



Universidad de Panamá
Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología
Escuela de Biología
Departamento de Genética y Biología Molecular

“ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES *VAR* ASOCIADOS CON *CITOADHESIÓN* EN
EL MODELO DE INFECCIÓN *PLASMODIUM FALCIPARUM* / *AOTUS*”

Por:

Kevin J. Escala M.

&

Mihail K. Pérez C.

Trabajo de graduación presentado a la
Escuela de Biología para optar por el
título de Licenciado en Biología con
orientación en Genética y Biología
Molecular.

Panamá, República de Panamá

2022



PROFESORES ASESORES

Título:

“ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES *VAR* ASOCIADOS CON *CITOADHESIÓN* EN EL MODELO DE INFECCIÓN *PLASMODIUM FALCIPARUM* / *AOTUS*”

Por:

Kevin J. Escala M.
8-932-135

Mihail K. Pérez C.
8-921-2249

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

PROF. ARIEL MAGALLÓN
Asesor Principal

PROF. JULIO CÉSAR CASTILLO
Co-Asesor

PROF. NIDIA SANDOVAL
Co-Asesora

DEDICATORIA

Por Kevin J. Escala M.:

Mi Trabajo de grado va dedicado a mis padres Otmianys Escala y Marianela Montenegro, que siempre me han dado su apoyo incondicional y motivación inagotable, para cumplir mis metas.

Por Mihail K. Perez C.

Este trabajo va dedicado a mis familiares y amigos, que siempre me han aconsejado y apoyado en todas las decisiones que he tomado. En especial dedico este trabajo a mis abuelos Jico y Albertina que siempre estuvieron al tanto de mi carrera universitaria.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos primeramente al Dios Altísimo por acompañarnos en nuestros caminos y permitir optar por el título de esta bella carrera.

Agradecemos a nuestros docentes de la Escuela de Biología de la Universidad de Panamá, por haber compartido sus conocimientos a lo largo de la preparación de nuestra profesión, de manera especial, al profesor Ariel Magallón Tejada, por apoyarnos a realizar el presente trabajo de tesis en el laboratorio del departamento de parasitología del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES).

A nuestros co-asesores de tesis, el Dr. Julio César Castillo y la Dr. Nidia Sandoval, quienes nos han apoyado en nuestro trabajo de tesis y han sido fuente de conocimiento y mucha inspiración en nuestros estudios de la carrera de Lic. en Biología.

Al ICGES por permitirnos realizar pasantías en sus instalaciones, con el objetivo de adquirir destrezas y conocimientos en las prácticas del laboratorio.

A la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado, Universidad de Panamá por parte del financiamiento de nuestra tesis.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
ÍNDICE GENERAL.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE CUADROS	X
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT	XII
INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS	3
OBJETIVOS.....	4
Objetivo general:	4
Objetivos específicos:.....	4
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO.....	5
1. Malaria.....	6
2. Malaria en el mundo.....	6
3. Malaria en Panamá	7
4. El parásito de la malaria: Características taxonómicas	9
4.1. Filo Apicomplexa	9
4.2. Familia Plasmodiidae	9
4.3. <i>Plasmodium falciparum</i>	10
5- Ciclo de vida	10
5.1. Generalidades	10
5.2. Ciclo de vida en el vertebrado	10

5.3. Ciclo de vida en el mosquito <i>Anopheles</i>	11
6. Fármacos antimaláricos	12
7. Métodos de diagnósticos	13
8. Sintomatología.....	14
9. Malaria en el embarazo.....	15
10. Malaria cerebral.....	15
11. Anemia palúdica grave	16
12. Patogénesis	17
12.1. Disfunción endotelial.....	17
12.2. Inflamación	17
12.3. Citoadhesión	18
13. <i>PfEMP1</i>	19
14. Genes <i>var</i>	20
15. La identificación de nuevas dianas terapéuticas y desarrollo de vacunas	21
16. Vacunas y métodos terapéuticos.....	23
CAPÍTULO II: METODOLOGÍA	25
1. Consideraciones éticas.....	26
2. Inoculación de parásitos:	26
3. Colecta de sangre y preparación de muestra:	26
4. Monitoreo de parasitemia por microscopía <i>in vitro</i>	27
5. Cultivo de Parásitos:.....	27
5.1 Preparación de medio de cultivo para parásitos	27
5.2 Preparación de eritrocitos para cultivo	28
5. Mantenimiento de parásitos.....	28
6. Administración de antimaláricos	28

7. Extracción de ADN genómico de <i>P. falciparum</i>	28
8. Extracción de ARN total de <i>P. falciparum</i>	29
9. Tratamiento con DNase I, Amplification Grade	29
10. Síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN total de <i>P. falciparum</i>	30
11. Estandarización de cebadores	30
12. Determinación de parasitemia por qPCR:	31
13. Perfil de transcripción de genes/Análisis transcripcional por PCR a tiempo real	31
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	55
CONCLUSIONES	56
RECOMENDACIONES	57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
FIGURAS Y CUADROS SUPLEMENTARIOS	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de regiones sanitarias en Panamá.....	8
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Plasmodium falciparum</i>	12
Figura 3. Mecanismos patogénicos de <i>Plasmodium falciparum</i>	19
Figura 4. Esquema de proteínas <i>PfEMPI</i> en la malaria cerebral	20
Figura 5. Monitoreo de análisis sanguíneos y carga parasitaria para el espécimen I.....	40
Figura 6. Frotis de sangre tomada por punción de la oreja en el Especimen I al día 22 post-inoculación	41
Figura 7. Monitoreo de análisis sanguíneos y carga parasitaria para el espécimen II.....	42
Figura 8. Frotis de sangre tomada por punción de la oreja en el Especimen II al día 11 post-inoculación	43
Figura 9. Monitoreo de análisis sanguíneos y carga parasitaria para el espécimen III	44
Figura 10. Frotis de sangre tomada por punción de la oreja en el Especimen III al día 11 post-inoculación	45
Figura 11. Monitoreo de análisis sanguíneos y carga parasitaria para el espécimen IV	46
Figura 12. Frotis de sangre tomada por punción de la oreja en el espécimen IV al día 16 post-inoculación	47
Figura 13. Análisis sanguíneo con prueba T pareada pre-inoculación (PRE) y post-inoculación (POS)	48
Figura 14. Análisis de componentes químicos en sangre con prueba T pareada PRE y POS...48	
Figura 15. Perfil de transcripción del repertorio de genes <i>var</i> , para el Especimen I al día 22 post-inoculación	50
Figura 16. Perfil de transcripción del repertorio de genes <i>var</i> , para el Especimen II al día 11 post-inoculación	51
Figura 17. Perfil de transcripción del repertorio de genes <i>var</i> , para el Especimen III al día 11 post-inoculación	52

Figura 18. Perfil de transcripción del repertorio de genes <i>var</i> , para el Espécimen IV al día 16 post-inoculación	53
Figura 19. Descongelación de parásitos	69
Figura 20. Congelación de parásitos	70
Figura 21. Curva estándar para determinar la parasitemia en cada espécimen	72
Figura 22. Tinción de sangre con reactivo Giemsa	73
Figura 23. Extracción de ARN	73
Figura 24. Visualización de ADNc mediante electroforesis en gel de agarosa.....	74

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Días de colecta de sangre por extracción venosa para todos los especímenes.	27
Cuadro 2. Análisis sanguíneos tomados el día en que los especímenes mostraron alta parasitemia.....	49
Cuadro 3. Dominios correspondientes a los genes var expresados en cada espécimen.	54
Cuadro 4. Concentraciones estandarizadas de cebadores utilizados en qPCR.....	71

RESUMEN

La malaria es una de las enfermedades más importantes a nivel mundial debido a que causa un gran número de muertes anuales, en su mayoría niños menores de 8 años del África Subsahariana. Existen 7 especies de parásitos de la malaria (género *Plasmodium*), los cuales son transmitidos al humano por la picadura de mosquitos hembra del género *Anopheles*. A pesar de ser una enfermedad prevenible y curable, en el año 2020 se reportaron 241 millones de casos y aproximadamente 627 000 muertes a nivel global. Entre las diferentes especies de *Plasmodium*, *P. falciparum* es la más letal, debido a su capacidad de acumularse en la microvasculatura de tejidos y órganos del hospedero humano (fenómeno conocido como: secuestro). Esto ocurre gracias a proteínas de citoadhesión llamadas PfEMP1 (*P. falciparum* Erythrocyte Membrane Protein-1), codificadas por aproximadamente 60 genes *var*, los cuales le confieren al parásito propiedades de citoadherencia y variación antigénica. La función de los genes *var* ha sido estudiada en los últimos años, lo que ha llevado a una mejor comprensión de los mecanismos que causan la acumulación de los eritrocitos infectados en el cerebro y la interacción de parásitos con las células de diferentes órganos. No obstante, aún se desconoce muchos aspectos moleculares sobre estas interacciones hospedero-parásito. Recientemente se ha reportado que muchos de los anticuerpos adquiridos naturalmente en respuesta a la malaria están dirigidos hacia las proteínas PfEMP1, por lo que es posible el desarrollo de vacunas dirigidas hacia estas proteínas. Los monos del género *Aotus* han sido utilizados como modelo para el estudio de la biología de *Plasmodium* y como modelos experimentales para el desarrollo de fármacos y vacunas antimaláricas. En este estudio se analizó el perfil de transcripción de los genes *var* en el modelo de infección *Plasmodium falciparum*/*Aotus*. Para este propósito se inoculó la cepa *Plasmodium falciparum* Vietnam-Oak Knoll (PfFVO) en cuatro ejemplares de monos *Aotus lemurinus lemurinus*. Se efectuó un seguimiento de la parasitemia por microscopía óptica y se realizaron análisis sanguíneos de los ejemplares, utilizando técnicas de PCR a tiempo real y qPCR para medir la transcripción de los genes *var* y la cuantificación de la carga parasitaria. Se pudo observar que la densidad de parásitos se incrementó entre el 5to y 11vo día. Además, hubo una disminución sustancial de los valores de hematocrito y hemoglobina. Cabe mencionar que la formación de rosetas (agregados de eritrocitos infectados y no infectados) fue el fenotipo adhesivo más comúnmente observado. Como principal hallazgo de este estudio reportamos la transcripción predominante del gen *var32* en todos los parásitos analizados en el modelo *P. falciparum*/*Aotus*. Este gen presenta entre su estructura proteica los dominios adhesivos DBLd1 y el dominio CIDRb1. Estos dominios se encontraron en la estructura de casi todos los genes *var* reportados en este estudio, expresados de manera moderada, lo que nos lleva a especular sobre la relevancia biológica de estos dominios en la formación de rosetas.

ABSTRACT

Malaria is one of the most important diseases worldwide because it causes a large number of annual deaths, mostly children under 8 years of age in Sub-Saharan Africa. There are 6 species of malaria parasites (genus *Plasmodium*), which are transmitted to humans by the bite of female mosquitoes of the genus *Anopheles*. Despite being a preventable and curable disease, in 2020, 241 million cases and approximately 627,000 deaths were reported globally. Among the different species of *Plasmodium*, *P. falciparum* is the most lethal, due to its ability to accumulate in the microvasculature of tissues and organs of the human host (a phenomenon known as: sequestration). This occurs thanks to cytoadhesion proteins called *Pf* EMP1 (*P. falciparum* erythrocyte Membrane Protein-1), encoded by approximately 60 *var genes*, which give the parasite properties of cytoadherence and antigenic variation. The function of *var genes* has been studied in recent years, which has led to a better understanding of the mechanisms that cause the accumulation of infected erythrocytes in the brain and the interaction of parasites with cells of different organs. However, many molecular aspects of these host-parasite interactions are still unknown. It has recently been reported that many of the antibodies naturally acquired in response to malaria are directed towards the *Pf* EMP1 proteins, so the development of vaccines directed towards these proteins is possible. Monkeys of the genus *Aotus* they have been used as a model for the study of the biology of *Plasmodium* and as experimental models for the development of antimalarial drugs and vaccines. In this study, the transcription profile of the *var genes* in the *Plasmodium* infection model was analyzed. *falciparum/Aotus*. For this purpose, the *Plasmodium* strain was inoculated. *falciparum* Vietnam- Oak Knoll (*Pf* FVO) in four specimens of *Aotus* monkeys *lemurinus lemurinus*. Parasitaemia was monitored by optical microscopy and blood analyzes of the specimens were performed, using real-time PCR and qPCR techniques to measure the transcription of the *var genes* and the quantification of the parasite load. It was observed that the density of parasites increased between the 5th and 11th day. In addition, there was a substantial decrease in hematocrit and hemoglobin values. It is worth mentioning that the formation of rosettes (aggregates of infected and uninfected erythrocytes) was the most commonly observed adhesive phenotype. As the main finding of this study, we report the predominant transcription of the *var32* gene in all the parasites analyzed in the *P. falciparum/Aotus* model. This gene presents among its protein structure the adhesive domains DBLd1 and the CIDRb1 domain. These domains were found in the structure of almost all *var genes* reported in this study, moderately expressed, which leads us to speculate about the biological relevance of these domains in rosette formation.

INTRODUCCIÓN

La malaria es una de las enfermedades parasitarias más importantes a nivel mundial, la cual genera una alta morbilidad y mortalidad en los seres humanos. Esta enfermedad es causada por parásitos protozoarios del género *Plasmodium* y es transmitida al humano por la picadura de mosquitos hembra del género *Anopheles* portadores de parásitos (Murray et al., 2012). En los humanos, se trata de una enfermedad prevenible y curable; sin embargo, para el año 2020, a nivel global, se reportaron 241 millones de casos de paludismo y 627 000 muertes causadas por la enfermedad, lo que supone un aumento de unos 14 millones de casos y 69 000 muertes en relación a las cifras del 2019. Las muertes se incrementaron en dos tercios para el año 2020, con una cifra de alrededor de 47 000; entre las causas de este aumento podemos mencionar, las interrupciones de los servicios de prevención, diagnóstico y tratamiento del paludismo durante la pandemia COVID-19 (WHO, 2021).

Existen siete especies de *Plasmodium* capaces de infectar al humano y causar malaria, éstas son: *P. ovale curtisi*, *P. ovale wallikeri*, *P. malariae*, *P. knowlesi*, *P. vivax* y *P. falciparum* (Lalremruata et al., 2017), cada una de las cuales causa manifestaciones clínicas similares en el individuo infectado. *P. vivax* y *P. falciparum* ocasionan la mayoría de las muertes y casos clínicos a nivel mundial, siendo *P. falciparum* el causante de las formas más graves de malaria (World Malaria Report, 2020; White, 2018). Dentro de las manifestaciones de la malaria grave provocadas por *P. falciparum* están la anemia, malaria cerebral (coma), malaria placentaria y acidosis metabólica entre otras (Miller et al, 2002).

Cabe destacar que, en las principales regiones endémicas de Panamá (Comarca Guna Yala y Comarca Guna de Madugandí), se ha observado un aumento significativo en la transmisión de malaria a humanos en las épocas donde aparece el evento climático denominado Fenómeno Del Niño, eventualmente la abundancia de vectores puede asociarse con este fenómeno climático (Hurtado et al., 2020).

En Panamá, históricamente se han reportado con mayor frecuencia casos de *P. vivax* y los casos recientes de *P. falciparum*, se han relacionado con eventos migratorios a través de la frontera de Panamá y Colombia. Para el periodo comprendido entre los años 2000-2019, se reportó un

aumento significativo de los casos de *P. falciparum*, principalmente provenientes del país Colombia. Según Hurtado (2020), de 2000-2019 Panamá ha acumulado un total de 25 muertes a causa de la malaria, y de 2013-2019, el número de casos anuales de malaria se mantuvo por encima de 500, alcanzando un pico de más de 1400 casos en 2019 y (Hurtado et al., 2020).

Una característica virulenta de *P. falciparum* es su capacidad de adhesión a células y receptores en la microvasculatura de diferentes tejidos y órganos. Esta capacidad se debe a la presencia de las proteínas adhesinas llamadas *PfEMP1* (del inglés, *Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1*). Las *PfEMP1* son una familia multigénica de proteínas polimórficas codificadas por hasta 60 genes *var* (Biggs et al, 1992). Debido a su gran polimorfismo el parásito utiliza las *PfEMP1*, para evadir la respuesta inmune del hospedero y adherirse a diferentes receptores del hospedero (Kraemer & Smith, 2006).

En este estudio, se analizó la expresión de genes *var* en el modelo de infección controlada de *P. falciparum* en el primate no humano *Aotus lemurinus lemurinus*. Destacamos que esta especie de monos se ha utilizado como modelo para el estudio de la malaria (Jones et al., 2002). Para nuestro trabajo se utilizó la cepa *Plasmodium falciparum* Vietnam-Oak Knoll (*PfFVO*), adaptada a monos *Aotus* (Kaneko et al., 1999). La cepa *PfFVO* es sensible a drogas como la quinina, doxiciclina, mefloquina y artesunato. (Obaldía et al, 2016; Ohrt et al, 2014).

El uso de modelos animales, en este caso el modelo de malaria *P.falciparum/Aotus*, brindan un enfoque más realista ya que permite identificar aquellos mecanismos patológicos e inmunológicos característicos de procesos infecciosos en un modelo *in vivo*. Las infecciones controladas en el modelo *Aotus* han sido instrumental para el estudio de los genes *var*, lo que ha permitido identificar genes asociados con citoadhesión.

HIPÓTESIS

En la malaria causada por *P. falciparum*, las proteínas PfEMP1 codificadas por los genes *var* son los ligandos responsables de la citoadhesión a ciertos órganos, y algunas variantes de estas proteínas han sido implicadas como contribuyentes a la patología observada en la malaria grave (e.g. malaria cerebral). Basado en lo anterior, planteamos la siguiente hipótesis: “La expresión de ciertos genes *var* asociados a citoadhesión puede influir en las manifestaciones clínicas de la malaria grave, como por ejemplo la anemia”. Para probar nuestra hipótesis utilizaremos el modelo de infección *P. falciparum*/Aotus.

OBJETIVOS

Los objetivos de la investigación se describen a continuación:

Objetivo general:

Analizar la transcripción de genes asociados con citoadhesión (genes *var*) en el modelo de infección *Plasmodium falciparum*/Aotus.

Objetivos específicos:

1. Inducir la infección controlada de *P. falciparum* en monos *Aotus lemurinus lemurinus*
2. Analizar el curso clínico de la infección por *P. falciparum* en monos *A. lemurinus lemurinus*
3. Recuperar parásitos (*P. falciparum*) a partir de monos *A. lemurinus lemurinus* inoculados con malaria.
4. Analizar el patrón de transcripción de genes *var* en parásitos aislados de monos infectados con malaria.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1. Malaria

A finales del siglo XIX, la malaria se consideraba un agente maligno que se encontraba en el aire de zonas pantanosas, de allí, su etimología deriva de *mal'aria que quiere decir "aire malo"* (Laverdant, 2007). Charles Louis Alphonse Laveran (1845-1922) sabía por artículos científicos contemporáneos, que muchas enfermedades previamente atribuidas a miasmas o vapores malignos, de hecho, eran causadas por microbios. Así, predijo: “*Las fiebres de los pantanos se deben a un germen*” (Jarcho, 1984). Laveran se trasladó a un puesto en la costa norteafricana de Argelia, e investigó su teoría. El 20 de octubre de 1880, mientras observaba a través de un toSCO microscopio la sangre de un soldado febril, vio cuerpos en forma de semiluna que eran casi transparentes excepto por un pequeño punto de pigmento (Laveran, 1978).

En décadas anteriores, un grupo de varios investigadores (entre estos Meckel, Virchow y Frerichs) habían encontrado el pigmento hemozoína de color negro pardusco en bazos de cadáveres y sangre de víctimas de la malaria. Más tarde, Laveran examinó muestras de sangre de 192 pacientes con paludismo y observó semilunas que contenían pigmentos en 148 pacientes (Laveran, 1978).

Finalmente, reconoció cuatro formas distintas en la sangre humana que resultarían ser el parásito de la malaria en diferentes etapas de su ciclo de vida. Camillo Golgi (1843-1926) vinculó la ruptura y liberación de parásitos asexuales de la malaria de los esquizontes sanguíneos (célula con múltiples núcleos denominados merozoitos) con la aparición de cada tercer y cuarto día de fiebre debida a *P. vivax* y *P. malariae*, respectivamente. Un año después, Laveran recibió el Premio Nobel por descubrir el protozoo unicelular que causa la malaria (Arrow et al., 2004).

2. Malaria en el mundo

La malaria es una de las enfermedades transmitidas por vectores más importantes a nivel mundial, donde el 50% de la población se encuentra en riesgo de contraerla. En el año 2020 se estimó que hubo en todo el mundo 241 millones de casos de malaria y ~627 000 muertes causadas por esta enfermedad, lo que supone un aumento de 14 millones de casos y ~69 000 muertes en relación con las cifras del año 2019. Aproximadamente dos tercios de estas muertes adicionales (~47 000) tienen que ver con interrupciones de los servicios de prevención,

diagnóstico y tratamiento del paludismo durante la pandemia (WHO, 2021). La región de África subsahariana sigue presentando la mayor carga de malaria; en el 2020, esta región concentró alrededor del 95% de los casos y el 96% de las muertes por esta enfermedad, en donde un 80% del total ocurre en niños menores de 5 años. La tormenta de COVID-19 llegó en un momento en que la lucha contra la malaria en el mundo ya se había estancado. Para el año 2017, podemos notar indicios de que los fenomenales avances registrados desde 2000 (con una reducción del 27% de la incidencia mundial de casos y una caída de casi el 51% de la tasa de mortalidad) se estaban frenando (WHO, 2021).

3. Malaria en Panamá

Panamá se ha enfrentado a una amplia cantidad de enfermedades tropicales causadas por patógenos transmitidos por vectores artrópodos, entre las que destacan la fiebre amarilla y la malaria. A finales del siglo XIX parte del fracaso de la construcción del canal de Panamá en manos de los franceses se debió a la falta de control de enfermedades transmitidas por vectores causando una alta morbilidad y mortalidad en los empleados. Todo esto ocurrió debido a que se desconocía el vínculo entre el mosquito vector transmisor de la malaria y fiebre amarilla. En el siglo XX hubo un gran desafío en la construcción del Canal de Panamá por parte de los Estados Unidos para el control de estas enfermedades (Baird, 2000; Hurtado et al., 2020; Stern, 2005). Panamá, durante la segunda mitad del siglo XX, fue considerado un país modelo en la implementación de nuevos tratamientos de malaria y medidas de control de vectores. Todo esto gracias al esfuerzo del comandante William Crawford Gorgas, (médico de la Armada de los Estados Unidos), que en 1906 logra erradicar la malaria en la zona de construcción del Canal de Panamá (Le Prince & Orenstein, 1916; Sutter, 2007).

Desde 2000-2019, Panamá ha acumulado un total de 28 921 casos de infecciones y 25 muertes por malaria. Vemos, que en los asentamientos indígenas, los casos de malaria han ido en aumento; vale la pena resaltar que en el año 2005, el 41.8% del total de casos de malaria se dieron en comunidades indígenas, mientras que para el año 2016, esta proporción alcanzó el 84.6% y para el 2019 más del 90%. De hecho, más del 70% de los casos acumulados en el país desde 2005 provienen de comunidades indígenas ubicadas en el Oriente de Panamá (Hurtado et al., 2020).

Históricamente en Panamá se han reportado más casos de *P. vivax* que de *P. falciparum*; sin embargo, los brotes recientes de *P. falciparum*, en áreas donde no se habían reportado anteriormente, ha sido correlacionado con eventos migratorios a través de la frontera entre Panamá y Colombia (Calzada et al., 2015). En el periodo de 2000 al 2019 se importó una proporción significativa y creciente de los casos de infecciones con *P. falciparum*, principalmente de Colombia (Hurtado et al., 2020). De los casos importados durante este período, el 28.5% fueron *P. falciparum* y el 71.5% *P. vivax*. La carga de la malaria importada (*P.falciparum*) procedía principalmente de Colombia (55.3%) y de diez países del continente africano (38.8%) (Hurtado et al., 2020).

