



**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ**

**VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO**

**PROGRAMA DE MAESTRIA EN CIENCIAS PARASITOLÓGICAS**

**CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR EN  
PRIMATES *AOTUS* INFECTADOS CON PARÁSITOS DEL GÉNERO  
*PLASMODIUM***

**JACINTO ARIEL PÉREZ RUÍZ**

**CIP 8-790-982**

**TRABAJO PRESENTADO  
COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
MAGISTER EN CIENCIAS  
PARASITOLÓGICAS**

**PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ**

**2024**

**UNIVERSIDAD DE PANAMA**  
**VICERECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS PARASITOLÓGICAS**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA**

1. **Título del proyecto:** Caracterización de la Respuesta Inmune Celular en Primates *Aotus* Infectados con Parásitos del Género *Plasmodium*
2. **Código:** \_\_\_\_\_
3. **Estudiante:** Jacinto Ariel Pérez Ruíz
4. **Especialidad:** Licenciatura en Biología con Orientación en Microbiología y Parasitología
5. **Título al que aspira:** Maestría en Ciencias Parasitológicas
6. **Nombre del asesor:** Ariel Humberto Magallón Tejada
7. **Firma del asesor:** \_\_\_\_\_
8. **Firma del estudiante:** \_\_\_\_\_
9. **Firma del Coordinador del Programa:** \_\_\_\_\_
10. **Director de Vicerrectoría de Investigación y Postgrado:** \_\_\_\_\_

**Fecha:** \_\_\_\_\_

## Resumen

La malaria es una de las enfermedades parasitarias más relevantes a nivel mundial ya que provoca una alta mortalidad y morbilidad. Es causada mayoritariamente por dos especies, *Plasmodium vivax* y *P. falciparum*, siendo este último responsable de la mayoría de las muertes por malaria grave. Para el 2021 se registró 247 millones de casos y 619000 muertes por malaria en el mundo, mientras que en Panamá se dieron 3660 casos para el mismo año, en regiones endémicas y comarcales. A nivel mundial no existe una vacuna preventiva contra las especies de *Plasmodium*. Considerando esto, de importancia conocer el comportamiento de los biomarcadores del sistema inmunitario a fin de determinar cómo el huésped responde ante la infección por este parásito, información crucial para el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas preventivas como drogas o vacunas. Con el fin de estudiar el perfil de biomarcadores de inflamación (citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento) frente a episodios controlados de malaria, se utilizaron 26 primates de la especie *Aotus l. lemurinus* infectados (*in vivo*) o previamente infectados (*ex vivo*) con *P. falciparum*-FVO. Para evaluar los biomarcadores durante la infección se diseñaron ensayos *in vivo* de infección inducida en cinco (5) especímenes *Aotus* a los cuales se les monitorizó la parasitemia durante todo el periodo de infección hasta ser tratados. En momentos puntuales (pre-infección, fase temprana, media y tardía) se analizó el plasma para observar los biomarcadores por medio de inmunoensayos Luminex, además, de evaluar el reconocimiento antigénico de eritrocitos infectados. Para la respuesta post-infección se diseñaron ensayos *ex vivo* en muestras de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de 20 individuos divididos en seis (6) grupos y un (1) control de acuerdo con

historial previo de infección (1 - 2 veces infectados en 1 -15 años previamente). En cultivo, los PBMC fueron estimulados con antígeno crudo de *Plasmodium falciparum* solo o con adición de oligonucleótidos que contienen citosina-guanosina-dinucleótido (CpG ODN) que son activadores de las células inmunes. Se tomó muestras de sobrenadante del cultivo a las 24h, 48h y 72h para analizar los biomarcadores. Los resultados muestran que en la infección *in vivo* hubo un incremento significativo en los niveles de las citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$ , CD40L e IL-17 a partir de la fase temprana de la infección, y los niveles de IFGg se incrementaron a partir de la fase media de la infección. También se observó un incremento de IL-6 en la fase temprana y media de la infección que luego se normalizaron en la fase tardía. Con relación a las citocinas anti-inflamatorias se observó incremento de IL-10 a partir de la fase media de la infección y la IL-4 e IL-5 mostraron aumento en la fase tardía. El reconocimiento antigénico nos muestra que la respuesta de anticuerpos IgG se mantienen activa hasta por 170-200 días post-tratamiento. La expresión de citocinas en cultivos de PBMC se ve influenciada por el número de veces en que un individuo pudo estar previamente expuesto al parásito y la cantidad de años luego de dicha exposición frente a un cuadro reciente de malaria ( $p < 0.05$ ), así como la utilización de ODN solo aumenta la expresión de ciertas citocinas en individuos con menos de cinco años de exposición a la malaria.

