

Perfil de citoquinas y anticuerpos en respuesta a la infección por *Plasmodium vivax* en una población del sur de Bolívar, Colombia

Diana Gómez Marrugo¹, Carlos Moneriz^{2*}.

¹ Química Farmacéutica. Candidata a Magister. Maestría de Bioquímica. Unidad de Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad de Cartagena. Colombia.

² Químico Farmacéutico. Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular. Docente de la Unidad de Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad de Cartagena. Colombia.

* Corresponding author: cmonerizp@unicartagena.edu.co

Perfil de citoquinas y anticuerpos en respuesta a la infección por Plasmodium vivax en una población del sur de Bolívar, Colombia

RESUMEN

Introducción: La malaria es una importante causa de enfermedad y muerte en los países tropicales. Las citoquinas inflamatorias producidas por el sistema inmune innato juegan un papel importante en la regulación de la inmunidad adaptativa frente a la etapa sanguínea del *Plasmodium*. Sin embargo, el papel de estos mediadores en la patogénesis de la enfermedad por *P. vivax* sigue siendo poco clara.

Objetivo: Determinar los niveles séricos de citoquinas e IgG en pacientes infectados con *P. vivax* y correlacionar estas moléculas con la severidad de la enfermedad.

Metodología: Estudio piloto de corte transversal realizado en el municipio de Montecristo, una población del sur de Bolívar (Colombia). El parásito de la malaria se identificó mediante examen microscópico. Los pacientes se distribuyeron en dos grupos: primera infección y reinfección por *P. vivax*, y se compararon con un grupo control sano. Los niveles séricos de las citoquinas y de IgG se determinaron mediante la técnica de ELISA.

Resultados: Los niveles de citoquinas e IgG fueron significativamente mayores en los pacientes con malaria en comparación con los controles sanos ($p < 0,05$). Los niveles de IL-10 fueron significativamente mayores en el grupo de primera infección cuando se comparó con el grupo de reinfección ($p < 0,05$). El cociente de IFN- γ /IL-10 fue mayor en el grupo de primera infección comparado con el grupo de reinfección.

Conclusión: El problema de la malaria continúa siendo de gran interés científico, y en especial la no detección del parásito ante posibles parasitemias submicroscópicas. Esta investigación sugiere que la severidad de la enfermedad está fuertemente asociada a activación de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias y a la respuesta inmune humoral.

PALABRAS CLAVES: *Plasmodium*, *citoquinas*, *Inmunoglobulinas*, *Interferón gamma*, *Interleuquina 10*.

Profile of cytokines and antibodies in response to infection by Plasmodium vivax in a population in southern Bolivar, Colombia

SUMMARY

Introduction: Malaria is a major cause of disease and death in tropical countries. Inflammatory cytokines produced by cells of the innate immune response play an important role in regulation of adaptive immunity to blood stage of *Plasmodium*. However, the role of these mediators in disease pathogenesis by *P. vivax* remains unclear.

Objective: determine serum levels of cytokines and IgG in patients infected with *P. vivax* and correlate these molecules with disease severity.

Methods: Pilot study of cross section carried in the municipality of Montecristo, a population of southern Bolivar (Colombia). Malaria parasites were identified by microscopic examination. Patients were distributed into two groups: first infection and reinfection by *P. vivax*, and compared with a healthy control group. The serum levels of the cytokines and IgG were evaluated by ELISA.

Results: The cytokines and IgG levels were significantly higher in the patients with malaria as compared with to healthy controls ($p < 0.05$). The levels of IL-10 in the first infection group were significantly higher than in reinfection group ($p < 0.05$). The IFN- γ /IL-10 ratio was higher in the group of primary infection compared with to reinfection group.

Conclusion: The problem of malaria continues to be of great scientific interest, especially the non-detection of the parasite to possible submicroscopic parasitemia. This research suggests that the severity of the disease is strongly associated with activation of proinflammatory and antiinflammatory cytokines and humoral immune response.

KEYWORDS: *Plasmodium*, *cytokines*, *immunoglobulins*, *interferon gamma*, *interleukin 10*.

INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad producida por parásitos del género *Plasmodium* y es transmitida principalmente por la picadura de la hembra infectada del mosquito *Anopheles* [1]. En el hombre, la infección puede estar ocasionada por 5 especies: *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malarie*, *P. ovale* y *P. knowlesi* [1-3].

La malaria sigue siendo uno de los principales problemas de salud pública en gran parte del mundo tropical debido a la alta morbilidad, mortalidad y el impacto socio económico, que ocasiona en la población humana [4, 5]. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) [6], cerca de la mitad de la población mundial permanece expuesta a esta enfermedad, y se estima que en el año 2010 aparecieron 243 millones de casos que ocasionaron 660.000 muertes siendo la mayoría en niños menores de 5 años, lo que hace de esta enfermedad la principal causa de muerte en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, especialmente al sur del Sahara en África, el sudeste de Asia y Latinoamérica [6-8]. A esta problemática se le suman factores como la resistencia del *Plasmodium* a los antimaláricos, la resistencia de *Anopheles* a los insecticidas, la falta de una vacuna eficaz, el cambio climático mundial y la expansión mundial de las áreas geográficas con condiciones propicias para la transmisión del agente infeccioso, todo lo cual contribuye a empeorar su panorama epidemiológico [9-12].

Colombia es uno de los seis países en las Américas que presentan un aumento anual en el número de casos en la última década, constituyéndose, después de Brasil, en el país que más aporta casos de malaria en la región [8]. En Colombia, durante el año 2012, se registraron en el Sistema de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) 56.175 casos de malaria, con predominio de infección por *P. vivax*, con 41.817 casos (74,4%), 13.733 (24,4%) correspondieron a *P. falciparum*, 617 (1,1%) a infección mixta (*P. vivax* y *P. falciparum*) y 8 (0,01%) a *P. malariae* [13]. Por departamento de procedencia en el año 2012, Antioquia registró el 43,3% de los casos, seguido por Chocó con 15,8%, Nariño con 12,2%, Córdoba con 9,8% y Bolívar con 6,7% de los casos. Estos cinco departamentos agrupan el 87,7% de casos notificados en el país. En el caso del departamento de Bolívar, se registraron en el año 2012: 2.950 casos de malaria por

P.vivax, 595 casos de malaria por *P. falciparum*, 191 casos de malaria asociada (Formas mixtas) y 1 de malaria por *P. malariae*, para un total de 3.737 casos [13].

Desde 1974, los casos de malaria que predominan en Colombia, son los producidos por *P. vivax*, a pesar de que hay regiones, como la Costa Pacífica, en donde la relación favorece a *P. falciparum* [14]. El comportamiento que se registra en Colombia se caracteriza por la presencia de ciclos epidémicos que ocurren cada 2 a 7 años, relacionados con el advenimiento del fenómeno de El Niño-Oscilación Sur [14-16].

La malaria por *P. vivax* está ampliamente distribuida alrededor del mundo; en las regiones del sur y sureste de Asia y representa 50% de los casos de malaria [17]. No obstante, la carga de este tipo de malaria es mayor en Centroamérica y Suramérica, donde produce hasta 71 a 81 % de los casos [17]. El *P. vivax* y *P.ovale* presentan una forma latente en el hígado denominada hipnozoíto, que pueden ser reactivado y causar recaídas o reinfecciones clínicas después de muchos meses del primer evento [5, 18, 19].

