controles sanos N= 50 MedianA (IQR)	MC vs MNC vs CS	MC vs MNC	MC vs CS	MNC vs CS
Recuento de parásitos/μL	2400 (1,400 – 5,393)	2388 (1,800 – 4150)	N/A	0,6510	0,6510	N/A	N/A
Glóbulos rojos x10⁶/μL	4,053 ± 0,0956	4,402 ± 0,08103	4,753 (4,408 – 5,058)	<0,0001	0,0061	<0,0001	0,0021
Leucocitos x10³/ μL	5,28 (4,59 – 6,39)	5,93 (4,62 – 7,3)	7,55 (6,9 – 9,47)	<0,0001	0,0320	<0,0001	<0,0001
Hemoglobina gr/dL (Mean ± SD)	11,21 ± 1,81	11, 83 ± 1,78	12,66 ± 1,51	0,0002	0,0757	<0,0001	0,0122
Plaquetas x10³/ μL	46,5 (31,75 – 89,5)	118 (85,5 – 154,8)	146 (245,3 – 326,3)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Glicemia mg/dL	67,95 (53,73 – 79,6)	79,9 (71,7 – 110))	76,6 (67,65 – 82,7)	0,0010	0,0003	0,013	0,13
Creatinina mg/dL	0,96 (0,72 – 1,51)	0,79 (0,67 – 1,0)	0,73 (0,60 – 0,84)	0,002	0,0125	<0,0001	0,0168
Bilirrubina Total mg/dL	0,71 (0,43 – 1,08)	0,75 (0,59 – 0,84)	0,71 (0,55 – 0,87)	0,8223	0,8984	0,7457	0,4947
Alanino aminotransferasa (ALT) U/L	34,65 (16,6 – 52,18)	28,8 (20,78 – 45,1)	23 (16,25 – 30,53)	0,0026	0,0475	<0,0001	0,0179
Aspartato aminotransferasa (AST) U/L	26,05 (14,18 – 42,7)	20,15 (14,85 – 26,55)	16,8 (11,7 – 22,9)	0,0022	0,0337	<0,0001	0,0482

IQR = Rango intercuartílico MC: Malaria Complicada; MNC: Malaria No complicada; CS: Controles Sanos. La comparación entre los tres grupos se realizó por Kruskal Wallis, las comparaciones entre dos grupos por Mann Withney.

El conteo de plaquetas presentó diferencias significativas entre los tres grupos de estudio. En el grupo de malaria complicada el 54% de los pacientes presentaron trombocitopenia severa (<50.000 plaquetas/mm³), el 28% trombocitopenia moderada (50.000 – 99.999 plaquetas/mm³) y 8% trombocitopenia leve (100.000 – 149.000 plaquetas/mm³) (tabla 2.5), mientras que el recuento de plaquetas en los pacientes con malaria no complicada presentó grados similares de trombocitopenia moderada y leve en un 35,7% y 32,1%, respectivamente.

Los pacientes que padecían por primera vez la enfermedad en el grupo de malaria complicada presentaron concentraciones disminuidas de plaquetas con respecto a los pacientes que padecieron la enfermedad por primera vez categorizados en el grupo de malaria no complicada (p <0,0001). En el grupo de complicados la media de la concentración plaquetaria fue de 39,12

$\pm 16,21$, mientras que en el grupo de malaria no complicada fue de $116,8 \pm 44,42$. Para el 66 % de los pacientes con trombocitopenia severa era la primera vez que padecía un episodio de malaria (figura 2.2).

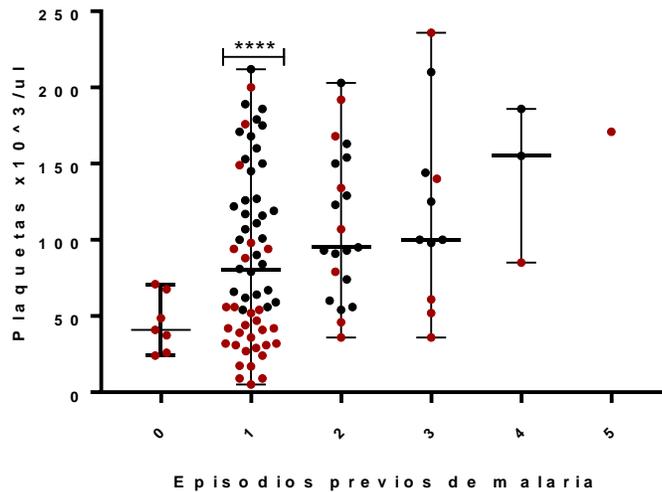


Figura 2.2 Concentración de plaquetas vs número de episodios previos de malaria en pacientes con malaria por *P. vivax*. Rojo: pacientes con malaria complicada; negro: pacientes sin malaria complicada. **** $p < 0.0001$

2.4.2.3 Características bioquímicas

En el grupo de pacientes con malaria complicada los parámetros bioquímicos se comportaron de la siguiente manera: el 28 % (n=14/50) presentó una concentración sérica de creatinina aumentada ($\geq 1,5$ mg/dL), dentro de este grupo 2 individuos presentaron valores superiores a 3,0 mg/dL; en general la concentración de creatinina fue superior en el grupo de complicados con respecto a los dos otros grupos de estudio, el 40 % (n=20/50) de los pacientes en este grupo presentaron concentraciones disminuidas de glicemia de acuerdo con lo establecido por INS (< 60 mg/dL) y el 6% (n= 3/50) concentraciones inferiores a 40 mg/dL, esta última corresponde al criterio de la OMS. El 30% de los pacientes con malaria complicada presentaron niveles aumentados de ambas transaminasas (> 40 U/L) (Tabla 2.5).

Tabla 2.5 Caracterización clínica de pacientes con malaria complicada.

Características clínicas	Grupo MC	%
--------------------------	----------	---

Trombocitopenia severa < 50.000	27	54
Trombocitopenia moderada 50.000 – 99.000	14	28
Trombocitopenia leve 100.000 – 149.000	4	8,0
Hipoglicemia (< 40mg/dL) OMS	4	8,0
Hipoglicemia (<60 mg/dL) INS	20	40,0
Insuficiencia renal (> 1.5 mg/dL) INS	13	26,0
Insuficiencia renal (> 3.0 mg/dL) OMS	2	4,0
Anemia leve - moderada (Hb < 11 g/dL)	20	40,0
Insuficiencia hepática (GPT/GOT > 40 U/L o Bilirrubina total > 1.5mg/dL)	15	30,0
Hiperparasitemia >50.000 par/ul	2	4,0
Con 1 criterios de complicación	24	48,0
Con 2 criterios de complicación	11	22,0
Con 3 criterios de complicación	7	14,0
Con 4 criterios de complicación	4	8,0
Con 5 criterios de complicación	3	6,0
Con 6 criterios de complicación	1	1,0

El 48% de los pacientes categorizados en el grupo de malaria complicada registraron un único criterio de complicación, en el 24 % de estos pacientes la hipoglicemia fue el único criterio de complicación (n= 12/50), seguido de la trombocitopenia severa en el 16% (n =8/50) de los casos complicados, mientras que el 52% de pacientes de este grupo presentaron entre 2 a 6 criterios de complicación (Tabla 2.5).

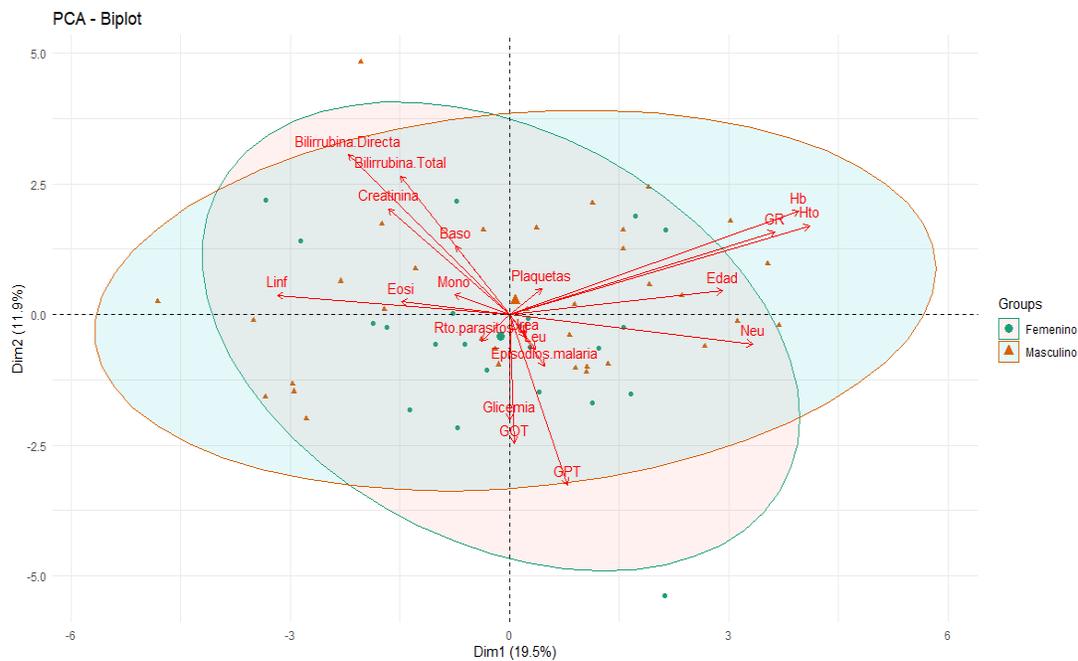
2.4.3 Asociación entre variables clínicas de pacientes con malaria complicada y no complicada por *P. vivax*.

En el análisis de componentes principales en ambos grupos de pacientes con malaria, mostró una correlación positiva esperada entre variables hematológicas como hemoglobina, hematocrito y glóbulos rojos con las diferencias ya establecidas con respecto al género, en cuanto a la sintomatología analizada por genero presento ligera diferencia entre estos grupos.

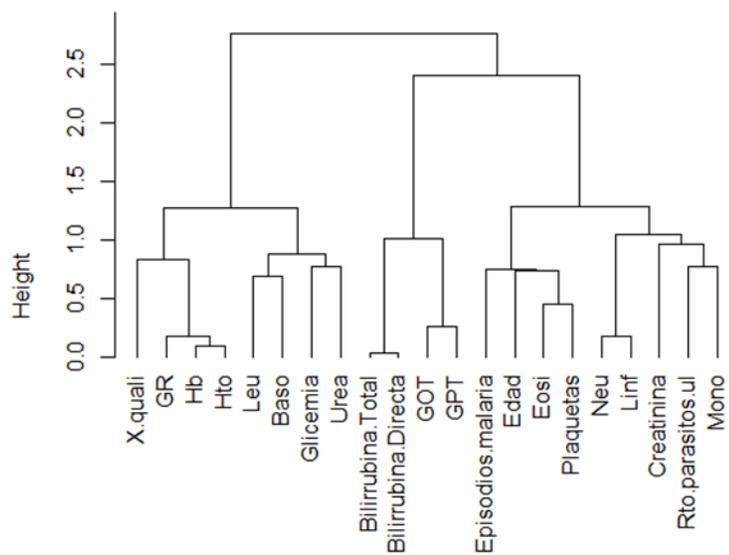
En el grupo de pacientes con malaria complicada se evidenció una correlación positiva y simultanea entre la bilirrubina total, bilirrubina directa, AST y ALT, y a su vez estas mismas variables se asocian de manera negativa con la edad, episodios previos de malaria, recuento de plaquetas y eosinófilos. Este análisis muestra que las personas que han sufrido más episodios

de malaria tienen menos síntomas que las personas con menos episodios padecidos de la enfermedad. En pacientes con malaria severa, es evidente una correlación positiva entre la hemoglobina, el hematocrito, los glóbulos rojos, los leucocitos y los basófilos, correlación no observada en pacientes con malaria no complicada. Estos parámetros podrían ser un marcador esencial de una posible complicación (Figura 2.3). Cada ACP se acompaña de un dendograma que permite visualizar de forma más clara las interacciones entre las variables.

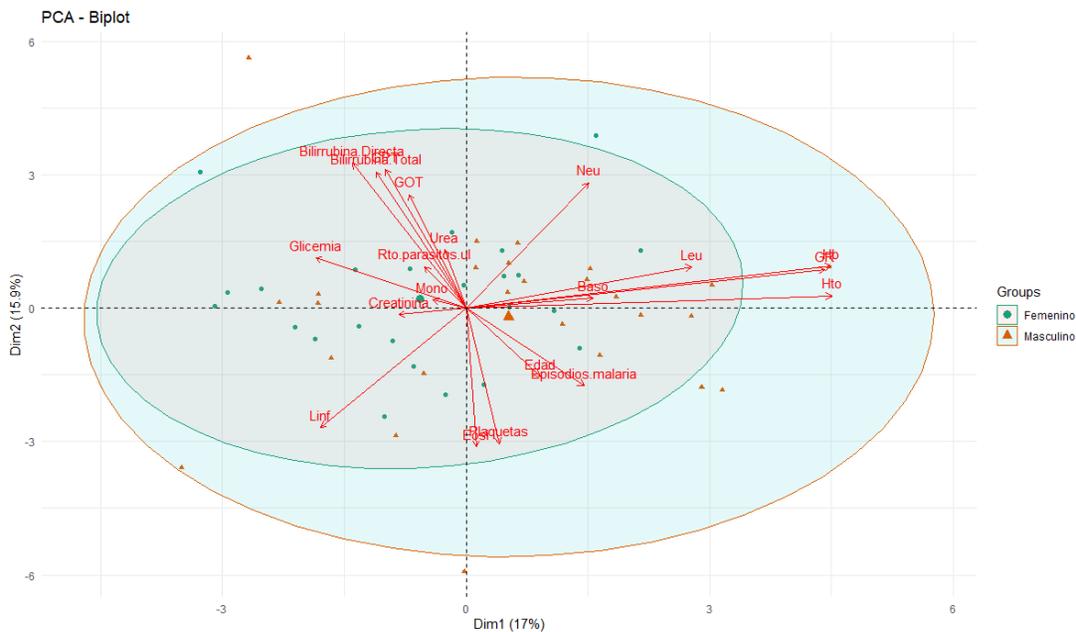
A) Malaria no complicada



Cluster Dendrogram



B) Malaria complicada



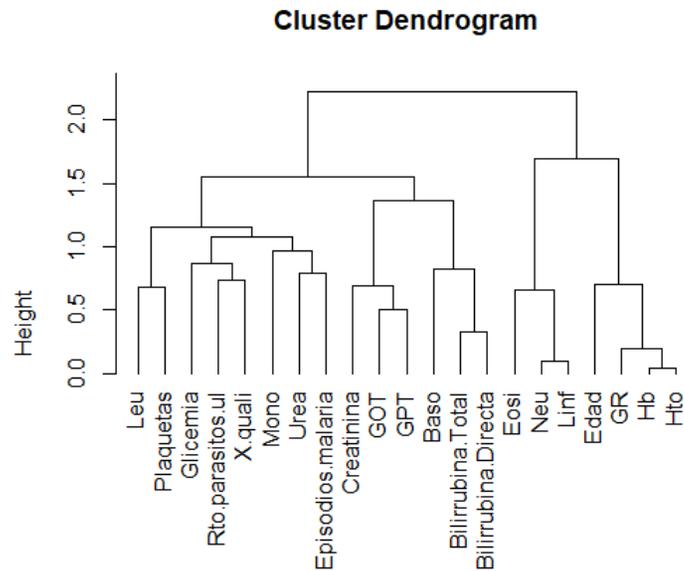


Figura 2.3 Análisis de la relación de variables epidemiológicas, hematológicas y bioquímicas por grupos de estudio A) Pacientes con malaria no complicada, B) Pacientes con malaria complicada.

2.5 DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluaron las características clínicas y epidemiológicas de pacientes diagnosticados con malaria complicada y no complicada por *P. vivax* en una zona endémica en el norte de Colombia (Figura 2.1, Tabla 2.2 - 2.3). A pesar de existir una política mundial liderada por OMS encaminada a la reducción y eliminación de áreas de transmisión de la malaria, en América del Sur países como Brasil, Venezuela y Colombia ha aumentado el reporte de casos en los últimos años (WHO, 2017). Actualmente, se reconoce que *P. vivax* es una especie que puede causar malaria complicada e incluso puede provocar la muerte; sin embargo, no se dispone de criterios de complicación específicos para esta especie, la OMS indica que se deben aplicar los parámetros descritos para complicación en malaria por *P. falciparum*, a pesar de conocer que son especies con comportamientos biológicos y epidemiológicos diferentes. En Colombia, los criterios de complicación para los pacientes con malaria contemplan los parámetros establecidos por la OMS, pero incluyen algunas variaciones de acuerdo con experiencias propias del país; sin embargo, estos son utilizados indistintamente de la especie.

Medidas históricas de protección contra la picadura de mosquitos, como el uso de angeo en las ventanas, uso de repelentes, no está siendo utilizadas por la población, el uso de toldillo fue

reportado por un poco más de la mitad de la población, siendo similar en los dos grupos de pacientes con malaria, incluso el grupo de controles sanos reporta un menor porcentaje de uso con respecto a las personas que padecían la enfermedad, por otra parte se evidenció un desconocimiento con respecto a las re-impregnaciones de los toldillos, muy poca personas reconocen que se ha re-impregnado el toldillo nuevamente, otros indican no tener conocimiento o no haber realizado la re-impregnación. Por otra parte, se observa que a pesar de que en el peridomicilio reportan la presencia de cuerpos de agua y cultivos alrededor de las viviendas, la frecuencia de fumigaciones alrededor de las viviendas es muy baja en los tres grupos de estudio (Tabla 2.2); con esta información es evidente que no hay adherencia a las medidas convencionales para evitar las picaduras de mosquitos, como uso de angeos repelentes, toldillos, programas de fumigación, situación similar en los tres grupos de estudio. El estudio de Chukwuocha y colaboradores, evidenciaron una baja adherencia al uso de toldillos como estrategia de prevención, atribuida a la percepción del calor, humedad que genera su uso y la desconfianza frente a los productos químicos utilizados para impregnar estas mallas (Chukwuocha et al., 2010). La publicación de Pulford y colaboradores, es una revisión de varios estudios con respecto al uso de los mosquiteros, encuentra que la mayoría de las personas manifiesta no usar el mosquitero por el calor que provoca, otra de las razones en la baja percepción en la densidad de insectos, e incluso que en algunos lugares los mosquiteros eran utilizados para otras actividades como la pesca (Pulford, Hetzel, Bryant, Siba, & Mueller, 2011)

La revisión sistemática de Rahimi BA et al. sobre el paludismo grave por *P. vivax* refleja la variabilidad clínica de las infecciones por esta especie respecto a las condiciones geográficas, la endemicidad e incluso el subregistro de casos complicados de paludismo por *P. vivax* (Rahimi et al., 2014). Las razones de la variabilidad clínica aún se desconocen; se requieren estudios para determinar la influencia de los factores genéticos del parásito, del huésped y factores ecoepidemiológicos en la forma clínica de la enfermedad.

La parasitemia presentó una mediana de 2.400 parásitos/ mm³ independientemente de la categoría clínica, sexo o edad (Tabla 2.4), el conteo fue inferior a lo reportado en otras áreas endémicas donde la mediana está frecuentemente alrededor de 10.000 parásitos (Arévalo-Herrera et al., 2017; Baird, 2013). En el grupo de pacientes con malaria complicada ingresaron dos pacientes con parasitemias mayores a 50,000 parásitos/mm³, el resto de pacientes de este grupo pese a no tener recuentos altos de parásitos presentaron criterios de complicación hematológicos, renales y hepáticos, no se encontró correlación entre la concentración de parásitos y las diferentes complicaciones que presentaron los pacientes durante la infección por

P. vivax, el criterio de hospitalización fue una variable que no se asoció con los criterios de complicación, menos de la mitad de los pacientes con malaria complicada se encontraban hospitalizados en el momento de su inclusión en el estudio.

Trombocitopenia, hipoglicemia, disfunción hepática y renal fueron las manifestaciones clínicas prevalentes en el grupo de pacientes con malaria complicada, no se observaron casos de alteraciones pulmonares o cerebrales (Tabla 2.5). Los compromisos hematológicos encontrados en este estudio fueron anemia y trombocitopenia. La anemia es una de las alteraciones más frecuentes en infecciones *P. vivax*, la anemia severa es considerada una complicación que afecta principalmente a adolescentes y mujeres en embarazo (Castro-Gomes et al., 2014). En este estudio el 33,9 % de los pacientes con malaria presentaron anemia moderada o leve, el análisis de esta variable dentro de cada grupo clínico indicó que el 38% de los pacientes con malaria complicada presentaron anemia, comparado con el 30,4% de los pacientes con malaria no complicada, en el grupo de malaria complicada un solo paciente presentó anemia severa, lo que correspondió al 2% dentro de este grupo clínico (Tabla 2.4), el comportamiento de esta variable fue similar a los descrito por otros autores para zonas endémicas de *P. vivax* en América Latina (Arevalo-Herrera et al., 2015); sin embargo, esta variable presenta variaciones que han sido asociadas con otros factores como la distribución geográfica y la edad, entre otras (Douglas et al., 2012). La aparición de anemia durante la infección por este protozoo no es del todo entendida, la limitada capacidad de esta especie para parasitar glóbulos rojos de todas las edades, pone en manifiesto que la destrucción de las células parasitadas no es el reflejo de la anemia resultante en el hospedero, lo que ha llevado a plantear que existen otros mecanismos implicados que median esta alteración, una de las hipótesis más sólidas es la generación de autoanticuerpos contra proteínas de la membrana del glóbulo rojo, que median la destrucción de glóbulos rojos parasitados y no parasitados (Rivera-Correa, Pardo-Ruge, Gonzalez, & Rodriguez, 2017; Rivera-Correa et al., 2020).

La trombocitopenia se presentó en el 78,3% (n=83/106) de las personas diagnosticadas con malaria, los porcentajes de trombocitopenia en pacientes con malaria por *P. falciparum* y *P. vivax* presentan variaciones entre el 40% - 78%, en la mayoría de los casos presentando una baja asociación con sangrados (Gupta, Bansal, Jain, & Sahare, 2013). El porcentaje de trombocitopenia fue mayor que lo reportado previamente por otros autores para zonas endémicas de Sur América en pacientes con malaria (Martínez-Salazar & Tobón-Castaño, 2014), pero similar a los estudios realizados en la India que reporta 88% de trombocitopenia en infecciones por esta especie (Saravu, Docherla, Vasudev, & Shastri, 2011).

En este estudio el 90% de los pacientes con malaria complicada presento trombocitopenia, donde el 54% de los individuos padeció de trombocitopenia severa ($n=27/50$), a su vez, el 62,9 % ($n=17/27$) de las personas con malaria complicada y trombocitopenia severa presentaban malaria por primera vez, situación que ha sido reportada previamente en pacientes con malaria por *P. falciparum* sin historia previa de infección que presentaron las concentraciones más bajas de plaquetas (Lampah et al., 2014). En este estudio la concentración de plaquetas presentó una correlación negativa con la parasitemia ($r -0.2223$, $p 0.0220$) (Figura 2.3) y fue el hallazgo más frecuente en los pacientes con disfunción hepática, similar a lo reportado por otros investigadores (Fazil et al., 2013; Martínez-Salazar & Tobón-Castaño, 2014). El mecanismo implicado en la trombocitopenia en la malaria no es claro, existe una diversidad de hipótesis que incluyen secuestro de plaquetas en el bazo durante la remoción de células parasitadas, autoagregación plaquetaria, circulación de anticuerpos anti-plaquetas y alteración en la síntesis de tromboxano derivada de la acción de citoquinas (M. V. G. Lacerda, Mourão, Coelho, & Santos, 2011; Punnath et al., 2019).

La hipoglicemia es una manifestación frecuente en infecciones por *Plasmodium*, en este estudio el 48% de los pacientes con malaria complicada presentó esta condición (Tabla 2.5), la prevalencia de hipoglicemia asociada a malaria varía entre países, en rangos entre el 6 al 50% en *P. vivax* (Rahimi et al., 2014). En *P. falciparum* la prevalencia puede incrementar hasta en un 70% (Dhangadamajhi, Panigrahi, Roy, & Tripathy, 2019); adicionalmente los porcentajes pueden variar dependiendo de la edad, siendo más frecuente en niños que en adultos, excluyendo a la mujeres embarazadas cuya condición fisiológica tiene un factor predisponente adicional. Algunos medicamentos como la quinina, afectan el metabolismo de la glucosa por su capacidad para estimular la producción de insulina (Bartoloni & Zammarchi, 2012), favoreciendo la hipoglicemia en los pacientes, este es uno de los principales mecanismos que explican esta condición.

Por otra parte, el consumo de glucosa durante infecciones severas por *Plasmodium* parece ser mayor con respecto a los cursos clínicos no complicados de la enfermedad, alteraciones en la producción de la glucosa y ayuno prolongado son factores desencadenantes de hipoglicemia. La concentración disminuida de glucosa en sangre está asociada con un mal pronóstico en malaria, principalmente en niños, donde se presentan alteraciones y manifestaciones neurológicas que pueden desencadenar en la muerte (Madrid, Lanaspá, Maculve, & Bassat, 2015).

El daño renal agudo por *P. vivax* es reportado en niños y adultos, estudios histológicos indican el hallazgo de microangiopatía trombótica, caracterizada por lesión endotelial, oclusión microvascular por plaquetas o trombos de fibrina e isquemia glomerular, en otros casos se reporta la presencia de focos de necrosis de localización cortical o glomerular (Sinha et al., 2013). El mecanismo patológico que conlleva al daño en el riñón no es claro; ; sin embargo, es conocida que las lesiones vasculares pueden ser desencadenadas por microorganismos, toxinas y medicamentos, que conllevan a un desbalance en la producción de moléculas del complemento, adhesión endotelial y citoquinas, siendo reconocido que en las infecciones por *P. vivax* se observa una mayor producción de moléculas que median la respuesta inmunológica con respecto a lo que se observa en una malaria por *P. falciparum*, por lo que se estima que desbalance de la respuesta inflamatoria juega un papel fundamental en la alteración de este órgano (Yeo et al., 2010).