## Summary

Malaria is one of the most relevant parasitic diseases worldwide as it causes high mortality and morbidity. It is mainly caused by two species, *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*, the latter being responsible for the majority of deaths from severe malaria. For 2021, 247 million cases and 619,000 deaths from malaria were registered in the world, while in Panama there were 3,660 cases for the same year, in endemic and regional regions. There is no preventive vaccine against Plasmodium species worldwide. Considering this, it is important to know the behavior of the immune system biomarkers in order to determine how the host responds to infection by this parasite, crucial information for the development of new preventive therapeutic targets such as drugs or vaccines. In order to study the profile of inflammation biomarkers (cytokines, chemokines and growth factors) against controlled episodes of malaria, 26 primates of the *Aotus l. lemurinus* species were infected (in vivo) or previously infected (ex vivo) with *P. falciparum*-FVO. To evaluate biomarkers during infection, in vivo induced infection assays were designed in five (5) *Aotus* specimens in which parasitemia was monitored throughout the infection period until treatment. At specific times (pre-infection, early, middle and late phase) the plasma was analyzed to observe the biomarkers using Luminex immunoassays, in addition to evaluating the antigenic recognition of infected erythrocytes. For the post-infection response, ex vivo assays are designed in samples of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 20 individuals divided into six (6) groups and one (1) control according to previous history of infection (1 - 2 times infected in 1 -15 years previously). In culture, PBMCs were stimulated with crude *Plasmodium falciparum* antigen alone or with the addition of

oligonucleotides containing cytosine-guanosine-dinucleotide (CpG ODN) that are activators of immune cells. Culture supernatant samples were taken at 24h, 48h and 72h to analyze the biomarkers. The results show that in the in vivo infection there was a significant increase in the levels of the proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , CD40L and IL-17 from the early phase of infection, and the levels of IFGg increased from the middle phase of infection. An increase in IL-6 will also be observed in the early and mid phase of infection which will then normalize in the late phase. In relation to anti-inflammatory cytokines, an increase in IL-10 was observed from the middle phase of the infection and IL-4 and IL-5 showed an increase in the late phase. Antigenic recognition shows us that the IgG antibody response remains active for up to 170-200 days post-treatment. The expression of cytokines in PBMC cultures is influenced by the number of times in which an individual could have been previously exposed to the parasite and the number of years after said exposure compared to a recent case of malaria ( $p < 0.05$ ), as well as the use of ODN only increases the expression of certain cytokines in individuals with less than five years of exposure to malaria.

## **Agradecimiento**

Primero que todo agradecer a Dios todo poderoso por haberme dado fuerza para intentar culminar esta etapa de formación académica. A mis familiares por todo el apoyo durante estos dos años de desarrollo de la investigación.

En segunda instancia quiero agradecer a SENACYT que financió mis estudios mediante una beca completa durante los dos años que duró en programa de maestría.

Como tercer punto agradecer a la Universidad de Panamá por admitirme como parte del programa de Maestría en Ciencias Parasitológicas y permitir la realización de mi trabajo de investigación.

Cuarto, agradecer a mi director de tesis Ariel Magallón-Tejada, PhD. por su guía, esfuerzo y paciencia en la realización del trabajo de tesis, así como los licenciados Lariza Mendoza, Eduardo Cornejo y Catalina Chen por su ayuda tanto en la ejecución de los ensayos de laboratorio, así como fuera de los tiempos del trabajo de investigación.

Por último, agradecer al Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud por permitirme desarrollar mi proyecto de tesis en sus laboratorios, oficinas y por las demás herramientas a las que tuve acceso, sin las cuales no hubiese podido finalizar esta investigación.