La malaria continúa representando un problema para la salud pública para Colombia, ya que el 85 % del territorio rural del país, situado por debajo de los 1.500 metros sobre el nivel del mar, presenta condiciones climáticas, geográficas, culturales y epidemiológicas adecuadas para la transmisión de la enfermedad [20-22]. El riesgo de transmisión se encuentra también relacionado con factores socioeconómicos, como poblaciones desplazadas debido a conflictos armados, violencia, pobreza en zonas rurales [20], crecimiento desordenado de los núcleos urbanos, migraciones continuas, explotación de los bosques y la minería de oro, secuelas ambientales de proyectos estatales y privados, y una deficiente gestión del ambiente [10, 20]. Igualmente, el comienzo del tratamiento luego de 48 horas de iniciados los síntomas, las demoras en la admisión en los servicios de salud y las fallas en la atención de los pacientes, son algunos de los factores identificados que se asocian con la mortalidad por malaria [23].

Por otra parte, muchas de las infecciones causadas por los diferentes parásitos de la malaria son clínicamente silenciosas, lo que refleja la capacidad de los mecanismos adaptativos inmunes para prevenir la enfermedad [24], sin embargo, el sistema inmune no es capaz de desarrollar una protección completamente eficiente en todos los

individuos infectados. Una observación clave en las regiones endémicas de malaria es la adquisición gradual de la respuesta inmune protectora en humanos frente al parásito [25]. Esta respuesta inmune es muy variable dentro de la población, dependiendo de un gran número de factores y dando lugar a distintas manifestaciones de la enfermedad, desde pacientes que la cursan de forma asintomática a los que adquieren la forma severa de la misma y mueren [26]. En zonas endémicas de malaria se requieren varias infecciones para alcanzar un nivel de inmunidad (preinmunización) que permita a los individuos infectados sobrevivir a futuras reinfecciones con parásitos letales, incluso cuando desarrollan parasitemias evidentes [27].

La inmunidad frente al *Plasmodium* a nivel del estadio eritrocítico esta mediada por la respuesta inmune innata y la respuesta adaptativa (Figura 1) [28, 29]. La respuesta inflamatoria generada como respuesta a la infección induce la liberación de citoquinas, las cuales conducen a daño tisular y favorecen la activación de macrófagos con el fin de matar los parásitos circulantes [30]. Específicamente, las células NK (natural killer), linfocitos T CD8+ y CD4+, producen interferón gamma (IFN- γ) y los macrófagos liberan Factor de Necrosis Tumoral (TNF). Estos factores secretados al plasma, son citoquinas pro-inflamatorias y son necesarias para la inhibición del crecimiento del parásito y la estimulación de la fagocitosis para eliminar eritrocitos parasitados [30]. A su vez, esta respuesta está regulada y controlada por citoquinas antiinflamatorias tales como la Interleuquina 10 (IL-10), interleuquina 4 (IL-4) y factor de crecimiento transformante- β (TGF β) [30]. La IL-10 es requerida para la protección frente a la malaria y tiene un importante papel como inmunoregulador de la infección causada por *Plasmodium*, debido a que neutraliza el efecto de citoquinas que son producidas por los linfocitos T CD8+, los cuales son responsables de la inmunopatología asociada con la sobreproducción de IFN- γ [31-35]. En este estadio el paciente infectado con *P. vivax* como producto de las citoquinas inflamatorias, presenta cuadros sintomatológicos, tales como: sudoración, fiebre, escalofrío, dolor en las articulaciones, entre otras [24, 36-40].

Debido a la gran diversidad de respuesta ante esta enfermedad, se necesitan con urgencia estudios más detallados sobre mecanismos del sistema inmune y la generación de anticuerpos frente a los estadios sanguíneos del *Plasmodium*. En el departamento de Bolívar son pocos los estudios realizados para evaluar la respuesta

inmune de los pacientes con malaria. Los estudios en Colombia han estado focalizados en zonas del pacífico, parte de Antioquia y Nariño.

En la actualidad, existen muchos estudios sobre los niveles de citoquinas en pacientes infectados con *P. falciparum*, pero poco se conoce sobre el balance de citoquinas inflamatorias y antiinflamatorias en pacientes infectados con *P. vivax*.

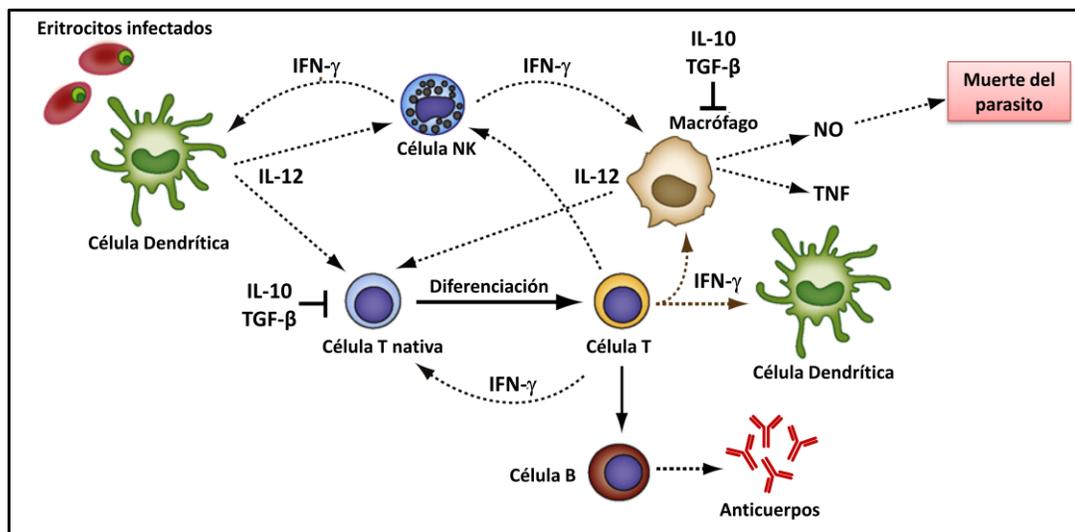


Figura 1. Relación entre la inmunidad innata y adaptativa frente a las fases sanguíneas del Plasmodium. La inmunidad adaptativa a la malaria es regulada por liberación de citoquinas producidas por las células de la respuesta inmune innata. Las células dendríticas (DCs) maduran y en respuesta a ligandos del parásito o también a citoquinas inflamatorias, como el IFN- γ , este es primer sitio de la respuesta inmune frente a las etapas sanguíneas del *Plasmodium*. La maduración de DCs se asocia con la regulación aumentada de la expresión de moléculas MHC de clase II, CD40, CD80, CD86, moléculas de adhesión y la producción de citoquinas como la interleuquina-12 (IL-12). La IL-12 activa a las células NK para producir IFN- γ e induce la diferenciación de las células T CD4+. La producción de citoquinas, particularmente el IFN- γ liberado de las células NK genera la maduración de DCs y aumenta el efecto de los estímulos derivados de la maduración del parásito, lo que facilita la expansión clonal de las células T CD4+. Citoquinas como la IL-10 y TGF- β regulan negativamente tanto la respuesta innata como la adaptativa. NO, óxido nítrico, TCR, receptor de células T; TNF, factor de necrosis tumoral. Adaptado de Good *et al.* 2010.

La respuesta humoral esta mediada por la secreción de anticuerpos tales como Inmunoglobulinas (IgG), que causan citotoxicidad a células infectadas dependientes de anticuerpos [18, 41]. Estudios realizados, han reportado el comportamiento de la respuesta inmunitaria tales como: altos niveles de citoquinas inflamatorias (TNF, IL-6 e IFN- γ) en patologías severas y bajos niveles de citoquinas antiinflamatorias (IL-10 y TGF- β) en malaria aguda [31, 33, 39, 42-49], así como también la respuesta mediada

por anticuerpos [25, 27, 50-52]. Asimismo, estudios han revelado que a medida que aumenta la severidad de la enfermedad del paciente, en términos de parasitemias (parásitos en sangre), los niveles de citoquinas (IFN- γ e IL-10), presentan una regulación recíproca en pacientes con malaria por *P. vivax* [39].