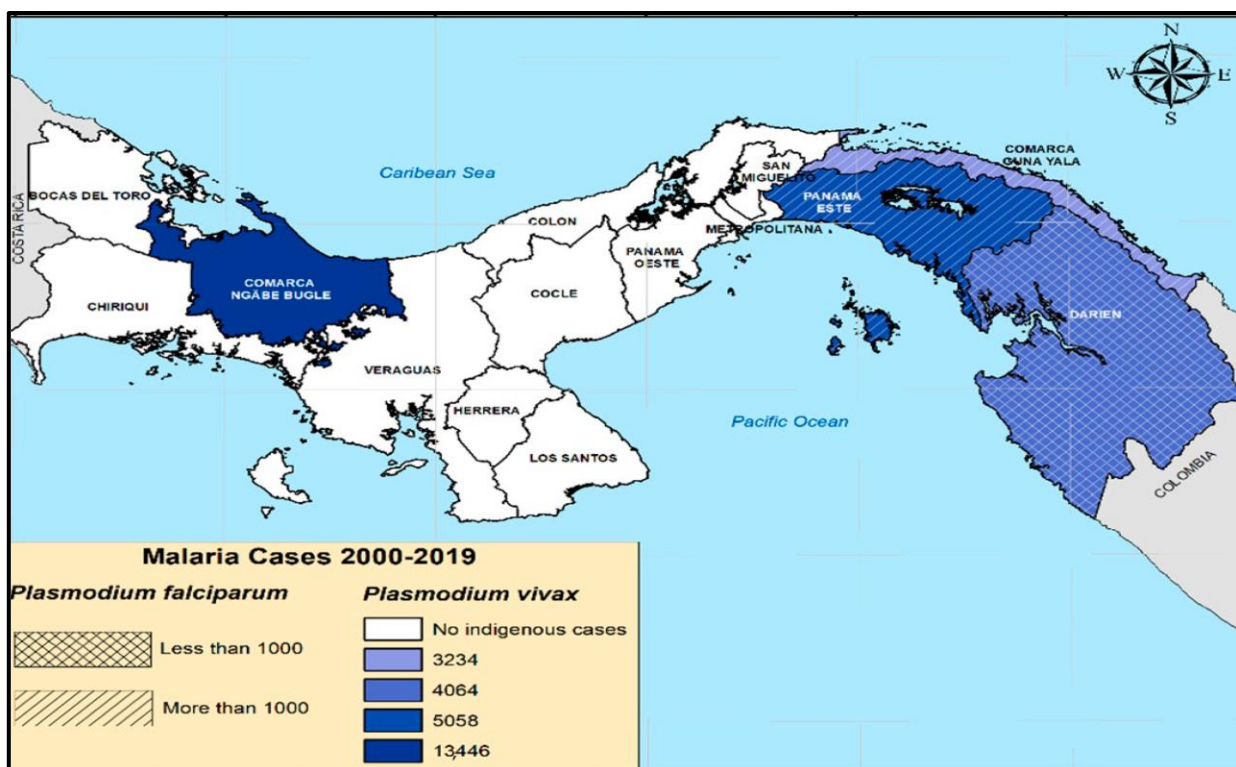


Figura 1. Mapa de regiones sanitarias en Panamá. Estas regiones presentan transmisión activa de malaria según el número acumulado de casos de *P. falciparum* y *P. vivax*, reportados entre 2000 y 2019 (Santamaría et al., 2020).

En el año 2020, El Departamento Nacional de Epidemiología del Ministerio de Salud de Panamá (Minsa), reportó un total de 2 128 casos de malaria confirmados. Este informe, revela, que las áreas más impactadas pertenecen a las cuatro zonas endémicas del país, Comarca Guna Yala (146 casos) Panamá Este (461 casos), Darién (401 casos) y la Comarca Ngäbe-Buglé (40 casos);

por otro lado, también se reportaron 1 080 casos en otras regiones, epidemiológicamente consideradas como focos de malaria sin clasificar.

4. El parásito de la malaria: Características taxonómicas

4.1. Filo Apicomplexa

El filo Apicomplexa incluye a una gran cantidad de especies protozoarias, muchas de ellas parásitos. Las especies parásitas de este grupo se caracterizan por ser intracelulares obligados que invaden las células hospedero al desarrollarse en etapas especializadas llamadas zoitos. Los zoitos tienen una estructura conservada, siendo células alargadas y polarizadas que secretan en su extremo apical el contenido de orgánulos secretores localizados apicalmente, denominados micronemas y roptrías (Dubremetz et al., 1998). Los zoitos permiten la invasión de las células hospedadoras dentro de la llamada vacuola parasitófora, un proceso que dura solo unos segundos (Tardieux & Ménard, 2008). Entre las especies parásitas del filo Apicomplexa se incluyen las de la familia Plasmodiidae, donde se encuentra *Plasmodium*, agente causante de la malaria en humanos, primates no humanos, entre otras especies (Ferreira et al., 2020; Thurber et al., 2013; Valkiūnas, 2005).

4.2. Familia Plasmodiidae

Los hemoparásitos (Hemosporidios) filo Apicomplexa, familia Plasmodiidae forman un grupo de parásitos protozoarios intracelulares generalizados que afectan a una amplia gama de mamíferos, aves y reptiles y utiliza insectos dípteros nematóceros (mosquitos) como vectores (Ferreira et al., 2020). Este grupo incluye a algunos de los patógenos humanos más importantes a nivel mundial. Se sabe que más de 20 especies de *Plasmodium* que causan malaria, capaces de infectar a primates no humanos y al menos cuatro especies, *P. inui*, *P. simium*, *P. cynomolgi* y *P. knowlesi*, son transmisibles a los humanos (Cox-Singh et al., 2008; Thurber et al., 2013). Las siete especies prevalentes que parasitan humanos son, *P. ovale curtisi*, *P. ovale wallikeri*, *P. malariae*, *P. knowlesi*, *P. vivax* y *P. falciparum* ((Lalremruata et al., 2017; Butcher & Mitchell, 2018; Taghdiri et al., 2019). De todas las especies de la familia Plasmodiidae que afectan humanos *P. falciparum* y *P. vivax* son las más prevalentes en el mundo, siendo *P. falciparum* la especie causante de los episodios graves (Loy et al., 2017; Zhong et al., 2018).

4.3. *Plasmodium falciparum*

El nombre del epíteto específico de esta especie fue elaborado por el médico estadounidense William Henry Welch en 1897. Su etimología viene del latín *falx*, que significa "hoz" y *parum* que significa "similar o igual a otro". Por lo tanto, significa "similar a una hoz", una herramienta agrícola hecha de hierro, cobre y que tiene como principal uso el corte de tallos de gramíneas (Bruce-Chwatt, 1987; Christophers & Sinton, 1938). *Plasmodium falciparum* se define como el parásito más peligroso, debido a que es considerado el más mortal de todos los *Plasmodium* que infectan humanos (Rich et al., 2009). Además, es el parásito con el 50% de casos por malaria y el único causante de Malaria Cerebral (Luzolo & Ngoyi, 2019; Perkins et al., 2011). El origen de *P. falciparum* fue a partir de especies de *Laverania*, un subgénero de *Plasmodium* que se encuentra en los simios gorilas de África occidental (Liu et al., 2010). Estudios de diversidad genética sugieren que el parásito en humanos surgió hace 10 000 años ((Loy et al., 2017). *P. falciparum* se puede identificar por su morfología, ya que cuando se encuentra en etapa de anillo dentro de los eritrocitos suele diferenciarse su núcleo de forma pronunciada, también los gametocitos son alargados y en forma de medialuna, por lo que algunas veces se logra identificar fácilmente (Taghdiri et al., 2019).

5- Ciclo de vida

5.1. Generalidades

El ciclo de vida del *P. falciparum* es de gran complejidad, se lleva a cabo en dos hospederos: su vector el cual es un mosquito del género *Anopheles* y el otro un vertebrado. Posee una amplia variedad de estadios morfo-fisiológicamente distintos distribuidos en dos fases, la fase asexual que se desarrolla completamente en el humano (dividida en dos etapas, una etapa exo-eritrocitaria y una etapa intra-eritrocitaria) y la fase sexual que inicia su desarrollo en el humano con la etapa de gametocitos y continúa con la etapa esporogónica en el mosquito vector (Nureye & Assefa, 2020; Tibúrcio et al., 2019).

5.2. Ciclo de vida en el vertebrado

A la forma infecciosa móvil del *Plasmodium* se le denomina esporozoito, se transmite al vertebrado cuando el mosquito inocula el parásito en la piel. Para alimentarse de sangre del hospedero, el vector secreta e inyecta saliva, la cual contiene un cóctel complejo de moléculas

moduladoras que incluyen diversos vasodilatadores y anticoagulantes que mantienen la sangre líquida y la vasculatura relajada (dilatada). Es durante la picada, que el parásito es inoculado en el hospedero. Los factores presentes en la saliva, de manera indirecta, benefician al parásito ya que facilitan su entrada a los vasos sanguíneos. Posterior a la inoculación (30-60 minutos), los esporozoitos son transportados al hígado por el sistema circulatorio (Win et al., 2017) en donde se alojan en células hepáticas. Durante los siguientes 7 a 12 días, los esporozoitos se convierten en esquizontes, para luego producir hasta 30 000 merozoitos. Es allí donde los hepatocitos se rompen, liberando miles de merozoitos que viajan al torrente sanguíneo e invaden los eritrocitos, comenzando así el ciclo asexual intraeritrocitario (Gazzinelli et al., 2014). Dentro del eritrocito el parásito desarrolla la etapa inicial de anillo hasta llegar a trofozoito tardío. En esta etapa el parásito experimenta divisiones mitóticas hasta la etapa de esquizonte, el cual contiene entre 6 a 32 merozoitos (Wipasa et al., 2002). Cuando se rompe el esquizonte, los merozoitos son liberados y continúan el ciclo de vida asexual invadiendo otros eritrocitos. Durante este ciclo repetido, algunos merozoitos se pueden diferenciar en formas sexuales masculinas y femeninas conocidas como gametocitos. Estos gametocitos se desarrollan y maduran en el eritrocito para ser ingeridos por el mosquito hembra *Anopheles*, continuando así su ciclo de vida en el invertebrado (Nureye & Assefa, 2020; Wipasa et al., 2002).

5.3. Ciclo de vida en el mosquito *Anopheles*

Cuando los gametocitos son ingeridos por el mosquito, el parásito induce la gametogénesis. Estas son las formas flageladas, que corresponden a gametos masculinos llamados microgametos, que penetran los gametos femeninos, llamados macrogametos, generando cigotos. Los cigotos se transforman en ookinetos, que luego, invaden las células epiteliales del intestino medio del mosquito, implantándose en la región basal para transformarse en un ooquiste redondo. En el ooquiste, el núcleo se divide repetidamente, con la formación de un gran número de esporozoitos, seguido de un agrandamiento del ooquiste (Nureye & Assefa, 2020). Cuando los esporozoitos están formados, el ooquiste estalla, liberando los esporozoitos en el hemocele (la cavidad corporal del mosquito). Los esporozoitos invaden las glándulas salivales, en el lumen lleno de saliva completando el ciclo el mosquito vector (Nureye & Assefa, 2020).

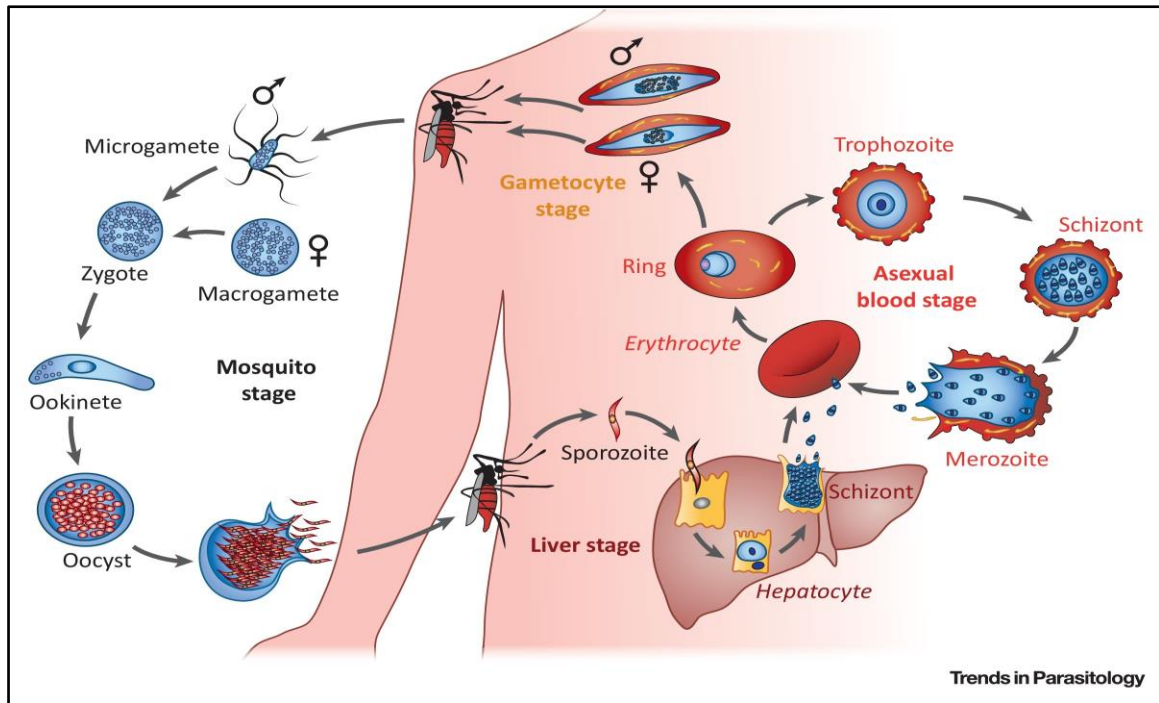


Figura 2. Ciclo de vida de *Plasmodium falciparum*. La infección humana con *P. falciparum* se inicia cuando una hembra infectada del género *Anopheles* inyecta esporozoitos durante la ingesta de sangre. Los esporozoitos transitan desde la circulación periférica del hospedador hacia el hígado, donde infectan los hepatocitos. La etapa hepática es asintomática y dura aproximadamente 1 semana. Las células hepáticas infectadas se rompen para liberar merozoitos extracelulares en la circulación del hospedador. Los merozoitos invaden los eritrocitos, iniciando así la etapa de sangre asexual de la infección, que causa todos los síntomas clínicos de la malaria. Una vez dentro del eritrocito, el merozoito sufre una serie de divisiones (esquizogonía) durante un período de 48 h, tras lo cual se liberan merozoitos hijos para infectar nuevos eritrocitos. Algunos parásitos asexuales no sufren esquizogonía, sino que se convierten en precursores sexuales (gametocitos), los cuales son adquiridos por los mosquitos durante la ingesta de sangre para completar su ciclo de vida en el vector (Maier et al., 2019).

6. Fármacos antimaláricos

El tratamiento de la malaria se da una vez confirmado el diagnóstico por *P. falciparum*. Cada paciente es tratado de acuerdo con la sintomatología que presenta. La terapia combinada de antimaláricos es la alternativa de primera línea para tratar la enfermedad. La terapia combinada se define como el uso de dos o más fármacos esquizonticidas sanguíneos generalmente con modos de acción independientes. La aplicación combinada de fármacos se basa en el hecho de que la sinergia entre fármacos antimalaríacos es frecuentemente más efectiva y en el caso que exista un parásito resistente o que desarrolle resistencia *de novo* a uno de los medicamentos, el otro medicamento actuará eliminándolo (WHO, 2010). La amplia presencia de resistencias a fármacos como la Sulfadoxina-Pirimetamina, la Cloroquina o la Amodiaquina, comprometió su eficacia incluso en combinación, por lo que actualmente la opción terapéutica disponible, especialmente en el caso de la malaria por *P. falciparum*, es el tratamiento combinado basado

en la artemisinina (*Arthemisin-based Combination Therapies, ACT*), tanto para la malaria no complicada como para la malaria complicada (WHO, 2010).

Los fármacos antimaláricos pueden clasificarse de acuerdo con:

A. El mecanismo de acción sobre el parásito:

- a. Inhibidores de formación de hemozoína: Quinina.
- b. Inhibidores del metabolismo del ácido fólico: Sulfadoxina, pirimetamina, proguanil.
- c. Formadores de radicales reactivos de oxígeno: Hidróxicloroquina.

B. La fase del ciclo donde actúan:

- a. Esquizonticidas tisulares: actúan en la etapa exo-eritrocitaria (hígado): Primaquina, Proguanil.
- b. Esquizonticidas sanguíneos: actúan en la etapa intra-eritrocitaria: Cloroquina, Mefloquina, Lumefantrina, artemisina.
- c. Gametocidas: actúan destruyendo los gametocitos previniendo la transmisión del parásito al mosquito: Primaquina, Artemisina, Cloroquina, Quinina.

Las opciones de tratamiento combinado basado en la artemisina que son recomendadas actualmente por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2012) (WHO, 2013) son:

1. Artemeter + Lumefantrina
2. Artesunato + Amodiaquina
3. Artesunato + Mefloquina
4. Artesunato + Sulfadoxina-Pirimetamina
5. Dihidroartemisinina + Piperaquina

7. Métodos de diagnósticos

El diagnóstico de la malaria se puede realizar mediante microscopía óptica, detección de antígenos (pruebas de diagnóstico rápido) o por PCR (reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés). El diagnóstico por microscopía consiste en la preparación de una tinción de gota gruesa y posterior visualización del parásito en el microscopio. Si la gota gruesa es

positiva, se realiza una gota fina o frotis para identificar la especie y el grado de parasitemia en la sangre. La prueba de diagnóstico rápido consiste en la detección de antígenos específicos del parásito, que se pueden encontrar en la sangre del paciente infectado. Se utiliza en casos que el paciente ya ha tomado fármacos antimaláricos o cuando no hay disponibilidad de análisis por microscopía. Las pruebas de diagnóstico molecular mediante PCR consisten en la identificación de material genético del parásito en una muestra de sangre (Zimmerman & Howes, 2015). La técnica de PCR cuantitativo (qPCR) es el método analítico molecular más sensible, con una sensibilidad de 99.41% (Khairnar, Martin, Lau, Ralevski, & Pillai, 2009), permitiendo la identificación de parásitos no detectados en gota gruesa (infecciones submicroscópicas). La detección específica de *P. falciparum* se realiza mediante la amplificación de regiones altamente conservadas del gen que codifica la subunidad 18s del de ARNr del parásito, lo que permite estimar con mayor certeza la carga parasitaria (Hermsen et al., 2001; Rougemont et al., 2004).

8. Sintomatología

La malaria causada por *P. falciparum* es una infección compleja y su sintomatología es tan diversa que puede variar desde pacientes asintomáticos con parasitemia detectable en sangre, pacientes con malaria clínica (fiebre no diferenciada) hasta pacientes con malaria grave que presentan complicaciones como la malaria cerebral, acidosis metabólica, dificultad respiratoria, lesión renal aguda y anemia grave. El deterioro cerebral y la lesión renal aguda son predictores independientes de mortalidad tanto en adultos como en niños con paludismo grave por *P. falciparum* (Plewes et al., 2018).

La capacidad única de *P. falciparum* de unirse al endotelio produce el síndrome clínico-patológico de malaria cerebral (Milner, 2017; Seydel et al., 2015). La acidosis metabólica es causada debido a que el parásito expresa la enzima lactato deshidrogenasa (pLDH) para producir ácido láctico, lo cual conlleva a una disminución del pH fisiológico. La dificultad respiratoria es una característica común de la malaria grave, ya que vemos que, debido al secuestro hay somnolencia y/o inflamación del cerebro, se produce la supresión central directa de los centros respiratorios, lo que conduce a patrones respiratorios irregulares en el contexto de la acidosis, lo que puede contribuir al desequilibrio del pH (Cheng & Yansouni, 2013).

La población pediátrica en áreas de alta transmisión es especialmente, susceptible a la anemia palúdica grave durante los primeros 2 años de vida. Los estudios en pacientes con malaria grave que tienen lesión renal aguda muestran una reducción del flujo sanguíneo cortical renal, un aumento del tamaño del riñón, además de cambios endoteliales en los capilares glomerulares y peritubulares (Atalabi et al., 2013; Nguansangiam et al., 2007; Sitprija et al., 1977). Existen muchas interrogantes sobre los mecanismos exactos que conducen a la anemia grave (Milner, 2017), sin embargo, se ha observado que cambios en la respuesta inmune de monocitos y linfocitos en respuesta a la hemozoína afectan la regulación de la eritropoyesis, causando anemia palúdica severa. Esta manifestación clínica puede deberse, entre otras razones a: (i) la inhibición de la síntesis de la hormona eritropoyetina por IL-6 (Interleucina-6), (ii) supresión de los niveles del mediador inmunológico RANTES (*Regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted*) o (iii) al aumento en los niveles de la citoquina MIP-1s (*Macrophage Inflammatory Protein 1s*) (Perkins et al., 2011).

9. Malaria en el embarazo

Con relación a las implicaciones de la malaria en el embarazo conoceremos el caso de África subsahariana, donde se ha estimado que 32 millones de mujeres corren el riesgo de infectarse con *Plasmodium falciparum* durante el embarazo, lo que aumenta el riesgo de anemia grave, abortos espontáneos, mortinatos y bebés con bajo peso al nacer (Dellicour, Tatem, Guerra, Snow, & Ter Kuile, 2010). En pacientes embarazadas infectadas con *P. falciparum*, los eritrocitos infectados expresan el antígeno VAR2CSA (*VARiant surface antigen 2-Chondroitin Sulfate A*), el cual es partícipe en la unión de eritrocitos infectados al condroitín Sulfato A en el sincitio-trofoblasto que recubre el espacio intervelloso de la placenta. La adhesión de eritrocitos infectados en la placenta resulta en la patología llamada paludismo placentario (Djontu et al., 2020). Se ha demostrado que los anticuerpos contra los eritrocitos infectados de unión a la placenta reducen el secuestro y mejoran los resultados del embarazo (Feng et al., 2009).

10. Malaria cerebral

El *P. falciparum* es el único parásito capaz de producir malaria cerebral y esto se debe a su capacidad única de unirse al endotelio, por lo que, es el parásito que causa el índice más alto de complicaciones y mortalidad (Gething et al., 2016; WHO, 2019). Los pacientes que sobreviven

a la malaria cerebral pueden permanecer con secuelas posteriores a la malaria cerebral de por vida, como déficits neurológicos, que afectan la calidad de vida (WHO, 2014). Esta patología se presenta de manera diferente entre niños y adultos. Si bien es cierto que, la tasa de mortalidad debido a la malaria cerebral pediátrica es más baja que la mortalidad por malaria cerebral en adultos, la malaria cerebral pediátrica se asocia con una mayor tasa de convulsiones y déficits neurocognitivos post-malaria cerebral (Birbeck et al., 2010; Schiess et al., 2020).