## Índice general

Página de Aprobación .....	ii
<b>Resumen</b> .....	iii
<b>Summary</b> .....	v
<b>Agradecimiento</b> .....	vii
<b>Índice general</b> .....	viii
<b>Índice de cuadros</b> .....	x
<b>Índice de figuras</b> .....	xi
<b>Abreviaturas utilizadas</b> .....	xiv
<b>CAPÍTULO I: FUNDAMENTO TEÓRICO</b> .....	1
<b>1.1. Introducción general</b> .....	2
<b>1.2. Marco de referencia</b> .....	3
<b>1.2.1. Breve reseña histórica</b> .....	3
<b>1.2.2. Taxonomía de <i>Plasmodium</i> sp.</b> .....	5
<b>1.2.3. Ciclo de vida</b> .....	5
<b>1.2.4. Aotus lemurinus lemurinus</b> .....	8
<b>1.3. Aspectos generales del problema de estudio</b> .....	9
<b>1.3.1. Planteamiento del problema</b> .....	9
<b>1.3.2. Justificación</b> .....	12
<b>1.3.3. Objetivos</b> .....	14
<b>CAPÍTULO II: ASPECTOS METODOLÓGICOS</b> .....	15
<b>2.1. Consideraciones éticas</b> .....	16
<b>2.2. Tipo de estudio</b> .....	16

2.2.1. Sujetos de Estudio .....	16
2.2.2. Muestra .....	17
2.3.    Método experimental .....	17
2.3.1. Inoculación y cultivo de <i>Plasmodium</i> sp. <i>in vivo</i> .....	17
2.3.2. Toma de muestra para monitoreo de parasitemia .....	18
2.3.3. Extracción de ADN de <i>P. falciparum</i> -FVO y PCR.....	19
2.3.4. Análisis cuantitativo de la carga parasitaria por qPCR.....	19
2.3.5. Toma de muestra para la obtención de PBMC para cultivo.....	20
2.3.6. Criopreservación de PBMC .....	20
2.3.7. Estimulación y cultivo de PBMC .....	21
2.3.8. Ensayo inmunoenzimático, Luminex-Cuantificación de biomarcadores	21
2.3.9. Actividad de anticuerpos .....	23
2.4.    Análisis de datos .....	24
<b>CAPITULO III: PRODUCTO.....</b>	<b>26</b>
3.1.    Resultados y discusión .....	27
3.1.1. Evaluación de la parasitemia en el cultivo <i>in vivo</i> de <i>Plasmodium</i> .....	27
3.1.2. Concentración de citocinas en plasma de <i>A. l. lemurinus</i> durante la infección por <i>P. falciparum</i> -FVO .....	28
3.1.3. Medición de la actividad de anticuerpos.....	31
3.1.4. Medición de citoquinas en cultivos de PBMC .....	32
<b>Conclusión y Recomendaciones .....</b>	<b>35</b>
<b>Literatura citada .....</b>	<b>36</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>45</b>

## Índice de cuadros

<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica del género <i>Plasmodium</i> .....	45
<b>Tabla 2.</b> Clasificación taxonómica del género <i>Aotus</i> sp.....	45
<b>Tabla 4.</b> Clasificación de monos <i>Aotus</i> por grupo experimental.....	45
<b>Tabla 5.</b> Clasificación de los tratamientos aplicados a los cultivos de PBMC .....	46

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Esquema de toma de muestras en procedimientos de infección in vivo..	47
<b>Figura 2.</b> Esquema de grupos y toma de muestras en procedimientos análisis de citocinas ex vivo.....	47
<b>Figura 3.</b> Densidad parasitaria de <i>P. falciparum</i> -FVO en modelo de infección in vivo..	48
<b>Figura 4.</b> Concentración de citocinas proinflamatorias en plasma de monos <i>A. l. lemurinus</i> durante la infección por <i>P. falciparum</i> -FVO .....	49
<b>Figura 5.</b> Concentración de citocinas anti-inflamatorias en plasma de monos <i>A. l. lemurinus</i> durante la infección por <i>P. falciparum</i> -FVO. ....	50
<b>Figura 6.</b> Concentración de quimiocinas, factores de crecimiento y otras citocinas en plasma de monos <i>A. l. lemurinus</i> durante la infección por <i>P. falciparum</i> -FVO.....	51
<b>Figura 7.</b> Asociación de citocinas, según tiempo de infección .....	52
<b>Figura 8.</b> Reconocimiento antigénico hacia eritrocitos infectados con <i>P. f</i> -FVO de plasma de primates <i>A. lemurinus l.</i> ....	52
<b>Figura 9.</b> Asociación de citocinas, según tiempo de infección en cultivo de PBMC. ....	53
<b>Figura 10.</b> Asociación de citocinas por grupos de PBMC expuesto entre una y dos veces a la infección por <i>Plasmodium</i> . ....	53
<b>Figura 11.</b> Diferencias en la concentración de TNF- $\alpha$ en los cultivos de PBMC de los diferentes grupos experimentales.....	54
<b>Figura 12.</b> Diferencias en la concentración de IL-17A en los cultivos de PBMC de los diferentes grupos experimentales.....	54