Teniendo en cuenta la importancia de la malaria en el perfil epidemiológico de Colombia, es necesario realizar estudios sobre el comportamiento de la respuesta inmunitaria frente a esta patología; con el propósito de describir y esclarecer los mecanismos de interacción parásito-huésped. En este trabajo se describen por primera vez algunos aspectos de relevancia relacionados con la problemática de la malaria en el sur de Bolívar (Colombia). El objetivo de este estudio consistió en determinar los niveles séricos de citoquinas e IgG en pacientes infectados con *P. vivax* y a su vez correlacionar estas moléculas con la severidad de la enfermedad.

METODOLOGIA

Tipo de estudio, población de referencia y selección de la muestra

Se llevó a cabo un estudio piloto de corte transversal, en una población de Montecristo ubicada en el Sur del departamento de Bolívar (Colombia) (Figura 2). Los participantes del estudio se seleccionaron de forma no aleatoria, utilizando la Ficha Única de Notificación de Malaria del Instituto Nacional de Salud de Colombia [53]. Para lo anterior, se realizó una brigada de salud en la zona de estudio y previamente convocada por la Secretaría Departamental de Salud de Bolívar (Colombia); donde participaron profesionales de la salud tales como: médicos, enfermeras, bacteriólogos, auxiliares de enfermería y odontólogos. Se incluyeron en el estudio pacientes voluntarios con *Plasmodium* en sangre y con sintomatología de malaria y pacientes voluntarios con gota gruesa negativa pero con sintomatología y antecedentes de malaria. Se excluyeron del estudio pacientes enfermos con otras patologías tales como: hepatitis viral, alcoholismo crónico, infección por VIH, fiebre amarilla, dengue, leptospirosis, tuberculosis, Leishmaniasis y aquellos que no aceptaron su participación en el estudio. Para este estudio, se compararon 3 grupos distribuidos así: pacientes infectados por primera vez por *P. vivax* (1ª Infección), pacientes con sintomatología y

antecedentes de malaria con menos de un mes por *P. vivax* (Reinfección) y personas sanas voluntarios que no habían presentado eventos de malaria (Control).

Diagnóstico Clínico

Durante la anamnesis, se identificaron las características clínicas por parte del profesional de la salud, en pacientes que posiblemente estaban infectados por *Plasmodium*; tales como: fiebre intermitente durante al menos 3 días, cefalea, debilidad, escalofrío, mialgia, entre otros; posteriormente en estos pacientes se confirmó el diagnóstico por gota gruesa. En cuanto, a los pacientes de reinfección, las características clínicas fueron mayoritariamente cefalea y malestar general. Estos pacientes presentaron episodios de malaria por *P. vivax* por lo menos con un mes de antelación.

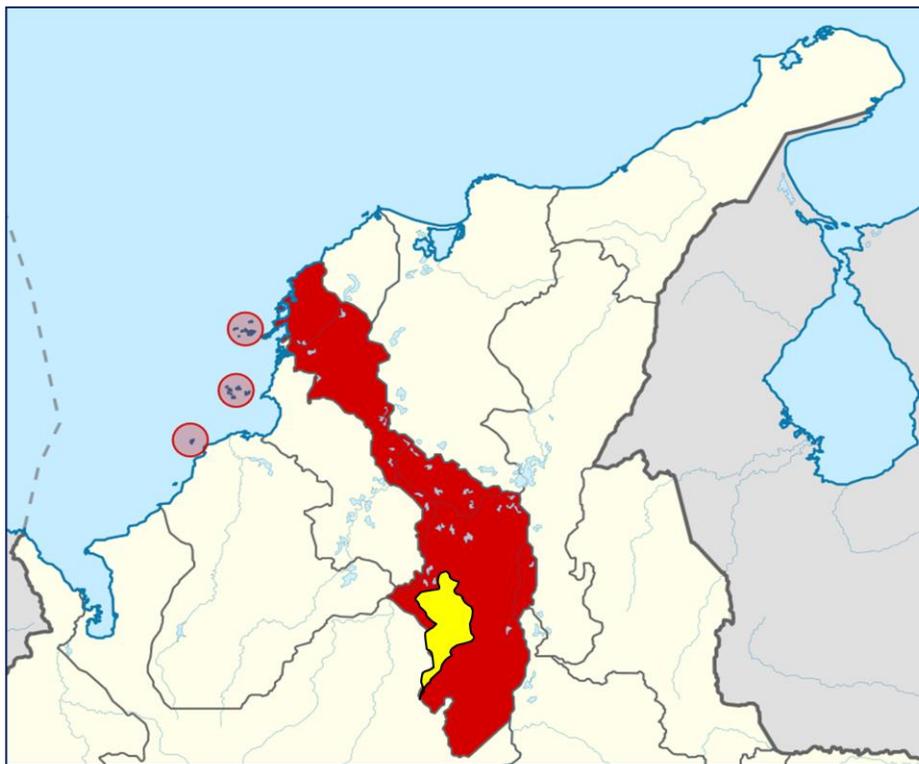


Figura 2. Localización geográfica de la localidad de estudio. Montecristo (amarillo), un municipio de Colombia, está ubicado en el departamento de Bolívar (rojo), al norte del país. Limita con poblaciones como: Achí, Tiquisio, Santa Rosa del Sur, Arenal del Sur y Río viejo; zonas con alta transmisión de malaria por *P. vivax*.

Diagnóstico parasitológico

La detección microscópica del parásito se realizó utilizando la técnica de gota gruesa, siguiendo los protocolos recomendados por la Guía para la atención clínica integral del paciente con malaria del Instituto Nacional de Salud [54]. Las parasitemias se calcularon en 100 leucocitos y el estándar utilizado para expresar la densidad parasitaria fue de 8.000 leucocitos. Los valores se expresaron en parásitos por microlitros de sangre, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Parásitos}/\mu\text{L} = (\# \text{ de parásitos} * 8000 \text{ leucocitos}/\mu\text{l}) / (100 \text{ leucocitos})$$

Obtención del plasma

Para las mediciones de las concentraciones de citoquinas e IgG en plasma, se extrajeron muestras de sangre venosa (5 mL) en tubos con Heparina Sódica como anticoagulante. Las muestras de plasma de los pacientes en estudio se obtuvieron por centrifugación, se separaron de la capa inferior (eritrocitos) y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Ensayos de Citoquinas e IgG total

Las concentraciones en plasma de IL-10 e IFN- γ , se cuantificaron por la técnica de ELISA mediante los Kits de reactivos: Human IL-10 y Human IFN- γ ELISA Ready-SET-Go!® respectivamente (BD, eBioscience, Inc.). Inicialmente, las microplacas de 96 pozos se incubaron con un anticuerpo de captura (anti-human IL-10 or IFN- γ coating antibody). Posteriormente a la incubación y después de varios lavados, las muestras o estándares se adicionaron a las microplacas con el objetivo de unir las Interleuquinas humanas con los anticuerpos de captura. Seguidamente y después de varios lavados se adicionó a las microplacas el anticuerpo de detección (biotin-conjugated anti-human IL-10 or IFN- γ antibody), con el fin de unirse a las interleuquinas humanas capturadas por el primer anticuerpo. A continuación, las microplacas se incubaron con la enzima peroxidasa de rábano unida a la avidina (Streptavidin-HRP), y después de varios pasos de lavado para eliminar los anticuerpos y enzimas no unida, se adicionó el reactivo sustrato específico (Tetrametilbenzidina) para la HRP. La reacción enzimática se detuvo con la adición de un ácido (H₂SO₄ 2N) y la densidad óptica se midió a 450 nm y finalmente las concentraciones se calcularon utilizando curvas de calibración en cada placa de 96 pozos con 8 diluciones de los estándares de citoquinas recombinantes

humanas. Todos los procedimientos se siguieron de acuerdo a las instrucciones específicas del proveedor del producto.