Los casos de disfunción renal asociados a *P. vivax* oscilan alrededor del 5 -20% (Naqvi, 2015), en el presente estudio la disfunción renal fue causa de malaria complicada en el 30% de los pacientes de este grupo, la concentración de creatinina transaminasas elevados se presentó en el 60% de los casos, de este porcentaje el 28,5% presentaba adicionalmente un aumento en la bilirrubina total. Algunos estudios reportan mayor frecuencia de alteraciones renales en pacientes adultos, ; sin embargo, en este estudio no se encontró una diferencia entre la concentración sérica de creatinina entre el rango de edad o el recuento de parásitos en este grupo (Miranda-Arboleda, Martínez-Salazar, & Tobón-Castano, 2014). En Brasil en un estudio con características similares al nuestro, consideraron una disfunción renal para aquellos pacientes que presentaron valores de creatinina superiores a 1,3 mg/dL, este grupo el total de los pacientes requirió hospitalización para el manejo terapéutico (L. A. B. Cruz, M. Barral-Netto, & B. B. Andrade, 2018); en nuestro estudio 71,5% de los pacientes con elevación de la creatinina se encontraban hospitalizados (dato no mostrado). Otro factor que puede producir un aumento sérico de la creatinina es la hemólisis, la cual con lleva a un aumento de la bilirrubina total; sin embargo, no en todos los estudios de disfunción renal por *P. vivax* se observa un aumento de creatinina y bilirrubina total al mismo tiempo, u otros parámetros como la anemia severa e incremento del BUN, como se observó en este estudio (Figura 2.3). Existen discrepancias en el valor de referencia de creatinina relacionado con alteración renal en infecciones por malaria, lo que se aprecia diversidad de parámetros encontrados en las publicaciones; algunos autores plantean que al tomar como referencia los parámetros de la OMS, que son los altos, podría conllevar a identificar de manera tardía las alteraciones renales (Miranda-Arboleda et al., 2014).

En el grupo de malaria complicada el 38% de los pacientes presentaron concentraciones aumentadas de Alanino aminotransferasa (ALT) y el 30% de Aspartato aminotransferasa (AST), solo el 6% presentó un aumento de 2 veces con respecto al valor normal de estas enzimas (40 U/L). Durante una infección por *Plasmodium* el aumento paralelo de bilirrubina y transaminasas es considerado como indicativo de disfunción hepática, situación que se presentó en el 10% de los pacientes de este grupo, quienes adicionalmente presentaron otras alteraciones como trombocitopenia severa (excepto un caso con trombocitopenia moderada), aumento en los niveles de creatinina, y un caso presento un recuento de 42.000 parásitos/mm³. Los valores reportados de estas moléculas en sangre relacionados con disfunción o daño hepático en infecciones por *Plasmodium spp.* presentan variaciones; algunos autores incluso consideran valores para categorizar un compromiso leve o grave, este último rango tiene concentraciones de > 3mg/dL para bilirrubina y un aumento de tres veces el valor para cada transaminasa (~ > 120 u/L); sin embargo, estas cifras son elevadas, y con baja sensibilidad para la predicción de una alteración en el órgano.

En Colombia la Guía de Atención Clínica Integral del paciente con malaria, señala que una concentración de 1,5 mg/dL de bilirrubina y un aumento de las transaminasas > a 40 U/L son indicativos de daño hepático. El compromiso hepático es reportado en menor medida para la infecciones causadas por *P. vivax*, que cursa con una leve alteración de las concentraciones de bilirrubina y transaminasas, y en algunos casos acompañados de ictericia (Shwetha, 2014), similar a lo que se encontró en nuestra población de estudio (INS, 2010b).

La literatura disponible acerca de los mecanismos derivados de la infección por *P. vivax* origina una alteración o disfunción hepática es escasa. El aumento de la concentración de las transaminasas y bilirrubinas en la sangre está relacionado con ciclo hepático del parásito, que involucra la ruptura de células de este órgano y liberación de estas moléculas a la circulación en el caso de las transaminasas, con la consecuente alteración de las funciones hepáticas, lo que puede con llevar a perdida de la capacidad de este órgano en la excreción de bilirrubina que se refleja en el aumento de esta sustancia en sangre (Poles et al., 2012). Las alteraciones hepáticas asociadas a *P. falciparum* son más estudiadas e involucran mecanismos patogénicos como la citoadherencia de células parasitadas, obstrucción de la microvasculatura y hemólisis de los glóbulos rojos (Fazil et al., 2013).

2.6 CONCLUSIONES

La trombocitopenia, la hipoglicemia y la disfunción hepática y renal fueron las complicaciones más frecuentes observadas en la malaria por *P. vivax* para la población de estudio. La concentración de hemoglobina y el recuento de parásitos fueron similares en las personas con malaria, independientemente de su estado clínico. En sus diferentes grados, la trombocitopenia fue el hallazgo más frecuente en los pacientes con malaria y su gravedad se relacionó con un menor número de episodios previos de la enfermedad por individuo. Es necesario indagar más sobre los mecanismos biológicos que median la disminución de plaquetas y su relación con un compromiso en diferentes órganos durante la malaria por *P. vivax*.

Es necesario revisar los criterios de complicación de la malaria por *Plasmodium vivax* en normativas nacionales e internacionales y ajustarlos de acuerdo con el contexto epidemiológico del país; pues este último ejerce influencias en la biología del parásito y en la relación hospedero – parásito. Es fundamental, contar con herramientas de laboratorio, como la determinación de parámetros clínicos, que permitan identificar de manera temprana pacientes en riesgo de desarrollar complicaciones; idealmente a través estudios de seguimiento clínico, esto favorecería la calidad de vida del paciente y la orientación de los recursos económicos en salud.

Bibliografía

- Andrade, B. B., Rocha, B. C., Reis-Filho, A., Camargo, L. M. A., Tadei, W. P., Moreira, L. A., . . . Barral-Netto, M. (2009). Anti-Anopheles darlingi saliva antibodies as marker of *Plasmodium vivax* infection and clinical immunity in the Brazilian Amazon. *Malaria journal*, 8, 121-121. doi:10.1186/1475-2875-8-121
- Arevalo-Herrera, M., Lopez-Perez, M., Medina, L., Moreno, A., Gutierrez, J. B., & Herrera, S. (2015). Clinical profile of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections in low and unstable malaria transmission settings of Colombia. *Malar J*, 14, 154. doi:10.1186/s12936-015-0678-3
- Arévalo-Herrera, M., Rengifo, L., Lopez-Perez, M., Arce-Plata, M. I., García, J., & Herrera, S. (2017). Complicated malaria in children and adults from three settings of the Colombian Pacific Coast: a prospective study. *PloS one*, 12(9), e0185435.
- Baird, J. K. (2013). Evidence and Implications of Mortality Associated with Acute *Plasmodium vivax*; Malaria. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(1), 36. doi:10.1128/CMR.00074-12
- Barber, B. E., William, T., Grigg, M. J., Parameswaran, U., Piera, K. A., Price, R. N., . . . Anstey, N. M. (2015). Parasite biomass-related inflammation, endothelial activation, microvascular dysfunction and disease severity in vivax malaria. *PLoS pathogens*, 11(1), e1004558-e1004558. doi:10.1371/journal.ppat.1004558
- Bartoloni, A., & Zammarchi, L. (2012). Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*, 4(1).
- Castro-Gomes, T., Mourão, L. C., Melo, G. C., Monteiro, W. M., Lacerda, M. V., & Braga, É. M. (2014). Potential immune mechanisms associated with anemia in *Plasmodium vivax* malaria: a puzzling question. *Infection and immunity*, IAI. 01972-01914.
- Cruz, L. A. B., Barral-Netto, M., & Andrade, B. B. (2018). Distinct inflammatory profile underlies pathological increases in creatinine levels associated with *Plasmodium vivax* malaria clinical severity. *PLoS neglected tropical diseases*, 12(3), e0006306-e0006306. doi:10.1371/journal.pntd.0006306
- Chukwuocha, U. M., Dozie, I., Onwuliri, C., Ukaga, C., Nwoke, B., Nwankwo, B., . . . Udujih, O. (2010). Perceptions on the use of insecticide treated nets in parts of the Imo River Basin, Nigeria: implications for preventing malaria in pregnancy. *African journal of reproductive health*, 14(1).
- Dayananda, K. K., Achur, R. N., & Gowda, D. C. (2018). Epidemiology, drug resistance, and pathophysiology of *Plasmodium vivax* malaria. *Journal of vector borne diseases*, 55(1), 1.
- Dhangadamajhi, G., Panigrahi, S., Roy, S., & Tripathy, S. (2019). Effect of *Plasmodium falciparum* infection on blood parameters and their association with clinical severity in adults of Odisha, India. *Acta tropica*, 190, 1-8.
- Douglas, N. M., Anstey, N. M., Buffet, P. A., Poespoprodjo, J. R., Yeo, T. W., White, N. J., & Price, R. N. (2012). The anaemia of *Plasmodium vivax* malaria. *Malaria journal*, 11(1), 135.
- Fazil, A., Vernekar, P. V., Geriani, D., Pant, S., Senthilkumaran, S., Anwar, N., . . . Menezes, R. G. (2013). Clinical profile and complication of malaria hepatopathy.

- Journal of Infection and Public Health*, 6(5), 383-388.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.jiph.2013.04.003>
- Howes, R. E., Battle, K. E., Mendis, K. N., Smith, D. L., Cibulskis, R. E., Baird, J. K., & Hay, S. I. (2016). Global epidemiology of *Plasmodium vivax*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 95(6_Suppl), 15-34.
- INS. (2010). Guía para Atención Clínica Integral del paciente con malaria. Bogotá.
- INS. (2020). *Semana epidemiológica 53, 27 de dic. de 2020 al 2 de enero de 2021*. Retrieved from [https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2020 Boletin epidemiologico semana 53.pdf](https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2020%20Boletin%20epidemiologico%20semana%2053.pdf)
- Kumar, B., Mitra, J. K., Rao, R., Kumar, A., Kumar, M., & Kumar, A. (2017). A Study on Incidence, Clinical Profile and Prognosis of *Falciparum* Malaria in Jharkhand. *International Journal of Contemporary Medical Research*, 4(7).
- Lacerda, M. V., Fragoso, S. C., Alecrim, M. G., Alexandre, M. A., Magalhaes, B. M., Siqueira, A. M., . . . Bassat, Q. (2012). Postmortem characterization of patients with clinical diagnosis of *Plasmodium vivax* malaria: to what extent does this parasite kill? *Clin Infect Dis*, 55(8), e67-74. doi:10.1093/cid/cis615
- Lacerda, M. V. G., Mourão, M. P. G., Coelho, H. C. C., & Santos, J. B. (2011). Thrombocytopenia in malaria: who cares? *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106, 52-63.
- Lampah, D. A., Yeo, T. W., Malloy, M., Kenangalem, E., Douglas, N. M., Ronaldo, D., . . . Price, R. N. (2014). Severe Malarial Thrombocytopenia: A Risk Factor for Mortality in Papua, Indonesia. *The Journal of infectious diseases*, 211(4), 623-634. doi:10.1093/infdis/jiu487
- Madrid, L., Lanaspá, M., Maculuvé, S. A., & Bassat, Q. (2015). Malaria-associated hypoglycaemia in children. *Expert review of anti-infective therapy*, 13(2), 267-277.
- Martínez-Salazar, E. L., & Tobón-Castaño, A. (2014). Platelet profile is associated with clinical complications in patients with vivax and *falciparum* malaria in Colombia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 47, 341-349.
- Milner, D. A., Jr. (2018). Malaria Pathogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 8(1), a025569. doi:10.1101/cshperspect.a025569
- Miranda-Arboleda, A. F., Martínez-Salazar, E. L., & Tobón-Castano, A. (2014). El riñón en la malaria: de la patogénesis a las manifestaciones clínicas. *Infectio*, 18(3), 120-128.
- Mukhtar, M. M., Eisawi, O. A., Amanfo, S. A., Elamin, E. M., Imam, Z. S., Osman, F. M., & Hamed, M. E. (2019). *Plasmodium vivax* cerebral malaria in an adult patient in Sudan. *Malaria journal*, 18(1), 1-3.
- Naqvi, R. (2015). *Plasmodium vivax* causing acute kidney injury: a foe less addressed. *Pakistan journal of medical sciences*, 31(6), 1472.
- Pinzon, M. A., Pineda, J. C., Rosso, F., Shinchi, M., & Bonilla-Abadía, F. (2013). *Plasmodium vivax* cerebral malaria complicated with venous sinus thrombosis in Colombia. *Asian Pac J Trop Med*, 6(5), 413-415. doi:10.1016/s1995-7645(13)60050-4
- Poles, N., Virga, E., Variego, M., Arosio, A., Baldomá, F., Siccardi, M., . . . Cera, D. (2012). Ictericia y colestasis.
- Pulford, J., Hetzel, M. W., Bryant, M., Siba, P. M., & Mueller, I. (2011). Reported reasons for not using a mosquito net when one is available: a review of the published literature. *Malaria journal*, 10(1), 83. doi:10.1186/1475-2875-10-83

- Punnath, K., Dayanand, K. K., Chandrashekar, V. N., Achur, R. N., Kakkilaya, S. B., Ghosh, S. K., . . . Gowda, D. (2019). Association between Inflammatory Cytokine Levels and Thrombocytopenia during *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* Infections in South-Western Coastal Region of India. *Malaria research and treatment*, 2019.
- Rahimi, B. A., Thakkinstian, A., White, N. J., Sirivichayakul, C., Dondorp, A. M., & Chokejindachai, W. (2014). Severe vivax malaria: a systematic review and meta-analysis of clinical studies since 1900. *Malaria journal*, 13(1), 481. doi:10.1186/1475-2875-13-481
- Rivera-Correa, J., Conroy, A. L., Opoka, R. O., Batte, A., Namazzi, R., Ouma, B., . . . Rodriguez, A. (2019). Autoantibody levels are associated with acute kidney injury, anemia and post-discharge morbidity and mortality in Ugandan children with severe malaria. *Scientific Reports*, 9(1), 14940. doi:10.1038/s41598-019-51426-z
- Rivera-Correa, J., Pardo-Ruge, M., Gonzalez, S., & Rodriguez, A. (2017). Autoreactive T-bet+ B-cells promote pathological anemia during infection: Am Assoc Immunol.
- Rivera-Correa, J., Yasnot-Acosta, M. F., Tovar, N. C., Velasco-Pareja, M. C., Easton, A., & Rodriguez, A. (2020). Atypical memory B-cells and autoantibodies correlate with anemia during *Plasmodium vivax* complicated infections. *PLoS neglected tropical diseases*, 14(7), e0008466.
- Rodríguez, J. C. P., Uribe, G. Á., Araújo, R. M., Narváez, P. C., & Valencia, S. H. (2011). Epidemiology and control of malaria in Colombia. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106 Suppl 1(Suppl 1), 114-122.
- Sarkar, S., & Bhattacharya, P. (2008). Cerebral malaria caused by *Plasmodium vivax* in adult subjects. *Indian J Crit Care Med*, 12(4), 204-205. doi:10.4103/0972-5229.45084
- Shwetha, M. (2014). Correlation of bilirubin with liver enzymes in patients of vivax malaria. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*, 3(60), 13402-13407.
- Sinha, A., Singh, G., Bhat, A. S., Mohapatra, S., Gulati, A., Hari, P., . . . Bagga, A. (2013). Thrombotic microangiopathy and acute kidney injury following vivax malaria. *Clinical and experimental nephrology*, 17(1), 66-72.
- Valecha, N., Pinto, R. G., Turner, G. D., Kumar, A., Rodrigues, S., Dubhashi, N. G., . . . Baird, J. K. (2009). Histopathology of fatal respiratory distress caused by *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg*, 81(5), 758-762. doi:10.4269/ajtmh.2009.09-0348
- Wassmer, S. C., Taylor, T. E., Rathod, P. K., Mishra, S. K., Mohanty, S., Arevalo-Herrera, M., . . . Smith, J. D. (2015). Investigating the Pathogenesis of Severe Malaria: A Multidisciplinary and Cross-Geographical Approach. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 93(3 Suppl), 42-56. doi:10.4269/ajtmh.14-0841
- WHO. (2015). *Guidelines for the treatment of malaria*: World Health Organization.
- WHO. (2017). *World malaria report 2017*. Geneva: World Health Organization. Retrieved from <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/259492/1/9789241565523-eng.pdf?ua=1>
- WHO. (2019). World malaria report 2019.
- Yeo, T. W., Lampah, D. A., Tjitra, E., Piera, K., Gitawati, R., Kenangalem, E., . . . Anstey, N. M. (2010). Greater endothelial activation, Weibel-Palade body release

and host inflammatory response to *Plasmodium vivax*, compared with *Plasmodium falciparum*: a prospective study in Papua, Indonesia. *The Journal of infectious diseases*, 202(1), 109-112.

CAPITULO III

EFFECTO DE LA INFECCIÓN DE *P. VIVAX* SOBRE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE CITOQUINAS DE PERFIL DE MONOCITOS, TH1 Y TREG

3.1 RESUMEN

3.1.1 introducción

Las citoquinas y quimiocinas son moléculas de la respuesta inmune con diversas funciones, entre las cuales está la inflamación y la regulación inmunitaria. En las infecciones por *Plasmodium vivax* la producción descontrolada de estas moléculas es postulada como un mecanismo inmunopatogénico de la enfermedad. El objetivo de este capítulo fue evaluar los efectos de la infección de *P. vivax* sobre la concentración plasmática de citoquinas de perfil de monocitos, Th1 y Treg, y su relación con las formas clínicas de la malaria.

3.1.2 Métodos

A la totalidad del grupo de estudio, pacientes con malaria complicado (n = 50), malaria no complicada (n = 56) por *P. vivax* y controles sanos (n = 50) se cuantificó la concentración plasmática de IL-6, IL-1 β del perfil de monocitos, IL-2, TNF- α , IFN- γ del perfil Th1 y IL-10, TGF- β 1 activo del perfil Treg, a través de un inmunoensayo multiplex con perlas, con lectura por citometría de flujo. Se realizó un análisis descriptivo de las variables, ilustrando los resultados mediante gráficos de cajas, para variables marginales, se establecieron comparaciones entre grupos utilizando la prueba de Kruskal-Wallis y test de Mann-Whitney de acuerdo con el número de grupos a analizar. Para evaluar relación entre variables se utilizó la prueba no paramétrica de Spearman al interior de los grupos. El valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo. Para determinar la influencia de las citoquinas y quimiocinas en las formas clínicas derivadas de la infección por *P. vivax*, se compararon diferentes modelos estadísticos de regresión logística. Procedimientos realizados con el Software estadístico R, versión 4.0.

3.1.3 Resultados

Las citoquinas con mayor concentración plasmática en pacientes con malaria fueron IL-10 y IL-6; mientras que en el grupo control predominó el TGF- β 1. Las citoquinas IL-6, IL-10 e IFN- γ presentaron concentraciones significativamente diferentes entre el grupo de pacientes con

malaria complicada y no complicada. Se observa una respuesta proinflamatoria aumentada en pacientes con malaria complicada. Los con pacientes trombocitopenia severa presentaron mayor concentración de IL-6, IL-10 e IFN γ . La disfunción renal se relacionó con el aumento de IL-2, IL-1 β , y la alteración hepática con IL-6 e IFN γ . La IL-6 mostró la mejor capacidad predictora de complicación en infección por *P. vivax* con un AUC de 0.732.

3.1.4 Conclusiones

La concentración de IL-6, IL-10 y IFN- γ marca un perfil diferenciador entre pacientes complicados y no complicados en la malaria por *P. vivax*, las altas concentraciones de estas citoquinas en pacientes complicados sugieren un papel influyente en el desarrollo de complicaciones. El TGF- β puede estar relacionado con papel inmunomodulador protector contra formas clínicas complicadas en las infecciones por *P. vivax*, pacientes con malaria no complicada, y controles sanos presentan una mayor concentración de esta citoquina con respecto a pacientes complicados. La IL-6 mostró potencial para pronosticar el desarrollo de complicaciones en pacientes con infección por *P. vivax*.

3.2 INTRODUCCIÓN

La respuesta inmunológica que se desencadena frente a una infección por *Plasmodium* es el resultado de una interacción multifactorial, donde parte de su complejidad depende de las diferentes formas del parásito, la alta variación antigénica y el estado inmunológico de hospedero (Hafalla et al., 2011). La respuesta inmune frente a *Plasmodium* comienza en una fase temprana de la infección, la migración de los esporozoítos inoculados en la piel hacia el hígado desencadena el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (Pathogen-associated molecular patterns - PAMPs), y patrones moleculares asociados a la lesión (Damage-associated molecular patterns - DAMPs) por macrófagos, células dendríticas, NK y NKT que secretan citoquinas proinflamatorias tipo TNF, IL-1 β e IFN tipo I, entre otras (Gazzinelli et al., 2014; Hafalla et al., 2011; Krishnegowda et al., 2005). Por otro lado, algunos esporozoítos inoculados en la dermis son arrastrados hacia los ganglios linfáticos más próximos donde pueden ser degradados por DCs residentes; lo que contribuye a la activación linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺ y la consecuente liberación de citoquinas proinflamatorias (Amino et al., 2006; Cockburn & Zavala, 2016).

Durante la invasión a los hepatocitos, el parásito induce la expresión de genes que codifican para IFN tipo I, mecanismo que atrae células NK y NKT, que secretan IFN γ , óxido nítrico y otros componentes tóxicos que contribuyen a la eliminación del parásito (Miller et al., 2014). Evidencias experimentales indican que los glóbulos rojos infectados son reconocidos por células dendríticas esplénicas, quienes realizan presentación a linfocitos CD4⁺, con la posterior liberación de IL-12, IFN- γ , TNF, IL-21 (Roetynck et al., 2013). IFN y TNF están involucrados en la inducción de la producción de especies reactivas de nitrógeno y del oxígeno contribuyendo a la reducción de la parasitemia; adicionalmente, el IFN- γ lidera otras funciones como la activación de macrófagos y células dendríticas, producción de IL-12 que favorece la diferenciación de la subpoblación Th1 y el cambio de isotipo en los linfocitos B conllevando a su activación (McCall & Sauerwein, 2010).

La liberación de citoquinas por las células efectoras resulta en una cascada de reacciones sinérgicas entre la respuesta adaptativa y celular ampliando la respuesta inmune con el objetivo de controlar el proceso infeccioso (Nasr et al., 2014; Villegas-Mendez et al., 2012); ; sin embargo, existen evidencias que sugieren que durante la infección por *P. vivax* se produce un desbalance en la producción de moléculas de la respuesta inmune como citoquinas y quimiocinas, generando una exacerbada respuesta proinflamatoria, la cual ha sido asociada con complicaciones hematológicas, renales, hepáticas y cerebrales observadas en la malaria

por *P. vivax*. (B. B. Andrade et al., 2010; Dunst, Kamena, & Matuschewski, 2017b).

Algunos estudios a cerca del comportamiento de citoquinas en las infecciones por *P. vivax*, han encontrado altas concentraciones de IL-6, IL-10 y TGF- β , lo cual ha sido asociado con trombocitopenia (Park et al., 2003; Punnath et al., 2019). Concentraciones elevadas de IL-10 con mayores recuentos parasitarios (Hojo-Souza et al., 2017), IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ se encuentran en mayor concentración en pacientes con disfunción hepática (Yeom et al., 2003). Se ha documentado una mayor producción de IL-6, IL-10 e IFN- γ en el primer episodio de malaria en comparación de pacientes que han padecido varios episodios de la enfermedad (R. Santos et al., 2020). En la literatura existen algunos datos contradictorios; por ejemplo, un aumento en la concentración de IFN γ y TNF α , y disminución en la IL-10 se ha reportado para paciente con malaria severa (B. B. Andrade et al., 2010). En mujeres embarazadas se encontraron concentraciones elevadas IL-6, IL-1 β , CCL4, CCL2, CXCL10 que padecían infecciones por *P. vivax* con respecto a embarazadas sin infección (Dobaño et al., 2020). Por otra parte, en población joven las concentraciones de TNF se asociaron con disminución en la concentración de hemoglobina (da Silva Ventura et al., 2018).

El objetivo de este capítulo fue evaluar los efectos de la infección de *P. vivax* sobre la concentración plasmática de citoquinas Th1 y Treg, y su relación con las formas clínicas de la malaria, en una región endémica de malaria en el norte de Colombia.

3.3 METÓDOS

3.3.1 Obtención de plasma

Fueron recolectados 10 mL de sangre completa (punción venosa) con tubos que contenía EDTA como anticoagulante, a cada uno de los 156 participantes durante el periodo febril y antes del inicio de tratamiento antimalárico. Los tubos fueron centrifugados durante 8 minutos a 35G (RFC) el plasma fue extraído con pipeta automática en ambiente estéril en una cabina de flujo laminar, alicuotado en tubos estériles de 500 μ l. Las muestras fueron almacenadas a -80° C hasta su procesamiento.

3.3.2 Cuantificación plasmática de citoquinas y quimiocinas

La cuantificación de citoquinas y quimiocinas se realizó partir de plasma utilizando el kit Human Essential Immune Response Panel (13-plex) (Cat. No. 740930) de la casa comercial Biolegend, que determina la concentración de citoquinas relacionadas con perfil de monocitos como IL-1 β y IL-6, Th1 con IL-2, TNF- α , IFN- γ e IL-10, TGF- β 1 activo del perfil Treg. Las muestras fueron descongeladas sobre hielo, y los reactivos fueron atemperados previo al procesamiento, el cual se llevó a cabo de acuerdo con las recomendaciones indicadas por el fabricante. Se prepararon las diluciones de los estándares (Tabla 3.1) y las muestras, cantidades iguales de plasma y perlas fueron incubadas durante 2 horas en agitación constante a 800 rpm en una placa protegida de la luz, posteriormente se realizaron dos lavados de cinco minutos a 306g (RFC) con la solución de lavado, el exceso de líquido fue removido cuidadosamente por inversión de la placa. Posteriormente se realizó la incubación por 60 min en agitación constante a 800 rpm con los anticuerpos secundarios biotinilados protegidos de la luz. La reacción de revelo con Strep-PE, las cantidades de los reactivos fueron igualitarias en todos los pasos, como se describe en el esquema (Figura 3.1). Las muestras fueron montadas por duplicado. La sensibilidad de detección del kit para cada analito se relaciona en la tabla 3.2.