De esta manera, las manifestaciones clínicas de la malaria cerebral pueden darse desde una presentación común de paludismo hasta desarrollar rápidamente un estado comatoso. Después de excluir otras posibles causas de coma, se puede realizar un diagnóstico clínico de malaria cerebral (Milner, 2017). La característica patológica de diagnóstico de la enfermedad, en la autopsia, es la presencia de parásitos *P. falciparum* en más del 20% de los capilares del cerebro mediante frotis de tejido o cortes histológicos (Taylor et al., 2004). Además, se pueden presentar otras características patológicas que pueden variar como trombos de fibrina, hemorragias en anillo, decoloración del cerebro, lesión axonal y fuga capilar (Dorovini-Zis et al., 2011). En pacientes pediátricos africanos, pasadas las 48 horas, se ha visto que los vasos cerebrales aparecen congestionados y la inflamación cerebral es más prominente en las muertes agudas. En pacientes adultos cuando la enfermedad ha evolucionado es más común observar una descompensación multiorgánica y síndrome agudo de dificultad respiratoria (Milner, 2017).

11. Anemia palúdica grave

La anemia Palúdica Grave, se caracteriza por concentraciones de hemoglobina (Hb) menores a 5 g/dl (o un hematocrito <15%) en presencia de cualquier parasitemia (WHO, 2000). La anemia palúdica grave en los países en desarrollo es una de las causas del 3 al 46% de las muertes pediátricas de pacientes hospitalizados en los centros de atención de referencia (English et al., 2004). Uno de los principales mecanismos responsables de los niveles bajos de hemoglobina en niños con anemia palúdica grave es la eritropoyesis alterada o ineficaz. La pérdida de la producción adecuada de eritrocitos se traduce en una falla en la capacidad de reponer el grupo reducido de eritrocitos debido a hemólisis inducida por los parásitos y/o la administración de antipalúdicos. Estudios previos han reportado daño parenquimatoso de la médula ósea,

eritropoyesis ineficaz y una tasa reducida de proliferación eritropoyética en pacientes con paludismo agudo por *P. falciparum* (Perkins et al., 2011).

Cuando la anemia es más grave produce isquemia e hipoxia tisular, con un aumento de la producción de lactato y un aumento de la relación lactato-piruvato (Brand et al., 2016). Cuando la carga parasitaria es muy alta, la obstrucción de la microvasculatura causada por el secuestro, la reducción de la deformabilidad de los glóbulos rojos y las fuerzas adhesivas intereritrocíticas agravan la reducción en el suministro de oxígeno a los tejidos, en consecuencia, se produce un aumento del índice cardíaco para mantener el suministro de oxígeno (Ishioka et al., 2015; White, 2018).

12. Patogénesis

Los procesos relacionados con la fisiopatología de la malaria se pueden resumir en tres:

1. La disfunción endotelial
2. La inflamación y
3. La citoadhesión

12.1. Disfunción endotelial

La disfunción endotelial se produce como consecuencia de un aumento en la citoadhesión de glóbulos rojos parasitados y leucocitos, activando las cascadas de coagulación y alterando el flujo sanguíneo. Esta consecuencia está asociada con los procesos patogénicos de la malaria cerebral, lo que resulta en un edema vasogénico (producto de la ruptura de las uniones entre las células del endotelio que forma la barrera hematoencefálica). Un componente central de la fisiopatología de la malaria cerebral es la activación de las células endoteliales microvasculares, que resulta tanto de la citoadherencia de los eritrocitos infectados en su superficie como de los efectos pro-inflamatorios de las citoquinas e interleucinas (Wassmer et al, 2005).

12.2. Inflamación

Existe una inflamación endotelial característica de *P. falciparum*, la cual es inducida por los eritrocitos infectados adheridos al endotelio y puede agravarse por productos de la respuesta

inmune del hospedero y productos del mismo parásito (Francischetti et al., 2007; Jensen et al., 2020; Viebig et al., 2005).

La intensidad y calidad de la respuesta inmune puede agravar la fisiopatología debido a las citosinas inflamatorias que conllevan a la activación endotelial. Esto induce un reclutamiento de leucocitos mediado por quimiocinas y una progresión de la inflamación local. Además, la activación endotelial por citoquinas proinflamatorias, como TNF (Tumor Necrosis Factor) y eritrocitos infectados, vemos que las células endoteliales secretan quimiocinas, que inician el reclutamiento de leucocitos que expresan los respectivos receptores de quimiocinas, incluidos macrófagos, monocitos, neutrófilos y linfocitos T, las cuales se secuestran en la microvasculatura durante la malaria cerebral en humanos (Hunt & Grau, 2003; Rénia et al., 2012). Al llegar al sitio de la agresión inflamatoria, estas subpoblaciones de leucocitos pueden a su vez secretar citoquinas, así como también quimiocinas, promoviendo así aún más la activación endotelial y el reclutamiento de leucocitos. Por consiguiente, se inicia un ciclo de retroalimentación que agrava la inflamación local en el cerebro (Dunst et al., 2017).

12.3. Citoadhesión

Al proceso de adhesión al endotelio se le denomina “secuestro” y es importante para el parásito, ya que permite que los eritrocitos infectados no pasen al bazo, el cual cumple la función de filtrarlos y destruirlos (Hommel, David and Oligino, 1983; Moxon, Grau and Craig, 2011). Además de la adhesión endotelial puede ocurrir la unión de eritrocitos infectados con no infectados, denominada rosetas (Angeletti et al., 2015); y la unión de eritrocitos infectados con otros infectados, denominada aglutinaciones (Mayor et al., 2011).

La citoadhesión de eritrocitos infectados a órganos se considera un proceso clave de la patogenicidad de la malaria grave causada por *P. falciparum*. Esto conlleva a una obstrucción de la microvasculatura, que puede dar como resultado la formación de trombos, además de la inflamación agravada por las proteínas proinflamatorias provocando así hemorragias elevadas (Hanson et al., 2012; Wassmer et al., 2015).

La citoadherencia y la formación de rosetas están involucradas en la patogénesis de la malaria al bloquear el flujo sanguíneo cuando la unión es excesiva. Esta acumulación conduce a falta de oxígeno en los tejidos, producción excesiva de lactato y reducción del pH en la sangre y los tejidos, que puede culminar en dificultad respiratoria, coma, anemia grave, sintomatología típica del paludismo grave (Wahlgren & Akhouri, 2017). Esta capacidad de citoadherencia se debe a la localización de las proteínas adhesinas llamadas *PfEMP1* (*Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1) en la membrana del eritrocito.

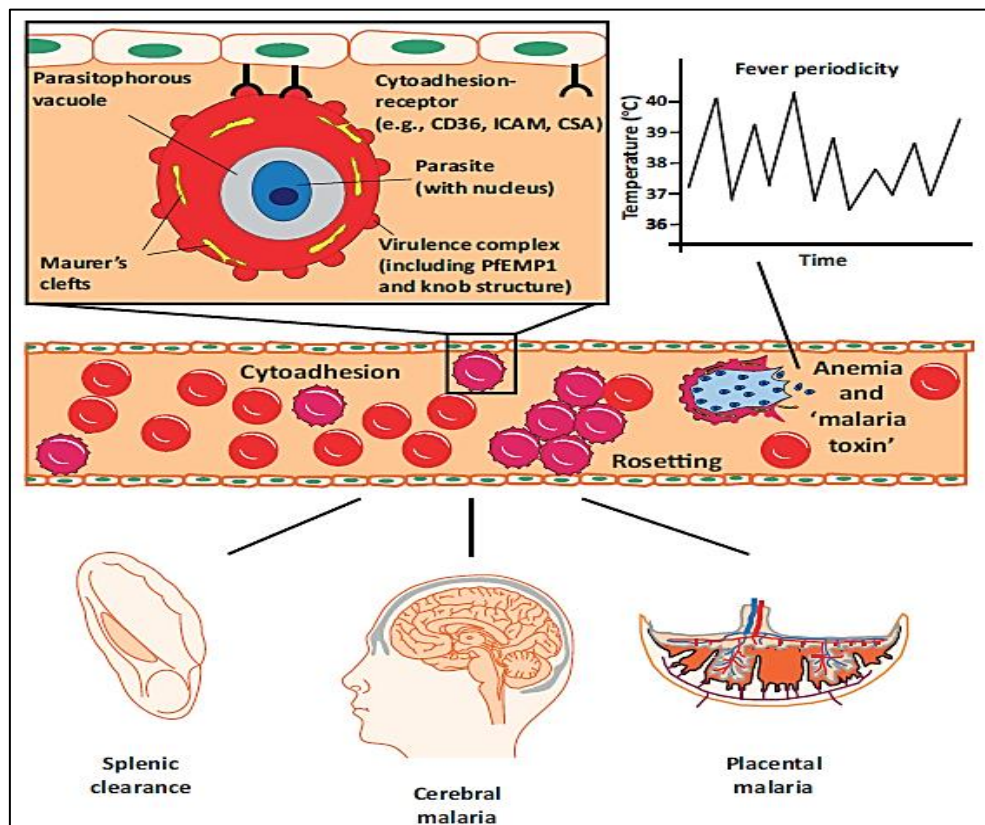


Figura 3. Mecanismos patogénicos de *Plasmodium falciparum*. Por medio de las proteínas *PfEMP1*, los eritrocitos infectados se unen a receptores humanos (e.g. CD36, ICAM, CSA), causando la citoadherencia en eritrocitos sanos e infectados (*rosetting*), lo que se traduce en las manifestaciones clínicas asociadas con la malaria grave como lo son anemia, malaria cerebral y malaria placentaria (Maier et al., 2019).

13. *PfEMP1*

Existen proteínas que participan en la adhesión de eritrocitos infectados al endotelio, la más estudiada es la *PfEMP1* (Hviid & Jensen, 2015). La unión de las diferentes variantes de la proteína *PfEMP1* al endotelio se da debido a la presencia de proteínas vasculares que sirven de receptores, entre las que están CD36, molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM - 1), receptor

de proteína C endotelial (EPCR), Condroitín Sulfato A (CSA) y antígenos de los grupos sanguíneos ABO (Jensen et al., 2020). El receptor CSA se ha mostrado como responsable de la acumulación de eritrocitos infectados en la placenta (Djontu et al., 2020; Salanti et al., 2003). Las *PfEMP1* están ancladas en protuberancias llamadas “*knobs*” inducidas por el parásito en la membrana del eritrocito infectado. Al estar expuestas en la superficie extracelular son susceptibles a la respuesta inmune del hospedero, además que pueden interactuar con el medio extracelular (Feldman et al, 1995). Estas proteínas son una familia mutagénica y muy polimórficas codificadas por un grupo de hasta 60 genes llamados genes *var* (Biggs et al, 1992).

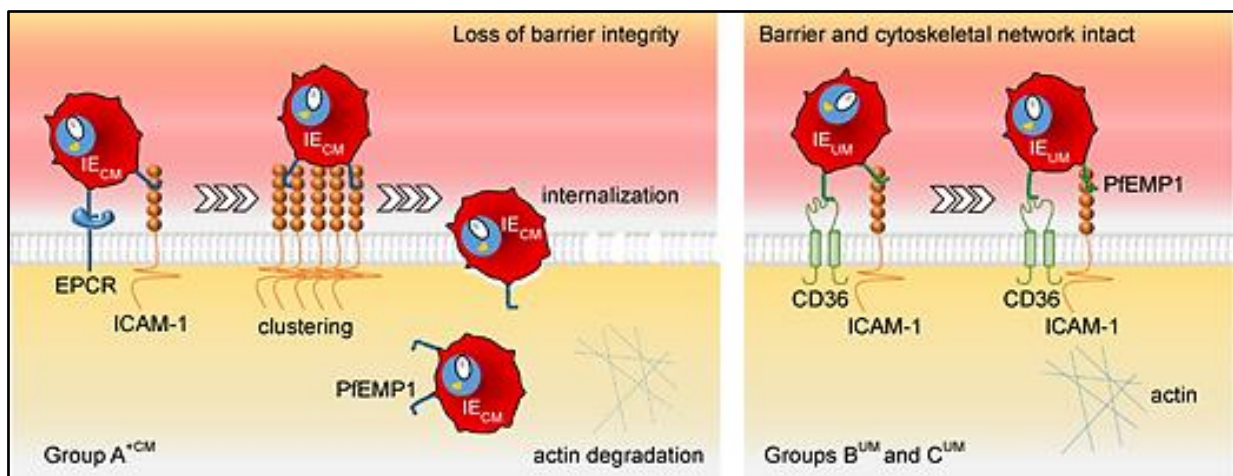


Figura 4. Esquema de proteínas *PfEMP1* en la malaria cerebral. La malaria cerebral es causada por la unión de eritrocitos infectados por *P. falciparum* a la microvasculatura cerebral, lo que produce inflamación, oclusión de vasos e hinchazón cerebral (Adams et al., 2021).

14. Genes *var*

El parásito *P. falciparum* depende de la expresión excluyente de una familia de genes de virulencia para sobrevivir dentro del hospedero (Barcons-Simon et al., 2020; Duraisingh & Horn, 2016; Guizetti & Scherf, 2013). Esto lo hace mediante los genes *var*, una familia multigénica muy polimórfica. Además de presentar variación antigénica clonal, esta singularidad permite a *P. falciparum* evadir respuestas específicas mediadas por anticuerpos y unirse a diferentes receptores del hospedero (Kraemer & Smith, 2006).

Cada parásito posee aproximadamente hasta 60 copias de genes diferentes con una superposición limitada de repertorios de genes *var* entre haplotipos de parásitos. Una pregunta fundamental para la patogenicidad de cada variante del parásito es si las interacciones

específicas entre *PfEMP1* y el receptor juegan un papel causal en la malaria grave (Wassmer et al., 2015).

Los genes *var* se encuentran localizados en dos subregiones cromosomales: (i) regiones subtelo méricas en 13 de los 14 cromosomas del parásito y en (ii) bloques centrales en los cromosomas 4, 6, 7, 8 y 12 (Gardner et al., 2002) y cuya transcripción está controlada epigenéticamente. La transcripción de un solo gen *var* alcanza su punto máximo aproximadamente 12 horas después de la invasión del eritrocito (Schieck et al., 2007), luego se silencia y se estabiliza durante las últimas etapas del ciclo intraeritrocítico de 48 horas. Todos los demás genes *var* permanecen silenciados transcripcionalmente a lo largo del ciclo y están atados en grupos heterocromáticos represivos, caracterizado por el patrón de metilación H3K9me3 y H3K36me3 en la periferia nuclear (Jiang et al., 2013; Lopez-Rubio et al., 2007). Por el contrario, el gen *var* activo es eucromático, caracterizados por las modificaciones H3K4me3 y H3K9ac y se localiza en un dominio de expresión perinuclear distinto (Barcons-Simon et al., 2020; Ralph et al., 2005).

15. La identificación de nuevas dianas terapéuticas y desarrollo de vacunas

El descubrimiento de los mecanismos moleculares que emplea *P. falciparum* es el objetivo principal para el desarrollo de fármacos y vacunas eficaces. La búsqueda de dianas permite la elaboración de fármacos que funcionan para el tratamiento de la malaria, incluso la elaboración de vacunas permitiría una alta protección contra la malaria (Alonso et al., 2011; Chan et al., 2014). Actualmente ya se han reportado vacunas para combatir la malaria, sin embargo, estas vacunas aun requieren de más estudios para ser aprobadas (Goswami et al., 2020; Laurens, 2020).

Los antígenos variantes expresados en la superficie de eritrocitos infectados son considerados candidatos a vacunas contra la malaria, ya que estas proteínas son biológicamente relevantes a la patología de la enfermedad (unión a la vasculatura) que afecta múltiples órganos. Estos antígenos de superficie variante son importantes, debido a la inmunidad protectora adquirida, por lo tanto, en los últimos años se han enfocado estudios en estas dianas. Ejemplo de estas dianas inmunes son RIFIN, STEVOR, SURFIN y *PfEMP1* (Chan et al., 2014).

Rif (*repetitive interspersed families*) es una familia multigénica comprendida por 150 a 200 genes que codifican un grupo de proteínas llamadas RIFINs (Fernandez et al., 1999). A diferencia de los genes *var*, un solo parásito transcribe a la vez varios genes *rif*, por consiguiente, se traducen múltiples variantes de RIFIN en la superficie de eritrocitos infectados (Fernandez et al., 1999). Las proteínas RIFIN se dividen en tipo A, estas proteínas se asocian a la malaria cerebral y están destinadas a la superficie del eritrocito; las proteínas de tipo B permanecen dentro del parásito (Petter et al., 2007).

Stevor (*subtelomeric variant open reading frame*) es otra familia multigénica con aproximadamente 30 a 40 genes por genoma que codifican proteínas llamadas STEVOR (Blythe et al., 2008). Se propone que estas proteínas son expresadas en merozoitos, esporozoitos y gametocitos (Khattab & Meri, 2011). Al igual que *rif* se han detectado múltiples versiones de *stevor* en un solo parásito (Khattab & Meri, 2011). Se ha descrito que la sobreexpresión de *stevor* cambia las propiedades mecánicas de los eritrocitos aumentando la rigidez de los mismos. Esta rigidez aumentada mejora el secuestro de eritrocitos infectados mediado por *PfEMP1* (Sanyal et al., 2012).

Surf (*surface associated interspersed*) es una familia múltiple de 10 genes que codifican para proteínas llamadas SURFINs (Winter et al., 2005). Se sabe poco de esta familia multigénica y no se ha determinado si las proteínas SURFIN provocan potencialmente inmunidad humoral o participan en la evasión inmunitaria (Mphande et al., 2008).

De todas estas familias de superficie multigénicas, las más estudiadas son las *PfEMP1*, ya que representan dianas importantes para el desarrollo de vacunas; sin embargo, la diversidad antigénica que presenta conlleva un gran desafío. Diversos estudios en modelos de animales evidencian que las proteínas *PfEMP1* recombinantes tienen la capacidad de generar una respuesta inmunitaria protectora. Ejemplo de esto es un estudio en el que se inmunizó monos *Aotus* con el dominio CIDRa de *PfEMP1*. Con estos resultados se demostró que la inoculación con CIDRa confirió protección contra una cepa homóloga letal del parásito, pero no otra sepa heteróloga. Para superar el desafío de variantes de los anticuerpos de *PfEMP1* se ha experimentado con diferentes combinaciones de dominios (Baruch et al., 2002). En el modelo

de ratas inmunizadas con diversos dominios NTS-DBLa se observó que la inducción de anticuerpos protectores que disminuían significativamente el secuestro (Ahuja et al., 2006). Este estudio fue posteriormente replicado en los Países Bajos en donde voluntarios, que no habían experimentado malaria, infectados con *P. falciparum*, pudieron generar anticuerpos de reacción cruzada y reconocieron PfEMP1 de diferentes genomas de parásitos (Turner et al., 2011).

16. Vacunas y métodos terapéuticos.

El avance hacia la generación de vacunas contra la malaria ha sido un camino arduo. La vacuna preeritrocítica conocida como RTS, S/AS01 (Mosquirix) es la primera vacuna anti-malaria aprobada por la FDA para la prevención de la malaria. La vacuna RTS, S tiene como objetivo activar el sistema inmunitario para que se defienda contra las primeras etapas de la malaria cuando el parásito *Plasmodium falciparum* ingresa al torrente sanguíneo a través de la picadura de un mosquito e infecta las células del hígado. La vacuna está diseñada para evitar que el parásito infecte el hígado, donde puede madurar, multiplicarse, volver a ingresar al torrente sanguíneo e infectar los glóbulos rojos, lo que puede provocar síntomas de la enfermedad. El diseño principal de esta vacuna se creó en 1987 como parte de una colaboración entre GlaxoSmithKline (GSK) y el Instituto de Investigación del Ejército Walter Reed (WRAIR) (Dame et al., 1984) y utiliza la proteína del circumsporozoíto de *P. falciparum* como antígeno más una formulación especial de adyuvantes, que en conjunto previenen la invasión del hígado por los esporozoítos (Clyde, Most, McCarthy, & Vanderberg, 1973). El sistema adyuvante AS01, compuesto por liposomas, MPL y QS-21, ha mejorado la inmunogenicidad de RTS, S (Polhemus et al., 2009). Por lo tanto, la formulación RTS, S/AS01 pasó por ensayos de fase 2, para luego entrar a ensayos clínicos (fase 3); esta fase transcurrió entre los años 2009 y 2014 demostrando una eficacia de cuatro dosis medida (regresión binominal negativa frente a la malaria clínica) del 25.9% en lactantes de 6 a 12 semanas de edad y un 36.3% de eficacia en niños de 5 a 17 meses de edad (RTS, S Clinical Trials Partnership, 2015). La vacuna RTS, S/AS01 (Mosquirix) es la primera vacuna que se ha probado en ensayos clínicos fase 3 y a pesar de su baja eficacia en un futuro el desarrollo de nuevas adyuvantes podrían mejorar su eficacia (Laurens, 2020).

Las vacunas que utilizan componentes vivos (esporozoítos enteros) son capaces de generar inmunidad esterilizante contra la malaria en modelos animales y, más importante aún, en humanos. La edición de genes específicos del parásito logra la generación de cepas de parásitos atenuados genéticamente (GAP) para la formulación de vacunas. Para esto se utilizan parásitos de malaria murina (ratón) genéticamente atenuados, pero con capacidad de replicación (RC, por sus siglas en inglés) llamados LARC (Late liver stage–Arresting, Replication Competent). Una vez dentro de los hepatocitos, estos parásitos se replican exitosamente y experimentan un crecimiento en estadio hepático, llevando a una expansión significativa de su biomasa y el repertorio de antígenos.

La generación de (GAP) en el parásito de la malaria humana *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) ha sido realmente un desafío. Aunque un estudio reciente reportó la generación y caracterización de una cepa de parásitos genéticamente atenuada de *P. falciparum* mediante la eliminación dirigida del gen *Mei2*: *P. falciparum mei2*⁻. Se observó esquizogonía exoeritrocítica robusta con crecimiento celular extensivo y replicación de ADN en estadios hepáticos en ratones quiméricos hepáticos humanos. Sin embargo, los estadios hepáticos *mei2* de *P. falciparum* no lograron completar su desarrollo y no formaron merozoítos exoeritrocitarios infecciosos, lo que impidió su transición a la infección en estadio sanguíneo asexual. Por lo tanto, *P. falciparum mei2*⁻ es una cepa atenuada del parásito del paludismo humano, competente para la replicación, con una potencia potencialmente aumentada, útil para proteger, mediante vacunación, contra la infección del paludismo por *P. falciparum* (Goswami et al., 2020).

CAPÍTULO II: METODOLOGÍA

1. Consideraciones éticas

El estudio se desarrolló en el bioterio de primates no humanos y en los laboratorios de malaria del Departamento de Investigación en Parasitología del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES). El protocolo de investigación para el desarrollo de este estudio fue avalado por el Comité Institucional para el Buen Uso y Cuidado de los Animales de Laboratorios (CIUCAL-ICGES) y por el comité de Bioética de la Investigación (CBI-ICGES) del ICGES. Notas de aprobación: CIUCAL-ICGES 2018/02 y CBI-ICGES 296/CBI/ICGES/20.

2. Inoculación de parásitos:

Para estudiar la dinámica de la infección por *P. falciparum*, se inocularon cuatro ejemplares de *Aotus lemurinus lemurinus* a través de la vena safena. El esquema de inoculación fue el siguiente: El espécimen I se inoculó con una dosis de 1.0×10^4 eritrocitos infectados con la cepa PfFVO, congelados en el año 2011; los especímenes II y espécimen III fueron inoculados con una dosis de 1.0×10^4 eritrocitos infectados del espécimen I, estos eritrocitos infectados se colectaron el día que se trató el espécimen I (año: 2020); el espécimen IV fue inoculado con una cepa de PfFVO, congelada en el año 2011, correspondiente a 1/3 de la dosis inoculada anteriormente (1.0×10^4). Se incluyó un mono no infectado como control el cual fue analizado igual que los infectados (análisis sanguíneo, monitoreo de parasitemia por microscopía óptica).