Para el caso de la medición de los niveles de IgG total, se utilizó el kit de reactivos: Human IgG total ELISA Ready-SET-Go![®] (BD, eBioscience, Inc.) y se usó un protocolo similar al realizado con las interleuquinas; a diferencia del anticuerpo de detección, el cual no tiene unido la biotina y la enzima es sólo la peroxidasa de rábano (HRP) sin unión a la avidina.

Consideraciones éticas

El presente trabajo se realizó conforme a las normas éticas de la resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia y cuenta con la aprobación del comité de ética de la Universidad de Cartagena (Colombia). Los pacientes diagnosticados con malaria recibieron los tratamientos terapéuticos adecuados, los cuales se prescribieron por el profesional de la salud autorizado por la Secretaria Departamental de Salud de Bolívar. Todos los pacientes del estudio, aceptaron voluntariamente su participación, mediante su consentimiento informado.

Análisis estadístico

Las variables cualitativas y cuantitativas se analizaron utilizando el paquete estadístico SigmaPlot v 11.0. Para las comparaciones entre las concentraciones de citoquinas e IgG entre los grupos, utilizamos el test de U Mann – Whitney para los datos que no tuvieron distribución normal, y el test de Student para los datos que tuvieron distribución normal. Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Características Generales de los grupos de estudio

En el estudio se incluyeron 58 individuos y se distribuyeron de la siguiente manera: 14 pacientes correspondientes al grupo de la 1^a Infección (24%), 21 pacientes correspondientes al grupo de Reinfeción (36%) y 23 personas del grupo control (40%). La especie mayoritaria dentro de los pacientes infectados fue el *P. vivax* y se encontró solo un paciente con *P. falciparum*, que se excluyó del estudio, debido a que no representaba una muestra significativa para realizar el análisis de los datos.

Con respecto al sexo de los participantes, se encontró que el género masculino fue mayor en el grupo de 1ª Infección, comparado con el resto de los grupos. La prueba de gota gruesa resultó positiva para *P. vivax* en el grupo de 1ª Infección y negativa para el grupo de reinfección y grupo control. En la variable edad no existieron diferencias estadísticamente significativas, entre los grupos de estudios ($p > 0,05$). En el grupo de 1ª infección se encontró una media de parasitemias de $3464,2 \pm 892,3$ parásitos/ μL , con un rango de valores que oscilaron entre 1900 a 5100 parásitos/ μL (Tabla 1). Los pacientes de este grupo se caracterizaron por síntomas tales como: fiebre, cefalea, escalofrío, astenia, adinamia y mialgia. La mayor parte de los pacientes presentaron parasitemias en los rangos hasta 3180 parásitos/ μL (28,6%) y 3820 parásitos/ μL (28,6%) (Figura 3). En cuanto al grupo de reinfección, la sintomatología se caracterizó por cefalea y malestar general.

Tabla 1. Características generales de los pacientes y controles sanos

Variables Cualitativas	1ª Infección (n=14)	Reinfección (n=21)	Control (n=23)
Sexo	M: 12 (86%) F: 2 (14%)	M: 8 (38%) F: 13 (62%)	M: 14 (61%) F: 9 (39%)
Gota gruesa	Positiva (<i>P. vivax</i>)	Negativa	Negativa
Variables* Cuantitativas	$\bar{X} \pm \text{DE}$ (rango)**	$\bar{X} \pm \text{DE}$ (rango)	$\bar{X} \pm \text{DE}$ (rango)
Edad (años)	$23,6 \pm 14,3$ (8,0 - 61,0)	$27,9 \pm 14,3$ (8,0 - 60,0)	$29,9 \pm 12,4$ (3,0 - 54,0)
Parasitemia (parásitos/ μL)	$3464,2 \pm 892,3$ (1900 - 5100)	-----	-----

* $\bar{X} \pm \text{DE}$: promedio \pm desviación estándar

** Valor mínimo-Valor máximo

--- No se detectaron parásitos

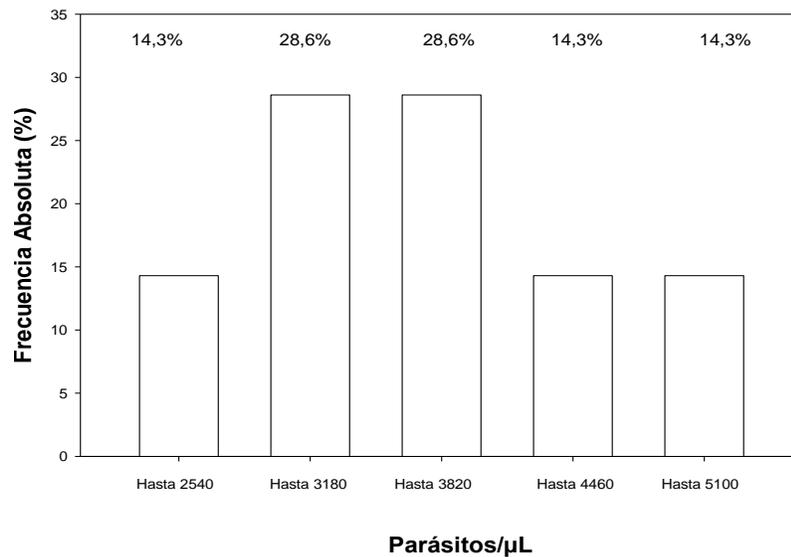


Figura 3. Distribución de las parasitemias de los casos de malaria por *P. vivax* en el grupo de 1ª Infección. Las parasitemias con mayores frecuencias absolutas en el grupo de 1ª Infección, se presentaron en los rangos hasta 3180 parásitos/μL (28,6%) y 3820 parásitos/μL (28,6%). Los resultados se expresaron como densidad parasitaria, después de la lectura por microscopía de parásitos/μL de sangre.

Niveles de citoquinas e inmunoglobulina G

Los resultados obtenidos para los niveles de IFN- γ , IL-10 e IgG entre los diferentes grupos (Tabla 2) (Figura 4), se analizaron utilizando el test de Mann-Whitney y t-Student, encontrándose que existen diferencias significativas entre el grupo de 1ª Infección vs grupo Control, para los valores promedios de IFN- γ , IL-10 e IgG, con un $p < 0,05$. Al comparar el grupo de 1ª Infección vs grupo de Reinfeción, no se evidenciaron diferencias significativas para los valores promedios de IFN- γ e IgG, con un $p > 0,05$; pero si se encontró diferencias significativas para los valores promedio de IL-10, con un $p < 0,05$, siendo mayor en el grupo de 1ª Infección.

Tabla 2. Niveles de Citoquinas e IgG de los grupos de 1ª Infección y Reinfeción para *P. vivax* y el grupo Control*

Variable	1ª Infección (n=14) $\bar{X} \pm DE^{***}$ (rango)***	p^a	Reinfeción (n=21) $\bar{X} \pm DE$ (rango)	p^b	Control (n=23) $\bar{X} \pm DE$ (rango)	p^c
IgG** total	498,5 ± 214,2 g/L 84,3 - 834,3	<0,001	414,6 ± 246,2 g/L 60,9 - 1040,6	0,30	144,4 ± 100 g/L 14 - 375	<0,001
IFN- γ **	35,32 ± 32,9 pg/mL 0,0 - 103,66	<0,001	39,4 ± 49,7 pg/mL 0,0 - 155,4	0,69	2,7 ± 7,9 pg/mL 0 - 35,2	<0,001
IL-10**	91,3 ± 109,6 pg/mL 0,0 - 296,9	<0,001	36,7 ± 96,9 pg/mL 0,0 - 445,1	0,04	6,0 ± 20,2 pg/mL 0,0 - 95,6	0,06

* Los valores significativos se determinaron usando el test de Mann-Whitney o la prueba t de Student con un $p < 0,05$.