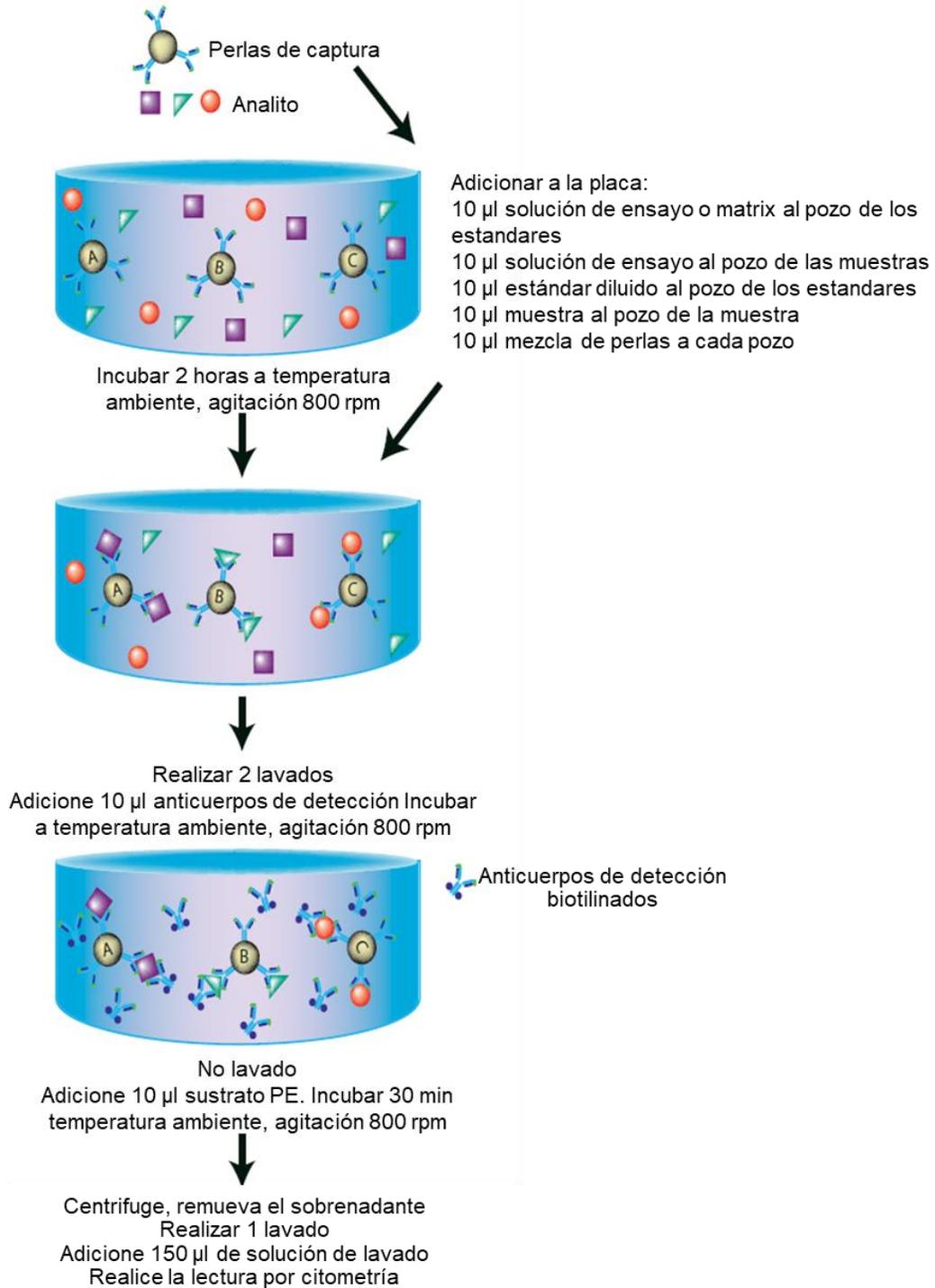


Figura 3.1. Procedimiento para la cuantificación de citoquinas y quimiocinas por perlas magnéticas. Esquema de Tomado y modificado del protocolo del fabricante. Disponible en: <https://www.biolegend.com/en-us/products/legendplex-hu-essential-immune-response-panel-standard-17230?GroupID=GROUP25>

Tabla 3.1. Concentración de los estándares de la curva de calibración

Estándar	Dilución	Concentración final (pg/mL)
C7	-	10,000
C6	1:4	2,500
C5	1:16	625
C4	1:64	156,25
C3	1:256	39,01
C2	1:1024	9,77
C1	1:4096	2,44
C0	blanco	0

Tabla 3.2. Sensibilidad de detección de cada analito en el Kit Human Essential Immune Response Panel (13-plex) catalogo No. 740930

Analito	Sensibilidad en suero (pg/mL)
IL-2	1.53 + 1.20
IL-1β	0.65 + 0.50
TNF-α	0.97 + 0.76
IL-6	0.86 + 1.23
IFN-γ	0.79 + 0.68
IL-10	1.02 + 1.30
TGF- β activo libre	3.06 + 2.82

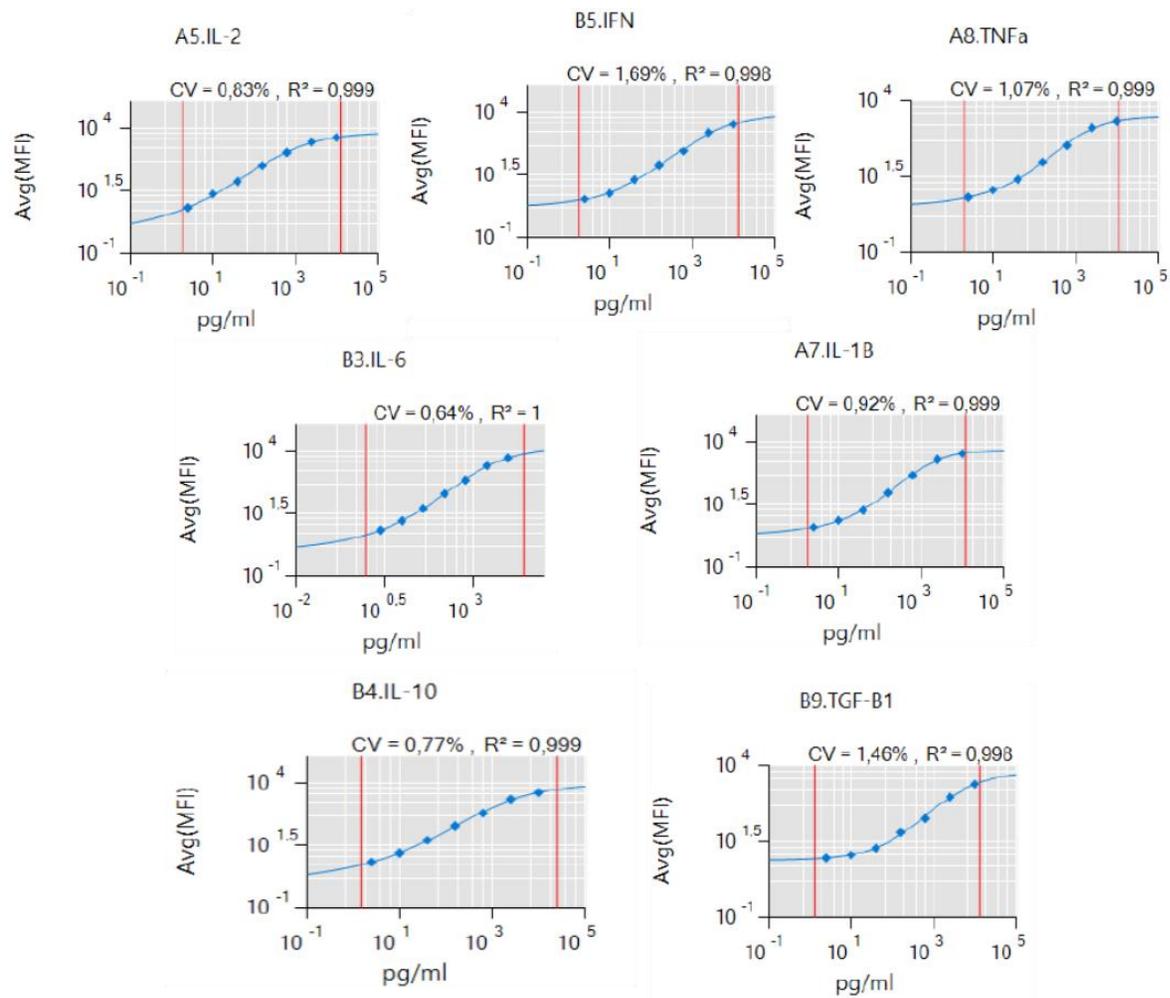


Figura 3.2. Gráficos de las curvas de estándar para las cuantificaciones de citoquinas y quimiocinas

3.3.3 Análisis de datos

La lectura se realizó en un FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), por cada muestra analizada se obtuvo un mínimo de 1500 eventos. Los datos de cuantificación se obtuvieron con Analysis Software Version 8.0. provisto por el fabricante del kit, el cual para cada analito ajusta una curva estándar utilizando algoritmos de ajuste de curvas de regresión logística, la validación de la curva fue realizada con la ubicación de los 7 estándares posicionados sobre la línea de la curva. Estas curvas posteriormente se utilizaron para calcular las concentraciones de cada analito en las muestras problema arrojando como producto la concentración de la molécula en pg/ml.

Para cada variable se hizo un análisis descriptivo, ilustrando los resultados mediante gráficos de cajas, para variables marginales, se establecieron comparaciones entre grupos utilizando la prueba de Kruskal-Wallis y test de Mann-Whitney de acuerdo con el número de grupos a analizar. Se realizaron análisis de curvas ROC (receiver operating characteristic curve). para evaluar la capacidad discriminadora de las citoquinas entre las formas clínicas complicado y no complicado en el curso de la infección por *P. vivax*. El valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo. Para evaluar relación entre variables se utilizó la prueba no paramétrica de Spearman al interior de los grupos. Para el análisis de los datos se utilizó el software R y para la construcción de graficas se utilizó el software GraphPad Prism versión 7.00.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Concentración plasmática de citoquinas del perfil de monocitos, Th1 y Treg en pacientes con malaria por *P. vivax*

Se determinaron las concentraciones plasmáticas de citoquinas de 156 muestras de plasma de pacientes con malaria severa, no complicada y controles sanos. Las moléculas con mayor concentración plasmática del perfil de monocitos fue IL-6, de Th1 el IFN- γ , e IL-10 como citoquina del perfil Treg, esta última fue quien presentó la mayor concentración plasmática de todas las citoquinas evaluadas. La mediana de concentración fue significativamente diferente entre los tres grupos para las siguientes citoquinas IL-6, IL-10, IFN- γ y TGF- β 1 activo. De las citoquinas proinflamatorias cuantificadas la concentración de IL-6 e IFN- γ fue mayor en pacientes con criterio de severidad comparado con los controles sanos. De las citoquinas con función reguladora como la IL-10 presentó concentraciones superiores en pacientes complicados, ; sin embargo, TGF- β 1 activo presentó una concentración mayor en los controles sanos con respecto a pacientes con malaria, y entre pacientes complicados y no complicados se observa una tendencia hacia la disminución de TGF- β 1 en pacientes complicados con respecto a los no complicados (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Concentración plasmática de citoquinas del perfil Th1 y Treg en pacientes con malaria por *P. vivax* y grupo control

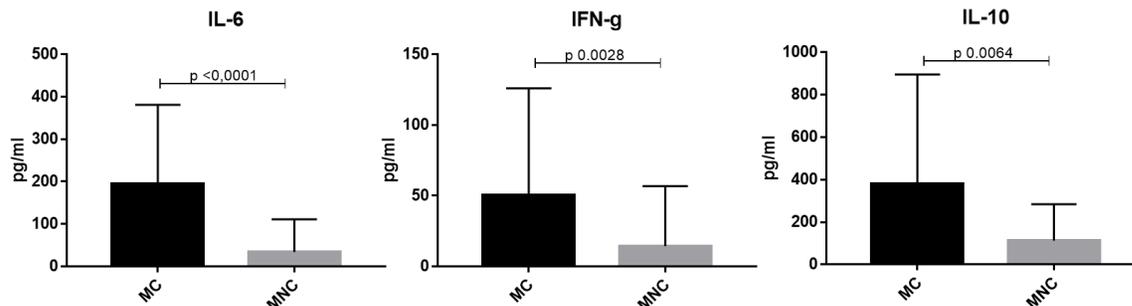
Moléculas	MC N= 50 Mediana (IQR) pg/ml	MNC N= 56 Mediana (IQR) pg/ml	CS N= 50 Mediana (IQR) pg/ml	Kruskal-Wallis test (<i>p</i> value)
Citoquina perfil monocitos				
IL-6	185,1 (40,3-353,3)	32,2 (18,3-95,9)	20,9 (4,6-66,0)	<0,0001
IL-1β	10,8 (5,2-37,1)	8,9 (5,6-33,2)	17,7 (7,9-33,3)	0,0843
Citoquinas perfil Th1				
TNF-α	4,3 (3,4-15,6)	3,9 (2,7-7,2)	3,9 (2,8-5,5)	0,1281
IL-2	3,6 (2,7-36,2)	3,6 (2,2-27,2)	3,6 (3,2-27,9)	0,2335
IFN-γ	50,2 (12,7-125,9)	14,5 (6,2-56,8)	7,0 (3,8-31,8)	<0,0001
Citoquinas perfil Treg				
IL-10	380,7 (92,1-895,3)	113,2 (53,3-284,5)	4,6 (2,9-20,5)	<0,0001
Free Active TGF-β1	4,1 (2,6-34,2)	13,1 (4,1-41,8)	39,6 (13,3-69,2)	<0,0001

MC = Malaria Complicada, MNC= Malaria No complicada, CS= Controles sanos. IQR= Rango intercuartílicos (*del inglés: Interquartile range*)

De las moléculas cuantificadas las concentraciones de IL-6, IL-10 e IFN- γ mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de malaria complicada y malaria no complicada, las concentraciones de estas moléculas fueron más altas en los pacientes con malaria complicada (Tabla 3.4, figura 3.3).

Tabla 3.4. Concentración plasmática de citoquinas del perfil monocitos, Th1 y Treg en pacientes complicados y no complicados con malaria por *P. vivax*

Moléculas	MC N= 50 Mediana (IQR) pg/ml	MNC N= 56 Mediana (IQR) pg/ml	Mann Whitney test (<i>p</i> value)
Citoquinas perfil monocitos			
IL-6	185,1 (40,3-353,3)	32,2 (18,3-95,9)	<0,0001
IL-1 β	10,8 (5,2-37,1)	8,9 (5,6-33,2)	0,4029
Citoquinas perfil Th1			
IL-2	3,6 (2,7-36,2)	3,6 (2,2-27,2)	0,1786
TNF- α	4,3 (3,4-15,6)	3,9 (2,7-7,2)	0,105
IFN- γ	50,2 (12,7-125,9)	14,5 (6,2-56,8)	0,0006
Citoquinas perfil Treg			
IL-10	380,7 (92,1-895,3)	113,2 (53,3-284,5)	0,0042
TGF- β 1 activo libre	4,1 (2,6-34,2)	13,1 (4,1-41,8)	0,1551

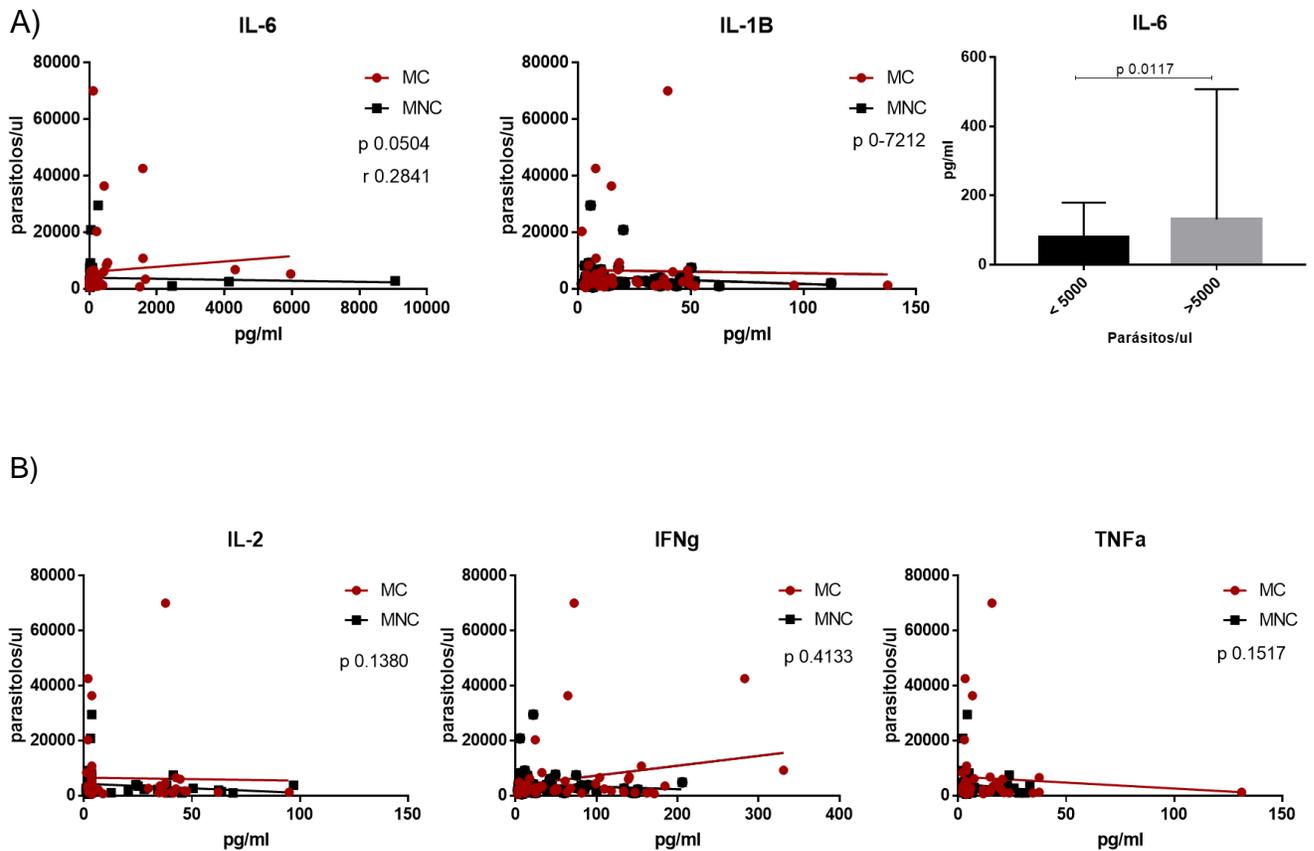


MC = Malaria complicada, MNC= Malaria no complicada, CS= Controles sanos. Se ilustra la mediana con el IQR. IQR= rango intercuartilico (*del inglés = Interquartile range*)

Figura 3.3. Concentración diferencial de IFN γ , IL-6 y IL-10 pacientes con malaria complicada y no complicada con infección por *P. vivax*. MC= Malaria complicada (n=50), MNC = Malaria no complicada (n=56). Las comparaciones entre los grupos se realizaron con el test Mann Whitney. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado como significativo. Las concentraciones de las citoquinas se expresan en pg/ml.

3.4.2 Análisis de correlación de citoquinas del perfil monocitos, Th1 y Treg durante la infección por *P. vivax*

Se realizó la prueba del coeficiente de correlación de Spearman para verificar la presencia de correlación del perfil de citoquinas de monocitos, Th1 y Treg en el curso de la infección por *P. vivax* a través de la parasitemia. Dentro del análisis se tuvo en cuenta la forma clínica de la malaria complicada y no complicada. La IL-6 mostró una correlación positiva (p 0,05) con la parasitemia en pacientes con malaria complicada. Las demás citoquinas no mostraron correlación con esta variable. ; sin embargo, al realizar una categorización de los pacientes por concentraciones de parásitos inferiores y superiores a 5.000 parásitos/ μ l, encontramos que la concentración de IL-10 y IL-6 es significativamente mayor en pacientes con recuentos superiores a 5.000 parásitos/ μ l (Figura 3.4).



C)

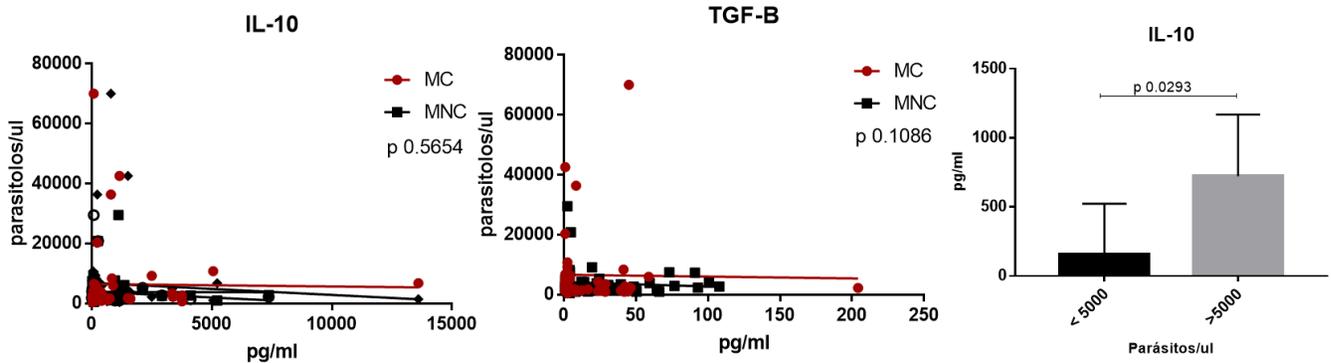


Figura 3.4. Correlación de citoquinas con la infección por *P. vivax*. A) Parasitemia / perfil citoquinas monocitos, B) Parasitemia / perfil de citoquinas Th1, C) Parasitemia / perfil de citoquinas Treg. MC= Malaria complicada (n=50), MNC = Malaria no complicada (n=56).

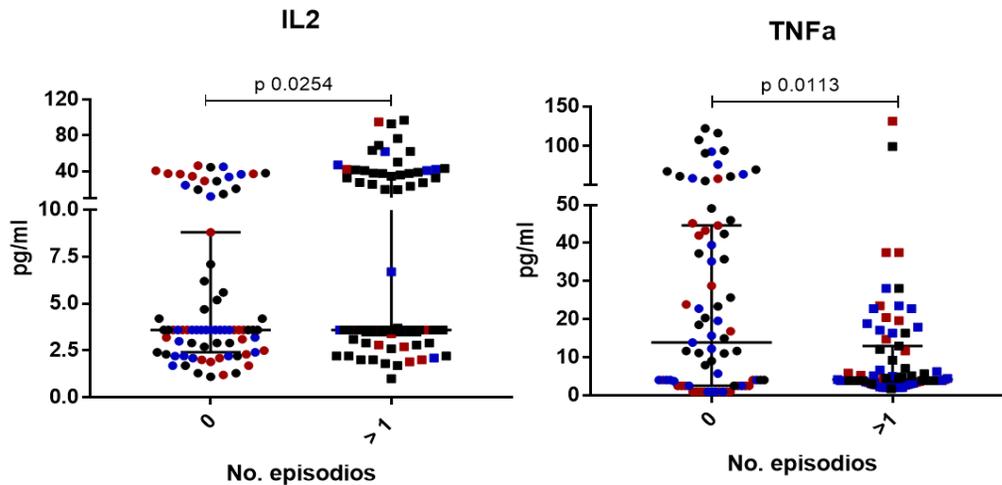


Figura 3.5 Concentración de citoquinas y su relación con episodios previos de la enfermedad. Rojo= complicados, azul= no complicados, negro= controles sanos. Círculos= individuos sin episodios previos de la enfermedad, cuadrados= individuos con más de un episodio padecido de la enfermedad.

Se evaluó si la concentración de las citoquinas tenía alguna relación con el número de episodios que el paciente había padecido de malaria, se realizó una comparación de la concentración por molécula dividido en dos grupos aquellos que padecían por primera vez malaria, y aquellos con más de un episodio de malaria. La concentración de IL-2 fue mayor en

pacientes con más de un episodio de la enfermedad, mientras que el TNF α presento mayor concentración en los individuos que padecían por primera vez la enfermedad. Para las demás citoquinas evaluadas no se encontraron diferencias significativas (Figura 3.5).

En análisis de correlación entre citoquinas en el grupo de pacientes con malaria complicada muestra un menor número de correlaciones con respecto al grupo de pacientes con malaria no complicada; sin embargo, en el grupo de malaria complicada las correlaciones son más fuertes. Las correlaciones positivas entre TGF- β con IL-2, IL-1 β y TNF α son de mayor intensidad en pacientes con malaria complicada, esto mismo sucede entre la IL-6 y IL-10, y entre IL-1 β y TNF α . En los pacientes con malaria no complicada se observan correlaciones positivas entre IL-2/IL-6, IL-6/ IL-1 β , IL-6/ TNF α , IL-6 /TGF- β , que están ausentes en el grupo de malaria complicada (Figura 3.6).