<b>Figura 13.</b> Diferencias en la concentración de IFN- $\gamma$ en los cultivos de PBMC de los diferentes grupos experimentales.....	55
<b>Figura 14.</b> Diferencias en la concentración de IL-6 en los cultivos de PBMC de los diferentes grupos experimentales.....	55
<b>Figura 15.</b> Diferencias en la concentración de IL-8 en los cultivos de PBMC de los diferentes grupos experimentales.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>Figura 16.</b> Diferencias en la concentración de IL-12p70 en los cultivos de PBMC de los diferentes grupos experimentales.....	56
<b>Figura 17.</b> Diferencias en la concentración de IL-15 en los cultivos de PBMC de los diferentes grupos experimentales.....	57
<b>Figura 18.</b> Diferencias en la concentración de IL-2 en los cultivos de PBMC de los diferentes grupos experimentales.....	57
<b>Figura 19.</b> Diferencias en la concentración de IL-4 en los cultivos de PBMC de los diferentes grupos experimentales.....	58
<b>Figura 20.</b> Diferencias en la concentración de IL-10 en los cultivos de PBMC de los diferentes grupos experimentales.....	58
<b>Figura 21.</b> Diferencias en la concentración de IL-5 en los cultivos de PBMC de los diferentes grupos experimentales.....	59
<b>Figura 22.</b> Diferencias en la concentración de IL-1b en los cultivos de PBMC de los diferentes grupos experimentales.....	59
<b>Figura 23.</b> Diferencias en la concentración de G-CSF en los cultivos de PBMC de los diferentes grupos experimentales.....	60
<b>Figura 24.</b> Cultivo de cepa Pf-FVO. ....	61

<b>Figura 25.</b> Preparación de medio de cultivo para pases de la cepa Pf-FVO.....	61
<b>Figura 26.</b> Proceso de tinción de frotis de cultivo con Giemsa.....	61
<b>Figura 27.</b> Placas teñidas para el proceso de medición de la parasitemia por microscopia. .....	61
<b>Figura 28.</b> Revisión de la parasitemia en cultivos de Pf-FVO.....	62
<b>Figura 29.</b> Observación de placas de cultivo de Pf-FVO donde se observa la presencia de anillos.....	62
<b>Figura 30.</b> Proceso de obtención de PBMC de <i>Aotus</i> . .....	62
<b>Figura 31.</b> Pelet con PBMC para su cultivo.....	62

## Abreviaturas utilizadas

<i>A. l. lemurinus</i>	<i>Aotus lemurinus lemurinus</i>
CD	Diferenciación de conglomerado (Cluster differentiation)
CIUCAL	Comité Institucional para el Buen Uso y Cuidado de los Animales de Laboratorio
CPDA	Citrato fosfato dextrosa adenina
CSP	Proteína circumsporozoito
DMSO	Dimetilsulfoxido
FBS	Suero fetal bovino
FVO	Vietnam Oak-Knoll
ICGES	Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud
IFN	Interferón
IL	Interleucina
LSA	Antígeno de la etapa hepática
MCP	Proteína quimiotáctica del macrófago
MIP	Proteína inflamatoria del macrófago
MSP-1	Proteína de superficie del merozoito-1
ODN	Oligodesoxinucliotidos
<i>P. falciparum</i> / Pf	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. vivax</i> / Pv	<i>Plasmodium vivax</i>
PBMC	Células mononucleares periféricas
PfEMP-1	Proteína 1 de membrana de eritrocitos de <i>Plasmodium falciparum</i>
PNH	Primates no humanos
SDF-1 $\alpha$	Estroma de células derivadas del factor 1 alfa
Th	Linfocito T cooperador
TNF	Factor de necrosis tumoral
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

## **CAPÍTULO I: FUNDAMENTO TEÓRICO**

## 1.1. Introducción general

La malaria continúa siendo una de las enfermedades transmitidas por vectores más importantes a nivel mundial, con una alta tasa de morbilidad y mortalidad; en 2019 globalmente se registraron 229 millones de casos y 409 000 defunciones mayoritariamente en países endémicos del continente africano (World Health Organization, 2020). Son siete las especies de *Plasmodium* spp. que pueden infectar al hombre, transmitidos a través de la picadura del mosquito *Anopheles*, de los cuales *Plasmodium falciparum* y *P. vivax* son las especies más distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales, siendo *P. falciparum* la más letal (Buery et al., 2021; Ramasamy, 2014; Sato, 2021).