** IgG: inmunoglobulina G; IFN- γ : Interferón Gamma; IL-10: interleuquina 10.

*** $\bar{X} \pm DE$: promedio \pm desviación estándar (Valor mínimo-Valor máximo)

^a 1ª Infección vs Control

^b 1ª Infección vs Reinfeción

^c Reinfeción vs Control

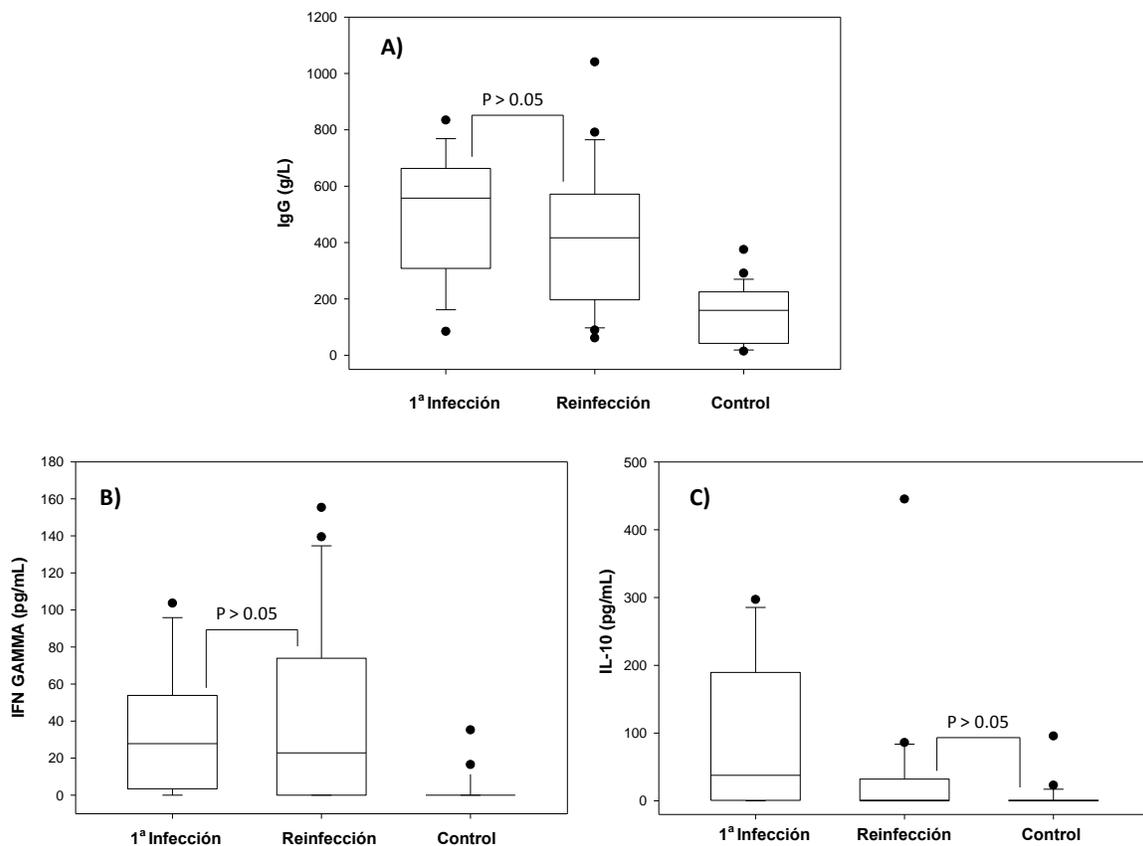


Figura 4. Perfil de IgG y Citoquinas para los pacientes con malaria por *P. vivax*. Niveles de A) IgG, B) IFN- γ e C) IL-10, en los tres grupos de estudio. Las concentraciones de IgG total e IFN- γ no presentaron diferencias significativas entre los grupos de 1ª infección y reinfeción por *P. vivax* ($p > 0,05$) y sólo la IL-10 no presentó diferencias significativas cuando se comparó el grupo de reinfeción por *P. vivax* y el grupo de controles de sanos ($p > 0,05$).

En cuanto a la comparación del grupo de Reinfeción vs grupo Control existen diferencias significativas para los valores promedios de IFN- γ e IgG, con un $p < 0,05$, pero no se presentaron diferencias significativas para el caso de los valores promedios de IL-10, con un $p > 0,05$.

Balance inflamatorio de Citoquinas en la Infección por *P. vivax*

El balance inflamatorio de Citoquinas en la Infección por *P. vivax* en los diferentes grupos de estudios se evaluó mediante los valores de ratio IFN- γ /IL-10 y los resultados obtenidos (Tabla 3) (Figura 5), se analizaron utilizando el test de Mann-Whitney, encontrándose que existen diferencias significativas entre el grupo de 1^a Infección vs grupo Control, para los valores de ratio IFN- γ /IL-10, con un $p < 0,05$. Al comparar el grupo de 1^a Infección vs grupo de Reinfeción, no se evidenciaron diferencias significativas para los valores de ratio IFN- γ /IL-10, con un $p > 0,05$. En cuanto a la comparación del grupo de Reinfeción vs grupo Control existen diferencias significativas para los valores de ratio IFN- γ /IL-10, con un $p < 0,05$.

Tabla 3. Ratio de IFN- γ /IL-10 de los grupos de 1^a Infección y Reinfeción para *P. vivax* y el grupo Control*

Variable	1 ^a Infección (n=14)		Reinfeción (n=21)		Control (n=23)	
	$\bar{X} \pm DE^{***}$ (rango)**	p^a	$\bar{X} \pm DE$ (rango)	p^b	$\bar{X} \pm DE$ (rango)	p^c
Ratio IFN- γ / IL-10**	3,4 \pm 9,8 0,0 - 37,2	<0,001	1,6 \pm 4,3 0,0 - 19,9	0,42	0,1 \pm 0,3 0,0 - 1,5	0,008

* Los valores significativos se determinaron usando el test de Mann-Whitney con un $p < 0,05$.

** IFN- γ : Interferón Gamma; IL-10: interleuquina 10.

*** $\bar{X} \pm DE$: promedio \pm desviación estándar (Valor mínimo-Valor máximo)

^a 1^a Infección vs Control

^b 1^a Infección vs Reinfeción

^c Reinfeción vs Control

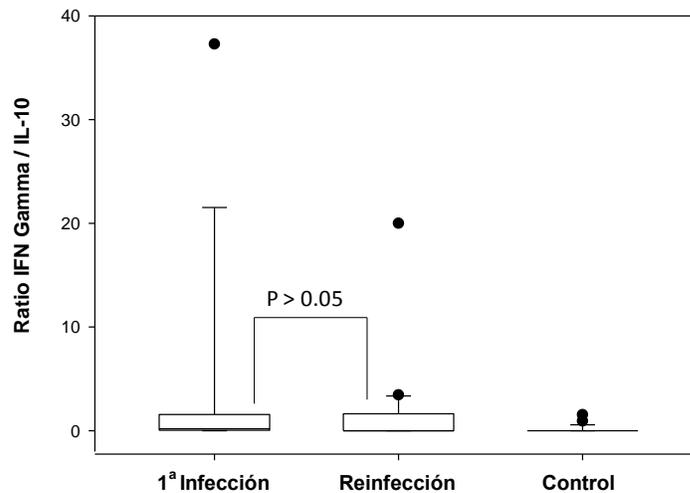


Figura 5. Ratio IFN- γ /IL-10 para los pacientes con malaria por *P. vivax*. Los valores de Ratio IFN- γ /IL-10 no presentaron diferencias significativas entre los grupos de 1ª infección y reinfección por *P. vivax* ($p > 0.05$).