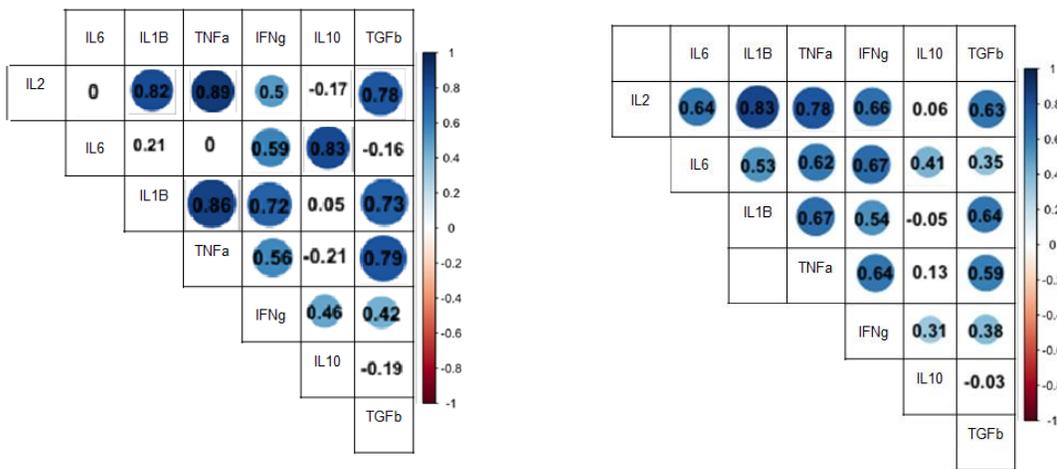


Figura 3.6. Correlación entre citoquinas de perfil monocitos, Th1 y Treg en malaria complicada y no complicada por *P.vivax*. Test de Spearman, el valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo. Azul= correlación positiva, Rojo= correlación negativa.

3.4.4 Evaluación de citoquinas como predictores de complicaciones en infecciones por *P. vivax*

Un análisis de curvas de ROC permitió evaluar la capacidad IL-6, IL-10 e IFN- γ como discriminadoras de las formas clínicas en la malaria por *P. vivax*, previamente se evidenció que estas moléculas presentaron concentraciones con diferencias significativas entre pacientes complicados y no complicados; el resultado de este análisis mostró que la IL-6 tiene una precisión diagnóstica (AUC = 0.732, la sensibilidad fue del 72 %, especificidad del 70%, valor predictivo positivo de 0.7519, valor predictivo negativo de 0.7022 (Figura 3.7)

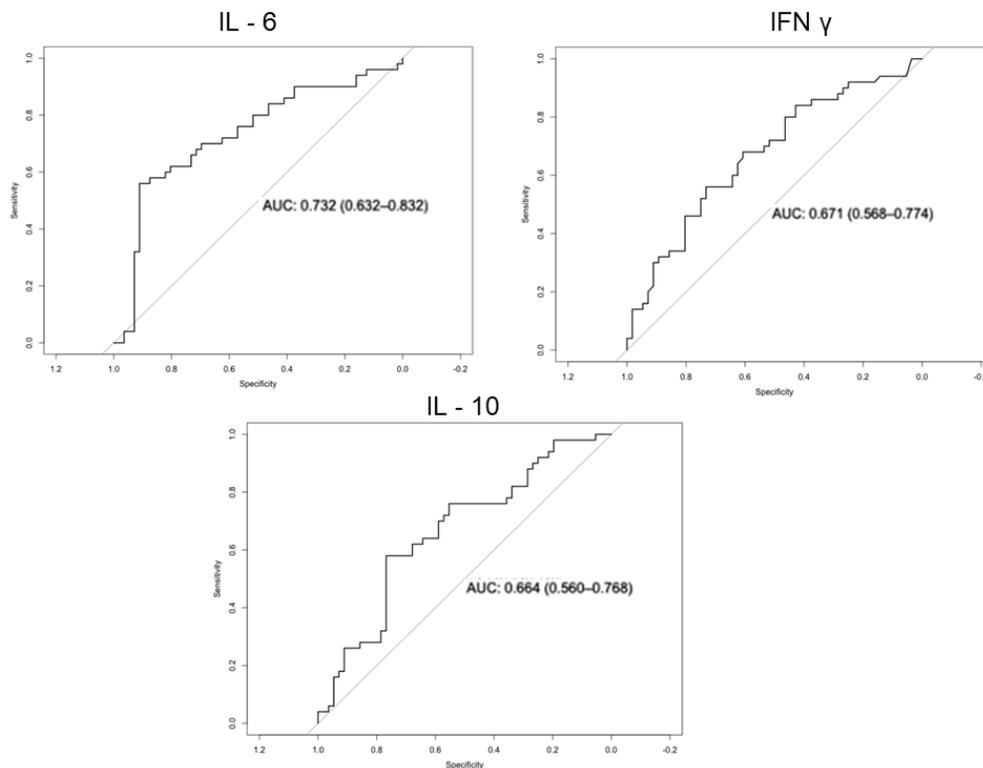


Figura 3.7. Capacidad de IFN- γ , IL-6, IL-10 como predictores de complicaciones en malaria por *P. vivax*

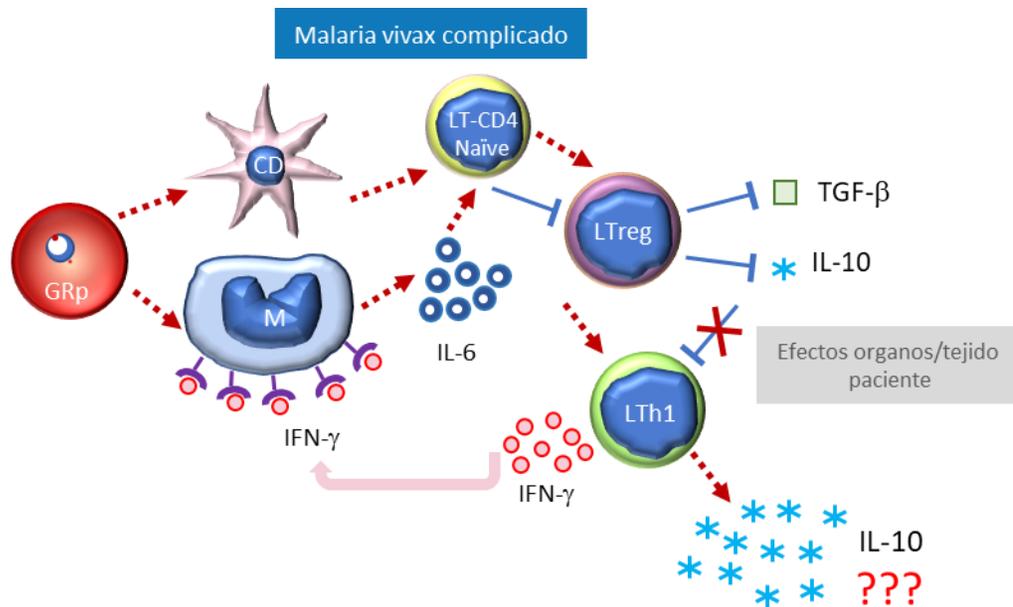


Figura 3.8 Modulación de citoquinas plasmáticas en la infección complicada por *P. vivax*.

De acuerdo con nuestros resultados postulamos que en el curso de la infección complicada por *P. vivax*, existe una desregulación o disfunción de las células Treg inducida por la IL-6, lo que conlleva a la reducción de la concentración plasmática de la citoquina reguladora TGF- β y al incremento de mediadores proinflamatorios como el IFN- γ e IL-6, que median el desarrollo de complicaciones en diferentes tejidos y órganos. Consideramos que la fuente de IL-10 proviene de células diferentes a Treg, como son células Th1 y monocitos, al parecer esta citoquina puede tener un papel relacionado con las manifestaciones complicadas observadas en la población estudio.

3.5 DISCUSIÓN

El papel de las citoquinas en la inmunopatogénesis de la malaria por *P. vivax*, es un tema con grandes incertidumbres. El desbalance en la producción de moléculas de la respuesta inmune parece mediar complicaciones en el curso de la infección por este parásito (B. B. Andrade et al., 2010; Gonçalves, Scopel, Bastos, & Ferreira, 2012). El interés del presente capítulo fue evaluar el efecto de la infección de *P. vivax* sobre la concentración plasmática de citoquinas producidas por monocitos, Th1 y Treg, y su relación con las formas clínicas de la malaria.

De las citoquinas de perfil monocitos y Th1, IL-6 e IFN- γ respectivamente, fueron las que presentaron una concentración diferente entre pacientes complicados y no complicados con malaria por *P. vivax*, siendo significativamente más alta en pacientes complicados. La IL-6 fue la citoquina con mayor concentración dentro del perfil de monocitos, triplicando la concentración de IFN- γ . Adicionalmente, la IL-6 mostró una correlación positiva con la parasitemia en el grupo de pacientes con malaria complicada. En general los hallazgos de IL-6 concuerdan con lo descrito previamente en otros estudios, donde esta citoquina ha sido descrita como un marcador sistémico de la inflamación, relacionada con severidad y disfunción orgánica en malaria (Barber et al., 2015; M. L. Santos et al., 2020). El IFN- γ es una molécula secretada por diferentes células del sistema inmunológico, desarrolla actividad en la inmunidad innata y adaptativa, en el control de la infección por *Plasmodium* participa en el ciclo hepático y eritrocítico (Longley, Sattabongkot, & Mueller, 2016). La producción excesiva de moléculas inflamatorias como IFN- γ promueve la patogénesis de la anemia, a la inmunosupresión de la médula ósea, la diseritropoyesis y la eritrofagocitosis (Perkins et al., 2011). El IFN- γ fue más alto en el grupo de pacientes con malaria complicada, resultado acorde con el descrito por Andrade y colaboradores en Brasil (B. B. Andrade et al., 2010), la diferencia en la concentración de esta citoquina entre complicados y no complicada, sugiere una asociación entre el IFN- γ y las complicaciones de malaria observadas en esta población.

En nuestro estudio, la concentración de TNF α fue similar en pacientes con malaria complicada y no complicada, similar a lo reportado por da Silva Ventura y colaboradores en la amazonia brasilera (Ventura et al., 2018); sin embargo, difiere con publicaciones previas donde el TNF α se caracteriza por contribuir a la respuesta inflamatoria en infecciones por *P. falciparum* (Mohapatra, Sarangi, Sarangi, Dalai, & Sahoo, 2014), y en infecciones por *P. vivax* en otros países como Pakistan y Asia (Raza et al., 2013). Esta diferencia en el perfil de TNF α en las infecciones por *Plasmodium*, podrían estar relacionados con la variabilidad genéticas del parásito que estimulan perfiles diferentes de citoquinas proinflamatoria (Penha-Gonçalves,

2019; Ribeiro et al., 2016). Al analizar la asociación entre las concentraciones de citoquinas y el número de episodios malaria, se encontró una correlación entre individuos que padecían por primera un cuadro de malaria con mayores concentraciones de TNF α , mientras que las personas con más de un episodio de malaria en su vida presentaron una concentración más alta de IL-2, no se encontraron más correlaciones entre esta variable y las citoquinas evaluadas. A diferencia de nuestros resultados, en el estudio de Medina y colaboradores, encontraron que la concentración de IFN- γ fue mayor en pacientes sin episodios previos de malaria (Medina et al., 2011a).

Las citoquinas del perfil Treg participan activamente en el control de las respuesta inmunitaria fisiológica y patológica, y contribuyen al mantenimiento de la homeostasis inmunológica (Miyara & Sakaguchi, 2007). En este estudio IL-10 fue la citoquina con mayor concentración plasmática de las cuantificadas, su valor duplicó la concentración de citoquinas proinflamatorias como la IL-6, y fue siete veces mayor a la concentración de IFN- γ . Encontramos una mayor concentración de IL-10 en pacientes con parasitemias superiores a 5.000 parásitos/ μ l, el aumento plasmático de esta citoquina ha sido asociado al desarrollo de complicaciones en la malaria (B. B. Andrade et al., 2010; M. L. Santos et al., 2020). En infecciones con *P. falciparum* altas concentraciones de IL-10, suprime la acción de IL-12, inhibiendo la producción de citoquinas proinflamatorias como el IFN γ , lo que disminuye la eficiencia en la remoción del parásito y favorece el desarrollo de complicaciones, (Hugosson, Montgomery, Premji, Troye-Blomberg, & Björkman, 2004; Luty et al., 2000; Niikura, Inoue, & Kobayashi, 2011); como la anemia en poblaciones infantil asociadas a la carga parasitaria (Luty et al., 2000; Othoro et al., 1999). Adicionalmente, se ha visto que la fagocitosis de hemozoína estimula la producción de IL-10 y TNF α , e inhibe la producción de IL-12 (Mordmüller, Turrini, Long, Kremsner, & Arese, 1998).

Algunos estudios que han tratado de esclarecer como una citoquina con función reguladora está mediando el desarrollo de complicaciones, han encontrado asociación de ciertos polimorfismos del gen de la IL-10 con el riesgo de complicación, por ejemplo la variante 1082G/A (da Silva Santos et al., 2012) y la variante alélica A-592C (Ouma et al., 2008; G. Zhang et al., 2012)

La producción descontrolada de IL-6 y IL-10 ha sido asociado a formas clínicas complicadas como acidosis, shock, ictericia e hiperparasitema, indicando una activación generalizada de citoquinas, postulándolas como buenos predictores de complicación en malaria (Day et al., 1999). Recientemente, estudios de la infección de Sars-Cov2 han postulado que IL6 y IL-10 son moléculas con buena capacidad para predecir casos severos; la progresión de la enfermedad conlleva a un aumento sérico de estas moléculas. Estas citoquinas pleiotrópicas, en el contexto

de esta enfermedad parecen estar favoreciendo un entorno proinflamatorio estimulando una tormenta de citoquinas, las cuales se asocian con formas graves de esta enfermedad (Dhar, Vishnupriyan, Damodar, Gujar, & Das, 2021; Han et al., 2020). Es importante seguir explorando la capacidad de la IL-6 para pronosticar el desarrollo de complicaciones en pacientes con infección por *P. vivax*, en este estudio mostró el mejor AUC de las citoquinas evaluadas, y una correlación positiva con la parasitemia en pacientes complicados. Es preciso seguir avanzando en estudios que permitan esclarecer el papel de estas citoquinas en la patogénesis de la malaria, toda vez, que podrían convertirse en un blanco inmunoterapéutico para evitar complicaciones, o predictores de complicaciones.

La concentración entre TGF- β 1 y IL-10 fue inversamente proporcional en pacientes con malaria complicada, siendo más alta la concentración de IL-10 en estos pacientes, estos hallazgos concuerdan con lo publicado por Hanisch y colaboradores en Uganda (Hanisch, Bangirana, Opoka, Park, & John, 2015). Adicionalmente, se observa una ligera tendencia al aumento de TGF- β 1 en pacientes con malaria no complicada. Algunos estudios previos en malaria por *P. falciparum* los resultados son similares, se destaca un papel inmunomodulador protector del TGF- β 1 frente al desarrollo de complicaciones (Drewry & Harty, 2020). La razón por la cual la concentración de TGF- β 1 esta disminuida en pacientes complicados, necesita ser evaluada, podrían existir problemas de regulación o supresión de esta molécula que evita que ejerza su función protectora.

En el grupo de pacientes con malaria no complicada se observó un mayor número de correlaciones entre las citoquinas cuantificadas, sobre todo un mayor número de correlaciones entre las citoquinas de perfil monocitos y Th1, en este mismo grupo la característica más notoria fue la presencia de correlaciones entre IL-6/IL-2, IL-6/IL-1 β , IL/TNF α , las cuales estuvieron ausentes en pacientes con malaria complicada, por otra parte, solo se observa una correlación con IL-10 (IL-10/IL-6). Por otra parte, en el grupo de malaria complicada, aunque se presentó un menor número de correlaciones, las que se presentaron fueron de mayor intensidad, dentro de las cuales se destaca la correlación entre IL-10 y IL-6 (r 0.83), la asociación entre estas citoquinas en pacientes complicados sugiere un papel inmunomodulador (Hojo-Souza et al., 2017), estas dos citoquinas no presentaron correlaciones adicionales. La desregulación de las citoquinas proinflamatorias y reguladoras está relacionada con inflamación sistémica, lo cual, puede contribuir al desarrollo de complicaciones observadas en la malaria por *P. vivax* (Barber et al., 2015).

Comprender la dinámica de las citoquinas en la inmunopatogénesis de la malaria contribuye a generar nuevo conocimiento que es la base para el desarrollo de nuevas estrategias que permitan evaluar o pronosticar los desenlaces clínicos en el curso de una infección, adicionalmente, es un insumo fundamental para el desarrollo e implementación de terapias inmunomoduladoras.

3.6 CONCLUSIONES

- El aumento de IL-6, IL-10 y IFN- γ , es un perfil diferenciador entre malaria vivax complicado y no complicado y es el reflejo de la desregulación en la producción de citoquinas como resultado de la infección por esta especie.
- La IL6 sugiere ser una molécula importante como candidata a biomarcador pronóstico de complicación en pacientes con P. vivax.
- La disminución de TGF- β parece tener un papel inmunomodulador protector contra formas clínicas complicadas en las infecciones por P. vivax.

Bibliografia

- Andrade, B. B., Reis-Filho, A., Souza-Neto, S. M., Clarencio, J., Camargo, L. M., Barral, A., & Barral-Netto, M. (2010). Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malar J*, 9, 13. doi:10.1186/1475-2875-9-13
- Amino, R., Thiberge, S., Martin, B., Celli, S., Shorte, S., Frischknecht, F., & Ménard, R. (2006). Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nature medicine*, 12(2), 220.
- Barber, B. E., William, T., Grigg, M. J., Parameswaran, U., Piera, K. A., Price, R. N., . . . Anstey, N. M. (2015). Parasite biomass-related inflammation, endothelial activation, microvascular dysfunction and disease severity in vivax malaria. *PLoS pathogens*, 11(1), e1004558-e1004558. doi:10.1371/journal.ppat.1004558
- Cockburn, I. A., & Zavala, F. (2016). Dendritic cell function and antigen presentation in malaria. *Current opinion in immunology*, 40, 1-6.
- da Silva Santos, S., Clark, T. G., Campino, S., Suarez-Mutis, M. C., Rockett, K. A., Kwiatkowski, D. P., & Fernandes, O. (2012). Investigation of host candidate malaria-associated risk/protective SNPs in a Brazilian Amazonian population. *PLoS one*, 7(5), e36692.
- da Silva Ventura, A. M. R., Fernandes, A. A. M., Zanini, G. M., Pratt-Riccio, L. R., Sequeira, C. G., do Monte, C. R. S., . . . de Souza, J. M. (2018). Clinical and immunological profiles of anaemia in children and adolescents with *Plasmodium vivax* malaria in the Pará State, Brazilian Amazon. *Acta tropica*, 181, 122-131.
- Day, N. P., Hien, T. T., Schollaardt, T., Loc, P. P., Chuong, L. V., Hong Chau, T. T., . . . White, N. J. (1999). The prognostic and pathophysiologic role of pro-and antiinflammatory cytokines in severe malaria. *The Journal of infectious diseases*, 180(4), 1288-1297.
- Dhar, S. K., Vishnupriyan, K., Damodar, S., Gujar, S., & Das, M. (2021). IL-6 and IL-10 as predictors of disease severity in COVID-19 patients: results from meta-analysis and regression. *Heliyon*, 7(2), e06155.
- Dobaño, C., Bardají, A., Arévalo-Herrera, M., Martínez-Espinosa, F. E., Bôtto-Menezes, C., Padilla, N., . . . Requena, P. (2020). Cytokine signatures of *Plasmodium vivax* infection during pregnancy and delivery outcomes. *PLoS neglected tropical diseases*, 14(5), e0008155. doi:10.1371/journal.pntd.0008155
- Drewry, L. L., & Harty, J. T. (2020). Balancing in a black box: Potential immunomodulatory roles for TGF- β signaling during blood-stage malaria. *Virulence*, 11(1), 159-169.
- Dunst, J., Kamena, F., & Matuschewski, K. (2017). Cytokines and Chemokines in Cerebral Malaria Pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(324). doi:10.3389/fcimb.2017.00324
- Gazzinelli, R. T., Kalantari, P., Fitzgerald, K. A., & Golenbock, D. T. (2014). Innate sensing of malaria parasites. *Nature Reviews Immunology*, 14(11), 744.
- Gonçalves, R. M., Scopel, K. K. G., Bastos, M. S., & Ferreira, M. U. (2012). Cytokine balance in human malaria: does *Plasmodium vivax* elicit more inflammatory responses than *Plasmodium falciparum*? *PLoS one*, 7(9), e44394-e44394. doi:10.1371/journal.pone.0044394

- Hafalla, J. C., Silvie, O., & Matuschewski, K. (2011). Cell biology and immunology of malaria. *Immunological reviews*, 240(1), 297-316.
- Han, H., Ma, Q., Li, C., Liu, R., Zhao, L., Wang, W., . . . Xia, Y. (2020). Profiling serum cytokines in COVID-19 patients reveals IL-6 and IL-10 are disease severity predictors. *Emerg Microbes Infect*, 9(1), 1123-1130. doi:10.1080/22221751.2020.1770129
- Hanisch, B. R., Bangirana, P., Opoka, R. O., Park, G. S., & John, C. C. (2015). Thrombocytopenia May Mediate Disease Severity in *Plasmodium falciparum* Malaria Through Reduced Transforming Growth Factor Beta-1 Regulation of Proinflammatory and Anti-inflammatory Cytokines. *The Pediatric infectious disease journal*, 34(7), 783-788. doi:10.1097/INF.0000000000000729
- Hojo-Souza, N. S., Pereira, D. B., de Souza, F. S. H., de Oliveira Mendes, T. A., Cardoso, M. S., Tada, M. S., . . . Bueno, L. L. (2017). On the cytokine/chemokine network during *Plasmodium vivax* malaria: new insights to understand the disease. *Malaria journal*, 16(1), 1-10.
- Hugosson, E., Montgomery, S., Premji, Z., Troye-Blomberg, M., & Björkman, A. (2004). Higher IL-10 levels are associated with less effective clearance of *Plasmodium falciparum* parasites. *Parasite Immunol*, 26(3), 111-117.
- Krishnegowda, G., Hajjar, A. M., Zhu, J., Douglass, E. J., Uematsu, S., Akira, S., . . . Gowda, D. C. (2005). Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum* cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *Journal of Biological Chemistry*, 280(9), 8606-8616.
- Longley, R. J., Sattabongkot, J., & Mueller, I. (2016). Insights into the naturally acquired immune response to *Plasmodium vivax* malaria. *Parasitology*, 143(2), 154.
- Luty, A. J., Perkins, D. J., Lell, B., Schmidt-Ott, R., Lehman, L. G., Luckner, D., . . . Schmid, D. (2000). Low interleukin-12 activity in severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Infection and immunity*, 68(7), 3909-3915.
- McCall, M. B., & Sauerwein, R. W. (2010). Interferon- γ —central mediator of protective immune responses against the pre-erythrocytic and blood stage of malaria. *Journal of leukocyte biology*, 88(6), 1131-1143.
- Medina, T. S., Costa, S. P., Oliveira, M. D., Ventura, A. M., Souza, J. M., Gomes, T. F., . . . Cunha, M. G. (2011). Increased interleukin-10 and interferon- γ levels in *Plasmodium vivax* malaria suggest a reciprocal regulation which is not altered by IL-10 gene promoter polymorphism. *Malaria journal*, 10(1), 1-10.
- Miller, J. L., Sack, B. K., Baldwin, M., Vaughan, A. M., & Kappe, S. H. (2014). Interferon-mediated innate immune responses against malaria parasite liver stages. *Cell reports*, 7(2), 436-447.
- Miyara, M., & Sakaguchi, S. (2007). Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends in molecular medicine*, 13(3), 108-116.
- Mohapatra, P., Sarangi, A., Sarangi, A. K., Dalai, R., & Sahoo, D. (2014). Sequential serum cytokine levels of TNF-alpha, IL-4 and IL-12 are associated with prognosis in *Plasmodium falciparum* malaria. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 29(3), 321-326.
- Nasr, A., Allam, G., Hamid, O., & Al-Ghamdi, A. (2014). IFN-gamma and TNF associated with severe *falciparum* malaria infection in Saudi pregnant women. *Malaria journal*, 13(1), 314.