Se han realizado numerosos estudios que investigan el comportamiento de *Plasmodium* sp. y la respuesta inmune que desarrolla un hospedero humano durante las diferentes etapas de la malaria; dentro de estos ensayos se suele utilizar modelos animales, principalmente de primates no humanos, siendo *Aotus* sp. el más empleado y que ha aportado significativamente al avance en el entendimiento de la malaria (Navarro et al., 2005). Estas investigaciones han revelado similitudes y diferencias importantes entre el ser humano y el modelo *Aotus* sp., lo que las hace comparables al momento de inferir y extrapolar resultados (Craig et al., 2012; Egan et al., 2002; Nguee et al., 2022; Sharma et al., 2022; Voinson et al., 2022).

Al ser los primates *Aotus* susceptibles a la infección por las dos especies de *Plasmodium* que infectan al hombre, son un modelo adecuado para el estudio de la biología de los parásitos, así como para el estudio de nuevos fármacos o vacunas (Collins, 2002; Duque et al., 1998; Kaneko et al., 1999).

En cuanto a la respuesta inmunitaria frente a *Plasmodium*, varios estudios han proporcionado información sobre las respuestas de anticuerpos contra los antígenos de *Plasmodium*, incluyendo la proteína circumsporozoito (CSP) (Karen et al., 2015; Yadava et al., 2014), la proteína de superficie del merozoito-1 (MSP-1) (Burns et al., 2016; N. Obaldia et al., 2017) y el antígeno de la etapa hepática (LSA) (Perlaza et al., 2003, 2008). Estos anticuerpos tienen gran importancia en la prevención de la infección del parásito y el control de su replicación.

Por otro lado, para la respuesta celular, se ha reportado que tanto los monos *Aotus* como los humanos desarrollan respuestas inmunes T contra los antígenos de *Plasmodium* (Guerrero et al., 2003; M. A. Herrera et al., 1992; Langermans et al., 2000). Además, se ha demostrado que las células T juegan un papel crítico en la eliminación de células infectadas y en la promoción de la memoria inmunológica. Sin embargo, a pesar de los valiosos conocimientos obtenidos de estudios previos, todavía existen varias brechas en nuestra comprensión de la inmunidad a la malaria en monos *Aotus* y su relevancia en la inmunidad humana.

## **1.2. Marco de referencia**

### **1.2.1. Breve reseña histórica**

Para el año 1880 el Dr. Charles Louis Alphonse Laveran, detectó por primera vez un eritrocito infectado por *Plasmodium* por microscopia en pacientes que presentaban malaria o antiguamente conocida como fiebre del pantano (Arias & Soto Bigot, 2009). Sin embargo, la llegada de la malaria a América ha sido controversial, debido a que se

considera la posible existencia de un paludismo americano, otras investigaciones afirman que la patología llegó junto a la conquista (*P. vivax* y *P. malariae*) desde el sudeste asiático o por la introducción de africanos al nuevo continente (*P. falciparum*) (Boyd, 1949; Coatney, 1971; Flores, 1886; Penna & Barbieri, 1925). En cuanto a los vectores, la evidencia muestra que, debido a que los parásitos se encuentran en un amplio grupo de vertebrados, pero los hospederos siempre resultan ser dípteros, esto ha generado dos líneas del origen de la relación parasito-vector para *Plasmodium*, ya que su antecesor (un coccidio) pudo parasitar a un artrópodo o el intestino de un vertebrado o ambas, sumado a esto se sabe que los *Haemosporidia* son patogénicos a los insectos en comparación a los vertebrados, por lo que se podría decir que *Plasmodium* ha estado asociado por más tiempo con los insectos que con los hospederos vertebrados, por lo que se deduce que los *Haemosporidia* fueron originalmente parásitos de insectos (Huff, 1945).