3. Colecta de sangre y preparación de muestra:

Las colectas de sangre se realizaron partir del 5to día post-inoculación para cada espécimen. Se extrajo diariamente entre 20-40 μ L por punción en el lóbulo marginal de la oreja izquierda o derecha, alternando día a día. Para muestras de papel de filtro, 3-5 μ L para análisis de parasitemia por frotis fino. Se extrajo aproximadamente 3.0 mL de sangre por extracción venosa en tubos de heparina de litio y EDTA, en periodos específicos (**Cuadro 1**). Se utilizó 0.6 mL para análisis de hematología en un analizador hematológico Abaxis VetScan HM5 y 0.4 mL para química sanguínea en un analizador bioquímico Abaxis VetScan VS2. La muestra restante se centrifugó a 1500 rpm durante 8 minutos, para separar los eritrocitos del resto de la sangre. Finalmente, a la muestra se le adicionó 4 mL de reactivo TRIzol y se conservó a -70 °C.

Cuadro 1. Días de colecta de sangre por extracción venosa para todos los especímenes. Días previo a la inoculación (-) y post-inoculación de la cepa *PfFVO*. El día 0 representa el día en el cual los especímenes recibieron el inóculo. Los días marcados en rojo representan el día en que se trató cada espécimen. Estas muestras de sangre fueron utilizadas para exámenes sanguíneos (hematología y química sanguínea). Los días en los que cada espécimen fue tratado se colectaron eritrocitos infectados y fueron debidamente congelados.

Especímen	Días										
	-12	0	5	13	20	22	25	39	44	56	
I	-12	0	5	13	20	22	25	39	44	56	
II	-12	8	11	19	22	26	30	37	47	72	96
III	-9	8	11	19	22	30	37	43	55	72	96
IV	-12	8	12	16	96						

4. Monitoreo de parasitemia por microscopía *in vitro*

Se evaluó la carga parasitaria de los animales al día 5to post-inoculación del parásito hasta siete días después del tratamiento con la droga antimalárica. Las muestras de sangre se obtuvieron por punción en la vena marginal de la oreja y se utilizó la técnica de frotis fino en portaobjeto, colocando una gota de sangre (3-5 μ L). Las células fueron fijadas con metanol al 100% y teñidas con Giemsa al 20% por 30 minutos (**figura 22**). Una vez lavadas y secadas se observaron en el microscopio a 100X. Se determinó la parasitemia por campo de visión en 100X mediante el cálculo:

$$\frac{\text{eritrocitos infectados}}{\text{total de eritrocitos}} \times 100$$

5. Cultivo de Parásitos:

5.1 Preparación de medio de cultivo para parásitos

Los medios de cultivo para parásitos se prepararon con medio RPMI diluido en 1000 mL de H₂O, con 0.05 g de hipoxantina diluida, 30 mL de solución de bicarbonato de sodio (7.5%) y 200 μ L de gentamicina (50 mg/mL), por medio de un potenciómetro se ajustó el pH entre 7.18 a 7.19 y se filtró con una unidad de filtración de membrana de 0.22 μ m, posteriormente se añadieron 100 mL de suero humano comercial (Inactivado por calor, a partir de plasma AB masculino humano, origen de EE. UU., filtrado estéril, REF: H3667-100ML, Números de modelo: MFCD00165829).

5.2 Preparación de eritrocitos para cultivo

Para cultivar parásitos se utilizó sangre humana extraída de voluntarios por personal idóneo. Se adicionó lentamente 9 mL de sangre en tubos cónicos con 5 mL de reactivo Ficoll, se centrifugó a 3000 rpm por 20 minutos en un rotor *swinging-bucket*, sin freno, para separar los componentes de la sangre. Se descartó el sobrenadante, y se conservó la capa de eritrocitos. Los lavados incluyeron un primer lavado 1:1 eritrocitos: PBS (pH: 7.4), seguido de otro lavado con PBS, pero esta vez llevando el volumen hasta 14 mL. Los eritrocitos se almacenaron a 4 °C en igual volumen de medio RPMI obteniendo un hematocrito del 50%.

5. Mantenimiento de parásitos

Se descongelaron parásitos *P. falciparum* cepas IT4 y HB3, usadas para controles positivos, preparación de curva estándar para PCR cuantitativo (qPCR), estandarización de concentraciones cebadores, agilización de la técnica y familiarización con las formas parasitarias. Los parásitos se cultivaron en medio RPMI suplementado con eritrocitos humanos a un hematocrito del 5%, dentro de matraces de 25 mL y 75 mL. Los cultivos fueron gaseados con una mezcla de gases: 90% N₂, 5% O₂ y 5% CO₂, para mantener una condición anóxica. Este procedimiento se realizaba entre 1-2 días.

6. Administración de antimaláricos

Una vez alcanzada una carga parasitaria elevada (2% o más), se procedió a tratar los especímenes con una dosis de mefloquina. Todos los animales fueron tratados por vía oral con una dosis de mefloquina 50 mg/kg. Una vez tratados, se siguió con el monitoreo de parasitemia por frotis fino y exámenes sanguíneos, para descartar cualquier infección residual de *P. falciparum* en cada espécimen.

7. Extracción de ADN genómico de *P. falciparum*

La extracción de ADN se realizó utilizando el kit de extracción Purelink DNA Genomic Kit (Invitrogen, #K182001), siguiendo la metodología del fabricante. La muestra de sangre tomada en papel de filtro se recortó utilizando una tijera esterilizada (hipoclorito de sodio (NaClO⁻) al 7% y Etanol al 70%) y fue digerida con proteinasa K a 55°C durante 30 minutos en tampón de

digestión en un tubo de 1.5 mL. La mezcla fue centrifugada a 12 000 g por 30 segundos. El sobrenadante fue transferido a una columna de extracción, a la cual se le añadió la solución de lavado para eliminar impurezas. La columna fue centrifugada a 12 000 g por 1 minuto. Finalmente, el ADN fue eluído en 50 µL de tampón de elución.

8. Extracción de ARN total de *P. falciparum*

Para la extracción del ARN total se utilizó el botón o pellet de eritrocitos conservado en TRIzol. Para preparar el homogenizado en TRIzol, se atemperó el reactivo en un baño térmico a 37°C. Por otro lado, los eritrocitos se centrifugaron a 1500 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavó con PBS 1X pH 7.4. Finalmente, el botón o pellet fue resuspendido en 15 volúmenes de TRIzol con una pipeta, se homogenizó mediante vortex y fue guardado a -70°C. Los extractos preparados en TRIzol fueron equilibrados a temperatura ambiente y agitados en un vortex por 30 segundos. Se procedió a agregar 2 mL de TRIzol en dos tubos de 1.5 mL (1 mL por tubo). Agregamos 200 µL de cloroformo a cada tubo y se agitó mediante inversión de tubos (manualmente) durante 15 segundos. La mezcla fue incubada a temperatura ambiente por 3 minutos para luego ser centrifugada a 12 000 g a 4°C durante 15 minutos. La fase acuosa superior fue transferida a un tubo limpio de 1.5 mL libre de RNasa, evitando contaminar la fase acuosa con la interfase que contiene ADN y proteínas. Procedimos a la purificación de RNA en columna siguiendo el protocolo del kit PureLink RNA Mini Kit. EL ARN purificado fue guardado a -70 °C hasta su posterior uso.

9. Tratamiento con DNase I, Amplification Grade

Para eliminar trazas de ADN, se trató el ARN total con una mezcla de ADNasa I (1 U/µL), Buffer de ADNasa I 10X en agua libre de ARNasas por 30 minutos a 37 °C. Luego se añadió 0.1 volúmenes del reactivo “Inactivator Dnase I”; LA solución fue mezclada bien por pipeteo y por vórtex e incubada a temperatura ambiente por 2 minutos mezclando ocasionalmente, centrifugamos a 10 000 rpm por 2 minutos y por último se transfirió el ARN a otro tubo.

La ausencia de ADN genómico fue confirmada mediante PCR convencional y qPCR utilizando cebadores específicos para la enzima serina-tRNA sintetasa y la proteína tubulina. Para el PCR convencional se utilizaron: 12.9 µL de agua ultrapura, 2.5 µL de 10x Taq buffer, 4 µL de dNTPs,

2.5 μL de mezcla de cebadores, 0.10 μL de Taq (5 U/ μL) y 3 μL de RNA. Para el qPCR se utilizaron 5 μL de SYBR Green PCR Máster Mix, 3 μL de la mezcla de cebadores, 2 μL de agua ultrapura y 5 μL del ARN.

10. Síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN total de *P. falciparum*

A cada muestra de ARN total se le agregaron 5 μL de Oligo(dt)20 (50 μM), 5 μL de hexámeros aleatorios (50 ng/ μL) y 5 μL de mezcla dNTPs (10 mM). Mezclamos e incubamos los tubos a 65 °C por 5 minutos, luego colocamos en hielo por 1 minuto, procedimos a preparar una mezcla de síntesis de ADNc con 10 μL de 10 X RT buffer, 20 μL de MgCl_2 (25 mM), 10 μL de DTT (0.1 M), 5 μL de RNase OUT (40 U/ μL), y 5 μL de transcriptasa reversa SuperScript III (200 U/ μL). Luego añadimos 50 μL de la mezcla de síntesis de ADNc mezclando cuidadosamente seguido de centrifugación. Se procedió a incubar la mezcla a 25 °C por 10 minutos, 50 °C por 50 minutos, 85 °C por 5 minutos y luego a 4°C por 2 minutos Se continuó agregando 1 μL de RNase H, para finalmente incubar a 37 °C por 20 minutos. El ADNc fue preservado a -20 °C.

Se llevó a cabo una PCR convencional y qPCR para comprobar la síntesis de ADNc utilizando los cebadores de la enzima serina-tRNA-sintetasa (SERYL) y cebadores de Fructosa deshidrogenasa Para el PCR convencional se utilizaron: 12.9 μL de agua ultrapura, 2.5 μL de 10xTaq buffer, 4 μL de dNTPs, 2.5 μL de mezcla de cebadores, 0.10 μL de Taq (5U/ μL) y 3 μL de ADNc. Para el qPCR se utilizaron 5 μL de SYBR Green PCR Máster Mix, 3 μL de la mezcla de cebadores, 2 μL de agua ultrapura y 5 μL del ADNc.

11. Estandarización de cebadores

Antes de realizar el análisis de perfil transcripcional de los parásitos obtenidos en diferentes especímenes de *Aotus* (I, II, III y IV), se estandarizaron las concentraciones de cebadores para genes *var* y genes constitutivos llevando a cabo distintas diluciones. Esta estandarización se realizó para evitar la formación de dímeros de cebadores, que causan interferencia en las amplificaciones realizadas por la qPCR con reactivo SYBR Green PCR Máster Mix. En esta estandarización se utilizó como plantilla el ADN de la cepa IT4 de cultivos a una parasitemia de 5%. El qPCR se llevó a cabo con los reactivos esenciales: 5 μL de SYBR Green PCR Máster Mix, 3 μL de la mezcla de cebadores, 2 μL de agua ultrapura y 5 μL del ADNc. Cada cebador

fue estandarizado con éxito, las diluciones para cada cebador fueron entre un rango de 0.125 μ M - 2.5 μ M (**Cuadro 4**). La estandarización se comprobó por medio de QuantStudio Software V1.5., utilizando la curva de disociación (melting curve análisis). Esta curva permite analizar la disociación de los productos de PCR formados en una reacción (Dwight et al., 2011). Los productores de PCR específicos presentan una curva con valores más altos, mientras que los dímeros de cebadores representan una curva menor, por consiguiente, presentan una temperatura menor de disociación.

12. Determinación de parasitemia por qPCR:

Se llevó a cabo la determinación de parasitemia por qPCR utilizando sondas TaqMan. Para esto se extrajo el ADN de parásitos a partir de sangre en papeles filtro y tomada de la oreja del animal, a los días 0, 5 post-inoculación, hasta días siguientes luego de administrar la droga antimalárica. Se llevaron a cabo diluciones de ADN de la cepa IT4 con una parasitemia de 5% y se hicieron diluciones 1/10, 1/100, 1/1000, y 1/10000. Estas diluciones se llevaron a cabo con el fin de tener 5 puntos en la curva estándar para la qPCR para así poder determinar la carga parasitaria de cada espécimen a distintos días (**Figura 21**). Con el porcentaje de parasitemia del cultivo de IT4 se calculó la cantidad de parásitos por microlitro (parásitos/ μ L) de muestra. La mezcla maestra se preparó con: 10 μ L de TaqMan Universal PCR Master Mix (REF: 4304437), 2 μ L de Sonda (1.5 μ M), 1.2 μ L de cebador 18S Reverse H (5 μ M), 1.2 μ L de cebador 18S Forward (5 μ M) y 0.6 μ L de agua ultrapura, por último, se añadió 5 μ L de ADN correspondiente al día de parasitemia en duplicados y las diluciones de ADN de la cepa IT4 en triplicado cada una. Este proceso se realizó en placas de 96 pocillos y fue procesada en el termociclador de tiempo real Applied Biosystems Quant Studio 6, y los datos fueron procesados utilizando el programa QuantStudio Software V1.5.

13. Perfil de transcripción de genes/Análisis transcripcional por PCR a tiempo real

Luego de llevar a cabo la extracción de ARN total y síntesis de ADNc, se procedió a realizar el perfil de transcripción de genes por PCR en tiempo real. Se utilizó ADNc para el análisis de genes transcritos utilizando cebadores específicos para los genes *var* de las cepas IT4/PfFVO (Janes et al, 2011). Además, se utilizaron cebadores de genes constitutivos como los que codifican para las enzimas SERYL (mencionada anteriormente), Gliceraldehído-3-fosfato

deshidrogenasa (GAPDH), Fructosa deshidrogenasa (FRUC) y el gen que codifica para la proteína actina (ACTIN). La reacción de PCR se realizó en placas de PCR de 96 pocillos y se procesó una placa por cada día de parasitemia. Para cada reacción se utilizaron 5 μ L de SYBR Green PCR Máster Mix (BioRad), 3 μ L de mezcla de cebadores, 2 μ L de agua ultrapura, y como templado se utilizó 5 μ L de ADNc correspondiente al día que se presentó la parasitemia más alta para cada espécimen. La placa fue procesada en el termociclador de tiempo real Applied Biosystems QuantStudio 6, y los datos fueron procesados utilizando el programa QuantStudio Software V1.5.

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para este estudio nos propusimos analizar el perfil transcripcional de genes *var* en *Plasmodium falciparum* obtenido de monos *Aotus* en un episodio de malaria inducida. Los datos obtenidos demuestran un patrón particular en cuanto a la dinámica de la infección y la abundancia de genes *var* transcritos.

Las líneas de parásitos *P. falciparum*, cepas HB3 e IT4, fueron cultivadas con éxito. Los cultivos para la cepa HB3 alcanzaron parasitemias entre 1%-3% y los cultivos de la cepa IT4 alcanzaron parasitemias entre 1%-6%. Los problemas más frecuentes en estos cultivos fueron las contaminaciones debido a una mala manipulación, principalmente cuando el cultivo se mantenía por más de tres (3) semanas.

La detección de parásitos por microscopía óptica ocurrió en distintos momentos en los especímenes analizados. Veamos entonces, con relación al espécimen I, observamos parásitos el día 13 post-inoculación, en los especímenes II y III, se evidenciaron el día 7 y con relación el espécimen IV, se manifestaron el día 10. En consecuencia, la parasitemia observada el día 22 de tratamiento fue de 8% para el espécimen I; y del 8% en el día 11 para el espécimen II; y un 2% en el día 11, para el espécimen III y finalmente un 13%, para el espécimen IV el día 16. (**Figura 5D, 7D, 9D y 11D**).

Al evaluar la carga parasitaria de cada espécimen por qPCR observamos que la carga de ADN de parásitos se comenzó a registrar en el espécimen I al día 11, para el espécimen II y III el día 5, y para el espécimen IV el día 6 (**Figura 5E, 7E, 9E y 11E**). Con estos resultados se puede evidenciar que el método de diagnóstico por qPCR es más sensible que el método por microscopía óptica. Además, los estadios de anillos son más difíciles de observar en comparación con los estadios en trofozoítos y esquizontes, debido a que los anillos son más pequeños y en ocasiones no se tiñen completamente.

Se determinó por qPCR el día en que la parasitemia fue más alta. El espécimen I al día 20 presento una parasitemia de 30 873 parásitos/ μ L, se tomó este día, ya que al día 21 y 22 la muestra del espécimen fue tomada de sangre periférica y no de la punción de la oreja como normalmente la tomamos. En el espécimen II al día 11 presentó una parasitemia de 7 813

parásitos/ μL , el espécimen III al día 11 una parasitemia de 1 076 parásitos/ μL , y el espécimen IV al día 15 una parasitemia de 2 549 parásitos/ μL y al día 16 una parasitemia de 82 parásitos/ μL (**Figura 5E, 7E, 9E y 11E**), sin embargo, este último dato no se puede considerar real; posiblemente, porque la muestra tomada el día 16 se encontraba a un porcentaje bajo de eritrocitos por debajo de 20% (17.67%). Por lo tanto, dedujimos que, al haber una menor cantidad de eritrocitos en sangre, la cantidad de parásitos puede ser menor. Todos los especímenes presentaron una parasitemia aproximadamente arriba de los 1 000 parásitos el día en que fueron tratados y días previos a que fuesen tratados con mefloquina, esto se observa en las figuras que muestran las parasitemias por qPCR y en los gráficos por microscopía óptica con una parasitemia entre 2% a 13% (**Figuras 5, 7, 9 y 11**). Dedujimos que la diferencia de días en la detección de parásitos se debe en cierta medida a la cantidad y viabilidad de parásito inoculado inicialmente. Ya que el inóculo en el espécimen I y IV fue de parásitos congelados desde 2011 y, en consecuencia, pudo haberse perdido una cantidad considerable en el proceso de descongelación. Los inóculos de parásitos para los especímenes II y III fueron colectados de eritrocitos infectados del espécimen I, el cual se mantuvo en congelación por aproximadamente 6 meses garantizando la viabilidad de los parásitos.

Los gráficos de análisis sanguíneos muestran que el nivel de hemoglobina, glóbulos rojos, y hematocrito es más bajo a medida que aumenta la parasitemia (**Figura 5, 7, 9 y 11**). Para el día en que la parasitemia fue más alta para cada espécimen, se representan los siguientes datos: para el espécimen I, hematocrito 39.33 %; para el espécimen II, hematocrito 30.01%; para el espécimen III, 39.86 %; para el espécimen IV, hematocrito 17.67%. Este mismo patrón de disminución se observa en los datos clínicos de hemoglobina y glóbulos rojos (**Cuadro 2**). Al analizar estos datos se evidencia la anemia causada por la cepa *PfFVO*. La anemia es considerada una de las complicaciones causadas por *P. falciparum*, esta anemia palúdica puede deberse a la adherencia de los eritrocitos infectados al endotelio vascular y a otros eritrocitos, y la deformabilidad reducida de los eritrocitos, esta deformabilidad reducida se debe a la proteólisis de hemoglobina a hemo, que se almacena en la vacuola digestiva del parásito como hemozoína, hemo induce la reticulación del citoesqueleto y la peroxidación de lípidos (White, 2018).

El análisis de las variables hematológicas (hematocritos, hemoglobina, eritrocitos y plaquetas) y química sanguínea (potasio y albumina) nos indican que hubo una reducción significativa en los 4 especímenes analizados; sin embargo, hubo aumento en los niveles de bilirrubina demostrando disfunción hepática. (**Figura 13** y **Figura 14**). Este daño hepático es ocasionado por la acumulación de bilirrubina conjugada y es causado por citoadherencia y obstrucción vascular de *P. falciparum*. Estos mecanismos causan daño microvascular y obstrucción del flujo capilar. Los eritrocitos parasitados también pueden formar rosetas que bloquean la microcirculación (Cortina & Tobón, 2010).

En un estudio previo se ha observado una reducción en el hematocrito de animales *A. l. lemurinus*, causada por el inóculo de la cepa *PfFVO*. La mayoría de los individuos presentó un hematocrito por debajo del 40% a los días post-inoculación de la cepa *PfFVO*. Luego del tratamiento se observó que el hematocrito puede seguir disminuyendo (Jones et al., 2002) pero luego inicia un periodo de recuperación.

Para el análisis del perfil transcripcional de los genes *var*, se logró la extracción de ARN y síntesis de ADNc de las muestras de parásitos preservadas en TRIzol. El ADN fue tratado con ADNasa para eliminar las trazas de ADN genómico y se comprobó por medio de PCR convencional y qPCR utilizando cebadores para serina-tRNA sintetasa y tubulina, también se comprobó la formación de ADNc mediante este mismo método.

Los niveles de transcripción de los genes *var* se determinaron por PCR en tiempo real utilizando cebadores específicos para el repertorio de genes *var* y el nivel de expresión se determinó en relación con el gen constitutivo serina-tRNA sintetasa. Todos los especímenes presentaron en común una sobreexpresión del gen *var32* y el pseudogén *var35*. Además, el espécimen I presentó una expresión moderada de los genes *var34*, *var45*. Los especímenes II y III mostraron una sobreexpresión del *var4/5'* y los pseudogenes *var35* y *var40*, adicional a esto, se observó una expresión moderada en el espécimen II del pseudogén *var31*. Para el espécimen IV se observó una sobreexpresión de los genes *var4/5'*, *var4/3'*, *var32* y el pseudogén *var40*, también presentó una expresión moderada de los genes *var7*, *var11*, *var12*, *var16*, *var18*, *var19*, *var27*,

var39, *var46*, *var47* y *var54*. Cabe destacar que los mencionados genes *var4/5'* y *var4/3'* corresponden al gen *var04*.

Para la búsqueda de los dominios extracelulares para los cuales codifica cada repertorio de genes *var* expresado, utilizamos el servidor VarDom-1.0. Este es un servidor de la Universidad Técnica de Dinamarca, que está dedicado al análisis de composición y clasificación de las proteínas *PfEMP1*, argumentado por la publicación *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 diversity in seven genomes-divide and conquer (Rask et al., 2010).

Como principal hallazgo de este estudio se encuentra el hecho de que todos los parásitos utilizados en el modelo *P. falciparum/Aotus* transcribieron predominantemente el gen *var32*. Este gen presenta entre su estructura proteica el dominio adhesivo DBLd1 y el dominio CIDRb1, de la porción extracelular de las proteínas *PfEMP1*. Cabe destacar que otros genes expresados de manera moderada en este estudio, también presentan en su estructura proteica estos dominios.

Las proteínas *PfEMP1* son parte clave de la patogenicidad de *P. falciparum*, además le permiten al parásito la evasión del sistema inmune del hospedero. Debido a que los genes *var*, que codifican para estas proteínas, presentan variación antigénica, esta singularidad le permite a *P. falciparum* evadir respuesta mediada por los anticuerpos y unirse a diferentes receptores del hospedero (Kraemer & Smith, 2006). Las regiones de unión extracelular de *PfEMP1* están formadas por dominios DBL (*Duffy-binding-like*) intercalados con regiones de dominios CIDRs (*Cysteine-rich interdomain regions*)(Rask et al., 2010).

En el perfil de transcripción se expresaron cuatro genes *var* pertenecientes al grupo A y C, y en su mayoría se observó más genes expresados del grupo B (**Cuadro 4**). Se ha descrito que los genes *var* pertenecientes al grupo A y hasta cierto grado del grupo B pueden estar asociadas con la enfermedad de malaria grave (Cham et al., 2009). Además, se ha determinado que varios dominios de la clase CIDRa median la unión al receptor CD36 humano (Baruch et al., 1997). Esta unión está limitada al grupo B y C de proteínas *PfEMP1* (Robinson, Welch, & Smith, 2003). Se ha demostrado que los dominios CIDRa se unen a la inmunoglobulina M y PECAM-1 (*Platelet-endothelial cell adhesion molecule*) (Chen et al., 2000). Todos los genes expresados

codifican para dominios CIDRa, a excepción del *var04*. Sin embargo, solo los dominios CIDRa2-6 se unen al receptor CD36, permitiendo la adhesión a células endoteliales (Cabrera et al., 2019). Por lo tanto, la expresión de estos genes puede correlacionarse con la citoadherencia a CD36.