- Niikura, M., Inoue, S., & Kobayashi, F. (2011). Role of interleukin-10 in malaria: focusing on coinfection with lethal and nonlethal murine malaria parasites. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 383962. doi:10.1155/2011/383962
- Othoro, C., Lal, A. A., Nahlen, B., Koech, D., Orago, A. S., & Udhayakumar, V. (1999). A low interleukin-10 tumor necrosis factor- α ratio is associated with malaria anemia in children residing in a holoendemic malaria region in western Kenya. *The Journal of infectious diseases*, 179(1), 279-282.
- Ouma, C., Davenport, G. C., Were, T., Otieno, M. F., Hittner, J. B., Vulule, J. M., . . . Perkins, D. J. (2008). Haplotypes of IL-10 promoter variants are associated with susceptibility to severe malarial anemia and functional changes in IL-10 production. *Human genetics*, 124(5), 515-524. doi:10.1007/s00439-008-0578-5
- Park, J. W., Park, S. H., Yeom, J. S., Huh, A. J., Cho, Y. K., Ahn, J. Y., . . . Seoh, J. Y. (2003). Serum cytokine profiles in patients with *Plasmodium vivax* malaria: a comparison between those who presented with and without thrombocytopenia. *Annals of tropical medicine and parasitology*, 97(4), 339-344. doi:10.1179/000349803235002416
- Penha-Gonçalves, C. (2019). Genetics of Malaria Inflammatory Responses: A Pathogenesis Perspective. *Frontiers in Immunology*, 10, 1771-1771. doi:10.3389/fimmu.2019.01771
- Perkins, D. J., Were, T., Davenport, G. C., Kempaiah, P., Hittner, J. B., & Ong'echa, J. M. (2011). Severe malarial anemia: innate immunity and pathogenesis. *International journal of biological sciences*, 7(9), 1427.
- Punnath, K., Dayanand, K. K., Chandrashekar, V. N., Achur, R. N., Kakkilaya, S. B., Ghosh, S. K., . . . Gowda, D. (2019). Association between Inflammatory Cytokine Levels and Thrombocytopenia during *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* Infections in South-Western Coastal Region of India. *Malaria research and treatment*, 2019.
- Raza, A., Ghanchi, N. K., Sarwar Zubairi, A., Raheem, A., Nizami, S., & Beg, M. A. (2013). Tumor necrosis factor - α , interleukin-10, intercellular and vascular adhesion molecules are possible biomarkers of disease severity in complicated *Plasmodium vivax* isolates from Pakistan. *PloS one*, 8(12), e81363. doi:10.1371/journal.pone.0081363
- Ribeiro, B. d. P., Cassiano, G. C., de Souza, R. M., Cysne, D. N., Grisotto, M. A. G., de Azevedo dos Santos, A. P. S., . . . Nascimento, F. R. F. (2016). Polymorphisms in *Plasmodium vivax* Circumsporozoite Protein (CSP) Influence Parasite Burden and Cytokine Balance in a Pre-Amazon Endemic Area from Brazil. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(3), e0004479-e0004479. doi:10.1371/journal.pntd.0004479
- Santos, M. L., Coimbra, R. S., Sousa, T. N., Guimarães, L. F., Gomes, M. S., Amaral, L. R., . . . Franklin, B. S. (2020). A distinct fingerprint of inflammatory mediators and miRNAs in *Plasmodium vivax* severe thrombocytopenia. *bioRxiv*.
- Santos, R. O. d., Cruz, M. G. S. d., Lopes, S. C. P., Oliveira, L. B., Nogueira, P. A., Lima, E. S., . . . Lalwani, P. (2020). A First *Plasmodium vivax* Natural Infection Induces Increased Activity of the Interferon Gamma-Driven Tryptophan Catabolism Pathway. *Front Microbiol*, 11(400). doi:10.3389/fmicb.2020.00400
- Ventura, A., Fernandes, A. A. M., Zanini, G. M., Pratt-Riccio, L. R., Sequeira, C. G., do Monte, C. R. S., . . . Daniel-Ribeiro, C. T. (2018). Clinical and immunological

profiles of anaemia in children and adolescents with *Plasmodium vivax* malaria in the Para state, Brazilian Amazon. *Acta Trop*, 181, 122-131. doi:10.1016/j.actatropica.2018.01.022

Villegas-Mendez, A., Greig, R., Shaw, T. N., de Souza, J. B., Gwyer Findlay, E., Stumhofer, J. S., . . . Couper, K. N. (2012). IFN-gamma-producing CD4+ T cells promote experimental cerebral malaria by modulating CD8+ T cell accumulation within the brain. *J Immunol*, 189(2), 968-979. doi:10.4049/jimmunol.1200688

Yeom, J.-S., Park, S.-H., Ryu, S.-H., Park, H.-K., Woo, S.-Y., Ha, E.-H., . . . Park, J.-W. (2003). Serum cytokine profiles in patients with *Plasmodium vivax* malaria: A comparison between those who presented with and without hepatic dysfunction. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(6), 687-691. doi:[https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(03\)80104-9](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(03)80104-9)

Zhang, G., Manaca, M. N., McNamara-Smith, M., Mayor, A., Nhabomba, A., Berthoud, T. K., . . . Dobaño, C. (2012). Interleukin-10 (IL-10) polymorphisms are associated with IL-10 production and clinical malaria in young children. *Infection and immunity*, 80(7), 2316-2322. doi:10.1128/IAI.00261-12

CAPITULO IV

MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DE CITOQUINAS DE LOS PERFILES DE MONOCITOS, TH1 Y TREG EN PACIENTES CON MALARIA COMPLICADA Y NO COMPLICADA.

4.1 RESUMEN

4.1.1 Introducción

Las citoquinas son moléculas que actúan fundamentalmente como reguladores de la respuesta inmunitaria; son indispensables en la modulación de los mecanismos que inmunológicos que controlan el parásito. Sin embargo, la producción descontrolada y persistente de las citoquinas puede contribuir al daño de órganos y tejidos. En el capítulo III se describió cómo la disregulación de las citoquinas parecen mediar las complicaciones que se observan en el curso de la infección por *P. vivax*. En este capítulo nos centramos en la determinación de la expresión génica de citoquinas que han sido reportadas en diferentes estudios con una fuerte relación con las formas clínicas de malaria.

4.1.2. Métodos

Se extrajeron células mononucleares de las 106 personas con malaria por *P. vivax*, a través de la técnica de ficoll, posteriormente se realizó extracción de RNA. Se determinó la expresión génica de TNF α , IFN γ , IL-1 β , IL-4, IL-6, TGF- β 1 y IL-10 por PCR en tiempo real, la expresión del RNA se expresó en términos de cuantificación relativa (RQ). calculado por el método comparativo de Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Se realizó un análisis descriptivo de las variables, ilustrando los resultados mediante gráficos de cajas, para variables marginales y se establecieron comparaciones entre grupos utilizando la prueba de Kruskal-Wallis y test de Wilcoxon de acuerdo con el número de grupos a analizar. Para evaluar relación entre variables se utilizó la prueba no paramétrica de Spearman al interior de los grupos. El valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo

4.1.3 Resultados

Ninguna de los siete transcritos de citoquinas evaluadas arrojó diferencias en cuanto a su expresión entre el grupo de pacientes complicados y no complicados con malaria. ; sin embargo, encontramos que a medida que aumenta la concentración de parásitos disminuye la expresión de IL-1 β y de TGF- β . El número de correlaciones entre las expresiones TGF- β 1 con citoquinas proinflamatorias son bajas y de menor intensidad en pacientes complicados, las correlaciones entre la expresión de IL-6/TNF- α , IL-6/ IL-1 β , IL-1 β / TNF- α son de intensidad fuerte en pacientes complicados, siendo un factor diferenciador con pacientes con malaria no complicada.

4.1.4 Conclusiones

La expresión génica TGF- β 1 y IL-1 β se correlacionó de manera negativa con la concentración de parásitos en sangre. El TGF- β 1 muestra un papel modulador de la respuesta inflamatoria derivada de la infección por *P. vivax*; y a su vez se relaciona con la disminución de complicaciones en la malaria por *P. vivax*.

4.2 INTRODUCCIÓN

La entrada de *Plasmodium vivax* al organismo humano con lleva al reconocimiento de antígenos del parásito por diferentes células del organismo, de una u otra manera estos procesos orquestan la interacción de moléculas que activan señales de transducción intracelular cuyo producto es la secreción de citoquinas y la acción que estas desencadenan sobre las células del organismo (Dunst et al., 2017a). La señalización intracelular que conduce a la síntesis de citoquinas se realiza por la vía de transducción de Janus quinasa (Jak), la unión de la citoquina induce la vinculación de las subunidades del receptor y la activación de las proteínas JAK cinasas tras la fosforilación del receptor. Estas proteínas activadas crean sitios de acople para los factores de transcripción pertenecientes a la familia de STAT, que posteriormente son traslocados al núcleo, la unión de las proteínas STAT a las regiones reguladoras de los genes diana resulta en la modulación de la expresión génica (Leonard & Lin, 2000).

Diferentes estudios evidencian una descontrolada respuesta inmunológica, en muestras sanguíneas de pacientes con malaria por *P. vivax* se han cuantificado concentraciones de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias durante el proceso infeccioso, y se postula que esta respuesta puede estar modulando la presentación clínica de diferentes complicaciones (B. B. Andrade et al., 2010; Dunst et al., 2017b). La mayoría de estos estudios describe la concentración de estas moléculas en sangre, y posteriormente realizan análisis por comparaciones entre grupos. Son pocos los estudios que indagan acerca de la expresión génicas de las citoquinas en el contexto de las formas clínicas de la enfermedad, siendo la mayoría de estos estudios realizados en pacientes como malaria por *Plasmodium falciparum*.

Algunos de los hallazgos han permitido documentar una correlación positiva entre la expresión génica de IL-6, IL-10, IL-1 β y TNF con la parasitemia (25,000 -100,000) en malaria por *falciparum*, la expresión génica de estas citoquinas fue inferior en pacientes con parasitemias inferiores a 25,000 (Colborn, Ylöstalo, Koita, Cissé, & Krogstad, 2015), resultados similares se han documentado cuando se compara la expresión de los genes de TNF- α , IFN- γ , IL-1 β y TGF- β que se encontraron aumentados en pacientes con malaria complicada por *P. falciparum* con respecto a pacientes con malaria no complicada (Mahanta, Kar, Kakati, & Baruah, 2015). Por otra parte, el estudio de Ahmed y colaboradores se encontró aumentada la expresión de IL-10 en pacientes con malaria complicada por *P. falciparum*, y una disminución en la fase temprana de la infección de IL-8 (Ahmed, Bhardwaj, Sharma, Pande, & Anvikar, 2019).

La información acerca de la expresión de citoquinas en infecciones por *P. vivax* es mínima, un estudio en mujeres embarazadas con malaria por *P. falciparum* se identificó un aumento en la expresión génica de IL-10, IFN- γ y TNF, comparada con embarazadas libre de infección; sin embargo, la expresión de estas citoquinas fue similar en infecciones por *P. falciparum* y *P. vivax* en las gestantes (López-Guzmán & Carmona-Fonseca, 2020). Un estudio previo en el departamento de Córdoba en embarazadas con infección por *P. vivax*, mostró un aumento en la expresión de IFN γ , TNF α , IL-6 TGF- β 1, IL-10 en mujeres embarazados con infección por *P. vivax* con respecto al grupo control (Yasnot et al., 2013). El estudio de Sortica y colaboradores en Brasil, evidencia una asociación entre algunos polimorfismos de la IL-1 β y el TNF y la susceptibilidad a la infección por *P. vivax* (Sortica et al., 2012).

El objetivo del presente capítulo es contribuir al entendimiento en la modulación de la expresión génica de las citoquinas del perfil de monocitos, Th1 y Treg en pacientes con malaria complicada y no complicada.

4.3 METODOLOGÍA

4.3.1 Población del estudio

Se procesaron un total de 106 muestras de plasma de individuos que estuvieron distribuidas de la siguiente manera: Pacientes con malaria complicada $n = 50$, pacientes con malaria no complicada $n = 56$. Los criterios de inclusión y exclusión para cada uno de los grupos fueron descritos en la metodología del capítulo III. Como muestra de referencia se utilizaron controles negativos, muestras de dos personas sanas, sin malaria, procedentes de área no endémica.

4.3.2 Obtención de células

A cada paciente se le tomaron dos tubos anticoagulados con EDTA, se centrifugaron a 1646g (RFC) durante 5 minutos. Se realizaron dos lavados de las células diluyendo el pellet en dos volúmenes de RPMI completo sin suero, seguido de una centrifugación a 1646g (RFC) rpm durante 8 minutos. En un tubo falcon de 15 ml se dispuso 1 ml de Ficoll por cada 2 ml de la solución celular del paso anterior, la sangre fue dispensada lentamente por las paredes del tubo para la adecuada formación de las capas. Posteriormente se centrifugó a 2000 rpm durante 30 minutos a 20 °C sin freno. Las células fueron removidas con pipetas y dispuestas en 10 ml de RPMI completo sin suero en un tubo de 15 mL. Se realizaron 3 lavados con RPMI completo sin suero, centrifugando a 302g (RFC) por 10 minutos a 4 °C. El pellet final fue resuspendido en 1 ml de RPMI + 10 % suero fetal bovino, se realizó recuento de células en cámara de Neubauer, en una dilución 1/10 con azul de tripán. Las células fueron congeladas 1mL de solución de congelamiento (Suero Fetal Bovino + 20% de DMSO), el enfriamiento de las células se realizó de forma gradual hasta llegar a un almacenamiento final de -70° C.

4.3.3 Extracción de RNA

El pellet de las células fue resuspendido en 1ml de TRIZOL e incubado 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó 200µl de cloroformo, se homogenizó vigorosamente por 15 s, seguido de una incubación por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó una centrifugación a 12.000g (RFC) por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue transferido a un tubo limpio, al cual se le adicionó 500µl de isopropanol, se mantuvo una incubación por 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de una centrifugación a 12.000g (RFC) por 10 minutos a 4°C. Al sedimento se le agrego 1ml de etanol 75 %, se mezcló con pipeta y posteriormente se centrifugo a 7500g por 5 minutos 4°C. El sobrenadante se descartó

por inversión, el tubo se colocó boca abajo sobre una toalla absorbente durante 10 - 15 minutos a temperatura ambiente. El pellet fue resuspendido en 30 μ l de agua DEPEC, se colocó en bloque térmico a 65° C por 5 minutos, seguido de agitación en vortex por 2 minutos. Para la determinación de la cantidad y calidad del RNA se realizó en un Nanodrop.

4.3.4 Obtención de cDNA

La reacción se llevó a cabo de la siguiente manera: 250 ng de random primers, 1,5 μ l 10 mM dNTP Mix (10 mM cada dATP, dGTP, dCTP and dTTP, 6 μ l de RNA y H₂O DEPC cantidad suficiente para un volumen final de 30 μ l para toda la reacción. La mezcla fue incubada a 65° C por 5 minutos, posteriormente se puso en gradilla refrigerada durante 1 minuto. Seguidamente a cada reacción se adicionó un mix que contenía 6 μ l 5X First-Strand Buffer, 6 μ l de MgCl₂ 25 Mm, 3 μ l 0.1 M DTT, 1 μ l RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor (Cat. no. 10777-019, 40 units/ μ l), 1 μ l de SuperScript™ III RT (200 units/ μ l), se mezcló muy bien y se trabajó el siguiente perfil térmico: 25°/10 minutos, 50° C/50 minutos, 85° C/ 5 minutos. La cantidad y calidad del cDNA fueron estimadas utilizando un Nanodrop ND 1000, las muestras se almacenaron en alícuotas a - 20° C. Los reactivos utilizados fueron de marca Invitrogen, se tomó como referencia las recomendaciones del fabricante para el procedimiento, ; sin embargo, se realizaron pequeñas modificaciones para aumentar el rendimiento del producto final.

4.3.5 Expresión génica por el método comparativo de C_T (2- $\Delta\Delta$ C_T)

Para determinar la magnitud del cambio de expresión de los genes de interés en las muestras de estudio en relación con la expresión del mismo gen en una muestra de referencia, a través de un experimento de C_T comparativos ($\Delta\Delta$ C_T). Cada fragmento amplificado emite una señal fluorescente que registra la cinética de la reacción, en un ciclo x se acumula suficiente producto para generar una señal fluorescente destacable denominada ciclo umbral o Ct, siendo su valor inversamente proporcional a la a la cantidad de ADNc inicial.

Para el ensayo de expresión génica se utilizaron las siguientes sondas de referencia TNF α Hs00174128_m1 250ul (FAM), IFN γ Hs00989291_m1 250ul (FAM), IL2 Hs00174114_m1 (FAM), IL-1 β Hs01555410_m1 250ul (FAM), IL-6 Hs00985639_m1 250ul (FAM), TGF- β 1 Hs00998130_m1 250ul (FAM), IL-10 Hs00961622_m1 250ul (FAM) y como control endógeno β -actina 4352935E (VIC), para cada citoquina se realizó un ensayo independiente. La sonda de interés y el control endógeno fueron montados por duplicado para cada una de las muestras. La mezcla de reacción fue la siguiente, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Tabla 4.1 Componente de la mezcla de reacción para la cuantificación de la expresión génica de citoquinas.

Componentes	Concentración de reactivos	Volumen 1 reacción
Agua destilada		3,5 µl
Sonda Taqman con primers	20X	0,5 µl
TaqMan™ Gene Expression Master Mix Applied Biosystems™ Ref: 4369510	2X	5,0 µl
cDNA	500 ng/µl	1 µl
Volumen Total		10 µl

Los ensayos se llevaron a cabo en el equipo de termociclado StepOnePlus de Applied Biosystems, bajo las siguientes condiciones: 50° C por 2 minutos, 95° C por 10 minutos, posteriormente 45 ciclos a 95° C por 10 minutos/60° C por 1 minutos. Para la interpretación de los datos se tuvo en cuenta la correcta amplificación del control endógeno para cada muestra y la amplificación de las muestras de referencia (calibrador).

4.3.6 Análisis de datos

El valor de la expresión del RNA de las citoquinas se expresó en términos de cuantificación relativa (*en inglés: Relative Quantification* (RQ)), el cual fue calculado por el método comparativo de Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (Livak & Schmittgen, 2001). Como control endógeno se utilizó la β -actina y como calibradores muestras de pacientes sanos provenientes de área no endémica para malaria. Se asume que el gen diana y el endógeno tienen eficiencias óptimas e idénticas entre si

$$\Delta Ct = (Ct_{\text{muestra}} - Ct_{\text{control endógeno}})$$

$$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct_{\text{muestra}} - \Delta Ct_{\text{control calibrador}})$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta Ct_{\text{muestra}} - \Delta Ct_{\text{calibrador}})}$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = RQ$$

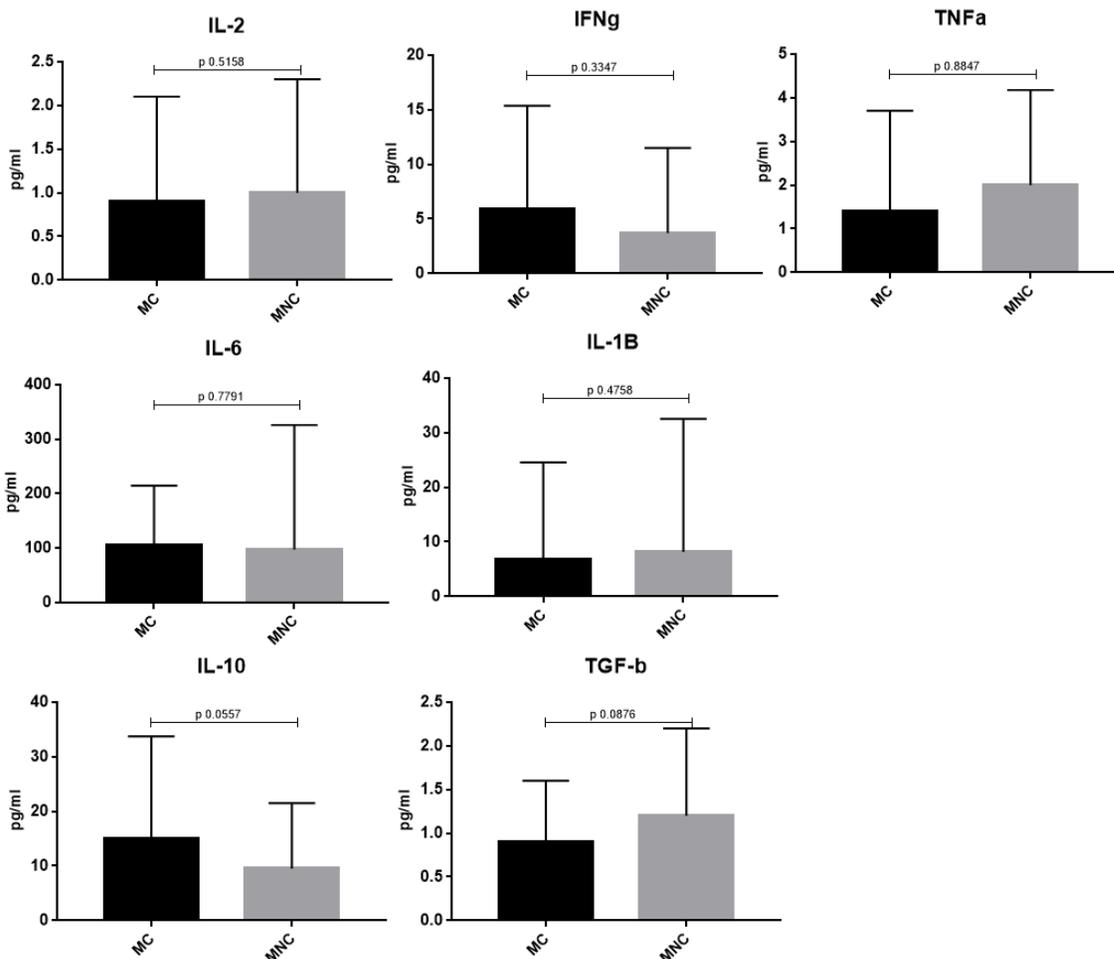
El valor de RQ fue tabulado y se analizaron las frecuencias, y diferencias entre los grupos de estudio con el test de Kruskal Wallis y Mann Whitney dependiendo del número de grupos a comparar. Por la prueba de Spearman se evaluó la presencia de correlaciones entre expresión génica y variables clínicas, hematológicas y bioquímicas.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Expresión de citoquinas de perfil de monocitos, Th1 y Treg en paciente con malaria complicada y no complicada por *P. vivax*

Fueron procesadas 106 muestras de pacientes con malaria no complicada y complicada, y se analizó la expresión de tres citoquinas del perfil Th1, dos citoquinas del perfil de monocitos y células Treg, respectivamente. No se observaron diferencias significativas entre la expresión de estos genes relacionados con la forma clínica de la malaria por vivax, ; sin embargo, se puede observar una ligera tendencia en el aumento de la expresión de IL-10 en pacientes complicados, y mientras que el grupo de malaria no complicada se observa este mismo comportamiento, pero con TGF- β (Figura 4.1).

Figura 4.1 Comparación de la expresión génica de citoquinas del perfil de monocitos, Th1 y



Treg en pacientes con malaria complicada y no complicada por *P. vivax*. MC= Malaria

complicada (n=50), MNC = Malaria no complicada (n=56). Las comparaciones entre los grupos se realizaron con el test de Mann Whitney. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado como significativo. La gráfica corresponde al valor de la mediana y los rangos de la cuantificación relativa de los genes (RQ).

4.4.2 Modulación de la expresión génica de citoquinas del perfil de monocitos, Th1 y Treg en la infección por *P. vivax*

Se realizó un análisis por el coeficiente de correlación de Spearman con la parasitemia en pacientes complicados y no complicados. La IL-1 β del perfil de monocitos y el TGF- β del perfil de células Treg, mostraron correlación negativa con el conteo de parásitos, a medida que la concentración de los parásitos disminuye la concentración de estas dos citoquinas aumenta (Figura 4.2).

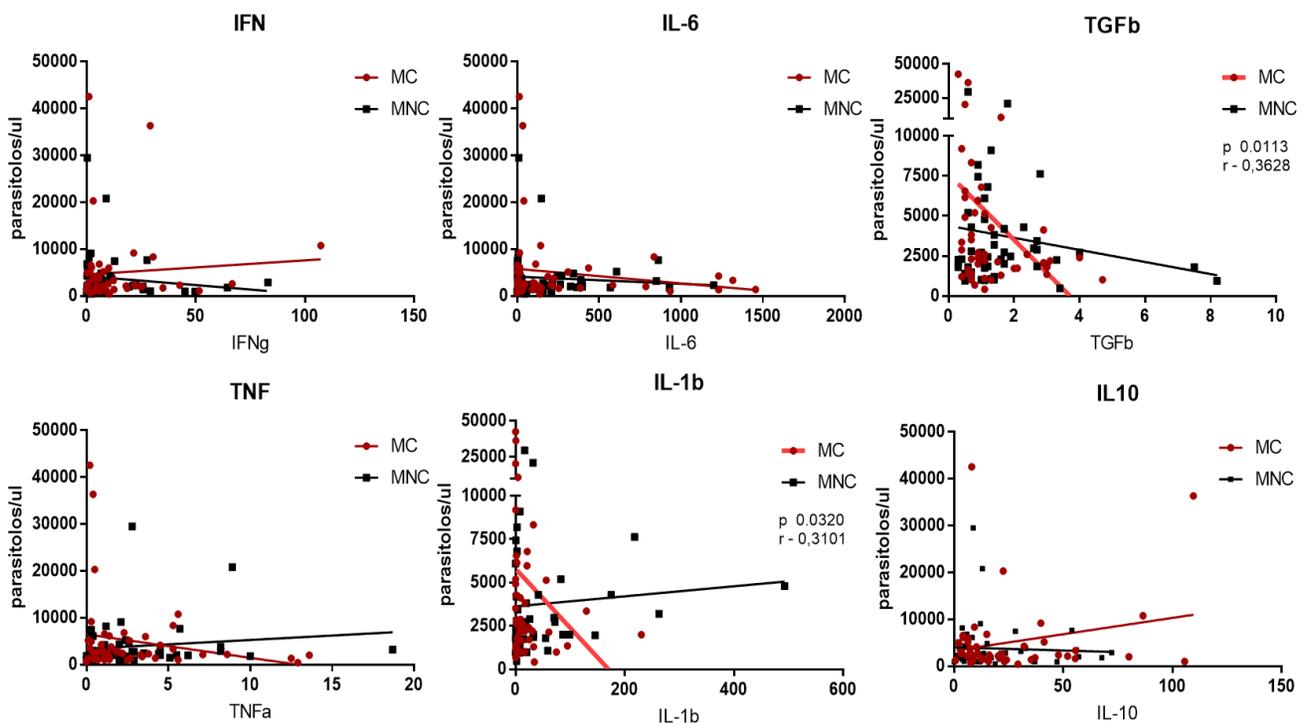


Figura 4.2 Correlación entre la expresión génica de citoquinas del perfil de monocitos, Th1 y Treg y la parasitemia en pacientes con malaria complicada y no complicada por *P. vivax*. MC= Malaria complicada (n=50), MNC = Malaria no complicada (n=56). Un valor de $p < 0.05$ fue considerado como significativo. La gráfica corresponde al valor de la cuantificación relativa de los genes (RQ).

4.4.2 Análisis de correlación de la expresión génica de citoquinas de perfil de monocitos, Th1 y Treg en pacientes no complicados y complicados con malaria por *P. vivax*

Se realizó un análisis por el coeficiente de correlación de Spearman entre las concentraciones relativas (*del inglés: Relative quantification* - RQ) de la expresión génica de las citoquinas de perfil de monocitos, Th1 y Treg. Se evidenciaron correlaciones positivas entre la expresión de las diferentes citoquinas, en el grupo de pacientes con malaria complicada y no complicada; el número de correlaciones fueron similares en ambos grupos. En pacientes con malaria no complicada se observaron siete correlaciones positivas fuertes, cuatro relacionadas entre citoquinas del perfil de Treg y Th1 y monocitos, entre TGF- β /IL-6, TGF- β /IL-1 β , TGF- β /IFN γ , IL-10/IFN γ , y, las tres restantes entre citoquinas proinflamatorias del perfil Th1 y monocitos, IL-6/TNF- α , IL-6/ IL-1 β , IL-1 β / TNF- α . En los pacientes complicados se observaron cuatro correlaciones fuertes positivas, una relacionada con citoquinas Treg, IL-10/IFN γ , las tres restantes entre citoquinas inflamatorias del perfil Th1 y monocitos, IL-6/TNF- α , IL-6/ IL-1 β , IL-1 β / TNF- α . En los pacientes complicados disminuyeron el número de correlaciones relacionadas con la expresión del gen TGF- β , y las que se presentaron fueron de menor intensidad al compararlas con pacientes no complicados.