Dado que el entendimiento sobre la relación *Plasmodium*-hospedero vertebrado-vector promulgo el desarrollo de estrategias para el control de vectores, ejemplo de ello el trabajo desarrollado por William C. Gorgas para controlar la fiebre amarilla y el paludismo en Cuba, replicando dichas estrategias durante la construcción del Canal de Panamá a partir de 1905, lo que sin duda contribuyó a el éxito de esta obra, saneando a su vez muchas otras áreas de malaria en el trópico (Beauperthuy, 1854; Finlay, 1881; Gorgas & Hendrick, 1924). Luego de estos acontecimiento y pasada la segunda guerra mundial, la recién OMS reconoce al paludismo como la enfermedad de mayor mortalidad en el mundo en ese momento y que adicional, interfería con el desarrollo de la agricultura e industria, sin embargo, la llegada del DDT interrumpió en cierta medida la propagación de mosquitos *Anopheles*, en conjunto con los programas de erradicación de reservorios de Malaria y

desarrollo de políticas públicas en países endémicos desde 1956, que también incluyeron las iniciativas de erradicación de los vectores de Chagas y *Leishmania* (OMS, 1957).

Al día de hoy la lucha antipalúdica continua y en los últimos cincuenta años se han producido tres modificaciones importantes de las estrategias contra el paludismo, una en 1969 con la posibilidad de erradicación del paludismo en la cintura tropical o la discusión en Alma Ata sobre la atención primaria de salud entorno a los programas de erradicación, o en 1992 con la conferencia de Mundial de Ministros de Salud de la Haya con la nueva visión sobre la contención y retroceso de la Malaria (OMS, 1969, 1978, 1992).

### **1.2.2. Taxonomía de *Plasmodium* sp.**

El género *Plasmodium*, es un grupo de parásitos protozoarios pertenecientes a la clase *Aconoidasida* dentro de la familia *Plasmodiidae*, del cual se conocen alrededor de 175 especies, de las cuales, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* y *P. knowlesi* causan paludismo en el hombre (Chavatte et al., 2007a).

### **1.2.3. Ciclo de vida**

El ciclo de vida de *Plasmodium* alterna entre un hospedero vertebrado y un hospedero invertebrado (mosquito), y en cada uno desarrolla diferentes formas parasitarias (asexuales y sexuales) que se desarrollan en diferentes tipos de células (Cowman et al., 2016). Una parte importante de este ciclo de vida corresponde a la etapa intra-eritrocitaria que puede tener diferentes estadios con desarrollo asexual o sexual (Venugopal et al., 2020) y en el humano, esta etapa es responsable de la sintomatología clínica de la malaria (fiebre, escalofríos, cefalea, dolor abdominal, diarrea, malestar general y dolor muscular).

Además, en la etapa intra-eritrocitaria, en el caso de *P. falciparum*, los estadios asexuales maduros poseen capacidades adhesivas que le permiten acumularse en diversos tejidos, lo que se considera un factor de virulencia para esta especie (Sherman et al., 2003).

**(a) Proceso de invasión**

La invasión ocurre principalmente en cuatro etapas, *i*) contacto inicial, *ii*) reorientación, *iii*) la unión fuerte, e *iv*) invaginación del parásito (Cowman & Crabb, 2006; Pinder et al., 2000; Volz et al., 2016) en las cuales el parásito interactúa con el eritrocito. El contacto inicial es un proceso no muy comprendido aún; sin embargo, la interacción del parásito en forma de merozoito se da a través de las proteínas MSP1 (*merozoite surface protein 1*) (Cowman et al., 2012, 2017).

Luego ocurre el paso intermedio de reorientación y el subsecuente paso de unión fuerte en la que se dan interacciones entre las proteínas de la familia *EBA* (*erythrocyte binding antigen*), *EBL* (*erythrocyte-binding-like*) o *PfRh* (*P. falciparum reticulocyte-binding protein homologs*) con los receptores glicoforina A, B o C o basigina (Galaway et al., 2019). Y finalmente el paso de invaginación del parásito donde este entra totalmente al eritrocito y puede inducir cambios morfológicos en la estructura de la célula huésped (Cowman et al., 2017).