Todos los especímenes codifican para dominios DBLa, este dominio se ha asociado con la unión a sulfato de heparina, antígeno del grupo sanguíneo A y receptor del complemento 1 (CR1) (Chen et al., 2000). La unión de CR1 se asocia con la adhesión de eritrocitos infectados a eritrocitos no infectados, un fenómeno conocido como formación de rosetas, que parece estar mediado hasta cierto punto por el grupo A *PfEMP1* (Vigan-Womas et al., 2008). Como se mencionó anteriormente, todos los genes *var* expresados para cada espécimen, a excepción del *var04*, codifican para el dominio específico DBLd. Este dominio se asocia con la molécula de adhesión PECAM-1. El dominio más observado de los genes *var* expresados en este estudio fue el dominio DBLd1. Este dominio es el más común, presente en el 51.5% de las *PfEMP1* incluidas en la base de datos de estas proteínas. Incluso se observó en un estudio que niños con niveles de anticuerpos elevados hacia los péptidos DBLg11 y DBLd1 tienden a tener densidades de parásitos más bajas en infecciones posteriores. Además, las densidades más bajas de parásitos en niños con anticuerpos específicos del péptido DBLg11 y DBLd1 podrían explicarse por los anticuerpos *PfEMP1* que inhiben la adhesión del parásito al endotelio vascular, lo que da como resultado un aclaramiento del bazo (Araj et al., 2021).

Se ha demostrado en estudios previos que eritrocitos infectados por *P. falciparum* pueden unirse a la integrina $\alpha V\beta 3$ (Siano et al., 1998). En un estudio, por medio de construcciones de *PfEMP1* inmovilizadas con perlas, se ha identificado que el dominio DBLd1_D4 de la proteína PFL2665c *PfEMP1*, se une a $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 6$. Además, en otro estudio se demostró que este dominio puede contribuir a la citoadhesión de eritrocitos infectados a células endoteliales e inmunes y afectar el estado fisiológico de estas células, que, a su vez, pueden desempeñar un papel en la patología de la malaria (Chesnokov et al., 2018).

En otro estudio se demostró que la serina proteasa trombina, que es fundamental en la activación de la cascada de coagulación, escinde la adhesina del parásito en la superficie de eritrocitos

infectados. Los sitios de escisión de trombina se mapearon en el dominio DBLd1, observando una correlación inversa entre la presencia de trombina y eritrocitos infectados en autopsias de malaria cerebral de niños. La escisión en DBLd1, que está próxima a la mayoría de los dominios *PfEMP1*, explicó la inhibición casi completa de la adhesión en células endoteliales microvasculares humanas dérmicas y de pulmón (Gillrie et al., 2016).

Este estudio nos permitió correlacionar las manifestaciones de la malaria grave (como la citoadhesión) con la abundancia de transcripciones del gen *var32*. Estos resultados proporcionan la primera evidencia en el modelo animal de parásitos *P. falciparum* en monos *Aotus*, para apoyar la hipótesis planteada anteriormente de que la expresión de ciertos genes *var* asociados a citoadhesión podría influir en las manifestaciones de la malaria grave, como la anemia. En general, todavía se necesita un mejor conocimiento de la interacción de estas proteínas involucradas en la patogénesis de la malaria. Sin embargo, esta información brinda un aporte molecular para esclarecer la dinámica de expresión de los genes *var* asociados con anemia por malaria en este modelo de infección.

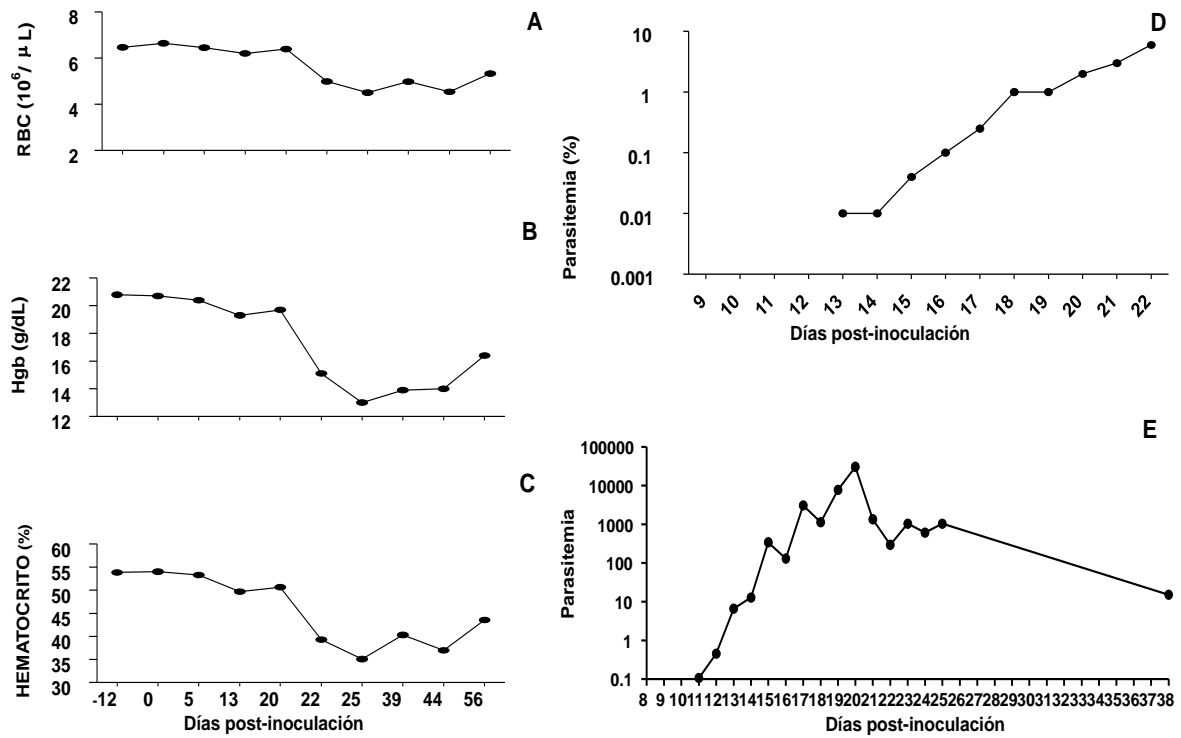


Figura 5. Monitoreo de análisis sanguíneos y carga parasitaria para el espécimen I. **A:** Glóbulos rojos (10⁶ células/μL), **B:** Valores de Hemoglobina (g/dL), **C:** Porcentaje de Hematocrito, **D:** Porcentaje de parasitemia por Microscopía Óptica, **E:** Porcentaje de parasitemia por cuantificación en qPCR.

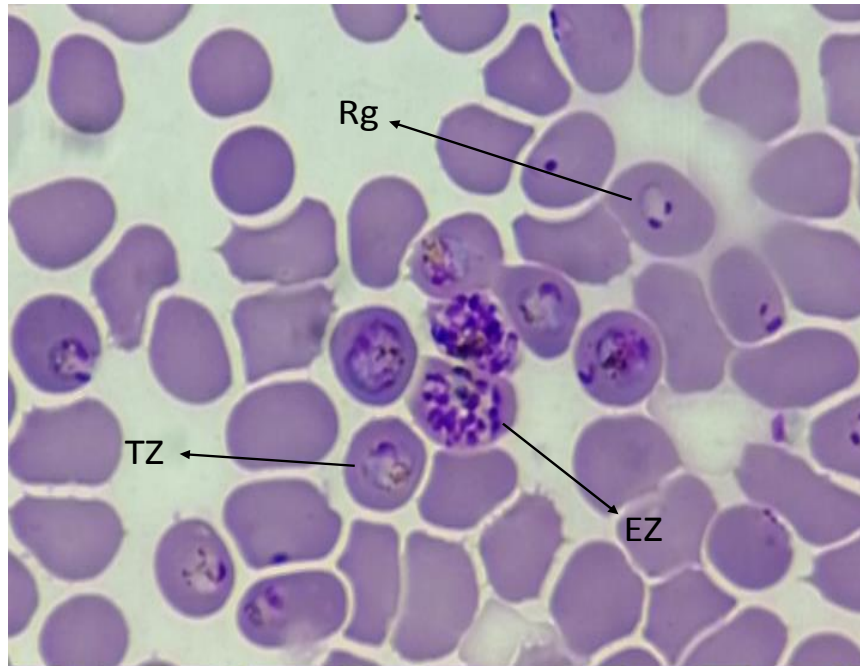


Figura 6. Frotis de sangre tomada por punción de la oreja en el Especimen I al día 22 post-inoculación. Se pueden observar los diferentes estadios del parásito. **Rg:** estadios de anillos **TZ:** estadios de trofozoítos. **EZ:** estadios de esquizontes. Observado a 100X.

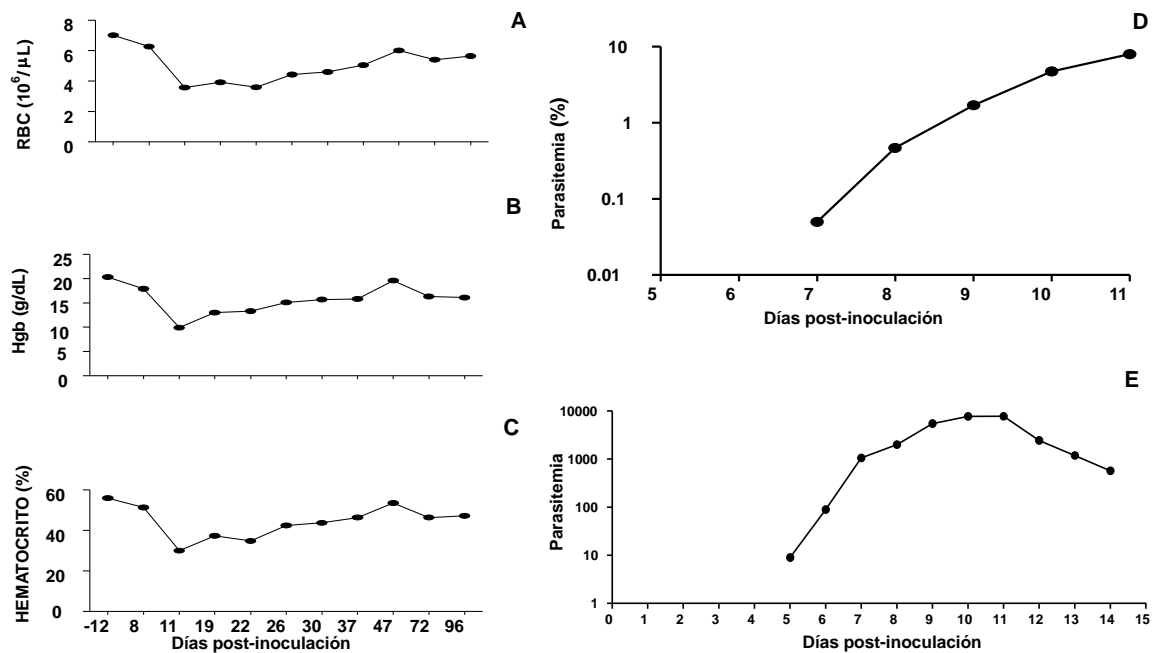


Figura 7. Monitoreo de análisis sanguíneos y carga parasitaria para el espécimen II. **A:** Glóbulos rojos (10^6 células/ μL), **B:** Valores de Hemoglobina (g/dL), **C:** Porcentaje de Hematocrito, **D:** Porcentaje de parasitemia por Microscopia Óptica, **E:** Porcentaje de parasitemia por cuantificación en qPCR.

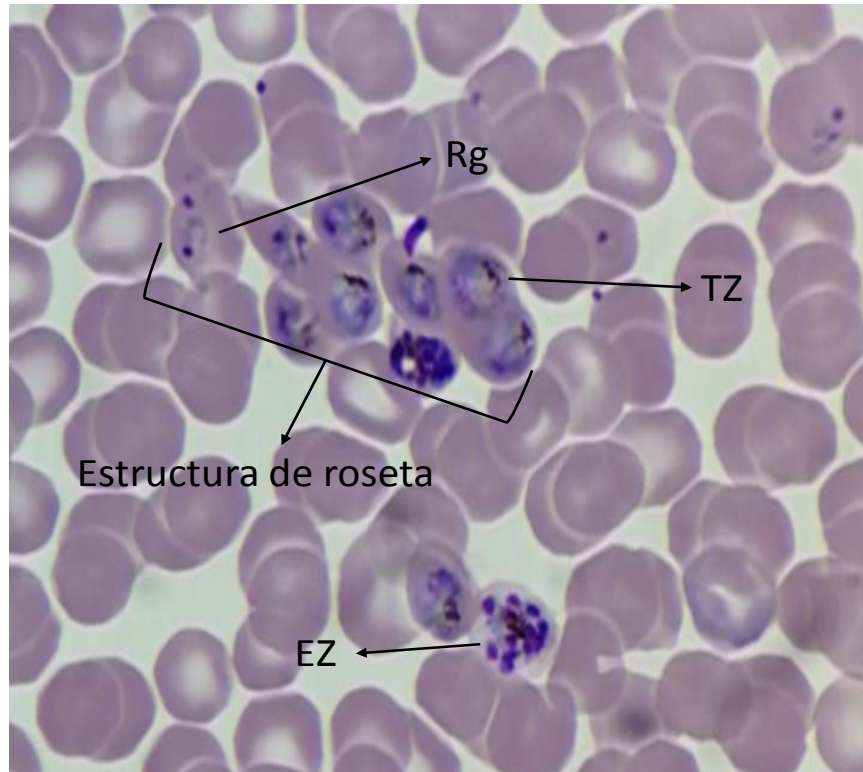


Figura 8. Frotis de sangre tomada por punción de la oreja en el Espécimen II al día 11 post-inoculación. Se pueden observar los diferentes estadios del parásito: **Rg**: estadios de anillos, **TZ**: estadios de trofozoítos, **EZ**: estadios de esquizontes. Se observa la estructura de roseta entre eritrocitos infectados (rosetting). Observado a 100X.

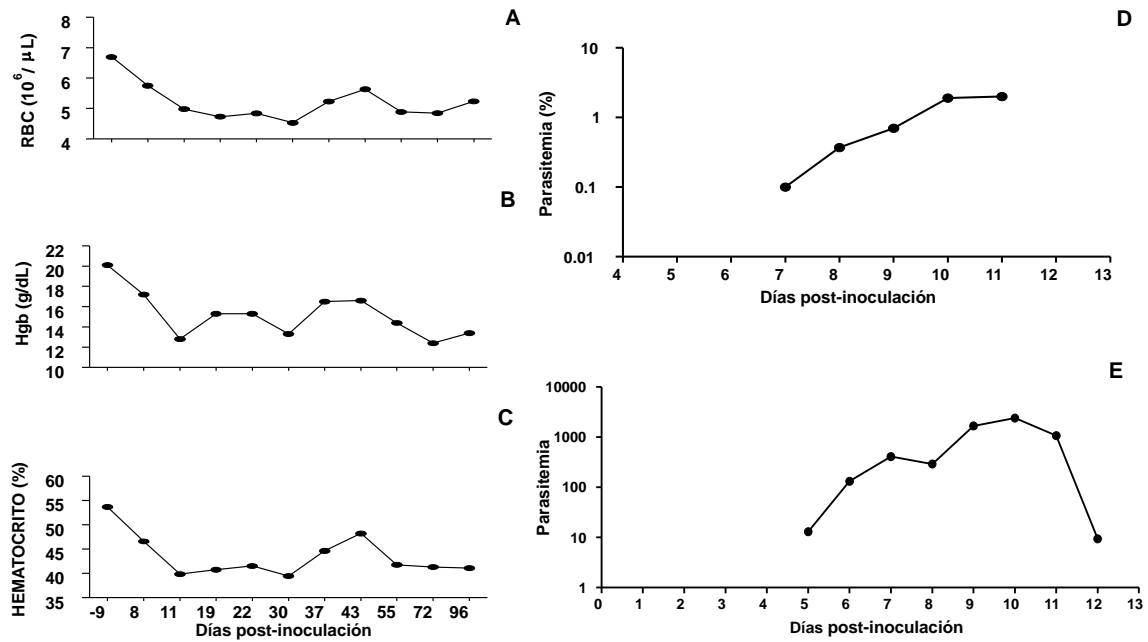


Figura 9. Monitoreo de análisis sanguíneos y carga parasitaria para el espécimen III. **A:** Glóbulos rojos (10^6 células/ μL), **B:** Valores de Hemoglobina (g/dL), **C:** Porcentaje de Hematocrito, **D:** Porcentaje de parasitemia por Microscopía Óptica, **E:** Porcentaje de parasitemia por cuantificación *en* qPCR.

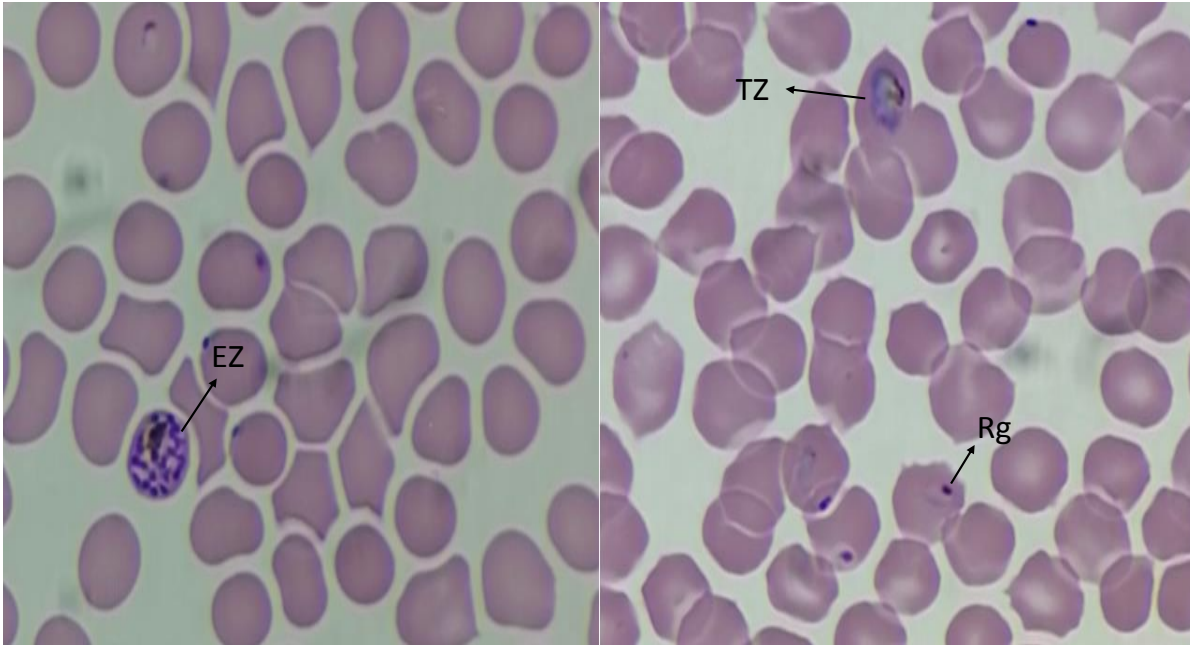


Figura 10. Frotis de sangre tomada por punción de la oreja en el Espécimen III al día 11 post-inoculación. Se pueden observar los diferentes estadios del parásito, **Rg**: estadios de anillos, **TZ**: estadios de trofozoítos, **EZ**: estadios de esquizontes. Observado a 100X.

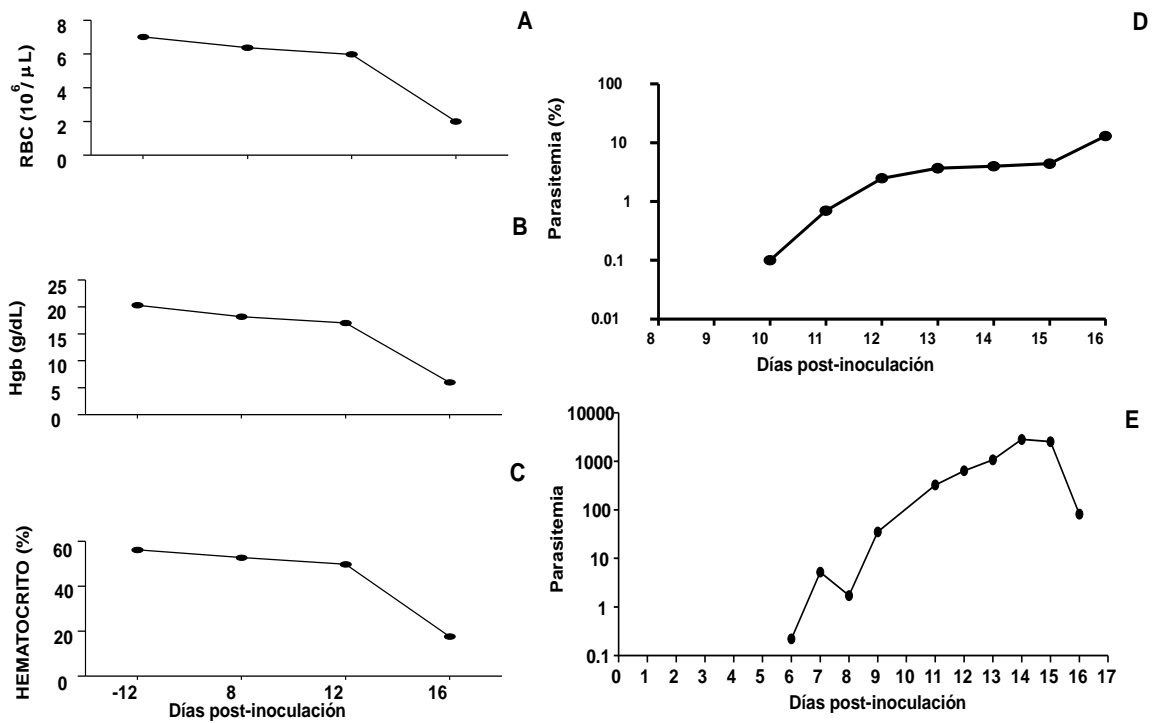


Figura 11. Monitoreo de análisis sanguíneos y carga parasitaria para el espécimen IV. **A:** Glóbulos rojos (10^6 células/ μL), **B:** Valores de Hemoglobina (g/dL), **C:** Porcentaje de Hematocrito, **D:** Porcentaje de parasitemia por Microscopia Óptica, **E:** Porcentaje de parasitemia por cuantificación en qPCR.