DISCUSIÓN

Durante la realización del estudio se observó que el municipio de Montecristo en el Sur de Bolívar (Colombia), presenta problemas socio-demográficos como: la creciente actividad minera, criaderos mal tratados, resistencia a antimaláricos, resistencia de los vectores transmisores a los insecticidas, dormitorios inadecuados, entre otros; todo lo anterior favorece la proliferación del mosquito *Anopheles* y por lo tanto, el aumento de la infección por malaria. Además, esta zona del país cuenta con la presencia de grupos armados al margen de la ley, que dificulta la toma de muestras de pacientes en esta región.

A pesar de que el objetivo inicial consistió en estudiar la respuesta inmunitaria mediante la medición de citoquinas e IgG en pacientes infectados con *P. vivax* y *P. falciparum*, por ser las especies que prevalecen en Colombia; se encontró un sólo caso de *P. falciparum* en el muestreo no aleatorio realizado, confirmando con lo anterior que la especie mayoritaria de la región es el *P. vivax*, como ha sido reportado por el Instituto Nacional de Salud de Colombia [13].

La etapa eritrocítica de la malaria humana, sigue siendo de interés científico debido a que es la más duradera en cuanto a respuesta inmunitaria (48 a 72 horas), permite evidenciarla con facilidad, compromete la inmunopatología y severidad en los pacientes y garantiza su estudio para la elaboración de nuevas vacunas [55].

La severidad de la enfermedad está mediada por la sintomatología del paciente y es causada por los niveles de citoquinas inflamatorias que median la inmunopatología [31, 42]. En este estudio y teniendo en cuenta investigaciones previas [31, 47-49, 56], los participantes mostraron un comportamiento de malaria aguda o no complicada, que está reflejado en los bajos niveles de citoquinas: 35,32 pg/mL para el IFN- γ y 91,3 pg/mL para la IL-10 en el grupo de 1^a infección.

Los niveles de parasitemias son un factor importante que condiciona la severidad de la enfermedad y a mayor cantidad de parásitos en sangre, se encuentran niveles más elevados de IL-10 [39, 43]. En este estudio, se encontró que los niveles de IL-10 son mayores significativamente en el grupo de 1^a infección en comparación con el grupo de reinfección. Los pacientes del grupo de 1^a infección cuentan con un recuento de parásitos que condicionan su patología; además ante un primer evento la respuesta inmune es más intensa comparada con una segunda infección [55] (Figura 6).

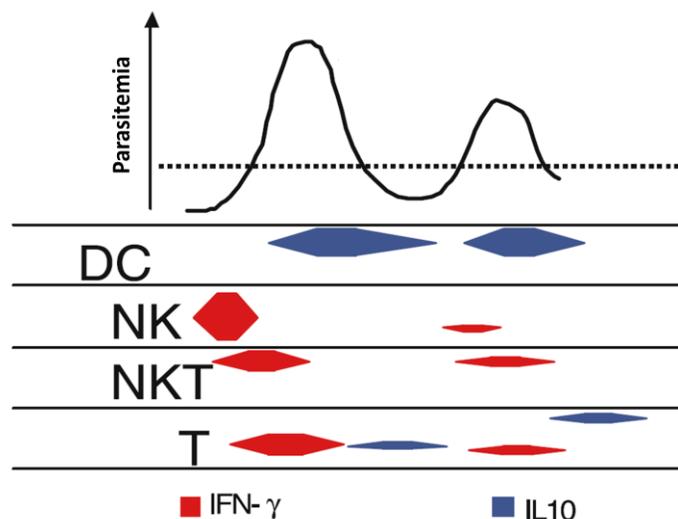


Figura 6. Respuesta inmunitaria frente a la malaria. En un primer evento de malaria la respuesta inmune es mayor con respecto a los siguientes eventos, reflejado en los niveles de citoquinas inflamatorias y antiinflamatorias. DC (células dendríticas), NK (Células NK), (Células T NK) y T (Células T). Adaptado de Urban et al. 2005.

En cuanto a los valores de IgG total en los pacientes con malaria (grupos de 1^a infección y reinfección) vs grupo control, se encontró una diferencia significativa reflejada en los elevados niveles en los grupos de estudio en comparación con el grupo control, demostrándose con ello la presencia de una respuesta inmune humoral mediada por anticuerpos ante la presencia del *Plasmodium*. Aunque los niveles de IgG total en los grupos de 1^a infección y reinfección no presentaron diferencias significativas, se sugiere una respuesta inmune inespecífica para el grupo de 1^a infección y una respuesta humoral de memoria para los re infectados, que los protege ante subsiguientes eventos de malaria con síntomas menos severos.

Los resultados encontrados demuestran una gran variabilidad de la respuesta inmunitaria, la cual está condicionada por cada individuo. Algunos estudios han reportado desviaciones estándares altas cuando se requiere esbozar respuestas inmunitarias frente a la malaria en una 1^a infección [39]. La respuesta de cada individuo depende en gran medida de factores como: la especie de *Plasmodium*, la inmunología del paciente, la intensidad y duración de la exposición al parásito y el tipo de región endémica [26, 57].

Por otra parte, el diagnóstico de malaria en la zona del sur de Bolívar sigue apoyándose en el examen de Gota Gruesa como prueba de primera elección. Sin embargo, se presentaron casos donde la gota gruesa resultó negativa, pero el paciente durante su anamnesis revelaba antecedentes de malaria y contaba con el diagnóstico clínico; por lo tanto se decidió incluir un grupo de reinfección e investigar las características de esta problemática. La malaria con leves síntomas puede deberse a que el paciente posee parasitemias sub-microscópicas y al realizar la prueba de gota gruesa resulta negativa. Algunas veces se recomienda repetir la gota gruesa cada 8 horas para confirmar el caso. Las recaídas en estos pacientes infectados con *P. vivax*, se podría explicar por reaparición de parasitemia asexual derivada de formas hepáticas persistentes. Las recaídas ocurren cuando la infección sanguínea ha sido eliminada; pero los hipnozoítos persisten en el hígado y maduran a esquizontes hepáticos después intervalos variables de tiempo [58]. En este mismo sentido, varios estudios han reportado la problemática de malaria asintomática; pacientes que no presentan *Plasmodium* cuando son examinados por gota gruesa, pero cuando son evaluados por

PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) u otras técnicas bioquímicas, se detecta la presencia del parásito [59, 60]. En esta zona del sur de Bolívar se necesita con urgencia implementar las pruebas de diagnóstico molecular con el fin de detectar los pacientes asintomáticos y los casos que presentan malaria sub-microscópica.

En cuanto a los niveles de IFN- γ e IgG en el grupo de reinfección, se encontró que no presentaron diferencias significativas cuando se compararon con el grupo de 1^a infección. Sin embargo, para el caso de la IL-10, se encontraron concentraciones menores en el grupo de reinfección en comparación con el grupo de 1^a infección. Lo anterior se podría explicar por la respuesta inmune de memoria de los pacientes re infectados, lo cual conlleva a una menor intensidad de la inflamación, debido a que el organismo ante una segunda eventualidad responde mucho más rápido y eficazmente [55].

Los datos encontrados sugieren que debe existir un equilibrio entre los diferentes factores inflamatorios durante la respuesta a la infección por malaria. De hecho, en la malaria leve, la respuesta inflamatoria puede ser contrarregulada por citoquinas antiinflamatorias [30, 55]. El IFN- γ es un determinante central de todas las vías inmunológicas implicadas en la protección contra la malaria, debido a su función inductora o efectora de la respuesta inmune innata y adaptativa, durante todo el ciclo de vida del parásito [34]. Mientras tanto, la IL10 es una citoquina antiinflamatoria que inhibe la actividad de las células T, NK, NKT y macrófagos, que se requieren para la eliminación óptima del parásito. Esta citoquina regula la respuesta inflamatoria producida por la citoquinas IL-12 e IFN- γ y por ende la inmunopatología de la infección [31]. Las concentraciones elevadas de IL-10, parecen ofrecer cierta protección frente a las complicaciones maláricas y los valores elevados de IFN- γ parecen asociarse a estas complicaciones [39, 43, 46, 47, 61].