Algunos estudios señalan a las proteínas MSP-1 de *Plasmodium vivax* y *P. falciparum*, como moléculas altamente inmunogénico con capacidad de modular la respuesta inmunitaria (Moormann et al., 2013; Riccio et al., 2013).

**(b) Estadios asexuales**

La etapa intra-eritrocitaria involucra el desarrollo asexual que se divide en tres estadios, anillos (trofozoítos inmaduros), trofozoítos maduros y esquizonte (Florens et al., 2002). Luego de invadir el eritrocito, el parásito comienza a producir proteínas algunas de estas serán exportadas a la membrana del eritrocito infectado (Boddey & Cowman, 2013). Así, en el estadio de anillo el eritrocito infectado mantiene casi la misma rigidez y flexibilidad del eritrocito no infectado, a medida que el parásito madura hacia el estadio de trofozoítos/esquizontes, el eritrocito infectado sufre cambios sustanciales en el esqueleto que afectan la rigidez y flexibilidad de la célula infectada (Warncke & Beck, 2019).

En el estadio de trofozoíto, el eritrocito infectado adquiere capacidades adhesivas, una característica especial de *P. falciparum* que lo hace diferente de las otras especies de *Plasmodium* y que le otorga un factor de virulencia importante (May & White, 1999). Esta capacidad adhesiva se la confiere las proteínas llamadas PfEMP1 (*P. falciparum erythrocyte membrane protein 1*) (Kalantari & Ghaffari, 2013; Rug et al., 2006; Subramani et al., 2015). Así, mientras que las formas asexuales inmaduras se mantienen circulando por la sangre periférica, las formas asexuales maduras (trofozoítos/esquizontes) de *P. falciparum* le permiten acumularse en diferentes tejidos y órganos.

Evidencias indican que la interacción de las proteínas asociadas al fenómeno de adhesión del eritrocito infectado (PfEMP-1) también poseen implicaciones en la modulación de la respuesta inmunitaria (Sampaio et al., 2018).

(c) *Estadios sexuales*

Durante el desarrollo asexual intra-eritrocitario, una pequeña porción de parásitos continúa la vía de desarrollo sexual (Florens et al., 2002; Talman et al., 2004) que se divide en cinco estadios (I-V). Los gametocitos I-IV son las formas sexuales inmaduras que se mantienen acumuladas en diferentes órganos como la médula ósea y el bazo (Tibúrcio et al., 2015) y una vez completan su maduración pasan a gametocitos estadio V y son liberadas a la circulación periférica donde pueden ser captados por el mosquito para completar su ciclo sexual, constituyéndose en los estadios transmisibles (Josling & Llinás, 2015; Tibúrcio et al., 2013).

El secuestro o acumulación de las formas sexuales inmaduras ocurre por retención mecánica mientras que el secuestro de las formas asexuales se debe a fenómenos de citoadhesividad (Silvestrini et al., 2012). Así, la acumulación de las formas sexuales inmaduras en órganos como la médula ósea pueden inducir estimulación de células del sistema inmunitario promoviendo secreción de citocinas (Messina et al., 2018).

**1.2.4. *Aotus lemurinus lemurinus***

El género *Aotus* sp. es un grupo de primates del neotrópico, cuya etimología de su nombre deriva del latín “A” = *sin* y “*otis*” = *orejas*, lo que literalmente significa “Sin oreja”, sin embargo, esto no quiere decir que este mono no posea orejas, ya que su abundante pelaje las oculta de la vista, otros nombres con los que se le conoce son Mono nocturno, Mono Búho o Jujuna (Vargas Madrid, 2013).

*Aotus lemurinus lemurinus* es un primate que se caracteriza por ser de pequeño tamaño (24 a 47 cm), con un peso entre 700 y 1100 g, con cabeza redondeada, hocico corto

pero prominente, orejas pequeñas, ojos color café de gran tamaño, abundante pelaje y desplazamiento a cuatro patas (Katsumura et al., 2016; N. Sánchez et al., 2006).

Su hábitat se caracteriza por bosques tropicales primarios, secundarios y remanentes caducifolios con una distribución en América en Colombia, Panamá, Ecuador y Brasil (Thomas et al., 2018).

En cuanto al aspecto inmunológico, este primate muestra homología con el ser humano, en cuanto a la expresión de citoquinas como IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 $\alpha$ , IL-12 $\beta$ , IL-15, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en un 93 a 99% (Villinger et al., 1995).