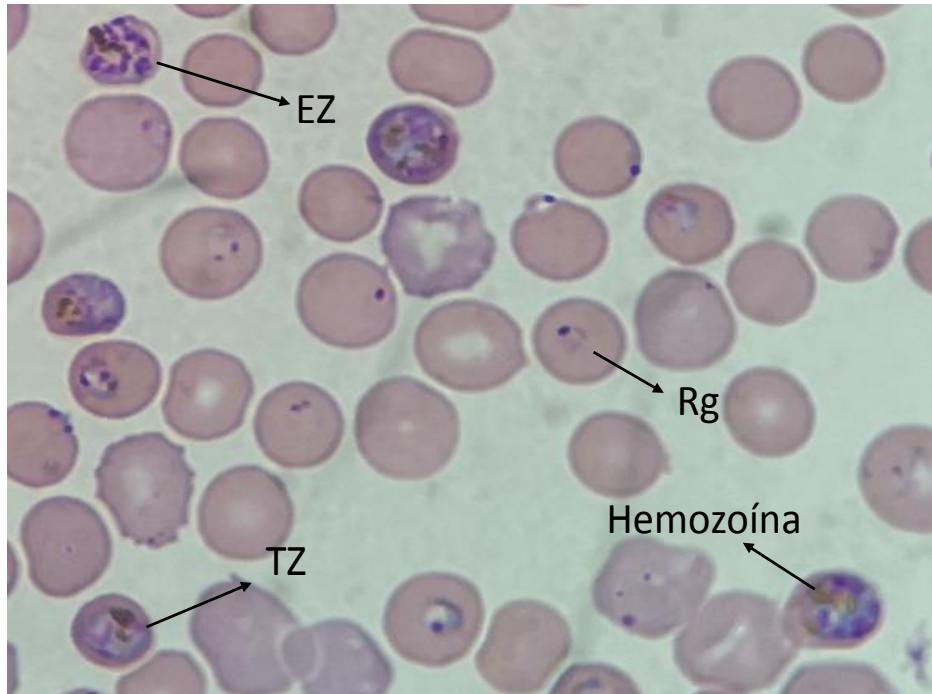


Figura 12. Frotis de sangre tomada por punción de la oreja en el espécimen IV al día 16 post-inoculación. Se pueden observar los diferentes estadios del parásito: **Rg**: estadios de anillos, **TZ**: estadios de trofozoítos, **EZ**: estadios de esquizontes. Se observa Hemozoína (color chocolate). Observado a 100X.

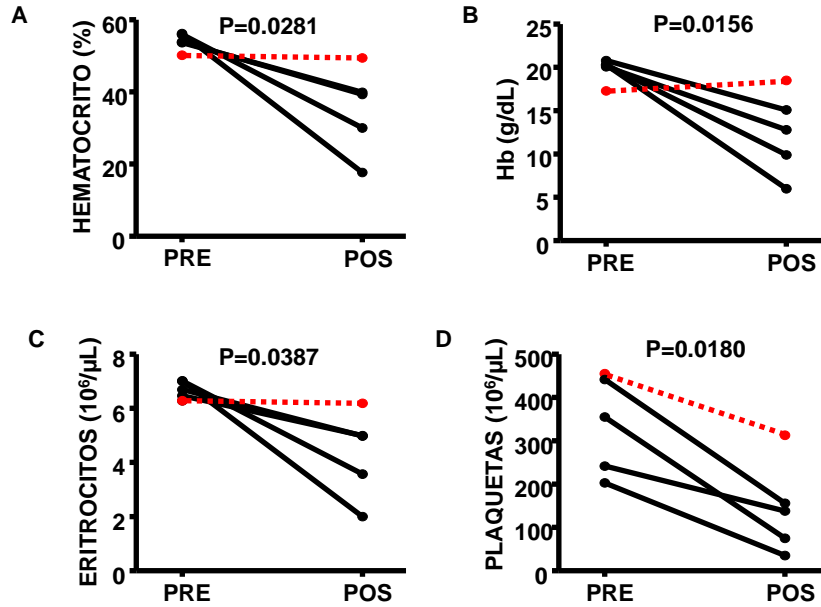


Figura 133. Análisis hematológico. Se muestran los valores pre-inoculación (PRE) y post-inoculación (POS) de **A:** porcentaje de hematocrito, **B:** valores de Hemoglobina, **C:** conteo de eritrocito, **D:** niveles de plaquetas. En rojo se muestran los valores del espécimen control. Se aplicó una prueba t-pareada, (n=4), y solo se muestran los gráficos de las comparaciones con diferencias significativas, ($p < 0.05$).

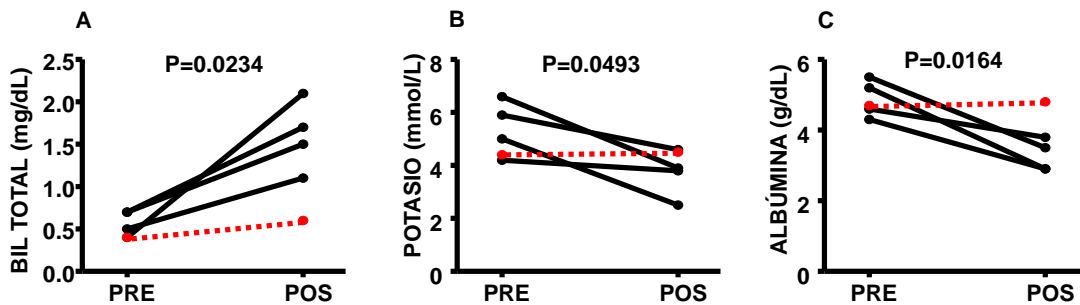


Figura 14. Análisis de componentes químicos en sangre. Se muestran los valores pre-inoculación (PRE) y post-inoculación (POS) de **A:** valores de bilirrubina total, **B:** niveles de potasio, **C:** valores de albumina. En rojo se muestran los valores del espécimen control. Se aplicó una prueba t-pareada, (n=4), y solo se muestran los gráficos de las comparaciones con diferencias significativas, ($p < 0.05$).

Cuadro 2. Análisis sanguíneos tomados el día en que los especímenes mostraron alta parasitemia.

Análisis Sanguíneo			Especímen				
Tipo	Especificación	Unidades	I	II	III	IV	Control
Hematología	Glóbulos blancos	10 ³ /μL	27.01	29.97	13.20	17.40	17.02
	Linfocitos	10 ³ /μL	1.21	4.92	0.45	10.07	4.05
	Monocitos	10 ³ /μL	14.32	18.74	7.77	3.12	5.98
	Neutrófilos	10 ³ /μL	11.48	6.31	4.98	4.21	7.00
	Linfocitos	%	4.50	16.40	3.40	57.80	23.80
	Monocitos	%	53.00	62.50	58.90	17.90	35.10
	Neutrófilos	%	42.50	21.10	37.70	24.20	41.10
	Glóbulos rojos	10 ⁶ /μL	4.99	3.58	4.98	2.00	6.19
	Hemoglobina	gm/dL	15.10	9.90	12.80	6.00	18.50
	Hematocrito	%	39.33	30.01	39.86	17.67	49.40
	Volumen corpuscular medio	fL	79.00	84.00	80.00	88.00	80.00
	Hemoglobina corpuscular media	pg	30.30	27.80	25.70	29.70	29.80
	Concentración de Hb corpuscular media	gm/dL	38.50	33.10	32.10	33.70	37.40
	Plaquetas	10 ⁶ /μL	156.00	138.00	75.00	35.00	313.00
Química Sanguínea	Albúmina	g/dL	2.90	3.50	3.80	2.90	4.80
	Fosfatasa alcalina	U/L	689.00	173.00	107.00	341.00	152.00
	Alanina aminotransferasa	U/L	98.00	133.00	136.00	434.00	58.00
	Amilasa	U/L	42.00	7.00	62.00	123.00	55.00
	Bilirrubina Total	mg/dL	2.100	1.10	1.50	1.20	0.60
	Nitrógeno Ureico	mg/dL	66.00	12.00	15.00	14.00	6.00
	Calcio	mg/dL	10.200	10.00	9.30	9.90	9.90
	Fosforo	mg/dL	6.00	9.20	5.00	4.20	5.00
	Creatina	mg/dL	0.20	0.50	0.80	0.30	0.40
	Glucosa	mg/dL	184.00	278.00	153.00	205.00	160.00
	Sodio	mmol/L	127.00	148.00	144.00	145.00	150.00
	Potasio	mmol/L	2.50	3.90	3.80	4.00	4.50
	Proteínas Totales	g/dL	7.00	6.70	7.80	8.10	8.00
	Globulinas	g/dL	4.10	3.20	4.00	4.00	3.20

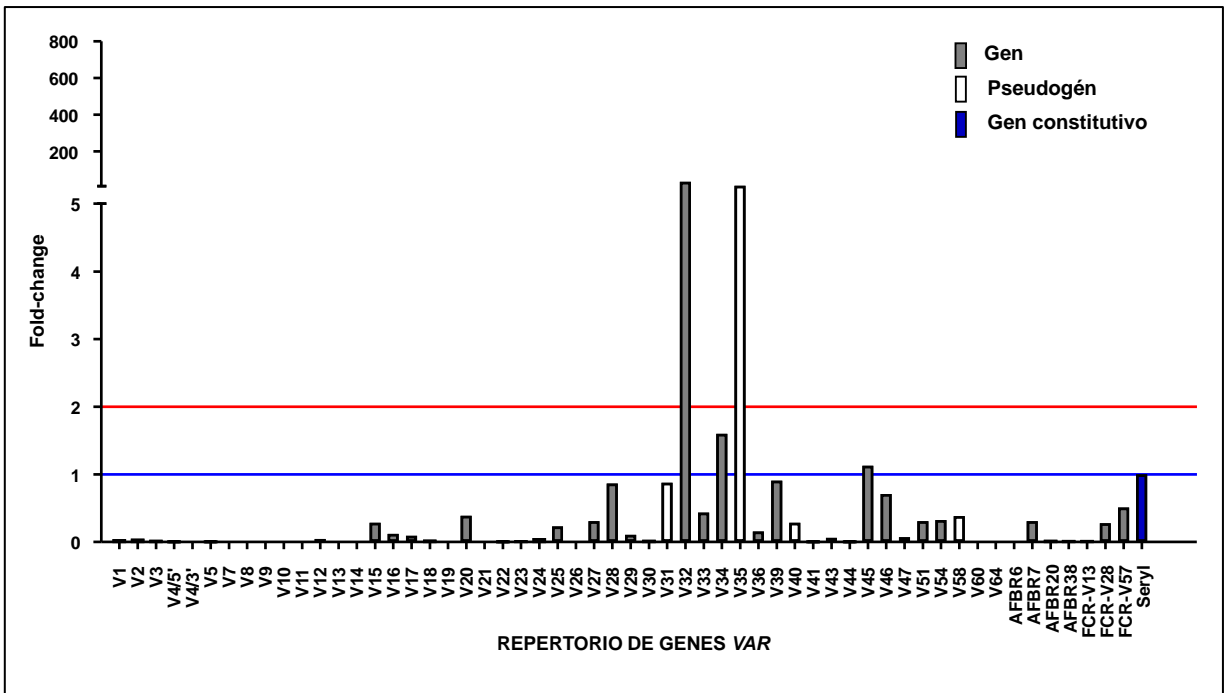


Figura 15. Perfil de transcripción del repertorio de genes *var*, para el Espécimen I al día 22 post-inoculación. Se observa una sobreexpresión del gen *var32*.

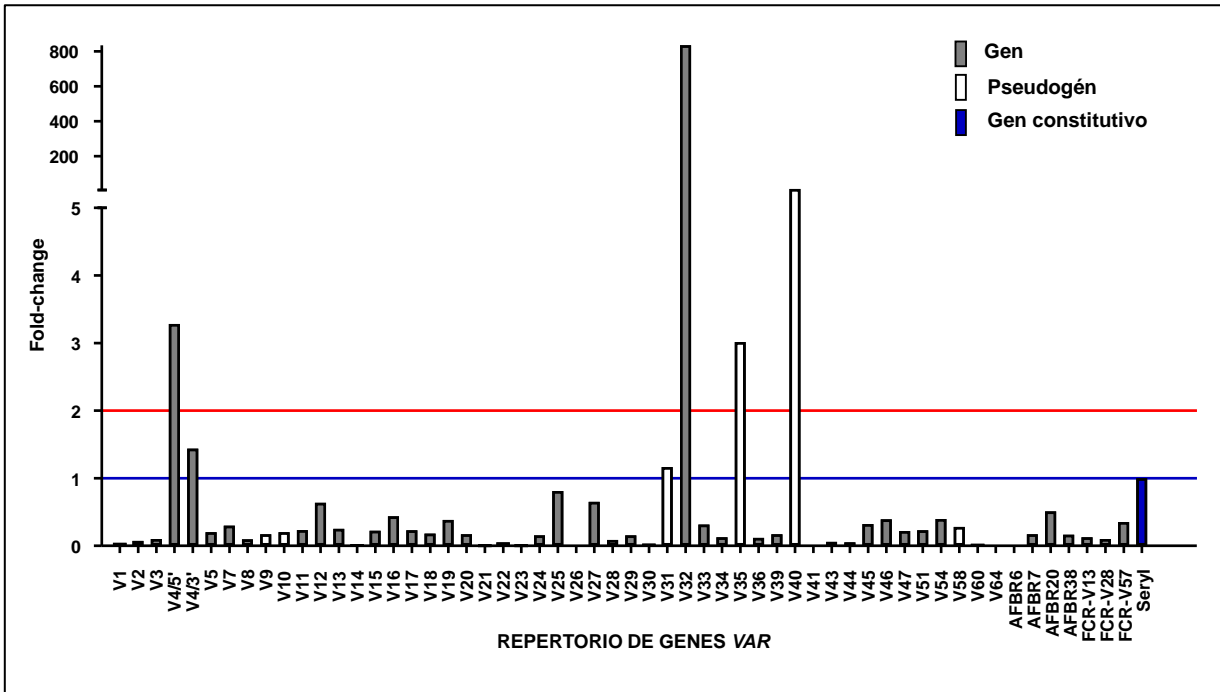


Figura 16. Perfil de transcripción del repertorio de genes *var*, para el Especímen II al día 11 post-inoculación. Se observa una sobreexpresión de los genes *var04* y *var32*.

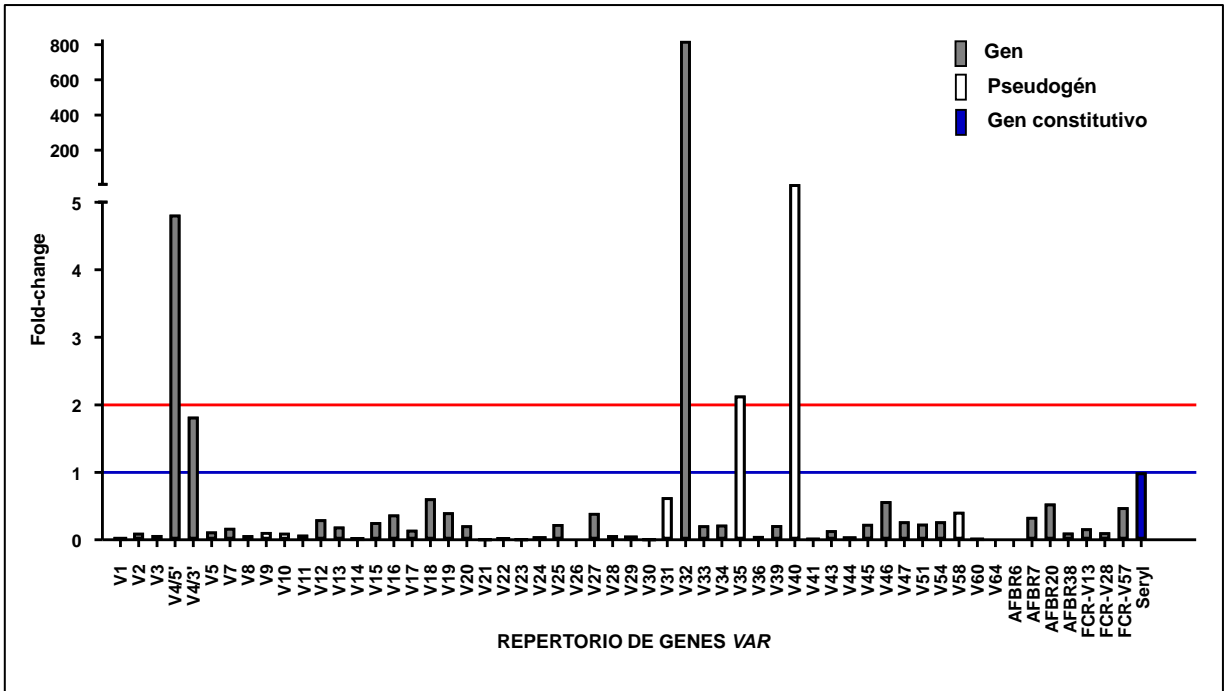


Figura 17. Perfil de transcripción del repertorio de genes *var*, para el Espécimen III al día 11 post-inoculación. Se observa una sobreexpresión de los genes var04 y var32.

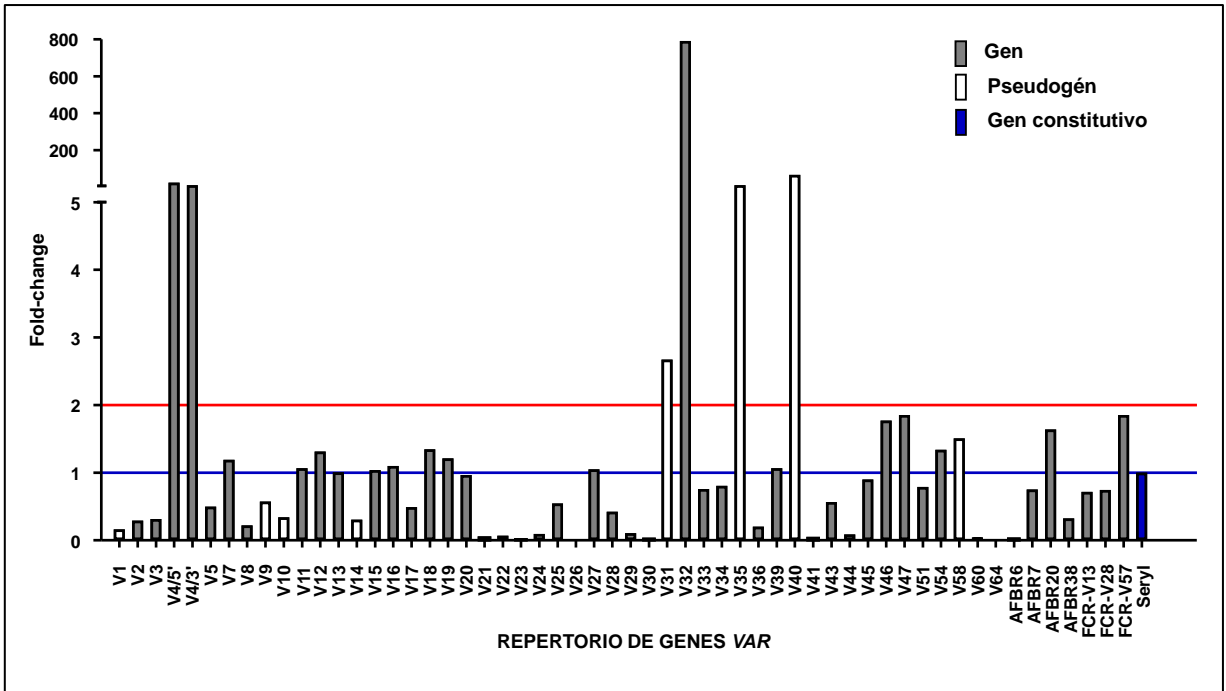


Figura 18. Perfil de transcripción del repertorio de genes *var*, para el Espécimen IV al día 16 post-inoculación. Se observa una sobreexpresión de los genes *var04* y *var32*.

Cuadro 3. Dominios correspondientes a los genes *var* expresados en cada espécimen.

Perfil	Genes	Grupo	Dominios							Espécimen
Sobreexpresión	<i>Var04</i>	E	DBLpam1	DBLpam2	CIDRpam	DBLpam3	DBLepam4	DBLepam5	DBLepam10	II, III, IV
	<i>Var32</i>	ND	DBLa0.23	CIDRa3.2	DBLg6	DBLd1	CIDRb1			I, II, III, IV
Expresión moderada	<i>Var7</i>	A	DBLa1.7	CIDRa1.4	DBLb1	DBLb3	DBLg10	DBLd1	CIDRb1	IV
	<i>Var11</i>	B	DBLa0.3	CIDRa2.4	DBLb10	DBLd1	CIDRb1			IV
	<i>Var12</i>	ND	DBLa0.18	CIDRa6	DBLb4	DBLd1	CIDRb1			IV
	<i>Var16</i>	B	DBLa0.4	CIDRa5	DBLb5	DBLg16	DBLd1	CIDRb6		IV
	<i>Var18</i>	A	DBLa1.2	CIDRa1.6	DBLb3	DBLg16	DBLg2	DBLd1	CIDRb1	IV
	<i>Var19</i>	B	DBLa2	CIDRa1.1	DBLb12	DBLg6	DBLd1	CIDRb1	DBLg9	IV
	<i>Var 27</i>	B	DBLa0.6	CIDRa3.1	DBLb5	DBLg5	DBLd1	CIDRb1		IV
	<i>Var34</i>	C	DBLa0.1	CIDRa3.1	DBLd1	CIDRb4				I
	<i>Var39</i>	ND	DBLa0.5	CIDRa2.5	DBLd1	CIDRb6				IV
	<i>Var45</i>	B	DBLa0.5	CIDRa2.9	DBLd1	CIDRb1				I
	<i>Var46</i>	B	DBLa0.10	CIDRa2.2	DBLd1	CIDRg4	DBLe2	DBLz3	DBLe3	IV
	<i>Var47</i>	C	DBLa0.1	CIDRa3.3	DBLd1	CIDRb1				IV
<i>Var54</i>	B	DBLa0.1	CIDRa3.1	DBLd1	CIDRb1				IV	

CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

1. Se pudo inducir eficazmente la infección controlada y la obtención de parásitos en monos *Aotus lemurinus lemurinus* comprobando que el modelo *P. falciparum*/*Aotus* puede ser utilizado para estudiar la dinámica del parásito *P. falciparum*, además se pueden evidenciar fenómenos de citoadhesión como lo es la formación de rosetas (**Figura 6, 8**).
2. Los niveles de hemoglobina, glóbulos rojos y porcentaje (%) de hematocrito, disminuyeron significativamente a medida que aumentaba la parasitemia cuantificada por microscopia óptica y cuantificación por qPCR. Lo que nos indica que a medida que aumenta la parasitemia disminuye el nivel de glóbulos rojos en sangre.
3. En el patrón de transcripción de los genes *var* para cada espécimen se concluye una sobreexpresión del gen *var32*, el cual contiene en su estructura el dominio DBLd1, este dominio también está presente en todos los genes *var* que se expresaron de manera moderada en este estudio.
4. El gen *var04* también presentó sobreexpresión en los especímenes II, III y IV. Sin embargo, la expresión de este gen no se puede considerar como un factor de virulencia, Ya que este gen es el responsable de codificar para dominios que son factores de virulencia en la malaria placentaria, y los especímenes utilizados fueron machos.