Tabla 4.2 Correlación de la expresión génica de citoquinas del perfil de monocitos, Th1 y Treg en pacientes no complicados y complicados con malaria por *P. vivax*.

Complicados						
	IFN γ	IL-6	TNF α	IL-1 β	IL-10	TGF- β
IFN γ	1	0.42	0.4	0.3	0.66	0.26
IL-6		1	0.73	0.72	0.33	0.29
TNF α			1	0.78	0.24	0.32
IL-1 β				1	0.27	0.37
IL-10					1	0.38
TGF- β						1
No complicados						
	IFN γ	IL-6	TNF α	IL-1 β	IL-10	TGF- β
IFN γ	1	0.43	0.43	0.29	0.64	0.55
IL-6		1	0.62	0.73	0.14	0.60
TNF α			1	0.61	0.43	0.29
IL-1 β				1	0.16	0.61
IL-10					1	0.44
TGF- β						1

Correlación positiva fuerte
Correlación positiva moderada
Correlación positiva leve
Correlación no significativa

La interpretación para el coeficiente de correlación de Spearman se tomaron de: A guide to appropriate use of Correlation coefficient in medical research (Mukaka, 2012).

4.5 DISCUSIÓN

La desregulación en la producción de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias en la infección por *P. vivax* es asociada con las manifestaciones complicadas que pueden observarse en el transcurso de la enfermedad, estas observaciones derivan de los resultados de la cuantificación plasmática de las citoquinas y su asociación con la sintomatología de los pacientes a través de diferentes aproximaciones estadísticas (B. B. Andrade et al., 2010; Dunst et al., 2017b). Poco se conoce acerca la expresión génica de estas citoquinas durante la infección por *P. vivax*, por lo cual a través de un ensayo de expresión relativa por PCR en tiempo real evaluamos la expresión génica en el curso de la infección, ninguna de las siete citoquinas evaluadas arrojó diferencias significativas en cuanto a su expresión entre el grupo de pacientes complicados y no complicados con malaria; sin embargo, se observó un incremento de la expresión de TGF- β 1 en pacientes con malaria no complicada.

Son muy escasos los estudios de expresión génica de citoquinas en infecciones por *P. vivax*; en la literatura reposan dos investigaciones que evalúan la expresión génica de citoquinas en mujeres embarazadas con malaria por *P. vivax*, a pesar de que la respuesta inmune pueda ser diferente en este tipo de población, hace parte de las pocas publicaciones al respecto. Un estudio previo en el departamento de Córdoba en mujeres embarazadas con malaria mostró un aumento en la expresión de IFN γ , TNF α , IL-6 TGF- β 1, IL-10 en mujeres embarazadas con infección por *P. vivax* con respecto al grupo control (Yasnot et al., 2013). El estudio de Dobaño y colaboradores, en mujeres embarazadas con infección por *P. falciparum* encontró una correlación positiva entre la expresión génicas de IL-10 con citoquinas inflamatorias como IL-1 β , IL-6, TNF e IL-8, y una correlación inversa entre IL-8 e IFN- γ o IL-12. la expresión génica de citoquinas entre sangre periférica y de cordón umbilical (Dobaño et al., 2018). Por otra parte, el estudio López y colaboradores, se identificó un aumento en la expresión génica de IL-10, IFN- γ y TNF en mujeres embarazadas con malaria, comparada con mujeres embarazadas libre de infección; sin embargo, la expresión de estas citoquinas fue similar en infecciones por *P. falciparum* y *P. vivax* en las gestantes (López-Guzmán & Carmona-Fonseca, 2020).

Fuera de esto, los pocos estudios de expresión génica de citoquinas y su relación con las complicaciones observadas en la malaria son acerca de infecciones por *P. falciparum*, es el caso del estudio de Mahanta y colabores, que difieren de nuestros hallazgos al reportar una expresión mayor de TNF- α , IL-1b, IFN- γ and TGF- β en pacientes con malaria complicada por *P. falciparum* (Mahanta, Kar, Kakati, & Baruah, 2015). En el estudio de Ahmed y colaboradores se encontró aumentada la expresión de IL-10 en pacientes con malaria complicada por *P.*

falciparum, y una disminución en la fase temprana de la infección de IL-8. Esto es contrario a nuestros hallazgos en *P. vivax*, donde no se observa un aumento de la expresión de IL-10 en pacientes complicados, pero si se observa la expresión aumentada de IL-10 en el grupo control comparado con los dos grupos de pacientes con malaria (Ahmed, Bhardwaj, Sharma, Pande, & Anvikar, 2019).

Por otra parte, se analizó la correlación entre la expresión génica y la parasitemia, encontramos que a medida que aumenta la concentración de parásitos disminuye la expresión de IL-1 β y de TGF- β . Algunos estudios sugieren que el TGF- β 1 modula la secreción de citoquinas proinflamatorias como el IFN- γ , en concentraciones que se permita la eliminación de parásito, sin que la respuesta inflamatoria se descontrole y genere complicaciones (Drewry & Harty, 2020). Esto va de la mano, con los resultados de las correlaciones de la expresión génica entre los grupos de estudio, en el grupo de malaria no complicada, se presentaron cinco correlaciones con TGF- β 1 el perfil con citoquinas proinflamatorias del perfil de monocitos y Th1, mientras que en el grupo de malaria complicada disminuye en número e intensidad las correlaciones con TGF- β 1, y se intensifican las correlaciones entre citoquinas proinflamatorias, principalmente con IL-6.

En modelos experimentales con *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) que guía al desarrollo de malaria cerebral se encontraron bajos nivel de mRNA de TGF- β 1, y altas concentraciones de mRNA de TNF- α , con respecto al grupo control (de Kossodo & Grau, 1993). Estudios en modelos murinos han mostrado que la capacidad para activar o inactivar TGF- β 1, está relacionada con la variabilidad intrínseca de las especies de *Plasmodium* (Omer, Kurtzhals, & Riley, 2000).

Al observar un mayor número e intensidad en las correlaciones con TGF- β 1 y un aumento de la expresión de TGF- β 1 en pacientes con malaria no complicada, postulamos que TGF- β 1 actúa como una citoquina inmunomoduladora de la inflamación en el curso de la malaria por *P. vivax* no complicada, controlando el entorno inflamatorio y la progresión hacia la complicación.

Adicionalmente, en pacientes con malaria complicada la expresión de esta citoquina disminuye, el número de correlaciones con TGF- β 1 disminuye al igual que la intensidad entre ellas, y la concentración es inferior: lo cual podría atribuirse a una supresión o desregulación de las células Treg, así mismo, ha sido reportado que la desregulación de células Treg pueden conducir a diferente procesos patológicos (Kondělková et al., 2010), recientemente en las investigaciones de Sars-Cov-2 se ha visto que pacientes con manifestaciones graves de la

enfermedad presentan niveles bajos de Treg, y postulan a esta línea celular como un blanco terapéutico para contrarrestar la inflamación exacerbada en esta enfermedad (Stephen-Victor et al., 2020).

Según nuestros resultados la modulación de las citoquinas de los perfiles de monocitos, Th1 y Treg, no presentan diferencias significativas entre pacientes con malaria complicada y no complicada por *P. vivax*, es posible que este resultado derive la supresión celular influenciada por la infección, o por limitaciones en la cuantificación de la expresión de estos genes asociados a la técnica utilizada para su determinación, toda vez que la concentración plasmática de estas citoquinas si presenta una diferencia en los grupos clínicos comparados.

4.6 CONCLUSIONES

La expresión de los genes de citoquinas Th1 y Treg no mostró diferencias entre las formas clínicas de la malaria por *P. vivax*.

En malaria complicada, la parasitemia parece no lograr ser controlada dada la disminución de las expresiones de TGF- β 1 y de la IL-1 β .

Es importante explorar más acerca del papel inmunomodulador del TGF- β 1 en la malaria por *P. vivax*, su potencial como biomarcador de complicaciones o como un blanco para terapia inmunomoduladora.

Bibliografía

- Ahmed, M. Z., Bhardwaj, N., Sharma, S., Pande, V., & Anvikar, A. R. (2019). Transcriptional Modulation of the Host Immunity Mediated by Cytokines and Transcriptional Factors in *Plasmodium falciparum*-Infected Patients of North-East India. *Biomolecules*, 9(10), 600. doi:10.3390/biom9100600
- Andrade, B. B., Reis-Filho, A., Souza-Neto, S. M., Clarencio, J., Camargo, L. M., Barral, A., & Barral-Netto, M. (2010). Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malaria journal*, 9, 13. doi:10.1186/1475-2875-9-13
- Colborn, J. M., Ylöstalo, J. H., Koita, O. A., Cissé, O. H., & Krogstad, D. J. (2015). Human Gene Expression in Uncomplicated *Plasmodium falciparum* Malaria. *Journal of Immunology Research*, 2015, 162639. doi:10.1155/2015/162639
- de Kossodo, S., & Grau, G. E. (1993). Profiles of cytokine production in relation with susceptibility to cerebral malaria. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 151(9), 4811-4820.
- Dobaño, C., Berthoud, T., Manaca, M. N., Nhabomba, A., Guinovart, C., Aguilar, R., . . . Alonso, P. L. (2018). High production of pro-inflammatory cytokines by maternal blood mononuclear cells is associated with reduced maternal malaria but increased cord blood infection. *Malaria journal*, 17(1), 177-177. doi:10.1186/s12936-018-2317-2
- Drewry, L. L., & Harty, J. T. (2020). Balancing in a black box: Potential immunomodulatory roles for TGF- β signaling during blood-stage malaria. *Virulence*, 11(1), 159-169.
- Dunst, J., Kamena, F., & Matuschewski, K. (2017a). Cytokines and Chemokines in Cerebral Malaria Pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 324-324. doi:10.3389/fcimb.2017.00324
- Kondělková, K., Vokurková, D., Krejsek, J., Borská, L., Fiala, Z., & Ctírad, A. (2010). Regulatory T cells (TREG) and their roles in immune system with respect to immunopathological disorders. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 53(2), 73-77. doi:10.14712/18059694.2016.63
- Leonard, W. J., & Lin, J.-X. (2000). Cytokine receptor signaling pathways. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 105(5), 877-888.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods*, 25(4), 402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- López-Guzmán, C., & Carmona-Fonseca, J. (2020). Submicroscopic placental malaria: histopathology and expression of physiological process mediators. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 37, 220-228.
- Mahanta, A., Kar, S. K., Kakati, S., & Baruah, S. (2015). Heightened inflammation in severe malaria is associated with decreased IL-10 expression levels and neutrophils. *Innate immunity*, 21(5), 546-552.
- Mukaka, M. M. (2012). Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi medical journal : the journal of Medical Association of Malawi*, 24(3), 69-71.

- Omer, F., Kurtzhals, J., & Riley, E. (2000). Maintaining the immunological balance in parasitic infections: a role for TGF- β ? *Parasitology Today*, 16(1), 18-23.
- Sortica, V. A., Cunha, M. G., Ohnishi, M. D. O., Souza, J. M., Ribeiro-dos-Santos, Â. K. C., Santos, N. P. C., . . . Hutz, M. H. (2012). IL1B, IL4R, IL12RB1 and TNF gene polymorphisms are associated with *Plasmodium vivax* malaria in Brazil. *Malaria journal*, 11(1), 409. doi:10.1186/1475-2875-11-409
- Stephen-Victor, E., Das, M., Karnam, A., Pitard, B., Gautier, J.-F., & Bayry, J. (2020). Potential of regulatory T-cell-based therapies in the management of severe COVID-19. *European Respiratory Journal*, 56(3).
- Yasnot, M. F., Perkins, D. J., Corredor, M., Yanow, S., Carmona-Fonseca, J., & Maestre, A. (2013). The effects of *Plasmodium vivax* gestational malaria on the clinical and immune status of pregnant women in Northwestern Colombia. *Colombia Médica: CM*, 44(3), 172.

CAPITULO V

INFLUENCIA DE LA EXPRESIÓN GENICA Y LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE CITOQUINAS DEL PERFIL DE MONOCITOS, TH1 y TREG EN EL DESENLACE CLÍNICO DE LA MALARIA POR *P. VIVAX*

5.1 RESUMEN

5.1.1 Introducción

Las manifestaciones clínicas de la malaria complicada por *P. vivax*, son asociadas con la respuesta inmunológica del paciente frente al parásito. La desregulación y acción de citoquinas es un mecanismo que ha sido postulado como mediador de las complicaciones en esta infección. En Colombia la información al respecto es mínima, por lo cual el objetivo de este capítulo fue evaluar cómo influye la expresión y concentración de citoquinas de monocitos, Th1 y Treg sobre variables epidemiológicas y sobre el desenlace clínico en la malaria por *P. vivax*, en un área endémica para la transmisión de malaria en Colombia.

5.1.2. Métodos

Las variables clínicas, epidemiológicas, concentración y expresión génica de citoquinas, fueron evaluados a través de herramientas estadísticas se realizaron gráficas y tablas para observar la distribución de los datos. Se realizó un análisis de correlación por el coeficiente de Spearman para evaluar posibles asociaciones entre las variables. Para los análisis se utilizó el software estadístico R versión 3.6.3 y el software GraphPad Prism versión 7.00, se utilizó un intervalo de confianza al 95%, y un valor de $p < 0.05$ para evaluar la significancia de las pruebas estadísticas.

5.1.3 Resultados

En el grupo de pacientes con malaria complicada se observó que el recuento de parásitos se correlacionó de manera negativa con la concentración de TGF- β , y la expresión de TGF- β e IL-10. La concentración aumentada de IL-6 se correlacionó con el aumento de parásitos y AST, y

la disminución de la concentración de plaquetas. La trombocitopenia se correlacionó con el aumento de IL-6, IL-10 e IFN γ . La creatinina se correlacionó positivamente con la concentración de IL-2 y IL-1 β . La bilirrubina total se correlacionó negativamente con TNF α y TGF- β , y el aumento de enzimas hepáticas se correlacionó positivamente con la concentración de IL-6 e IFN γ . EN el grupo de paciente con malaria no complicada, los episodios de malaria previa se correlacionaron de forma negativa con la IL-10, la concentración de creatinina se correlaciona positivamente con la concentración de IL-2 T y TNF α , de la misma manera se correlaciona la bilirrubina directa con el IFN γ .

5.1.4 Conclusiones

Citoquinas del perfil Th1 principalmente IL-6 e IFN γ , pueden contribuir al desarrollo de complicaciones como la trombocitopenia severa, hipoglicemia, alteración de la función renal y hepática en las infecciones por *P. vivax*. La concentración aumentada de IL-10 y IL-6 en pacientes con malaria, tiene un papel influyente en el desarrollo de complicaciones, mientras que el TGF- β ejerce un mecanismo protector en el desarrollo de malaria por *P. vivax*.

5.2 INTRODUCCIÓN

En curso de las infecciones por *P. vivax* las personas pueden desarrollar una malaria asintomática, no complicada o complicada, estas formas clínicas son el resultado de la interacción de factores asociados al parásito, hospedero y otras condiciones ecoepidemiológicas relacionadas con el ciclo de vida del parásito.

En el caso de *P. vivax* no se conocen claramente los mecanismos fisiopatológicos que median las diversas manifestaciones clínicas; ; sin embargo, se cree que están estrechamente asociadas con la respuesta inmunitaria del huésped, mediada por la activación de la respuesta proinflamatoria y el desequilibrio en la producción de citoquinas y de moléculas de adhesión, las cuales favorecen el proceso fisiopatológico que desencadena disfunción endotelial y secuestro celular, generando obstrucción del flujo microvascular y deterioro progresivo de los procesos metabólicos celulares (Naing et al., 2014).

Las manifestaciones clínicas severas descritas para *P. vivax* incluye condiciones neurológicas, especialmente coma o sucesivas convulsiones y alteración de la conciencia; condiciones hematológicas, en particular anemia y trombocitopenia severa, y hemoglobinuria; síntomas sistémicos como el colapso circulatorio, daño vital de órganos, incluyendo la disfunción respiratoria y síndrome de dificultad respiratoria aguda, falla renal aguda, ruptura esplénica, disfunción hepática e ictericia (Bruno B Andrade et al., 2010; Howes et al., 2016; Kaushik, Gomber, & Dewan, 2012).

Algunos estudios han evaluado el papel de las citoquinas en la patogénesis de la malaria por *P. vivax*, principalmente a través de la cuantificación plasmática de estas moléculas y su asociación con las características clínicas descritas en pacientes categorizados con malaria asintomática, no complicada y complicada, aunque esta clasificación no es igual en todos los estudios. Las citoquinas IL-6, IL-17, IL-12p40, TNF, IP-10/CXCL10, IL-10 e IFN- γ se han reportado en concentraciones mayores en personas naturalmente infectadas con *P. vivax* comparados con controles sanos y personas recuperadas de malaria (Hojo-Souza et al., 2017), por otra parte, las concentraciones de TNF- α , IL-10 e IL-6 se han encontrado aumentadas en pacientes con malaria complicada y no complicada, siendo más alta en el primer grupo (Medina et al., 2011b; Raza et al., 2013). La parasitemia se ha correlacionado de manera positiva entre la carga parasitaria con la concentración de IL-10 , IL-12 e IL-6 (Guimarães da Costa et al., 2014; Zeyrek, Kurcer, Zeyrek, & Simsek, 2006) y anemia se ha correlacionado negativamente con la concentración de IL-10, CXCL10 e IFN- γ (Jain et al., 2010), la relación IFN- γ /IL-10, ha

mostrado una correlación con pacientes con concentraciones elevadas de creatinina en la malaria vivax (L. A. B. Cruz et al., 2018). El estudio de Marrugo y colaboradores en el departamento de Bolívar, Colombia, encontró una concentración aumentada de IL-10 e IFN- γ en pacientes con primo infección por *P. vivax*, con respecto a aquellos pacientes con episodios previos de la enfermedad (Gómez Marrugo, 2013). Así mismo, los perfiles de citoquinas en la población gestante con malaria por *P. vivax* también ha sido objeto de estudio, evaluando diferentes perfiles de estas moléculas y su relación con los desenlaces clínicos en esta población particular, donde concentraciones superiores de IL-10 estuvo asociada con la infección y complicaciones durante el embarazo (Dobaño et al., 2020).

En Colombia no existen estudios que evalúen como la infección por *P. vivax* modula la expresión o secreción de citoquinas, y como esto influye en las formas clínicas de la enfermedad, con excepción de los dos estudios en mujeres embarazadas; el objetivo de esta capítulo fue evaluar la modulación de las citoquinas del perfil Th1 y Treg por la infección de *P. vivax*, y su relación con las formas clínicas de la enfermedad malaria no complicada y complicada.

5.3 METODOLOGÍA

Se recopiló la información clínica, epidemiológica, y de concentración de citoquinas de los 156 participantes del estudio, y la información de la expresión génica de citoquinas de los 106 pacientes diagnosticados con malaria; estos datos fueron evaluados a través de herramientas estadísticas se realizaron gráficas y tablas para observar la distribución de los datos, para las comparaciones entre los grupos se utilizó el test de Kruskal wallis y el test de Mann Whitney dependiendo del número de grupos a comparar. Se realizó un análisis de correlación por el coeficiente de Spearman para evaluar posibles asociaciones entre las variables. Para los análisis se utilizó el software estadístico R versión 3.6.3 y el software GraphPad Prism versión 7.00, se utilizó un intervalo de confianza al 95%, y un valor de $p < 0.05$ para evaluar la significancia de las pruebas estadísticas.

5.4 RESULTADOS

5.4.1 Concentración de citoquinas del perfil de monocitos, Th1 y Treg y su relación con características demográficas

De las citoquinas de perfil Treg la concentración de IL-10 y de TGF- β fue significativamente mayor en mujeres con respecto a los hombres en el grupo de malaria complicada ($p < 0,0001$ para ambas citoquinas) en el grupo de malaria no complicada y controles sanos, las concentraciones de estas dos citoquinas fueron similares.

Se compararon las medianas de la concentración de citoquinas por sexo, en cada uno de los grupos de estudio. La concentración de IFN γ del perfil Th1 fue superior en mujeres ($p 0,0464$) del grupo de malaria complicada, mientras que la concentración de IL-6 del perfil de monocitos fue más alta en mujeres en el grupo de malaria no complicada ($p 0,0462$), la concentración de las demás citoquinas del perfil Th1 y de monocitos fueron similares entre hombres y mujeres (Figura 5.1)

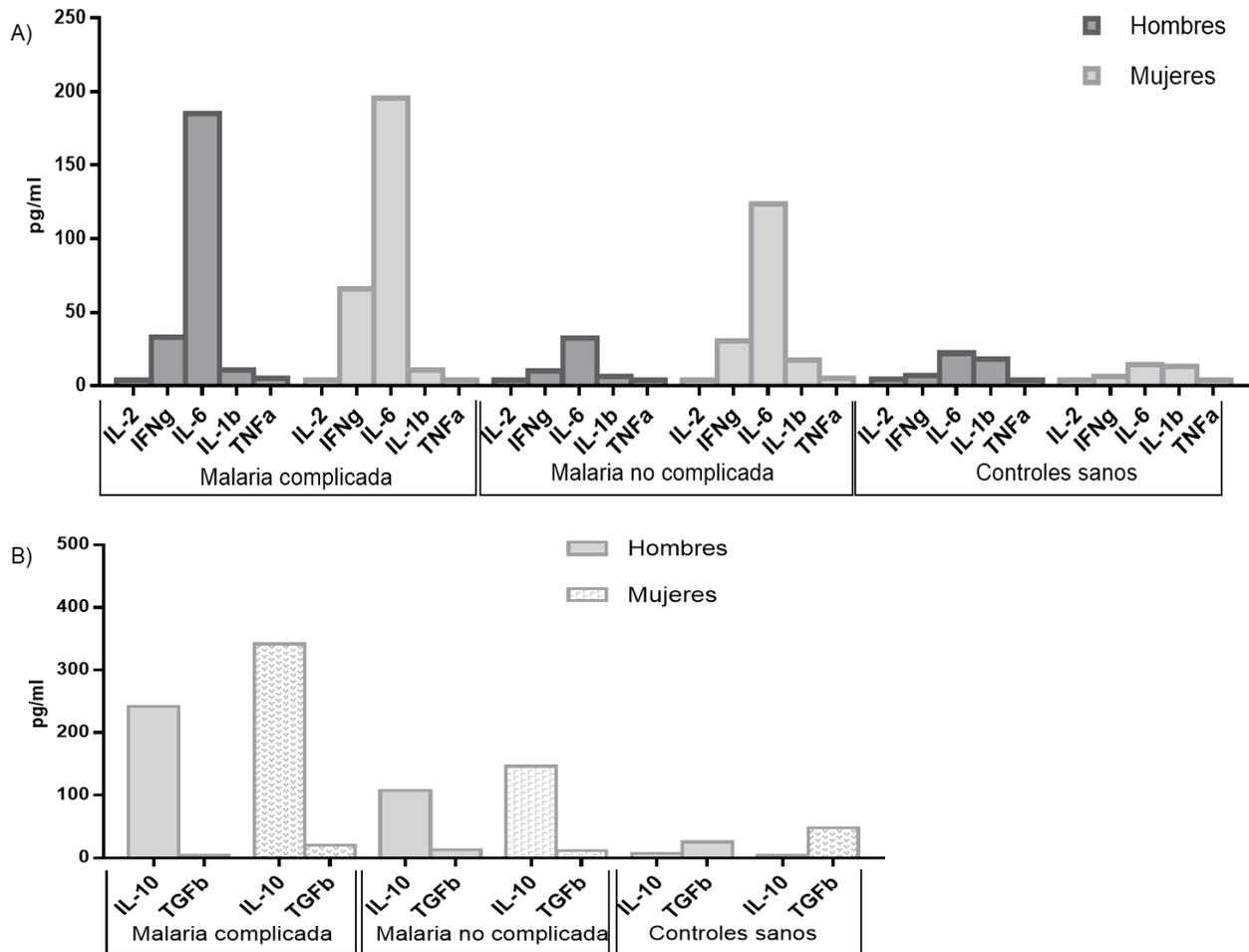


Figura 5.1 Distribución de la concentración de citoquinas por género. A) Citoquinas de perfil de monocitos y Th1, B) Citoquinas perfil Treg. Se gráfico la mediana de la concentración de cada citoquina.