En este estudio, las concentraciones de IL10 resultaron altas en el grupo de 1^a infección. Esto es indicativo de que la IL-10 juega un papel importante en el rol regulatorio de la infección por malaria, debido a que se controla la intensidad de la respuesta inmune, suprimiendo el efecto del IFN- γ . Esta conclusión es corroborada por otros estudios, que reportan una correlación positiva entre los niveles de IL-10 y la densidad de parásito en pacientes con malaria por *P. vivax* [31, 38, 48, 49, 62].

En el caso de los valores de las concentraciones de IFN- γ , no existen diferencias significativas entre el grupo de 1^a infección comparado con el de reinfección, es posible que esto se deba a el efecto de supresión que ejerce la IL-10 sobre el IFN- γ en el grupo de 1^a infección y por la baja densidad de parásitos en sangre en el grupo de reinfección.

Debido a que estas citoquinas responden en forma de un balance inflamatorio; resulta conveniente utilizar un indicador de la relación cuantitativa entre IFN- γ /IL-10, para evaluar la actividad inflamatoria en la malaria en los pacientes en estudio. Los Ratios IFN- γ /IL-10 menor o igual a 1 podrían indicar un factor protector debido al control sobre la actividad inflamatoria del IFN- γ y un cociente mayor de 1 indicaría cierta probabilidad de complicarse, debido a una mayor participación de la actividad inflamatoria.

Diferentes estudios han reportado que ratio IFN- γ /IL-10 es mayor en individuos de regiones no endémicas [55]. Recientemente en Brasil, se demostró que la relación IFN- γ :IL-10 es mayor en pacientes severos con malaria por *P.vivax* que en pacientes asintomáticos, lo que significa que los pacientes graves exhibieron una tendencia lineal con aumento gradual de la gravedad de la enfermedad [46].

El balance inflamatorio en esta zona del sur de Bolívar, arrojó una relación de citoquinas IFN- γ /IL-10, mayor en el grupo de 1^a infección comparado con el grupo de reinfección, aunque estas diferencias no resultaron significativas. Estos valores superan el valor de 1, por lo tanto, existe una probabilidad de complicarse ante nuevos episodios; sin embargo, se considera pertinente la realización de otros estudios para evaluar este parámetro y aclarar su utilidad, debido a que estos resultados pueden ser benéficos o perjudiciales para entender la capacidad del huésped para responder frente a la infección y combatir la enfermedad.

Finalmente, los resultados revelan, que a pesar de contar con bajas parasitemias, existe una respuesta inmune mediada por citoquinas e IgG. En otros estudios en los que se evidenciaron parasitemias similares [39], presentaron niveles de citoquinas más elevados. Con este precedente, se podría sugerir que la respuesta inmune

posiblemente debe estar condicionada a aspectos tales como: región endémica, raza, condiciones ambientales y por supuesto el tipo de cepa de *Plasmodium* de la región.

CONCLUSIÓN

Teniendo en cuenta que es el primer estudio que se ha realizado en esta región del sur de Bolívar (Colombia) y con miras a futuros proyectos, sería bueno implementar capacitaciones a las poblaciones sobre la problemática y el aporte que puede generarse a partir de estas investigaciones. A futuro sería interesante realizar la genotipificación de la Cepa de *Plasmodium* de Bolívar, y realizar estudios de perfiles de citoquinas, para evaluar respuesta inmunitaria específica de nuestra población de manera más amplia. Además con la implementación del cultivo del *Plasmodium*, se podría realizar la proteómica de las especies y evaluar respuesta humoral inmunitaria específica de esta región.

Es de interés, evaluar grupos específicos tales como mujeres embarazadas con malaria y niños menores de 5 años, debido a que son los grupos más vulnerables y la atención oportuna en estos pacientes disminuirá la severidad de la enfermedad en ocasiones futuras.

Finalmente, esta investigación sugiere que la severidad de la enfermedad está fuertemente asociada a activación de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias que desencadenan la respuesta inmune humoral.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hoffman, S.L., et al., *Plasmodium, human and Anopheles genomics and malaria*. Nature, 2002. **415**(6872): p. 702-9.
2. Figtree, M., et al., *Plasmodium knowlesi in human, Indonesian Borneo*. Emerg Infect Dis, 2010. **16**(4): p. 672-4.
3. Martínez-Salazar, E., A. Tobon-Castano, and S. Blair, [*Natural Plasmodium knowlesi malaria infections in humans*]. Biomedica, 2012. **32 Suppl 1**: p. 121-30.
4. Enayati, A. and J. Hemingway, *Malaria management: past, present, and future*. Annu Rev Entomol, 2010. **55**: p. 569-91.
5. Greenwood, B.M., et al., *Malaria*. Lancet, 2005. **365**(9469): p. 1487-98.
6. WHO. *World Malaria Report 2012*. . 2012 [cited April de 2013]; Available from: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/wmr2012_full_report.pdf.

7. Ridley, R.G., *Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs*. Nature, 2002. **415**(6872): p. 686-93.
8. Ospina, O.L., et al., [*Characterization of the national malaria diagnostic network, Colombia, 2006-2010*]. Biomedica, 2012. **32 Suppl 1**: p. 46-59.
9. Byass, P., *Making sense of long-term changes in malaria*. Lancet, 2008. **372**(9649): p. 1523-5.
10. Pineros, J.G., [*Malaria and social health determinants: a new heuristic framework from the perspective of Latin American social medicine*]. Biomedica, 2010. **30**(2): p. 178-87.
11. Chilengi, R., *Clinical development of malaria vaccines: should earlier trials be done in malaria endemic countries?* Hum Vaccin, 2009. **5**(9): p. 627-36.
12. Richie, T.L. and A. Saul, *Progress and challenges for malaria vaccines*. Nature, 2002. **415**(6872): p. 694-701.
13. Instituto Nacional de Salud. *Boletín epidemiológico no. 50 de la malaria en Colombia. SIVIGILA*. 2012 [cited (hasta el 21 de Diciembre 2012)].
14. Echeverri, D., et al., [*A case report of transfusion-transmitted Plasmodium vivax malaria from an asymptomatic donor to a premature newborn*]. Biomedica, 2012. **32 Suppl 1**: p. 8-12.
15. Poveda, G., et al, *Coupling between annual and ENSO timescales in the malaria-climate association in Colombia*. Environ Health Perspect, 2001. **109**(5): p. 489-93.
16. Mantilla, G., H. Oliveros, and A.G. Barnston, *The role of ENSO in understanding changes in Colombia's annual malaria burden by region, 1960-2006*. Malar J, 2009. **8**: p. 6.
17. Arboleda, M., et al., [*Clinical and laboratory profile of Plasmodium vivax malaria patients hospitalized in Apartado, Colombia*]. Biomedica, 2012. **32 Suppl 1**: p. 58-67.
18. Fauci, A.S., et, al., *Parte 7: Enfermedades infecciosas. Sección 18: Infecciones por protozoarios. Capítulo 203: paludismo*, in Harrison. *Principios de Medicina Interna*. 2008.
19. Laishram, D.D., et al., *The complexities of malaria disease manifestations with a focus on asymptomatic malaria*. Malar J, 2012. **11**: p. 29.
20. Borrero, E., G. Carrasquilla, and N. Alexander, [*Decentralization and health system reform: what is their impact on malaria incidence in Colombian municipalities?*]. Biomedica, 2012. **32 Suppl 1**: p. 68-78.
21. Valero, M., *Malaria in Colombia: Retrospective glance during the past 40 years*. Rev Salud Pública, 2006. **8**: p. 141-9.
22. Chaparro, P., et al., [*Estimation of the underreporting of malaria measurement in ten municipalities of the Pacific coast of Narino during 2009*]. Biomedica, 2012. **32 Suppl 1**: p. 29-37.
23. Chaparro, P. and J. Padilla, [*Malaria mortality in Colombia, 1979-2008*]. Biomedica, 2012. **32 Suppl 1**: p. 95-105.
24. Schofield, L. and G.E. Grau, *Immunological processes in malaria pathogenesis*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(9): p. 722-35.
25. Matuschewski, K. and A.K. Mueller, *Vaccines against malaria - an update*. FEBS J, 2007. **274**(18): p. 4680-7.
26. Artavanis-Tsakonas, K., J.E. Tongren, and E.M. Riley, *The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology*. Clin Exp Immunol, 2003. **133**(2): p. 145-52.
27. Legorreta-Herrera, M., et al., *Early treatment during a primary malaria infection modifies the development of cross immunity*. Parasite Immunol, 2004. **26**(1): p. 7-17.
28. Perlmann, P. and M. Troye-Blomberg, *Malaria and the immune system in humans*. Chem Immunol, 2002. **80**: p. 229-42.
29. Good, M.F. and D.L. Doolan, *Malaria vaccine design: immunological considerations*. Immunity, 2010. **33**(4): p. 555-66.
30. Malaguarnera, L. and S. Musumeci, *The immune response to Plasmodium falciparum malaria*. Lancet Infect Dis, 2002. **2**(8): p. 472-8.
31. Couper, K.N., D.G. Blount, and E.M. Riley, *IL-10: the master regulator of immunity to infection*. J Immunol, 2008. **180**(9): p. 5771-7.
32. Langhorne, J., et al., *Immunity to malaria: more questions than answers*. Nat Immunol, 2008. **9**(7): p. 725-32.