RECOMENDACIONES

1. Realizar ensayos de adhesión de *P. falciparum* a células que expresen receptores humanos, para obtener el fenotipo que expresa el parásito.
2. Realizar análisis por citometría de flujo con el plasma de los animales, para determinar su respuesta frente a los eritrocitos infectados e identificar los tiempos de seroconversión (aparición de anticuerpos contra una determinada enfermedad infecciosa).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, Y., Olsen, R. W., Bengtsson, A., Dalgaard, N., Zdioruk, M., Satpathi, S., Behera, P. K., Sahu, P. K., Lawler, S. E., Qvortrup, K., Wassmer, S. C., & Jensen, A. T. R. (2021). Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 variants induce cell swelling and disrupt the blood-brain barrier in cerebral malaria. *Journal of Experimental Medicine*, 218(3).
- Ahuja, S., Pettersson, F., Moll, K., Jonsson, C., Wahlgren, M., & Chen, Q. (2006). Induction of cross-reactive immune responses to NTS-DBL-1/x of PfEMP1 and in vivo protection on challenge with Plasmodium falciparum. *Vaccine*, 24, 6140–6154.
- Alonso, P. L., Brown, G., Arevalo-Herrera, M., Binka, F., Chitnis, C., Collins, F., Doumbo, O. K., Greenwood, B., Hall, B. F., Levine, M. M., Mendis, K., Newman, R. D., Plowe, C. V., Rodríguez, M. H., Sinden, R., Slutsker, L., & Tanner, M. (2011). A Research Agenda to Underpin Malaria Eradication. *PLOS Medicine*, 8(1), e1000406.
- Araj, B. N., Swihart, B., Morrison, R., Hurtado, P. G., Teo, A., Mahamar, A., ... Fried, M. (2021). Antibody Levels to Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1-DBLγ11 and DBLδ-1 Predict Reduction in Parasite Density. *MSystems*, 6(3).
- Arrow, K., Panosian, C., & Gelband, H. (2004). Breve historia del paludismo. In *Salvando vidas, ganando tiempo: economía de los medicamentos contra la malaria en una era de resistencia* (pp. 125–135).
- Atalabi, O. M., Orimadegun, A. E., Adekanmi, A. J., & Akinyinka, O. O. (2013). Ultrasonographic renal sizes, cortical thickness, and volume in Nigerian children with acute falciparum malaria. *Malaria Journal*, 12(1), 1–7.
- Baird, J. K. (2000). Resurgent malaria at the millennium: Control strategies in crisis. *Drugs*, 59(4), 719–743.
- Barcons-Simon, A., Cordon-Obras, C., Guizetti, J., Bryant, J. M., & Scherf, A. (2020). CRISPR interference of a clonally variant GC-rich noncoding RNA family leads to general repression of var genes in Plasmodium falciparum. *MBio*, 11(1), 1–11.
- Baruch, D. I., Gamain, B., Barnwell, J. W., Sullivan, J. S., Stowers, A., Gale Galland, G., ... Collins, W. E. (2002). Immunization of Aotus monkeys with a functional domain of the Plasmodium falciparum variant antigen induces protection against a lethal parasite line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(6), 3860.
- Baruch, D. I., Singh, H. B., Pasloske, B. L., & Howard, R. J. (1997). Identification of a Region of PfEMP1 That Mediates Adherence of Plasmodium falciparum Infected Erythrocytes to CD36: Conserved Function With Variant Sequence. *Blood*, 90(9), 3766–3775.
- Birbeck, G. L., Beare, N., Lewallen, S., Glover, S. J., Molyneux, M. E., Kaplan, P. W., & Taylor, T. E. (2010). Identification of malaria retinopathy improves the specificity of the clinical diagnosis of cerebral malaria:

- Findings from a prospective cohort study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(2), 231–234.
- Blythe, J. E., Xue, Y. Y., Kuss, C., Bozdech, Z., Holder, A. A., Marsh, K., Preiser, P. R. (2008). Plasmodium falciparum STEVOR proteins are highly expressed in patient isolates and located in the surface membranes of infected red blood cells and the apical tips of merozoites. *Infection and Immunity*, 76(7).
- Brand, N. R., Opoka, R. O., Hamre, K. E. S., & John, C. C. (2016). Differing causes of lactic acidosis and deep breathing in cerebral malaria and severe malarial anemia may explain differences in acidosis-related mortality. *PLoS ONE*, 11(9).
- Bruce-Chwatt, L.J. (1987). Falciparum nomenclature. *Parasitology Today*, 3(8), 252.
- Butcher, G. A., & Mitchell, G. H. (2018). The role of Plasmodium knowlesi in the history of malaria research. *Parasitology*, 145(1), 6–17.
- Cabrera, A., Neculai, D., Tran, V., Lavstsen, T., Turner, L., & Kain, K. C. (2019). Plasmodium falciparum-CD36 Structure-Function Relationships Defined by Ortholog Scanning Mutagenesis. *The Journal of Infectious Diseases*, 219(6), 945.
- Calzada, J. E., Marquez, R., Rigg, C., Victoria, C., De La Cruz, M., Chaves, L. F., & Cáceres, L. (2015). Characterization of a recent malaria outbreak in the autonomous indigenous region of Guna Yala, Panama. *Malaria Journal*, 14(1), 1–10.
- Cham, G. K. K., Turner, L., Lusingu, J., Vestergaard, L., Mmbando, B. P., Kurtis, J. D., ... Theander, T. G. (2009). Sequential, Ordered Acquisition of Antibodies to Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1 Domains. *The Journal of Immunology*, 183(5), 3356–3363.
- Chan, J.-A., Fowkes, F. J. I., & Beeson, J. G. (2014). Surface antigens of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes as immune targets and malaria vaccine candidates. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(19), 3633.
- Chen, Q., Heddini, A., Barragan, A., Fernandez, V., Pearce, S. F. A., & Wahlgren, M. (2000). The Semiconserved Head Structure of Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1 Mediates Binding to Multiple Independent Host Receptors. *Journal of Experimental Medicine*, 192(1), 1–10.
- Cheng, M. P., & Yansouni, C. P. (2013). Management of Severe Malaria in the Intensive Care Unit. *Critical Care Clinics*, 29(4), 865–885. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2013.06.008>
- Chesnokov, O., Merritt, J., Tcherniuk, S. O., Milman, N., & Oleinikov, A. V. (2018). Plasmodium falciparum infected erythrocytes can bind to host receptors integrins $\alpha V\beta 3$ and $\alpha V\beta 6$ through DBL $\delta 1_D4$ domain of PFL2665c PfEMP1 protein. *Scientific Reports* 2018 8:1, 8(1), 1–7.
- Christophers, R., & Sinton, J. A. (1938). Correct Name of Malignant Tertian Parasite. *Sinton*, 2(4065), 1130–1134.
- Clyde, D. F., Most, H., McCarthy, V. C., & Vanderberg, J. P. (1973). Immunization of man against sporozite-induced falciparum malaria. *The American Journal of the Medical Sciences*, 266(3), 169–177.

- Cortina, A. del M., & Tobón, A. (2010). Ictericia y hepatopatía en el paciente con malaria. *Infectio*, 14(4), 277–285.
- Cox-Singh, J., Davis, T. M. E., Lee, K. S., Shamsul, S. S. G., Matusop, A., Ratnam, S., Rahman, H. A., Conway, D. J., & Singh, B. (2008). Plasmodium knowlesi malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clinical Infectious Diseases*, 46(2), 165–171.
- Dame, J. B., Williams, J. L., McCutchan, T. F., Weber, J. L., Wirtz, R. A., Hockmeyer, W. T., ... Miller, L. H. (1984). Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Science (New York, N.Y.)*, 225(4662), 587–593.
- Dellicour, S., Tatem, A. J., Guerra, C. A., Snow, R. W., & Ter Kuile, F. O. (2010). Quantifying the number of pregnancies at risk of malaria in 2007: A demographic study. *PLoS Medicine*, 7(1).
- Dwight, Z., Palais, R., & Wittwer, C. T. (2011). uMELT: prediction of high-resolution melting curves and dynamic melting profiles of PCR products in a rich web application. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 27(7), 1019–1020.
- Djontu, J. C., Lloyd, Y. M., Megnekou, R., Seumko’O, R. M. N., Salanti, A., Taylor, D. W., & Leke, R. G. F. (2020). Antibodies to full-length and the DBL5 domain of VAR2CSA in pregnant women after long-term implementation of intermittent preventive treatment in Etoudi, Cameroon. *PLoS ONE*, 15(8 August), 1–13.
- Dorovini-Zis, K., Schmidt, K., Huynh, H., Fu, W., Whitten, R. O., Milner, D., Kamiza, S., Molyneux, M., & Taylor, T. E. (2011). The neuropathology of fatal cerebral malaria in Malawian children. *American Journal of Pathology*, 178(5), 2146–2158.
- Dubremetz, J. F., Garcia-Réguet, N., Conseil, V., & Fourmaux, M. N. (1998). Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *International Journal for Parasitology*, 28(7), 1007–1013.
- Dunst, J., Kamena, F., & Matuschewski, K. (2017). Cytokines and chemokines in cerebral malaria pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(JUL).
- Duraisingh, M. T., & Horn, D. (2016). Epigenetic Regulation of Virulence Gene Expression in Parasitic Protozoa. *Cell Host and Microbe*, 19(5), 629–640.
- English, M., Esamai, F., Wasunna, A., Were, F., Ogutu, B., Wamae, A., Snow, R. W., & Peshu, N. (2004). Assessment of inpatient paediatric care in first referral level hospitals in 13 districts in Kenya. *Lancet*, 363(9425), 1948–1953.
- Feldman, M., Taraschi, T. F., & Howard, R. J. (1995). Cloning the *P. falciparum* Gene Encoding PfEMPI, a Malarial Variant Antigen and Adherence Receptor on the Surface of Parasitized Human Erythrocytes. 92.
- Feng, G., Aitken, E., Yosaatmadja, F., Kalilani, L., Meshnick, S. R., Jaworowski, A., Simpson, J. A., & Rogerson, S. J. (2009). Antibodies to variant surface antigens of plasmodium falciparum-infected

- erythrocytes are associated with protection from treatment failure and the development of anemia in pregnancy. *Journal of Infectious Diseases*, 200(2), 299–306.
- Fernandez, V., Hommel, M., Chen, Q., Hagblom, P., & Wahlgren, M. (1999). Small, Clonally Variant Antigens Expressed on the Surface of the Plasmodium falciparum–Infected Erythrocyte Are Encoded by the rif Gene Family and Are the Target of Human Immune Responses. *The Journal of Experimental Medicine*, 190(10), 1393.
- Ferreira, F. C., Alves, L. G. M., Jager, G. B., Franzini, L. D., Mesquita, D. O., Díaz-Delgado, J., Catão-Dias, J. L., & Braga, É. M. (2020). Molecular and pathological investigations of Plasmodium parasites infecting striped forest whiptail lizards (Kentropyx calcarata) in Brazil. *Parasitology Research*, 119(8), 2631–2640.
- Francischetti, I. M. B., Seydel, K. B., Monteiro, R. Q., Whitten, R. O., Erexson, C. R., Noronha, A. L. L., Ostera, G. R., Kamiza, S. B., Molyneux, M. E., Ward, J. M., & Taylor, T. E. (2007). Plasmodium falciparum-infected erythrocytes induce tissue factor expression in endothelial cells and support the assembly of multimolecular coagulation complexes. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5(1), 155–165.
- Gardner, M. J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R. W., Carlton, J. M., Pain, A., Nelson, K. E., Bowman, S., Paulsen, I. T., James, K., Eisen, J. A., Rutherford, K., Salzberg, S. L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M. S., Nene, V., ... Barrell, B. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Nature*, 419(6906), 498–511.
- Gazzinelli, R. T., Kalantari, P., Fitzgerald, K. A., & Golenbock, D. T. (2014). Innate sensing of malaria parasites. *Nature Reviews Immunology*, 14(11), 744–757.
- Gething, P. W., Casey, D. C., Weiss, D. J., Bisanzio, D., Bhatt, S., Cameron, E., Battle, K. E., Dalrymple, U., Rozier, J., Rao, P. C., Kutz, M. J., Barber, R. M., Huynh, C., Shackelford, K. A., Coates, M. M., Nguyen, G., Fraser, M. S., Kulikoff, R., Wang, H., ... Lim, S. S. (2016). Mapping Plasmodium falciparum Mortality in Africa between 1990 and 2015. *New England Journal of Medicine*, 375(25), 2435–2445.
- Global Malaria Programme: WHO Global. (2019). World malaria report 2019. In *WHO Regional Office for Africa*.
- Goswami, D., Betz, W., Locham, N. K., Parthiban, C., Brager, C., Schäfer, C., Camargo, N., Nguyen, T., Kennedy, S. Y., Murphy, S. C., Vaughan, A. M., & Kappe, S. H. I. (2020). A replication-competent late liver stage–attenuated human malaria parasite. *JCI Insight*, 5(13).
- Gillrie, M. R., Renaux, B., Russell-Goldman, E., Avril, M., Brazier, A. J., Mihara, K., Ho, M. (2016). Thrombin cleavage of plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 inhibits cytoadherence. *MBio*, 7(5).

- Guizetti, J., & Scherf, A. (2013). Silence, activate, poise and switch! Mechanisms of antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. *Cellular Microbiology*, *15*(5), 718–726.
- Hanson, J., Lam, S. W. K., Mahanta, K. C., Pattnaik, R., Alam, S., Mohanty, S., Hasan, M. U., Hossain, A., Charunwatthana, P., Chotivanich, K., Maude, R. J., Kingston, H., Day, N. P., Mishra, S., White, N. J., & Dondorp, A. M. (2012). Relative contributions of macrovascular and microvascular dysfunction to disease severity in falciparum malaria. *Journal of Infectious Diseases*, *206*(4), 571–579.
- Hunt, N. H., & Grau, G. E. (2003). Cytokines: Accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends in Immunology*, *24*(9), 491–499.
- Hurtado, L. A., Cáceres, L., Chaves, L. F., & Calzada, J. E. (2014). When Climate Change Couples Social Neglect: Malaria Dynamics in Panamá. *Emerging Microbes and Infections*, *3*(4), 1–11.
- Hurtado, L. A., Calzada, J. E., Rigg, C. A., Castillo, M., & Chaves, L. F. (2018). Climatic fluctuations and malaria transmission dynamics, prior to elimination, in Guna Yala, República de Panamá. *Malaria Journal*, *17*(1), 1–12.
- Hurtado, L., Cumbreira, A., Rigg, C., Perea, M., Santamaría, A. M., Chaves, L. F., Moreno, D., Romero, L., Lasso, J., Cáceres, L., Saldaña, A., & Calzada, J. E. (2020). Long-term transmission patterns and public health policies leading to malaria elimination in Panamá. *Malaria Journal*, *19*(1), 1–16.
- Hviid, L., & Jensen, A. T. R. (2015). *PfEMP1* - a parasite protein family of key importance in plasmodium falciparum malaria immunity and pathogenesis. In *Advances in Parasitology* (Vol. 88). Elsevier Ltd.
- Ishioka, H., Ghose, A., Charunwatthana, P., Maude, R., Plewes, K., Kingston, H., Intharabut, B., Woodrow, C., Chotivanich, K., Sayeed, A. A., Hasan, M. U., Day, N. P., Faiz, A., White, N. J., Hossain, A., & Dondorp, A. M. (2015). Sequestration and red cell deformability as determinants of hyperlactatemia in falciparum malaria. *Journal of Infectious Diseases*, *212*(11), 788–793.
- Jarcho, S. (1984). Laveran's discovery in the retrospect of a century. *Bull Hist Med*, *58*(2), 215–224.
- Jensen, A. R., Adams, Y., & Hviid, L. (2020). Cerebral *Plasmodium falciparum* malaria: The role of *PfEMP1* in its pathogenesis and immunity, and *PfEMP1*-based vaccines to prevent it. *Immunological Reviews*, *293*(1), 230–252.
- Jiang, L., Mu, J., Zhang, Q., Ni, T., Srinivasan, P., Rayavara, K., Yang, W., Turner, L., Lavstsen, T., Theander, T. G., Peng, W., Wei, G., Jing, Q., Wakabayashi, Y., Bansal, A., Luo, Y., Ribeiro, J. M. C., Scherf, A., Aravind, L., ... Miller, L. H. (2013). *PfSETvs* methylation of histone H3K36 represses virulence genes in *Plasmodium falciparum*. *Nature*, *499*(7457), 223–227.
- Jones, T. R., Magill, A. J., Andersen, E. M., Lucas, C., Sim, B. K. L., Obaldia, N., ... Gozalo, A. S. (2002). Anemia in parasite- and recombinant protein-immunized aotus monkeys infected with *Plasmodium falciparum*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *66*(6), 672–679.

- Kaneko, O., Soubes, S. C., & Miller, L. H. (1999). Plasmodium falciparum: Invasion of Aotus Monkey Red Blood Cells and Adaptation to Aotus Monkeys. *Experimental Parasitology*, 93(2), 116–119.
- Khattab, A., & Meri, S. (2011). Exposure of the Plasmodium falciparum clonally variant STEVOR proteins on the merozoite surface. *Malaria Journal*, 10.
- Kengganpanich, M., & Kaewkungwal, J. (2017). Understanding malaria treatment-seeking preferences within the public sector amongst mobile/migrant workers in a malaria elimination scenario: A mixed-methods study. *Malaria Journal*, 16(1), 1–13.
- Kraemer, S. M., & Smith, J. D. (2006). *A family affair: var genes, PfEMP1 binding, and malaria disease. 1*, 374–380.
- Lalremruata, A., Jeyaraj, S., Engleitner, T., Joanny, F., Lang, A., B elard, S., ... Held, J. (2017). Species and genotype diversity of Plasmodium in malaria patients from Gabon analysed by next generation sequencing. *Malaria Journal*, 16(1).
- Laurens, M. B. (2020). RTS, S/AS01 vaccine (MosquirixTM): an overview. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 16(3), 480.
- Laveran, C. (1978). A newly discovered parasite in the blood of patients suffering from malaria. In K. Mott & A. Russell (Eds.), *Parasitic etiology of attacks of malaria*.
- Laverdant, C. (2007). The contemporary scientific context of A. Laveran's discovery. *Elsevier*, 191(7), 1227–1234.
- Le Prince, J. A., & Orenstein, A. J. (1916). *Mosquito control in Panama: the eradication of malaria and yellow fever in Cuba and Panama*. G.P Putnam Sons.
- Liu, W., Li, Y., Learn, G. H., Rudicell, R. S., Robertson, J. D., Keele, B. F., Ndjingo, J. B. N., Sanz, C. M., Morgan, D. B., Locatelli, S., Gonder, M. K., Kranzusch, P. J., Walsh, P. D., Delaporte, E., Mpoudi-Ngole, E., Georgiev, A. V., Muller, M. N., Shaw, G. M., Peeters, M., ... Hahn, B. H. (2010). Origin of the human malaria parasite Plasmodium falciparum in gorillas. *Nature*, 467(7314), 420–425.
- Lopez-Rubio, J. J., Gontijo, A. M., Nunes, M. C., Issar, N., Hernandez Rivas, R., & Scherf, A. (2007). 5' Flanking Region of Var Genes Nucleate Histone Modification Patterns Linked To Phenotypic Inheritance of Virulence Traits in Malaria Parasites. *Molecular Microbiology*, 66(6), 1296–1305.
- Loy, D. E., Liu, W., Li, Y., Learn, G. H., Plenderleith, L. J., Sundararaman, S. A., Sharp, P. M., & Hahn, B. H. (2017). Out of Africa: origins and evolution of the human malaria parasites Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax. *International Journal for Parasitology*, 47(2–3), 87–97.
- Luzolo, A. L., & Ngoyi, D. M. (2019). Cerebral malaria. *Brain Research Bulletin*, 145(December 2018), 53–58.
- Maier, A. G., Matuschewski, K., Zhang, M., & Rug, M. (2019). Plasmodium falciparum. *Trends in Parasitology*, 35(6), 481–482.

- Mandala, W. L., Msefula, C. L., Gondwe, E. N., Drayson, M. T., Molyneux, M. E., & MacLennana, C. A. (2017). *Cytokine Profiles in Malawian Children Presenting with Uncomplicated Malaria*, 24(4), 1–11.
- Milner, D. A. (2017). Malaria pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 8(1).
- Mphande, F. A., Ribacke, U., Kaneko, O., Kironde, F., Winter, G., & Wahlgren, M. (2008). SURFIN4.1, a schizont-merozoite associated protein in the SURFIN family of *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal*, 7, 116.
- Murray, C. J. L., Rosenfeld, L. C., Lim, S. S., Andrews, K. G., Foreman, K. J., Haring, D., Fullman, N., Naghavi, M., Lozano, R., & Lopez, A. D. (2012). Global malaria mortality between 1980 and 2010: A systematic analysis. *The Lancet*, 379(9814), 413–431.
- N'Dilimabaka, N., Taoufiq, Z., Zougbedé, S., Bonnefoy, S., Lorthiois, A., Couraud, P. O., Rebollo, A., Snounou, G., Mazier, D., & Sabater, A. M. (2014). *P. falciparum* isolate-specific distinct patterns of induced apoptosis in pulmonary and brain endothelial cells. *PLoS ONE*, 9(3).
- Nguansangiam, S., Day, N. P. J., Hien, T. T., Mai, N. T. H., Chaisri, U., Riganti, M., Dondorp, A. M., Lee, S. J., Phu, N. H., Turner, G. D. H., White, N. J., Ferguson, D. J. P., & Pongponratn, E. (2007). A quantitative ultrastructural study of renal pathology in fatal *Plasmodium falciparum* malaria. *Tropical Medicine and International Health*, 12(9), 1037–1050.
- Nureye, D., & Assefa, S. (2020). Old and Recent Advances in Life Cycle, Pathogenesis, Diagnosis, Prevention, and Treatment of Malaria including Perspectives in Ethiopia. *Scientific World Journal*, 2020.
- Obaldía, N., 3rd, Dow, G. S., Gerena, L., Kyle, D., Otero, W., Mantel, P. Y., Baro, N., Daniels, R., Mukherjee, A., Childs, L. M., Buckee, C., Duraisingh, M. T., Volkman, S. K., Wirth, D. F., & Marti, M. (2016). Altered drug susceptibility during host adaptation of a *Plasmodium falciparum* strain in a non-human primate model. *Scientific reports*, 6, 21216.
- Ohr, C., DiTusa, C., Kozar, M. P., Pybus, B., Sousa, J., Berman, J., Gettayacamin, M., Im-erbsin, R., & Tungtaeng, A. (2014). Causal prophylactic efficacy of primaquine, tafenoquine, and atovaquone-proguanil against *Plasmodium cynomolgi* in a rhesus monkey model. *The Journal of parasitology*, 100(5), 671–673.
- Oleinikov, A. V., Amos, E., Frye, I. T., Rossnagle, E., Mutabingwa, T. K., Fried, M., & Duffy, P. E. (2009). High Throughput Functional Assays of the Variant Antigen PfEMP1 Reveal a Single Domain in the 3D7 *Plasmodium falciparum* Genome that Binds ICAM1 with High Affinity and Is Targeted by Naturally Acquired Neutralizing Antibodies. *PLOS Pathogens*, 5(4), e1000386.
- 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), 1427–1442.

- Plewes, K., Turner, G. D. H., & Dondorp, A. M. (2018). Pathophysiology, clinical presentation, and treatment of coma and acute kidney injury complicating falciparum malaria. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 31(1), 69–77.
- Polhemus, M. E., Remich, S. A., Ogutu, B. R., Waitumbi, J. N., Otieno, L., Apollo, S., Cummings, J. F., Kester, K. E., Ockenhouse, C. F., Stewart, A., Ofori-Anyinam, O., Ramboer, I., Cahill, C. P., Lievens, M., Dubois, M.-C., Demoitie, M.-A., Leach, A., Cohen, J., Ballou, W. R., ... Jr. (2009). Evaluation of RTS, S/AS02A and RTS,S/AS01B in Adults in a High Malaria Transmission Area. *PLoS ONE*, 4(7).
- Ralph, S. A., Scheidig-Benatar, C., & Scherf, A. (2005). Antigenic variation in Plasmodium falciparum is associated with movement of var loci between subnuclear locations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(15), 5414–5419.
- Rask, T. S., Hansen, D. A., Theander, T. G., Pedersen, A. G., & Lavstsen, T. (2010). Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1 Diversity in Seven Genomes – Divide and Conquer. *PLOS Computational Biology*, 6(9), e1000933.
- Rénia, L., Howland, S. W., Claser, C., Gruner, A. C., Suwanarusk, R., Teo, T. H., Russell, B., & Lisa, N. P. (2012). Cerebral malaria Mysteries at the blood-brain barrier. *Virulence*, 3(2), 193–201.
- Rich, S. M., Leendertz, F. H., Xu, G., LeBreton, M., Djoko, C. F., Aminake, M. N., Takan, E. E., Diffo, J. L., Pike, B. L., Rosenthal, B. M., Formenty, P., Chrispothe, B., & Ayala, N. D. W. (2009). The origin of malignant malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(35), 1–6.
- Robinson, B. A., Welch, T. L., & Smith, J. D. (2003). Widespread functional specialization of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 family members to bind CD36 analysed across a parasite genome. *Molecular Microbiology*, 47(5), 1265–1278.
- RTS, & Partnership, S. C. T. (2015). Efficacy and safety of RTS, S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *Lancet (London, England)*, 386(9988), 31.
- Sanyal, S., Egeé, S., Bouyer, G., Perrot, S., Safeukui, I., Bischoff, E., ... Lavazec, C. (2012). Plasmodium falciparum STEVOR proteins impact erythrocyte mechanical properties. *Blood*, 119(2), e1.
- Salanti, A., Staalsoe, T., Lavstsen, T., Jensen, A. T. R., Sowa, M. P. K., Arnot, D. E., Hviid, L., & Theander, T. G. (2003). Selective upregulation of a single distinctly structured var gene in chondroitin sulphate A-adhering Plasmodium falciparum involved in pregnancy-associated malaria. *Molecular Microbiology*, 49(1), 179–191.
- Santamaría, A. M., Vásquez, V., Rigg, C., Moreno, D., Romero, L., Justo, C., Chaves, L. F., Saldaña, A., & Calzada, J. E. (2020). Plasmodium falciparum Genetic Diversity in Panamá Based on glurp, msp-1 and msp-2 Genes: Implications for Malaria Elimination in Mesoamerica. *Life* 2020, Vol. 10, Page 319, 10(12), 319.