Para evaluar la tendencia de la concentración de las citoquinas por rangos de edades, se construyó una gráfica descriptiva ilustrando tres grupos de edades para cada uno de los grupos de estudio, adicionalmente se realizaron comparaciones de las medianas de la concentración de cada citoquina en los tres grupos etarios por el test de Kruskal wallis y Mann Whitney, dependiendo del número de grupos a comparar. La IL-2 en el grupo de control presentó mayor concentración en las personas > de 40 años con una mediana de concentración de 20,25 pg/ml ($p = 0,0066$), mientras que para las personas de 0-17 y 18-10 años fue de 3,25 y 8,1 respectivamente. Por otra parte, la concentración de IL-1 β mostró una concentración más alta (15,2 pg/ml $p = 0,0111$) en pacientes complicados entre 0 – 17 años, con respecto a personas > 40 años con 3,9 pg/ml, para los demás grupos analizados por edad y forma clínica la IL-1 β

presentó concentraciones similares. Para las demás citoquinas del perfil monocitos, Th1 y Treg no se observó una diferencia significativa de la concentración con respecto a los rangos de edades evaluados (Figura 5.2)

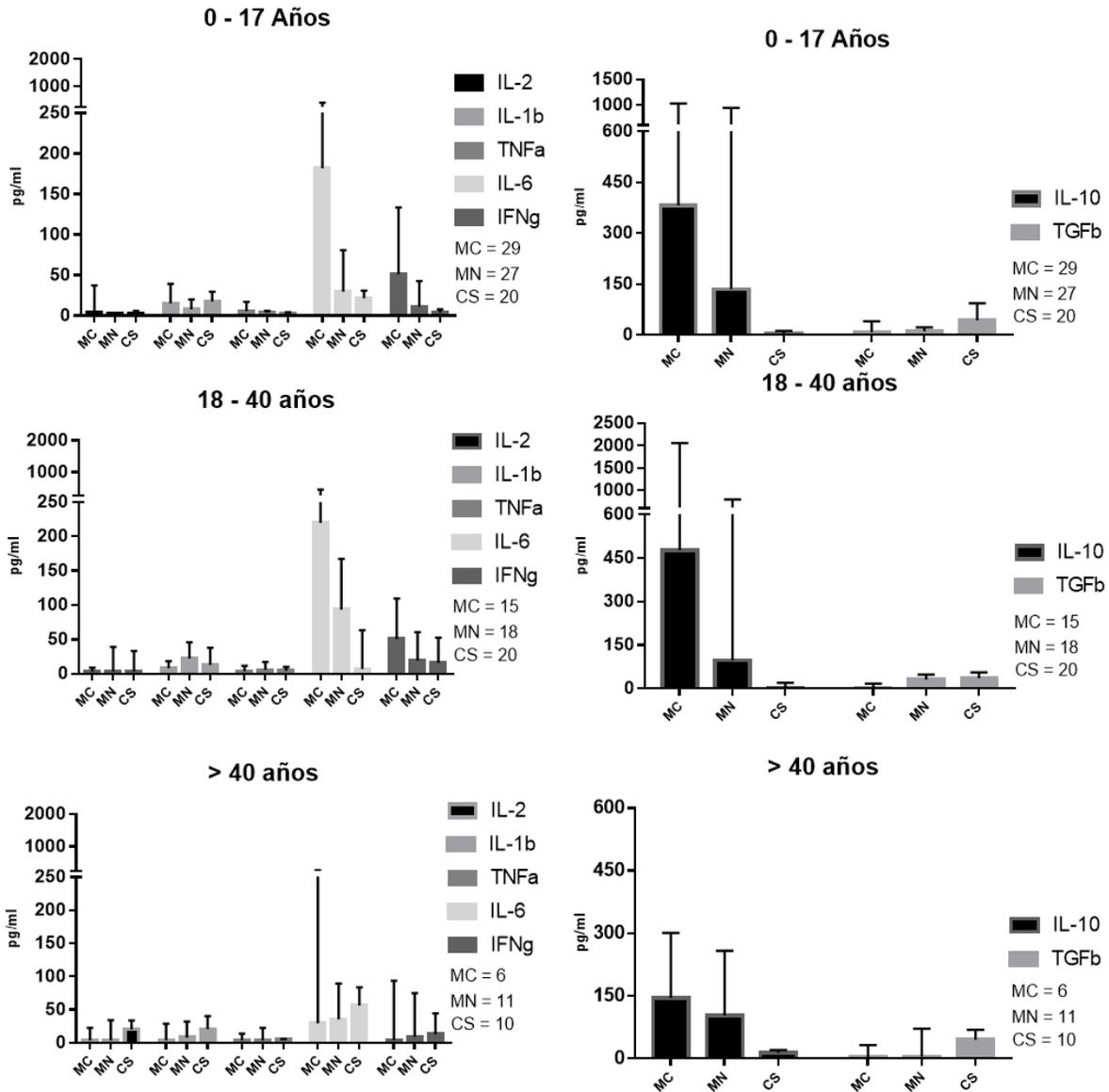


Figura 5.2. Distribución de las citoquinas por grupos etarios. Izquierda.) Citoquinas de perfil de monocitos y Th1, Derecha) Citoquinas perfil Treg. Se gráfico la mediana de la concentración de cada citoquina.

5.4.2 Correlaciones entre la concentración y expresión de citoquinas del perfil de monocitos, Th1 y Treg con parámetros de laboratorios asociados a malaria complicada.

Con un análisis de correlaciones por el coeficiente de Spearman se evaluaron las asociaciones entre la concentración de citoquinas, expresión génica, y parámetros de laboratorios utilizados como criterios de complicación en los individuos con malaria por *P. vivax*.

Para los pacientes con malaria complicada el recuento de parásitos mostró una asociación positiva con la concentración de IL-6 y negativa con la concentración de TGF- β y la expresión génica de IL-10 y TGF- β .

La edad de los pacientes se correlacionó positivamente con la concentración de IL-1 β . Los episodios de malaria previa se correlacionaron de manera positiva con las plaquetas, y de manera negativa con la concentración de IFN γ . La concentración de plaquetas se correlacionó de manera negativa con la concentración de IL-6, IL-10 e IFN γ . La concentración de glicemia se correlaciona de manera positiva con IL-2, IL-1 β y TNF α . La concentración de creatinina sérica se correlaciona positivamente con IL-2 y IL-1 β . Bilirrubina total se correlacionó con la concentración de TNF α y TGF- β , de manera negativa. Las enzimas hepáticas se correlacionan de manera positiva con IFN γ , adicionalmente se observó una correlación positiva entre AST e IL-6. La concentración de IL-6 se correlacionó de manera positiva con la expresión de IFN γ , y negativamente con la expresión de TGF- β . La IL-10 y TGF- β presentó correlación positiva entre la expresión génica y la concentración plasmática, para cada una de estas moléculas (Figura 5.3 A).

En el grupo de pacientes con malaria no complicada en general se observaron menos correlaciones entre la expresión, concentración de citoquinas con las variables de clínicas; el número de episodios de malarías previas se correlacionó de manera negativa con la concentración de IL-10. La concentración sérica de glicemia se correlacionó negativamente con la concentración de IL-6, y la expresión de IL-6 y IL-1 β . La concentración de creatinina se correlaciona de manera positiva con la concentración de TNF α , y de forma negativa con la expresión de TGF- β y IL-1 β . La concentración de bilirrubina directa se correlaciona de forma positiva con la concentración de IFN γ . La expresión de IFN γ se correlaciona de manera positiva con la concentración de IFN γ e IL-2 (Figura 5.3 B).

A) Malaria complicada

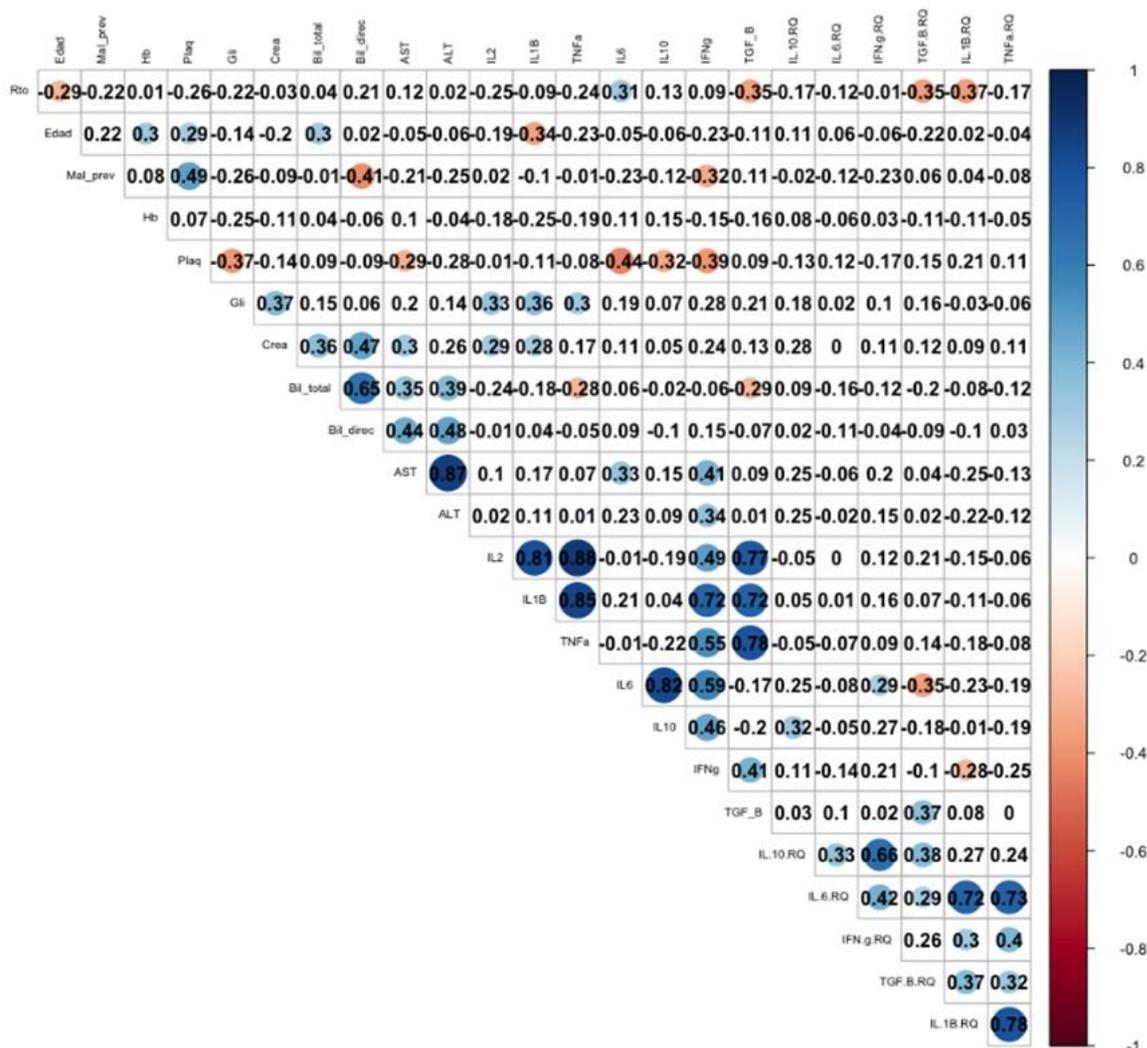


Figura 5.3 A. Correlaciones entre concentración de citoquinas, expresión génica y variables de laboratorio en pacientes con malaria complicada por *P. vivax*. El círculo en la intersección de variables indica un valor de $p < 0.05$ para la asociación de esas dos variables, el tamaño del punto es proporcional a la intensidad de la correlación, azul, correlación positiva; roja, correlación negativa (Escala al lado derecho).

B) Malaria no complicada

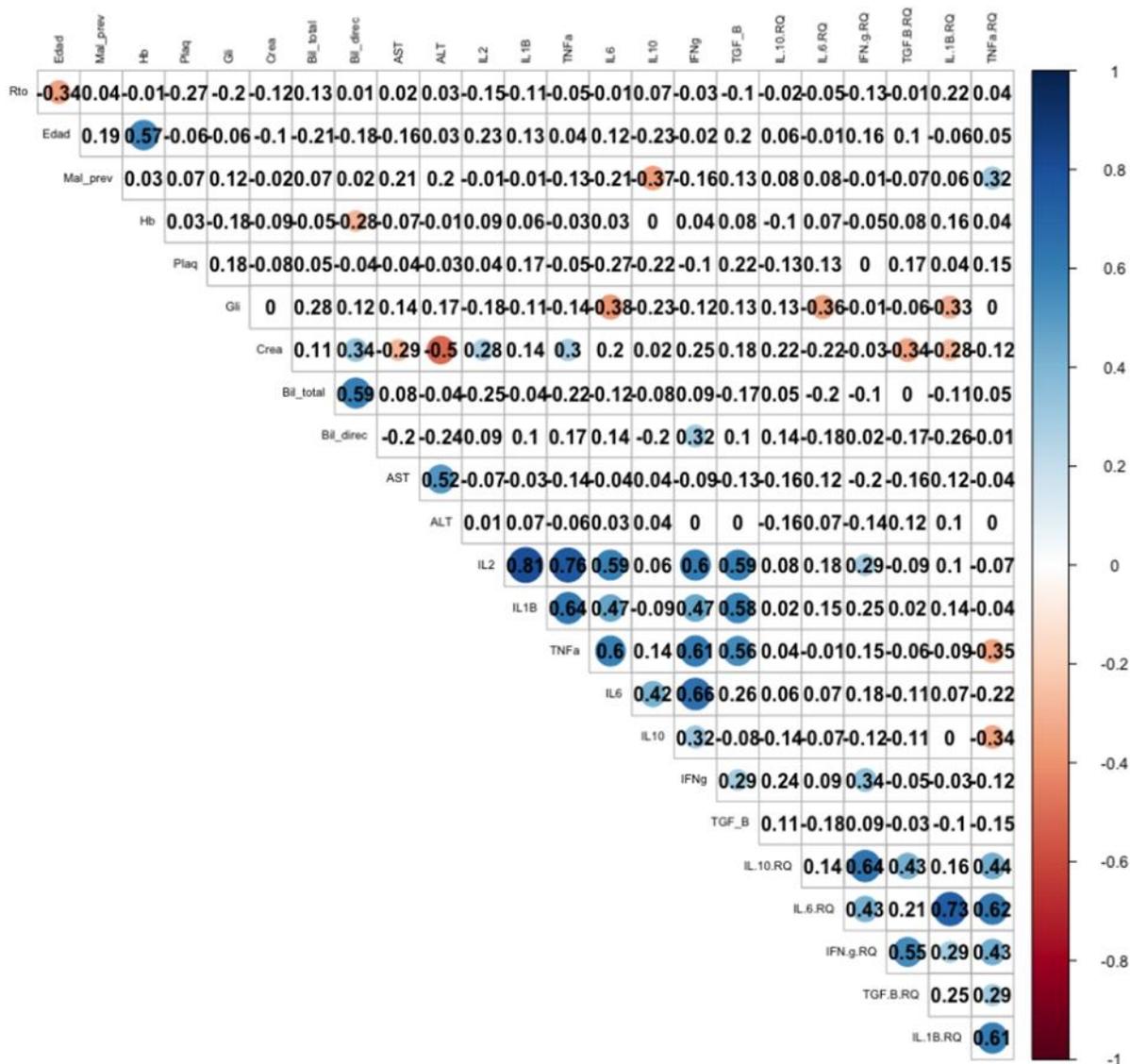
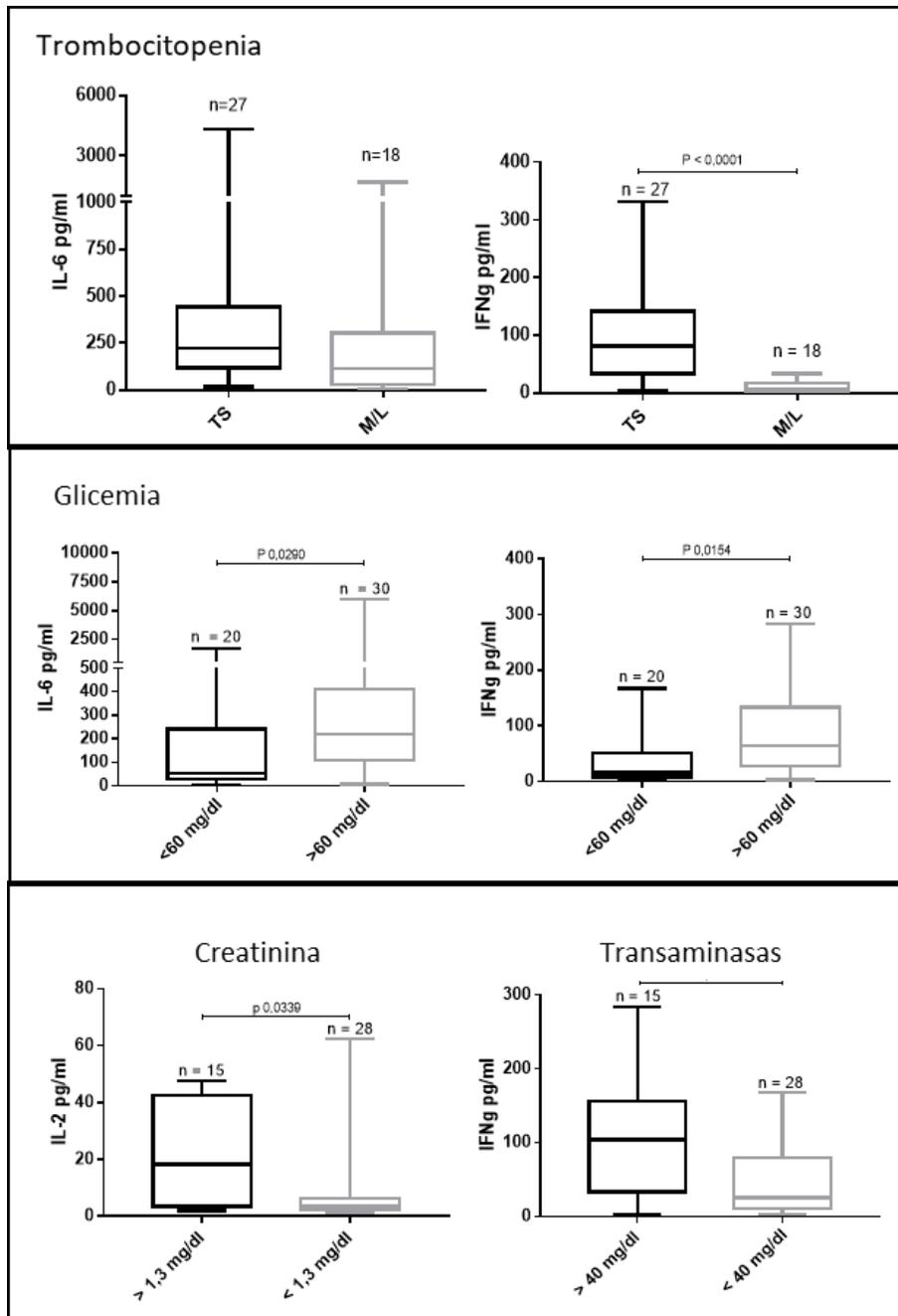


Figura 5.3 B. Correlaciones entre concentración de citoquinas, expresión génica y variables de laboratorio en pacientes con malaria no complicada por *P. vivax*. El círculo en la intersección de variables indica un valor de $p < 0.05$ para la asociación de esas dos variables, el tamaño del punto es proporcional a la intensidad de la correlación, azul, correlación positiva; roja, correlación negativa (Escala al lado derecho).

5.4.3 Análisis de la concentración de citoquinas con parámetros de laboratorio estratificados en pacientes con malaria complicada por *P. vivax*

En el grupo de pacientes con malaria complicada se realizó una estratificación de los parámetros de laboratorio que son utilizados como criterios para determinar la complicación en los pacientes con malaria, se analizó el comportamiento de la concentración plasmática de las citoquinas en estas estratificaciones, en la figura 5.4 se ilustra en diagrama de cajas los resultados con significancia estadística.

En este grupo de 50 pacientes con malaria complicada estratificamos las plaquetas en concentraciones $\leq 49.999/\mu\text{l}$ para trombocitopenia severa, de $50.000 - 99.999$ plaquetas/ μl trombocitopenia moderada, y $100.000 - 149.999$ plaquetas/ μl trombocitopenia leve; se observó que la concentración de IL-6 y IFN γ fue más alta en pacientes con trombocitopenia severa, con respecto a quienes presentaron trombocitopenia moderada o leve. La concentración de IL-6 y IFN γ fue menor en pacientes que tenían una concentración sérica de glicemia menor a 60 mg/dL. Los pacientes con concentración sérica de creatinina mayor a 1,3 mg/dL presentaron mayor concentración de IL-2, y aquellos pacientes con enzimas hepáticas superiores a 40 mg/dL tuvieron mayor concentración de IFN γ .



TS = Trombocitopenia severa, M= Trombocitopenia modera, L = Trombocitopenia leve. El valor de $p < 0.05$ fue considerado significativo.

Figura 5.4 Concentración de citoquinas y su relación con parámetros de laboratorio en pacientes con malaria complicada con *P. vivax*. Test de Mann–Whitney, valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo.

5.5 DISCUSIÓN

Algunas evidencias sugieren que las complicaciones observadas en la malaria por *P. vivax*, son producto de la desregulación de moléculas de la respuesta inmune como las citoquinas. En este capítulo evaluamos la asociación de la expresión y concentración de citoquinas del perfil de monocitos, Th1 y Treg, con el desenlace clínico en la malaria por *P. vivax*. La edad y el sexo no presentaron diferencias significativas entre los tres grupos de estudio, no se evidenciaron asociaciones entre el sexo con parámetros clínicos, pero encontramos que la concentración de IL-10, TGF- β e IFN γ fue más alta en las mujeres en el grupo de malaria complicada, y la IL-6 fue más alta en las mujeres del grupo de malaria no complicada. con respecto a las mujeres de los otros grupos de estudio.

La situación fue similar con la variable edad, esta no presento diferencias significativas entre los tres grupos de estudio, pero los pacientes de 0 -17 años del grupo de malaria complicada presentaron una mayor concentración de IL-1 β con respecto a pacientes entre los 18 – 40 o mayores de 40 años, para las demás citoquinas la concentración fue similar en los grupos de edad analizados.

Con respecto al análisis entre en número de episodios de malaria y su relación con las variables estudiadas, encontramos que en los pacientes con malaria complicada las personas con menos episodios de malaria por *P. vivax*, presentaron una correlación positiva con plaquetas, es decir, menos episodios previos de la enfermedad se asocia a una menor concentración de plaquetas, pero a su vez mayores concentraciones de IFN γ y de bilirrubina directa en sangre, obteniendo una correlación negativa con las últimas dos variables. En el grupo de malaria no complicada, evidenciamos una correlación negativa entre el número de episodios e IL-10, lo que nos indica que entre menos episodios de la enfermedad haya padecido la persona presentó una mayor concentración plasmática de IL-10.

La trombocitopenia es una de las principales manifestaciones en infecciones por *P. vivax*, en este estudio se encontró un alto porcentaje de pacientes con trombocitopenia severa, con respecto a publicaciones anteriores (Martínez-Salazar & Tobón-Castaño, 2014; Saravu, Docherla, Vasudev, & Shastry, 2011). Encontramos que entre más alto estuviera la concentración de IL-6, IL-10 e IFN γ , el conteo de plaquetas era más bajo, además las personas con menos episodios de la enfermedad tuvieron concentraciones más bajas de plaquetas. A diferencia de otros estudios donde concentraciones bajas de IL-6 son asociadas con trombocitopenia severa, en nuestro estudio se evidenció una correlación negativa entre estas

variables, los pacientes con trombocitopenia severa tenían las concentraciones más altas de IL-6, con respecto a pacientes con trombocitopenia moderada-leve, o pacientes sin trombocitopenia. En modelos in vitro la IL-6 estimula la proliferación y maduración de megacariocitos, resultando en un aumento en la producción de plaquetas, nuestro resultado podría evidenciar un mecanismo de restableciendo de la concentración plasmática de plaquetas al aumentar la producción de IL-6 (Senchenkova et al., 2013).

La concentración de IL-10 tuvo una correlación negativa con el conteo de plaquetas, dato similar a los reportado en estudios previos en infecciones por *P. vivax* y *P. falciparum* (Lacerda, Mourão, Coelho, & Santos, 2011); concentraciones altas de IL-10 disminuyen la producción de citoquinas proinflamatorias, lo que a su vez está relacionado con la disminución de progenitores de células plaquetarias (Punnath et al., 2019), esto podría contribuir al desarrollo de trombocitopenia severa. La concentración aumentada de IL-10 en pacientes como malaria complicada podría explicarse como una acción de sistema inmunológico para controlar la infección (Antonelli et al., 2020), aunque la IL-10 ha sido asociada con las manifestaciones complicadas en la malaria, en su función reguladora, disminuye la concentración de citoquinas proinflamatorias necesarias para el control de la parasitemia, en este estudio encontramos que en pacientes con recuentos superiores de 5.000 parásitos/ μ l es más alta la concentración de IL-10 (Rajiv Kumar, Ng, & Engwerda, 2019). Por otra parte, en pacientes con trombocitopenia en infecciones por *P. vivax* se ha observado la presencia de anemia, disfunción hepática y renal; se ha documentado que la disfunción multiorgánica está asociada con mortalidad en estos pacientes (Naing et al., 2014).

En el grupo de pacientes con criterio de complicación el aumento en la concentración sérica de la creatinina estuvo correlacionado con el aumento de bilirrubina total, bilirrubina directa, AST, y con citoquinas proinflamatorias como IL-2 y IL-1 β , estos resultados difieren a los reportes previos, el estudio publicado por Cruz y colaboradores en la amazonia brasilera, encontraron que el ratio entre IFN- γ /IL-10 fue mayor en pacientes con creatinina aumenta con respecto a quienes tuvieron creatinina normal (L. A. Cruz, M. Barral-Netto, & B. B. Andrade, 2018), en el estudio de Mendonça y colaboradores también encontraron relación entre el aumento de creatinina e IFN- γ (Mendonça, Queiroz, Lopes, Andrade, & Barral-Netto, 2013). En el análisis al interior del grupo de pacientes con malaria complicada, los pacientes con valores de creatinina > 1,3 mg/dl presenta mayor concentración de IL-2 (antiinflamatoria) con respecto a pacientes con concentración de creatinina de < 1,3 mg/dl en el mismo grupo.

Las citoquinas del perfil Th1 por su rol proinflamatorio están relacionadas con la producción de alteraciones en la función vascular, tubular y glomerular de los riñones, el reclutamiento de células inflamatorias como neutrófilos y macrófagos, contribuye a la activación de las células del endotelio renal y tubular, células que a su vez promueven la inflamación a través de la producción de citoquinas proinflamatorias, estos focos inflamatorios han sido asociados con el desarrollo de isquemia durante insuficiencia renal aguda (Monteserín Matesanz et al., 2019; Ortega & Fornoni, 2010). En malaria ha sido reportado nefritis intersticial aguda, glomerulonefritis aguda, necrosis cortical, lo cual puede estar influenciado por la respuesta inflamatoria exacerbada (Silva Junior, Pinto, Barros, Farias, & Daher, 2017).