33. Bostrom, S., et al., *Changes in the levels of cytokines, chemokines and malaria-specific antibodies in response to Plasmodium falciparum infection in children living in sympatry in Mali*. Malar J, 2012. **11**(1): p. 109.
34. McCall, M.B. and R.W. Sauerwein, *Interferon-gamma--central mediator of protective immune responses against the pre-erythrocytic and blood stage of malaria*. J Leukoc Biol, 2010. **88**(6): p. 1131-43.
35. Perlaza, B.L., et al., *Interferon-gamma, a valuable surrogate marker of Plasmodium falciparum pre-erythrocytic stages protective immunity*. Malar J, 2011. **10**(1): p. 27.
36. Karunaweera, N.D., et al., *Dynamics of fever and serum levels of tumor necrosis factor are closely associated during clinical paroxysms in Plasmodium vivax malaria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(8): p. 3200-3.
37. Karunaweera, N.D., et al., *The paroxysm of Plasmodium vivax malaria*. Trends Parasitol, 2003. **19**(4): p. 188-93.
38. Zeyrek, F.Y., et al., *Parasite density and serum cytokine levels in Plasmodium vivax malaria in Turkey*. Parasite Immunol, 2006. **28**(5): p. 201-7.
39. Medina, T.S., et al., *Increased interleukin-10 and interferon-gamma levels in Plasmodium vivax malaria suggest a reciprocal regulation which is not altered by IL-10 gene promoter polymorphism*. Malar J, 2011. **10**: p. 264.
40. Miller, L.H., et al., *The pathogenic basis of malaria*. Nature, 2002. **415**(6872): p. 673-9.
41. Bergmann-Leitner, E.S., et al., *Evaluation of immunoglobulin purification methods and their impact on quality and yield of antigen-specific antibodies*. Malar J, 2008. **7**: p. 129.
42. Day, N.P., et al., *The prognostic and pathophysiologic role of pro- and antiinflammatory cytokines in severe malaria*. J Infect Dis, 1999. **180**(4): p. 1288-97.
43. Lyke, K.E., et al., *Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1beta), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12(p70) in Malian children with severe Plasmodium falciparum malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls*. Infect Immun, 2004. **72**(10): p. 5630-7.
44. Clark, I.A., et al., *Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release*. Malar J, 2006. **5**: p. 85.
45. Anstey, N.M., et al., *The pathophysiology of vivax malaria*. Trends Parasitol, 2009. **25**(5): p. 220-7.
46. Andrade, B.B., et al., *Severe Plasmodium vivax malaria exhibits marked inflammatory imbalance*. Malar J, 2010. **9**: p. 13.
47. Peyron, F., et al., *High levels of circulating IL-10 in human malaria*. Clin Exp Immunol, 1994. **95**(2): p. 300-3.
48. Belkaid, Y. and B.T. Rouse, *Natural regulatory T cells in infectious disease*. Nat Immunol, 2005. **6**(4): p. 353-60.
49. Hansen, D.S. and L. Schofield, *Natural regulatory T cells in malaria: host or parasite allies?* PLoS Pathog, 2010. **6**(4): p. e1000771.
50. Bouharoun-Tayoun, H., et al., *Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of Plasmodium falciparum asexual blood stages*. J Exp Med, 1995. **182**(2): p. 409-18.
51. Carvalho, L.J., C.T. Daniel-Ribeiro, and H. Goto, *Malaria vaccine: candidate antigens, mechanisms, constraints and prospects*. Scand J Immunol, 2002. **56**(4): p. 327-43.
52. Garraud, O., S. Mahanty, and R. Perraut, *Malaria-specific antibody subclasses in immune individuals: a key source of information for vaccine design*. Trends Immunol, 2003. **24**(1): p. 30-5.
53. Instituto Nacional de Salud. *PROTOCOLO DE VIGILANCIA Y CONTROL DE MALARIA.Ficha única de notificación de malaria*. 2011 [cited (2011/07/25)]; Available from: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Protocolos%20SIVIGILA/MALARIA.pdf>.
54. Instituto Nacional de Salud. *Guía para Atención Clínica Integral del paciente con malaria*. 2010 [cited; Available from: <http://www.dssa.gov.co/media/dssa/dssa.gov.co/documentos/Protocolos-Vectores-INS/Clinica-Malaria.pdf>].
55. Urban, B.C., R. Ing, and M.M. Stevenson, *Early interactions between blood-stage plasmodium parasites and the immune system*. Curr Top Microbiol Immunol, 2005. **297**: p. 25-70.

56. Wroczynska, A., et al., *Cytokines and clinical manifestations of malaria in adults with severe and uncomplicated disease*. Int Marit Health, 2005. **56**(1-4): p. 103-14.
57. Greenwood, B., *What can the residents of malaria endemic countries do to protect themselves against malaria?* Parassitologia. , 1999. **41(1-3):295-9**.
58. White, N.J., *Determinants of relapse periodicity in Plasmodium vivax malaria*. Malar J, 2011. **10**: p. 297.
59. Alves, F.P., et al., *High prevalence of asymptomatic Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum infections in native Amazonian populations*. Am J Trop Med Hyg, 2002. **66**(6): p. 641-8.
60. Ladeia-Andrade, S., et al., *Age-dependent acquisition of protective immunity to malaria in riverine populations of the Amazon Basin of Brazil*. Am J Trop Med Hyg, 2009. **80**(3): p. 452-9.
61. Torre, D., et al., *Role of Th1 and Th2 cytokines in immune response to uncomplicated Plasmodium falciparum malaria*. Clin Diagn Lab Immunol, 2002. **9**(2): p. 348-51.
62. Sanni, L.A., et al., *Cerebral edema and cerebral hemorrhages in interleukin-10-deficient mice infected with Plasmodium chabaudi*. Infect Immun, 2004. **72**(5): p. 3054-8.