- Schieck, E., Pfahler, J. M., Sanchez, C. P., & Lanzer, M. (2007). Nuclear run-on analysis of var gene expression in *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *153*(2), 207–
- Schiess, N., Villabona-Rueda, A., Cottier, K. E., Huether, K., Chipeta, J., & Stins, M. F. (2020). Pathophysiology and neurologic sequelae of cerebral malaria. In *Malaria Journal* (Vol. 19, Issue 1, p. 266). BioMed Central.
- Seydel, K. B., Kampondeni, S. D., Valim, C., Potchen, M. J., Milner, D. A., Muwalo, F. W., Birbeck, G. L., Bradley, W. G., Fox, L. L., Glover, S. J., Hammond, C. A., Heyderman, R. S., Chilingulo, C. A., Molyneux, M. E., & Taylor, T. E. (2015). Brain swelling and death in children with cerebral malaria. *New England Journal of Medicine*, *372*(12), 1126–1137.
- Siano, J. P., Grady, K. K., Millet, P., & Wick, T. M. (1998). Short report: *Plasmodium falciparum*: Cytoadherence to $\alpha(v)\beta3$ on human microvascular endothelial cells. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *59*(1), 77–79.
- Sitprija, V., Vongsthongsri, M., Poshyachinda, V., & Arthachinta, S. (1977). Renal failure in malaria: A pathophysiologic study. *Nephron*, *18*(5), 277–287.
- Stern, A. (2005). The public Health Service in the Panama Canal: a forgotten chapter of U. S. public health. *Public Health*, *6*, 675–679.
- Sutter, P. S. (2007). Nature's agents or agents of empire? Entomological workers and environmental change during the construction of the Panama Canal. *Isis*, *98*(4), 724–754.
- Taghdiri, A., Nejad Almani, P. G., Sharifi, I., Mohammadi, M. A., & Salari, S. (2019). Detection of malaria with light microscopy and Nested polymerase chain reaction (Nested PCR) methods in peripheral blood expansions and investigation of the genetic diversity of *Plasmodium* species by 18S rRNA gene in Southeast of Iran. *Microbial Pathogenesis*, *137*, 103782.
- Tardieux, I., & Ménard, R. (2008). Migration of Apicomplexa across biological barriers: The *Toxoplasma* and *Plasmodium* rides. *Traffic*, *9*(5), 627–635.
- Taylor, T. E., Fu, W. J., Carr, R. A., Whitten, R. O., Mueller, J. G., Fosiko, N. G., Lewallen, S., Liomba, N. G., & Molyneux, M. E. (2004). Differentiating the pathologies of cerebral malaria by postmortem parasite counts. *Nature Medicine*, *10*(2), 143–145.
- Thurber, M. I., Ghai, R. R., Hyeroba, D., Weny, G., Tumukunde, A., Chapman, C. A., Wiseman, R. W., Dinis, J., Steil, J., Greiner, E. C., Friedrich, T. C., O'Connor, D. H., & Goldberg, T. L. (2013). Co-infection and cross-species transmission of divergent *Hepaticystis* lineages in a wild African primate community. *International Journal for Parasitology*, *43*(8), 613–619.
- Tibúrcio, M., Yang, A. S. P., Yahata, K., Suárez-Cortés, P., Belda, H., Baumgarten, S., Van De Vegte-Bolmer, M., Gemert, G. J. Van, Waardenburg, Y. Van, Levashina, E. A., Sauerwein, R. W., & Treeck, M. (2019).

- A novel tool for the generation of conditional knockouts to study gene function across the plasmodium falciparum life cycle. *MBio*, 10(5), 1–12.
- Turner, L., Wang, C. W., Lavstsen, T., Mwakalinga, S. B., Sauerwein, R. W., Hermesen, C. C., & Theander, T. G. (2011). Antibodies against PfEMP1, RIFIN, MSP3 and GLURP Are Acquired during Controlled Plasmodium falciparum Malaria Infections in Naïve Volunteers. *PLoS ONE*, 6(12), 29025.
- Valkiūnas, G. (2005). *Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia* (1st edn). CRC Press.
- Viebig, N. K., Wulbrand, U., Förster, R., Andrews, K. T., Lanzer, M., & Knolle, P. A. (2005). Direct activation of human endothelial cells by Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Infection and Immunity*, 73(6), 3271–3277.
- Vigan-Womas, I., Guillotte, M., Le Scanf, C., Igonet, S., Petres, S., Juillerat, A., ... Mercereau-Puijalon, O. (2008). An in vivo and in vitro model of Plasmodium falciparum rosetting and autoagglutination mediated by varO, a group A var gene encoding a frequent serotype. *Infection and Immunity*, 76(12), 5565–5580.
- Wassmer, S. C., Moxon, C. A., Taylor, T., Grau, G. E., Molyneux, M. E., & Craig, A. G. (2011). Vascular endothelial cells cultured from patients with cerebral or uncomplicated malaria exhibit differential reactivity to TNF. *Cellular Microbiology*, 13(2), 198–209.
- Wassmer, S. C., Taylor, T. E., Rathod, P. K., Mishra, S. K., Mohanty, S., Arevalo-Herrera, M., Duraisingh, M. T., & Smith, J. D. (2015). Investigating the pathogenesis of severe malaria: A multidisciplinary and cross-geographical approach. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(Suppl 3), 42–56.
- White, N. J. (2018). Anaemia and malaria 11 Medical and Health Sciences 1108 Medical Microbiology 11 Medical and Health Sciences 1103 Clinical Sciences. *Malaria Journal* (Vol. 17, Issue 1, p. 371). BioMed Central Ltd.
- WHO. (2010). *World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria.*
- WHO. (2012). *Management of severe malaria: a practical handbook.*
- WHO. (2013). *Model Lists of Essential Medicines. Antimalarial Medicines.*
- WHO. (2014). Severe malaria. *Tropical Medicine & International Health: TM & IH*, 19 Suppl 1, 7–131.
- WHO. (2019). *Malaria*. Malaria. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>
- WHO. (2021). *World Malaria Report.*
- Win, A. Y. N., Maung, T. M., Wai, K. T., Oo, T., Thi, A., Tipmontree, R., Soonthornworasiri, N., Winter, G., Kawai, S., Haeggström, M., Kaneko, O., Euler, A. von, Kawazu, S., Palm, D., Fernandez, V., & Wahlgren, M. (2005). SURFIN is a polymorphic antigen expressed on Plasmodium falciparum merozoites and infected erythrocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(11), 1853.
- Wipasa, J., Elliott, S., Xu, H., & Good, M. F. (2002). Immunity to asexual blood stage malaria and vaccine approaches. *Immunology and Cell Biology*, 80(5), 401–414.

World Health Organization. (2000). Severe falciparum malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94, 1–90.

Zhong, D., Lo, E., Wang, X., Yewhalaw, D., Zhou, G., Atieli, H. E., Githeko, A., Hemming-Schroeder, E., Lee, M. C., Afrane, Y., & Yan, G. (2018). Multiplicity and molecular epidemiology of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in East Africa. *Malaria Journal*, 17(1), 1–14.

FIGURAS Y CUADROS SUPLEMENTARIOS

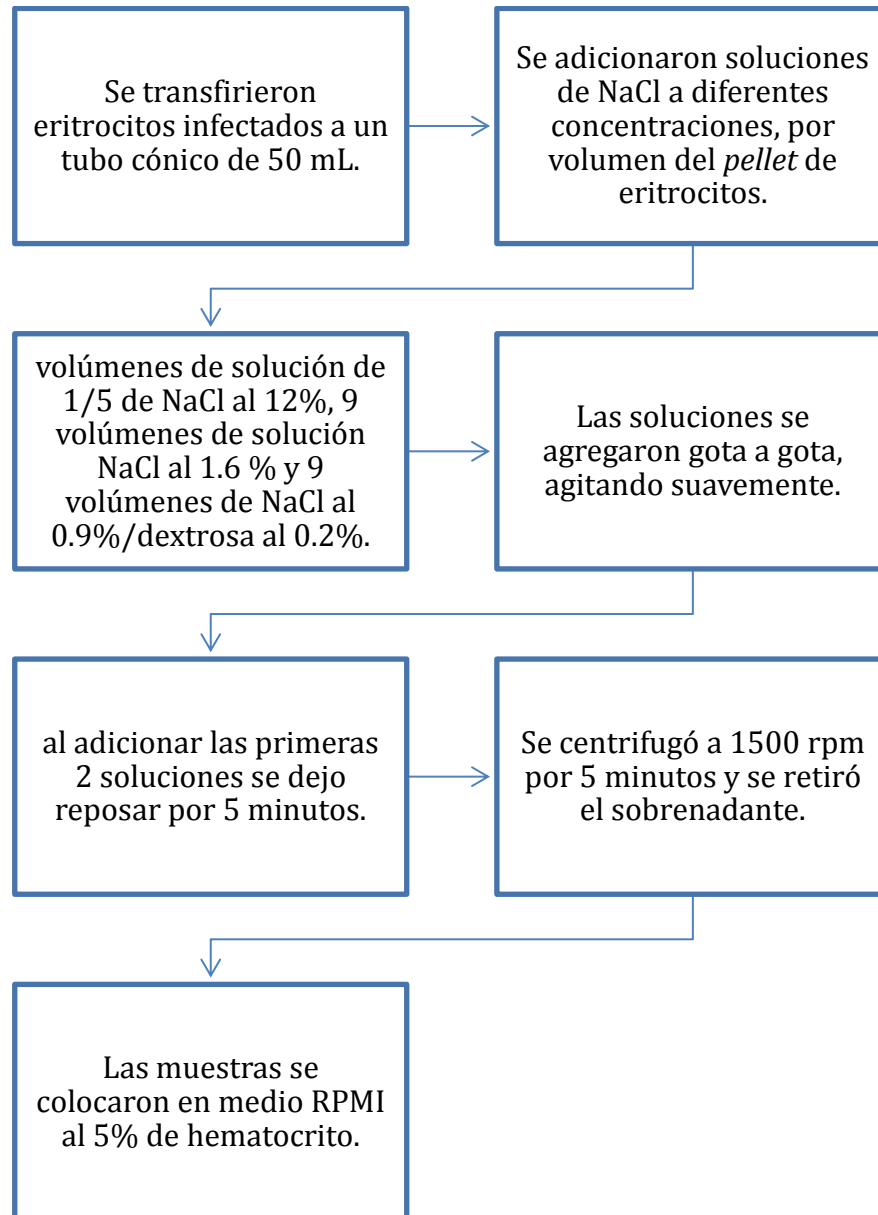


Figura 19. Descongelación de parásitos.

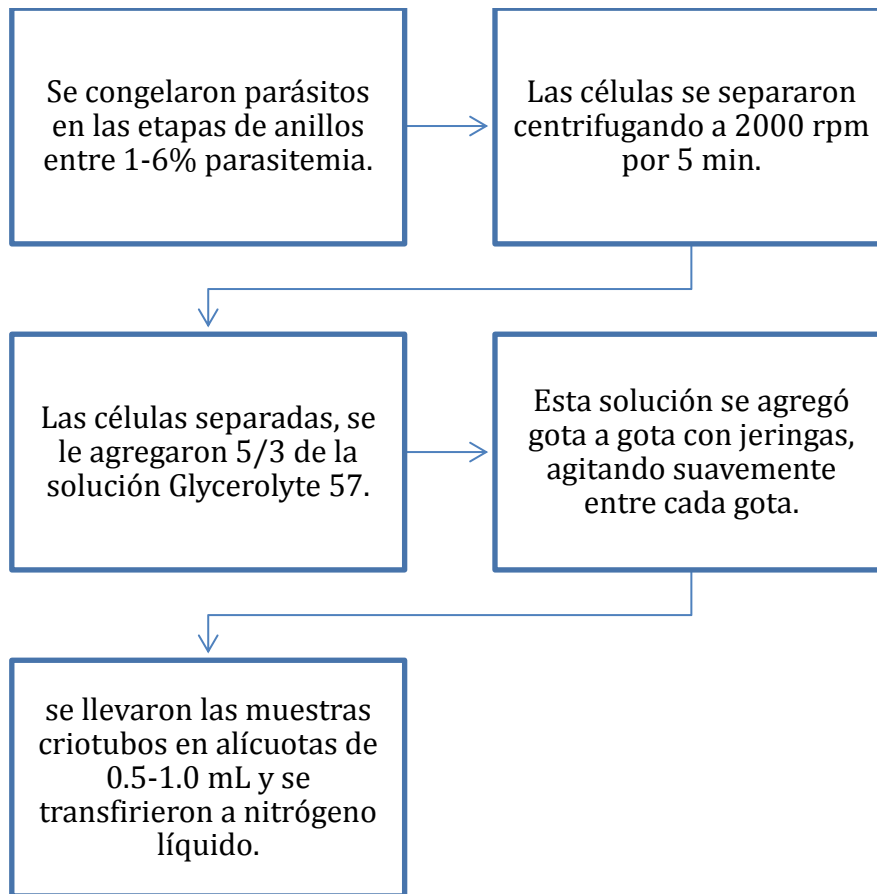


Figura 20. Congelación de parásitos.

Cuadro 4. Concentraciones estandarizadas de cebadores utilizados en qPCR.

Cebadores	μM	Cebadores	μM	Cebadores	μM
<i>var1</i>	0.125	<i>var21</i>	0.250	<i>var44</i>	0.125
<i>var2</i>	0.500	<i>var22</i>	0.250	<i>var45</i>	1.000
<i>var3</i>	0.500	<i>var23</i>	0.250	<i>var46</i>	0.750
<i>var4/3</i>	0.250	<i>var24</i>	0.250	<i>var47</i>	0.250
<i>var4/5</i>	0.500	<i>var25</i>	0.200	<i>var51</i>	0.750
<i>var5</i>	0.500	<i>var26</i>	0.125	<i>var54</i>	0.500
<i>var7</i>	0.500	<i>var27</i>	0.500	<i>var58</i>	0.500
<i>var8</i>	0.250	<i>var28</i>	0.250	<i>var60</i>	0.500
<i>var9</i>	0.500	<i>var29</i>	0.312	<i>var64</i>	0.125
<i>var10</i>	0.250	<i>var30</i>	0.250	AFBR20	0.750
<i>var11</i>	0.625	<i>var31</i>	0.250	AFBR38	0.250
<i>var12</i>	0.300	<i>var32</i>	0.500	AFBR6	0.150
<i>var13</i>	0.625	<i>var33</i>	0.500	AFBR7	0.500
<i>var14</i>	0.500	<i>var34</i>	2.500	FCR3 <i>var13</i>	0.500
<i>var15</i>	0.500	<i>var35</i>	0.500	FCR3 <i>var57</i>	1.000
<i>var16</i>	0.500	<i>var36</i>	0.250	FCR3 <i>varc28</i>	1.000
<i>var17</i>	1.00	<i>var39</i>	0.750	FRUC	0.500
<i>var18</i>	0.500	<i>var40</i>	0.500	GAPDH	0.500
<i>var19</i>	0.500	<i>var41</i>	1.25	SERYL	0.125
<i>var20</i>	0.500	<i>var43</i>	0.500	ACTIN	0.250

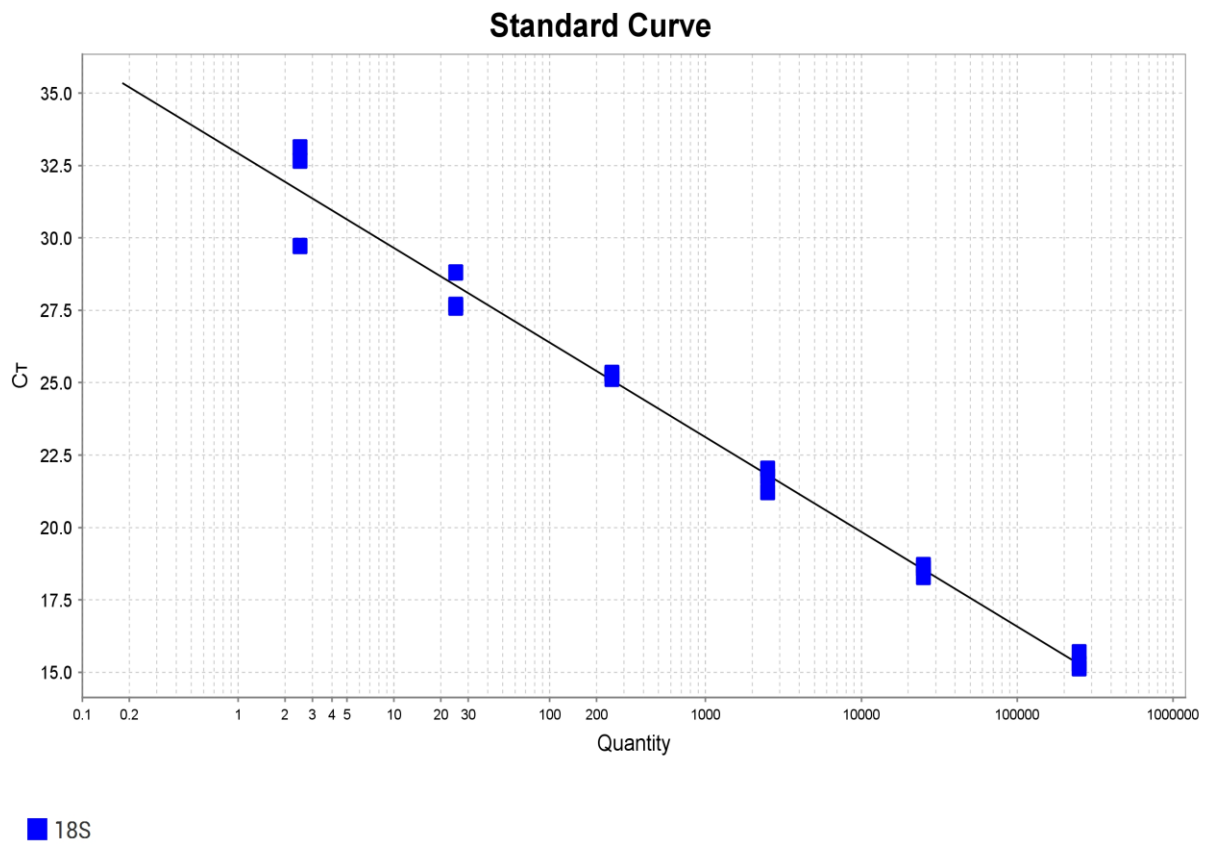


Figura 21. Curva estándar para determinar la parasitemia en cada espécimen. Para obtener el número de parásitos/ μ L se hizo el cálculo utilizando el programa QuantStudio Software V1.5.

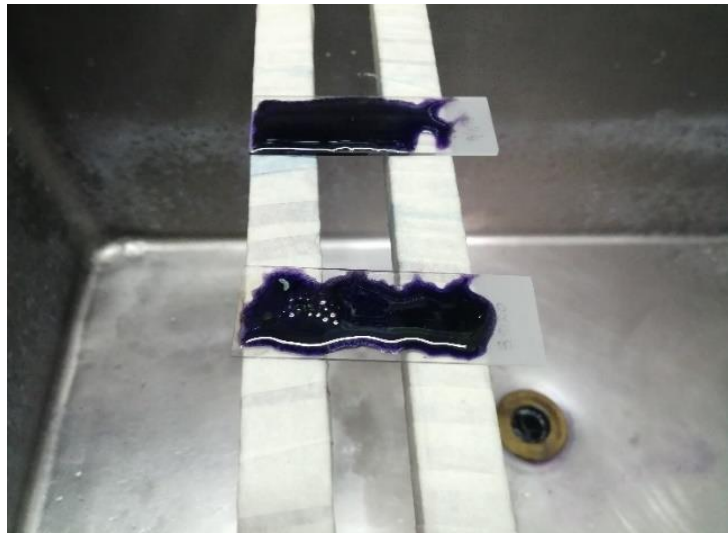


Figura 22. Tinción de sangre con reactivo Giemsa.



Figura 23. Extracción de ARN.

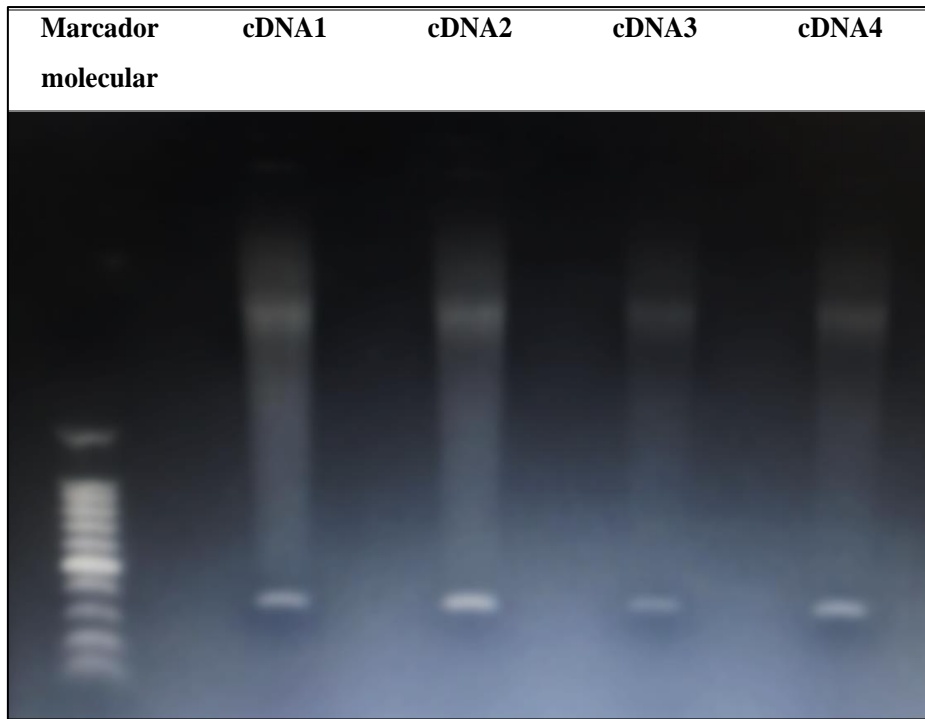


Figura 24. Visualización de ADNc mediante electroforesis en gel de agarosa.