Con respecto a la función hepática se evidenció una correlación positiva entre la concentración de AST y ALT con IFN γ , y AST con IL-6; en pacientes con malaria complicada, estos resultados guardan algunas similitudes con el estudio de Yeo y colaboradores, quienes reportaron una mayor concentración de IL-4, IL-6, IL-10, TNF α e IFN γ en pacientes con disfunción hepática en infección por *P. vivax*, con respecto a pacientes sin disfunción hepática en Asia (Yeom et al., 2003). Las citoquinas están relacionadas con una función reestructuradora del tejido hepático, ; sin embargo, una sostenida producción de citoquinas en el tiempo es asociada con afectaciones crónicas de este órgano (Tilg, 2001).

En el grupo de malaria complicada los pacientes con hipoglicemia (<60 mg/dl) presentaron niveles bajos de IL-6 e IFN- γ , con respecto a pacientes con concentraciones normales de glicemia en ese mismo grupo de paciente, estos resultados son contradictorios con otros estudios donde relacionan el aumento de citoquinas como IL-6, IL-1 y TNF α , con la disminución de la glicemia sérica. CXCL10 previamente había sido reportada como una molécula predictora de malaria cerebral por *P. falciparum* (Wilson et al., 2011). La IL-6 es una citoquina pleiotrópica, que en concentraciones elevadas ha sido asociada al desarrollo de severidad y letalidad en modelos experimentales (Wunderlich et al., 2012). Moléculas como la IL-6, se han involucrado en el metabolismo anormal de la glucosa por la inhibición de la gluconeogenesis, lo que disminuye la concentración de la glucosa en sangre (Dotson, Freeman, Failing, & Adler, 2008; Metzger et al., 1997; Shi, Fan, Su, & Yang, 2019), lo cual podría explicar la hipoglicemia en nuestra población estudio.

La concentración de TNF α fue baja y no se encontraron diferencias entre pacientes con malaria y el grupo control, similar a lo reportado por da Silva Ventura y colaboradores en la amazonia brasilera (Ventura et al., 2018), esta diferencia que se observa con respecto a los estudios de *P. vivax* en Asia o la India , podrían estar relacionados con la variabilidad genéticas del parásito

que estimulan perfiles diferentes de citoquinas proinflamatoria, ellos atribuyen una mayor respuesta del perfil Th2 sobre Th1, a la presencia de parásitos intestinales en los pacientes.

5.6 CONCLUSIONES

Repetidos encuentros de un hospedero con *P. vivax*, disminuye la probabilidad de desarrollar trombocitopenia, y de tener una respuesta proinflamatoria aumentada por IFN- γ .

El proceso inflamatorio vía Th1 sugiere un papel en la disminución de las plaquetas en sangre en la malaria por *P. vivax*.

La TGF- β parece tener un papel protector frente al desarrollo de complicaciones en pacientes con malaria vivax.

Las altas concentraciones plasmáticas de IL10, al igual que de la mayoría de citoquinas con perfil Th1 (proinflamatorio), sugiere que no es una molécula que haga regulación de manera eficaz y podría estar asociada con mecanismos fisiopatológicos que conducen a complicaciones en la malaria.

La IL-6 muestra un papel importante en la complicación de pacientes con malaria vivax, sobretodo en pacientes con trombocitopenia, hipoglicemia y disfunción hepática.

Bibliografía

- Andrade, B. B., Reis-Filho, A., Souza-Neto, S. M., Clarêncio, J., Camargo, L. M., Barral, A., & Barral-Netto, M. (2010). Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malaria journal*, 9(1), 13.
- Antonelli, L. R., Junqueira, C., Vinetz, J. M., Golenbock, D. T., Ferreira, M. U., & Gazzinelli, R. T. (2020). The immunology of *Plasmodium vivax* malaria. *Immunol Rev*, 293(1), 163-189. doi:10.1111/imr.12816
- Cruz, L. A. B., Barral-Netto, M., & Andrade, B. B. (2018). Distinct inflammatory profile underlies pathological increases in creatinine levels associated with *Plasmodium vivax* malaria clinical severity. *PLoS neglected tropical diseases*, 12(3), e0006306-e0006306. doi:10.1371/journal.pntd.0006306
- Dobaño, C., Bardají, A., Arévalo-Herrera, M., Martínez-Espinosa, F. E., Bôtto-Menezes, C., Padilla, N., . . . Requena, P. (2020). Cytokine signatures of *Plasmodium vivax* infection during pregnancy and delivery outcomes. *PLoS neglected tropical diseases*, 14(5), e0008155. doi:10.1371/journal.pntd.0008155
- Dotson, S., Freeman, R., Failing, H. J., & Adler, G. K. (2008). Hypoglycemia increases serum interleukin-6 levels in healthy men and women. *Diabetes care*, 31(6), 1222-1223.
- Gómez Marrugo, D. C. (2013). Perfil de citoquinas y anticuerpos en respuesta a la infección por *Plasmodium vivax* en una población del sur de Bolívar, Colombia.
- Guimarães da Costa, A., do Valle Antonelli, L. R., Augusto Carvalho Costa, P., Paulo Diniz Pimentel, J., Garcia, N. P., Monteiro Tarragô, A., . . . Malheiro, A. (2014). The Robust and Modulated Biomarker Network Elicited by the *Plasmodium vivax* Infection Is Mainly Mediated by the IL-6/IL-10 Axis and Is Associated with the Parasite Load. *Journal of Immunology Research*, 2014, 318250. doi:10.1155/2014/318250
- Hojo-Souza, N. S., Pereira, D. B., de Souza, F. S. H., de Oliveira Mendes, T. A., Cardoso, M. S., Tada, M. S., . . . Bueno, L. L. (2017). On the cytokine/chemokine network during *Plasmodium vivax* malaria: new insights to understand the disease. *Malaria journal*, 16(1), 1-10.
- Howes, R. E., Battle, K. E., Mendis, K. N., Smith, D. L., Cibulskis, R. E., Baird, J. K., & Hay, S. I. (2016). Global epidemiology of *Plasmodium vivax*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 95(6_Suppl), 15-34.
- Jain, V., Singh, P. P., Silawat, N., Patel, R., Saxena, A., Bharti, P. K., . . . Singh, N. (2010). A preliminary study on pro- and anti-inflammatory cytokine profiles in *Plasmodium vivax* malaria patients from central zone of India. *Acta Trop*, 113(3), 263-268. doi:10.1016/j.actatropica.2009.11.009
- Kaushik, J. S., Gomber, S., & Dewan, P. (2012). Clinical and Epidemiological Profiles of Severe Malaria in Children from Delhi, India. *Journal of Health, Population, and Nutrition*, 30(1), 113-116.
- Kumar, R., Ng, S., & Engwerda, C. (2019). The Role of IL-10 in Malaria: A Double Edged Sword. *Frontiers in Immunology*, 10(229). doi:10.3389/fimmu.2019.00229
- Martínez-Salazar, E. L., & Tobón-Castaño, A. (2014). Platelet profile is associated with clinical complications in patients with vivax and *falciparum* malaria in Colombia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 47, 341-349.

- Medina, T. S., Costa, S. P., Oliveira, M. D., Ventura, A. M., Souza, J. M., Gomes, T. F., . . . Cunha, M. G. (2011). Increased interleukin-10 and interferon- γ levels in *Plasmodium vivax* malaria suggest a reciprocal regulation which is not altered by IL-10 gene promoter polymorphism. *Malaria journal*, 10(1), 264.
- Mendonça, V. R., Queiroz, A. T., Lopes, F. M., Andrade, B. B., & Barral-Netto, M. (2013). Networking the host immune response in *Plasmodium vivax* malaria. *Malaria journal*, 12(1), 69.
- Metzger, S., Goldschmidt, N., Barash, V., Peretz, T., Drize, O., Shilyansky, J., . . . Chajek-Shaul, T. (1997). Interleukin-6 secretion in mice is associated with reduced glucose-6-phosphatase and liver glycogen levels. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 273(2), E262-E267.
- Monteserín Matesanz, C., de la Gala, F., Rancan, L., Piñeiro, P., Simón, C., Tejedor, A., . . . Garutti, I. (2019). Predictive value of plasma cytokines for acute kidney injury following lung resection surgery: prospective observational study. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 69, 242-252.
- Naing, C., Whittaker, M. A., Nyunt Wai, V., & Mak, J. W. (2014). Is *Plasmodium vivax* Malaria a Severe Malaria?: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(8), e3071. doi:10.1371/journal.pntd.0003071
- Ortega, L. M., & Feroni, A. (2010). Role of cytokines in the pathogenesis of acute and chronic kidney disease, glomerulonephritis, and end-stage kidney disease. *International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research*, 2(1), 49-62.
- Raza, A., Ghanchi, N. K., Sarwar Zubairi, A., Raheem, A., Nizami, S., & Beg, M. A. (2013). Tumor necrosis factor - α , interleukin-10, intercellular and vascular adhesion molecules are possible biomarkers of disease severity in complicated *Plasmodium vivax* isolates from Pakistan. *PloS one*, 8(12), e81363. doi:10.1371/journal.pone.0081363
- Saravu, K., Docherla, M., Vasudev, A., & Shastry, B. A. (2011). Thrombocytopenia in vivax and falciparum malaria: an observational study of 131 patients in Karnataka, India. *Annals of tropical medicine and parasitology*, 105(8), 593-598. doi:10.1179/2047773211Y.0000000013
- Senchenkova, E. Y., Komoto, S., Russell, J., Almeida-Paula, L. D., Yan, L.-S., Zhang, S., & Granger, D. N. (2013). Interleukin-6 mediates the platelet abnormalities and thrombogenesis associated with experimental colitis. *The American journal of pathology*, 183(1), 173-181.
- Shi, J., Fan, J., Su, Q., & Yang, Z. (2019). Cytokines and Abnormal Glucose and Lipid Metabolism. *Frontiers in Endocrinology*, 10(703). doi:10.3389/fendo.2019.00703
- Silva Junior, G. B. d., Pinto, J. R., Barros, E. J. G., Farias, G. M. N., & Daher, E. D. F. (2017). Kidney involvement in malaria: an update. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 59.
- Tilg, H. (2001). Cytokines and liver diseases. *Canadian Journal of Gastroenterology*, 15.
- Ventura, A., Fernandes, A. A. M., Zanini, G. M., Pratt-Riccio, L. R., Sequeira, C. G., do Monte, C. R. S., . . . Daniel-Ribeiro, C. T. (2018). Clinical and immunological profiles of anaemia in children and adolescents with *Plasmodium vivax* malaria in the Para state, Brazilian Amazon. *Acta Trop*, 181, 122-131. doi:10.1016/j.actatropica.2018.01.022

- Wilson, N. O., Jain, V., Roberts, C. E., Lucchi, N., Joel, P. K., Singh, M. P., . . . Stiles, J. K. (2011). CXCL4 and CXCL10 predict risk of fatal cerebral malaria. *Dis Markers*, 30(1), 39-49. doi:10.3233/dma-2011-0763
- Wunderlich, C. M., Delić, D., Behnke, K., Meryk, A., Ströhle, P., Chaurasia, B., . . . Wunderlich, F. T. (2012). Cutting edge: Inhibition of IL-6 trans-signaling protects from malaria-induced lethality in mice. *The Journal of Immunology*, 188(9), 4141-4144.
- Yeom, J.-S., Park, S.-H., Ryu, S.-H., Park, H.-K., Woo, S.-Y., Ha, E.-H., . . . Park, J.-W. (2003). Serum cytokine profiles in patients with *Plasmodium vivax* malaria: A comparison between those who presented with and without hepatic dysfunction. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(6), 687-691. doi:[https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(03\)80104-9](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(03)80104-9)
- Zeyrek, F. Y., Kurcer, M. A., Zeyrek, D., & Simsek, Z. (2006). Parasite density and serum cytokine levels in *Plasmodium vivax* malaria in Turkey. *Parasite Immunol*, 28(5), 201-207. doi:10.1111/j.1365-3024.2006.00822.x

ANEXO 1



Grupo de Investigaciones Microbiológicas y Biomédicas de Córdoba - Universidad de Córdoba
Proyecto: EVALUACIÓN DE CITOQUINAS, QUEMOQUINAS Y MOLÉCULAS ENDOTELIALES COMO
POTENCIALES BIOMARCADORES PRONÓSTICO DE COMPLICACIONES EN PACIENTES CON MALARIA
POR PLASMODIUM VIVAX Y PLASMODIUM FALCIPARUM.
FICHA CLINICO - EPIDEMIOLÓGICA



1. IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE					
1.1 Número de identificación		1.2 Fecha de toma de muestra (dd/mm/aa)		1.3 Código	
1.4 Tipo de documento: O RC: Registro civil; O TI: Tarjeta de identidad; O CC: Cédula de ciudadanía; O PA: Pasaporte; O MS: Menor sin ID; O CE: Cédula de extranjería; O AS: Adulto sin ID					1.5 No de Identificación:
1.6 Nombres y apellidos del paciente					1.7 Teléfono
1.8 Fecha de nacimiento (dd/mm/aaaa)		1.9 Edad	1.10 Sexo O 1. Masculino O 2. Femenino O 3. Indeterminado		1.11 Dpto y municipio de procedencia
1.12 Área de procedencia/ocurrencia del caso O 1. Cabecera municipal O 2. Centro poblado O 3. Rural disperso			1.13 Localidad /barrio/vereda de ocurrencia del caso		
1.14 Ocupación actual del paciente O 1. Agricultura O 2. Pecuaria O 3. Ama de casa O 4. Turismo O 5. Expediciones O 6. Minería O 7. Caza/pesca O 8. Excavación O 9. Viajero O 10. Conductor O 11. Desconocido O 12. Estudiante O 13. Doméstica O 14. Militar O 15. Otro ¿Cuál?			1.15 Tipo de régimen en salud O 1. Excepción o especial O 2. No asegurado O 3. Contributivo O 4. Subsidiado	1.16 Nombre de la administradora de salud	
1.18 Pertenencia étnica O 1. Indígena O 2. Rom, Gitano O 3. Raizal O 4. Palenquero O 5. Negro, mulato, afro colombiano O 6. Otro ¿Cuál?			1.17 Grupos poblacionales a los que pertenece el paciente O 1. Desplazado O 2. Gestantes O 3. Desmovilizados O 4. Población psiquiátrica O 5. Indigentes O 6. Discapacitados O 7. Carcelarios O 8. Migrantes O 9. Víctimas de la violencia armada O 10. Madres comunitarias O 11. Población infantil a cargo del ICBF O 12. Otros grupos poblacionales ¿Cuáles?		
1.19 Dpto y municipio de residencia del paciente		1.20 Dirección de residencia		1.21 Tiempo en el lugar de residencia ? ____ meses	
				1.22 Lugares frecuentados en el último mes?	
1.23 Escolaridad					
O 1. Ninguno	O 2. Primaria	O 3. Primaria no graduado	O 4. Bachillerato	O 5. Bachillerato no graduado	O 6. Técnico O 7. Técnico no graduado
O 8. Tecnólogo	O 9. Tecnólogo no graduado	O 10. Profesional	O 11. Profesional no graduado	O 12. Posgrado no graduado	O 13. Educación informal. ¿Cuál?
2. DATOS COMPLEMENTARIOS					
2.1 Diagnóstico inicial del caso: _____ O1. Probable O 2. Confirmado por			2.2 Fecha de consulta (dd / mm / aaaa)		
2.3 ¿Hospitalizado? O 1. Si O 2. No		2.4 Fecha de Hospitalización (dd / mm / aaaa)		2.5 Condición final O 1. Vivo O 2. Muerto	2.6 Causa básica de la muerte
2.7 ¿Paciente remitido a centro de salud? O 1. Si O 2. No ¿Cuál?		2.8 Vigilancia activa O 1. Si O 2. No	2.9 Sintomático O 1. Si O 2. No	2.10 Fecha de defunción (dd / mm / aaaa)	
2.11 Especie de Plasmodium		2.12 Tipo de examen O 1. GG O 2. PCR O 3. PDR O 4. OTRO		2.13 Primera vez de diagnóstico de malaria? O 1. Si O 2. No Fecha aproximada (dd / mm / aaaa)	
2.14 Recuento parasitario		2.15 ¿Presencia de Gametocitos? O 1. Si O 2. No Recuento:		2.16 Clasificación según origen O 1. Autóctono O 2. Importado	
Cuantas veces ha tenido malaria?				2.17 Recrudescencia O 1. Si O 2. No	2.18 Edad gestacional (en meses)
Cuantas veces ha tenido dengue?		Ha presentado la siguientes infecciones? VIH Zika Chikunguya Hepatitis			
2.19 ¿Ha referido usted alguno de los siguientes síntomas?					
O 1 Fiebre*	O 2. Cefalea	O 3. Escalofríos	O 4. Mareo	O 5. Náuseas	O 6. Ictericia O 7. Hematuria
O 8. Artralgias	O 9. Mialgias	O 10. Somnolencia	O 11. Dolor retroocular	O 12. Hemorragia	O 13. Convulsión O 14. Choque
O 15. Cansancio	O 16. Pérdida del apetito	O 17. Sudoración	O 18. Coma	O 19. Confusión	O 21. Anemia O 23. CID

O24. Hepatomegalia		O25. Esplenomegalia		O26. pérdida de peso		O27. prolapso rectal		O28. Otro. ¿Cuál? _____					
*Si la persona ha tenido fiebre indique: 1.1. Días de fiebre: _____ 1.2 Temperatura _____													
3. COMPLICACIONES													
O1. NO		O2. Cerebral		O3. Renal		O4. Hepática		O5. Pulmonar		O6. Hematológica		O7. Otra	
4. TRATAMIENTO													
O1. Art+Lum		O2. Ars M		O3. Art+Lum+Pri		O4. Clo		O5. Qui M		4.1 Fecha de inicio de tratamiento (dd/mm/aaaa)			
O6. Qui oral +Cii		O7. Qui M+Dox		O8. Qui oral+Cii+Pri		O9. Qui IV+ Cii		O10. Qui oral					
O11. Qui oral+Dox+f		O12. Ars rectal		O13. Clo+Pri		O14. Sintto		O15. Otro					
Art: Artemeter; LUM: Lumefantrine; Ars: Artesunato; Pri: Primaquina; Clo: Cloroquina; Qui: quinina; Cii: clindamicina; Dox: Doxiciclina; IV: Intravenoso													
5. ANTECEDENTES EPIDEMIOLÓGICOS													
FACTORES DE RIESGO		1 SI 2 NO		FACTORES DE RIESGO		1 SI 2 NO							
5.1 Criaderos de animales en casa o vecinos				5.15 Vivienda cerca del área de cultivo									
5.2 Criaderos de animales en el sitio de trabajo				5.16 Número de personas en el grupo familiar									
5.3 Presencia de mosquitos en el área				5.17 Transfusiones sanguíneas anteriores									
5.4 Disponibilidad de recolección de basura				5.18 Familiares, vecinos o compañeros de trabajo con síntomas febriles en los últimos 15 días									
5.5 Agua por acueducto en vivienda				5.19 Fumigaciones recientes cerca de su vivienda o trabajo									
5.6 Suministro de agua continuo a su vivienda				5.20 Ingestión de medicamentos para malaria									
5.7 Uso de angeos en ventana				5.21 Desplazamiento forzoso de su vivienda									
5.8 Usa insecticida en su casa				5.22 Lavado de manos: con agua de chorro, agua en recipiente									
5.9 Uso de repelente				5.23 Lavado de alimentos: con agua de chorro, agua en recipiente									
5.10 Uso de toldillos para dormir				5.24 Disposición de escretas: Aire libre, letrina, sanitario									
5.11 Uso de toldillo impregnados				5.25 Casa con piso de tierra									
5.12 Cuando fue la ultima impregnación?				5.27 Uso de calzado en el trabajo									
5.13 Lluvias en los últimos 15 días				5.28 Bajo rendimiento escolar									
5.14 Contactos con aguas estancadas e inundaciones													
6. ANTECEDENTES REPRODUCTIVOS													
6.1 Número de embarazos (Incluido el embarazo actual)				6.5 Muertes neonatales									
6.2 Nacidos vivos				6.6 Partos prematuros									
6.3 Abortos espontáneos				6.7 Episodios previos de malaria durante el embarazo actual									
6.4 Mbrtinos				6.8 Medicamentos antimaláricos durante el embarazo actual, bien como prevención o tratamiento									
Para cada variable responda 1: Sí o 2: No e indique la cantidad seguida de un guión													
7. PRUEBAS DE LABORATORIO													
7.1 Hematocrito (%) _____		7.7 Neutrófilos (%) _____		7.12 Creatinina serica mg/dl _____									
7.2 Hemoglobina (g/dL) _____		7.8 Eosinófilos (%) _____		7.13 TGO U/L _____									
7.3 Rto. Eritrocitos (/mm ³) _____		7.9 Basófilos (%) _____		7.14 TGP U/L _____									
7.4 Rto. Leucocitos (/mm ³) _____		7.10 Mbnocitos (%) _____		7.15 Bilirubina total mg/dl _____									
7.5 Reticulocitos _____		7.11 Linfocitos (%) _____		7.16 Bilirubina directa mg/dl _____									
7.6 Plaquetas/mm ³ _____				7.17 Glucosa mg/dl _____									
				7.18 Proteínas md/dl _____									
				7.19 Fosfasa alcalina _____									
Nombre de quien diligencia la encuesta: _____													

ANEXO 2.

EVALUACIÓN DE CITOQUINAS, QUIMIOCINAS Y MOLÉCULAS ENDOTELIALES COMO POTENCIALES BIOMARCADORES PRONÓSTICO DE COMPLICACIONES EN PACIENTES CON MALARIA POR *PLASMODIUM VIVAX* Y *PLASMODIUM FALCIPARUM*.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

La malaria complicada tiene manifestaciones clínicas que comprometen el funcionamiento de diferentes órganos, afecta principalmente a niños, mujeres embarazadas y personas con deficiencias inmunológicas. El propósito de este estudio es evaluar citoquinas, quimiocinas y moléculas endoteliales como potenciales biomarcadores pronóstico de complicaciones en pacientes con malaria por *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum* pacientes del departamento de Córdoba. Se estudiarán 3 grupos (individuos control, pacientes no complicados y pacientes complicados). A cada grupo de individuos se les realizarán pruebas de laboratorios de diagnóstico (convencional y/o molecular), bioquímicos, hematológicos; con el fin de obtener factores pronóstico de omplicaciones en los pacientes. Por tanto se tomarán dos tubos de sangre con anticoagulante EDTA y dos tubos de sangre en tubo seco.

Procedimientos de estudio

Si usted acepta participar, serán tomados los datos clínicos registrados en su historia clínica con el fin de conocer los procedimientos realizados, diagnóstico y tratamiento de su enfermedad. Además se tomará una muestra de sangre con elementos seguros, que no significaran ningún riesgo para su bienestar.

Beneficios

El beneficio más que individual es colectivo, su participación es una generosa contribución al desarrollo de la ciencia, cuyas aplicaciones serán futuras, a través del desarrollo de mejores estrategias para mejorar el manejo clínico con malaria y evitar el desarrollo de cuadros complicados de la enfermedad y así mejorar la calidad de vida de los pacientes, minimizando el ausentismo laboral y escolar, altos costos al sistema de salud, millones de muertes de niños y adultos alrededor del mundo; y a la vez impactar positivamente al desarrollo socioeconómico de los países afectados.

Riesgos

No aplica

Confidencialidad

Guardaremos privacidad acerca de los registros que puedan identificarlo hasta donde nos lo permita la ley. Su información será manejada bajo un código asignado en el estudio, y solo el investigador y personal autorizado, tendrán acceso a ellos. Usted no será identificado por nombre en ningún informe publicado ni en presentación de resultados.

Personas a contactar

Si tiene alguna pregunta acerca de este estudio o acerca de lo que debe hacer en caso de que se sienta alguna molestia durante el estudio, puede comunicarse con el investigador responsable.

Nombre del investigador: María Fernanda Yasnot Acosta
Dirección: Carrera 6 #76-103, Universidad de Córdoba, Facultad de Ciencias de la salud.
Grupo de Investigaciones Microbiológicas y biomédicas de Córdoba (GIMBIC)
Teléfono: (Tan et al.)-7860319 o fax 7860319

Nombre del Investigador: Catalina Tovar Acero/Mayra Raciny Alemán
Dirección: Carrera 6 #76-103, Universidad de Córdoba, Facultad de Ciencias de la salud.
Grupo de Investigaciones Microbiológicas y biomédicas de Córdoba (GIMBIC)
Teléfono: 3145976629/3005627135

Terminación del estudio

Usted entiende que su participación es VOLUNTARIA. En cualquier momento usted puede retirar su consentimiento para participar en este estudio.

Aceptación

Los componentes sanguíneos de su cuerpo que vienen en la muestra que usted generosamente dona, serán utilizados en los procedimientos aquí descritos, pero pueden ser almacenados para futuros estudios de investigación que estén relacionados con temas microbiológicos y biomédicos, previo aval del Comité de Ética para investigación en Humanos de la Facultad de Salud de la Universidad de Córdoba.

¿Usted acepta que sus componentes sanguíneos sean usados en futuras investigaciones?

SI _____ NO _____

SU FIRMA (O HUELLA DIGITAL) INDICA QUE USTED HA DECIDIDO PARTICIPAR VOLUNTARIAMENTE EN ESTE ESTUDIO HABIENDO LEIDO (O ESCUCHADO) LA INFORMACIÓN ANTERIOR. SI EXISTE ALGUNA PARTE DE ESTE DOCUMENTO QUE NO ENTIENDA, O REQUIERE INFORMACIÓN ADICIONAL, PREGUNTE A UNA DE LAS PERSONAS ENCARGADAS DEL PROCEDIMIENTO ANTES DE FIRMAR.

El presente consentimiento se diligencia a los _____ días del mes de _____ del año _____.

Nombre del voluntario: _____

No. Documento identidad: _____ Firma o huella: _____

Testigo 1 (Nombre) _____ Firma o huella: _____

Testigo 2 (Nombre) _____ Firma o huella: _____

Investigador (Nombre) _____ Firma: _____

Este procedimiento de consentimiento informado está ajustado a las normas de ética médica vigentes en Colombia, a la declaración de Helsinki y sus enmiendas, a la guía para Buenas Prácticas Clínicas (ICH E6) y a la aprobación del Comité de ética para investigación en Humanos de la facultad de ciencias de la salud de la Universidad de Córdoba.