En Panamá, las investigaciones sobre la especie *Aotus l. lemurinus*, como modelo de infección, se emplean en pruebas para antimaláricos y moléculas candidatas a vacunas, dentro del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES) (N. I. Obaldia, 2007).

Los estudios de *Aotus* sp. como modelo animal se enfoca principalmente en encontrar posibles candidatos a vacunas contra *Plasmodium*, a través del establecimiento de la relación entre el perfil Th1 (IFN- $\nu$  y TNF- $\beta$ ) / Th2 (IL-4 e IL-10), utilizando los mecanismos de inmunidad, la expresión de citoquinas y progreso de la patogenicidad desarrollada durante la Malaria (Hernández et al., 2002; Pico de Coaña et al., 2004).

### **1.3. Aspectos generales del problema de estudio**

#### **1.3.1. Planteamiento del problema**

La malaria es una enfermedad transmitida por mosquitos que afecta a millones de personas en todo el mundo, causando enfermedades graves y muertes. Esta enfermedad

afecta principalmente a niños menores de cinco años y a mujeres embarazadas (CDC, 2023; WHO, 2023b, 2023a). Es causada por parásitos del género *Plasmodium*, cuyo ciclo de vida incluye estadios que invaden y se reproducen dentro de los glóbulos rojos (Galinski, 2022; Volz et al., 2016).

Si bien existen tratamientos eficaces para la malaria, no siempre son accesibles. Además, los parásitos han desarrollado resistencia a las drogas antimaláricas actuales (Paloque et al., 2016).

Actualmente se está trabajando en el desarrollo de algunas vacunas para prevenir la infección por *P. falciparum*, considerada la especie más letal. Sin embargo, estas vacunas están en fase experimental o no poseen la eficacia necesaria para recomendar su uso a nivel clínico (Aderinto et al., 2024; Oduoye et al., 2024).

El desarrollo exitoso de una vacuna contra la malaria dependerá en última instancia de la comprensión completa de los mecanismos inmunitarios básicos de la resistencia adquirida naturalmente durante la enfermedad, así como también de la caracterización integral de las respuestas a la inmunización con antígenos candidatos para la vacuna (Garcia et al., 2006).

Hasta la fecha, la ausencia de una vacuna efectiva puede atribuirse en parte a la dificultad de identificar inductores y reguladores específicos de la función efectora. En muchos casos, la evaluación de antígenos candidatos para la vacuna en sujetos humanos puede facilitarse y acelerarse mediante pruebas previas en modelos animales, como los primates no humanos.

El modelo de mono *Aotus* se ha convertido en una herramienta importante en el estudio de la malaria, en el desarrollo de drogas antimaláricas y en los ensayos de

candidatos a vacunas contra la malaria, ya que sus características comportamentales y fisiológicas se asemejan a la de los humanos (S. Herrera et al., 2002; N. I. Obaldia et al., 2017; Sharma et al., 2022).

Los monos *Aotus* son susceptibles a las dos especies más prevalentes de *Plasmodium*, *P. falciparum* y *P. vivax*. Se ha determinado que las respuestas inmunitarias en monos *Aotus* son comparables a la que exhiben los seres humanos, lo que hace que sea una especie útil para estudiar las reacciones del sistema inmunitario ante estos parásitos (Collins, 2002; Collins et al., 1996; Jones et al., 1999; Ruebush et al., 1990). Por lo tanto, el mono *Aotus* es una herramienta invaluable para comprender las respuestas inmunitarias que se producen tras la inmunización e infección con especies de *Plasmodium*.

Al estudiar la respuesta inmune a antígenos específicos del parásito en monos *Aotus*, se pueden evaluar diferentes formulaciones de vacunas y adyuvantes que induzcan inmunidad protectora. Luego, estos estudios pueden dirigirse hacia la evaluación de la eficacia y seguridad de nuevos candidatos a vacunas. La información obtenida puede ser utilizada para refinar el diseño de las vacunas y optimizar su capacidad de protección contra la malaria (Barrero et al., 2005; Douglas et al., 2019; Langermans et al., 2000; Pinzoñ-Charry et al., 2003; Taylor & Siddiqui, 1978).

Sin embargo, existen pocos sitios en el mundo que cuentan con la capacidad de albergar un bioterio de primates no humanos para realizar infecciones experimentales. Además, no se han aplicado las herramientas moleculares y técnicas inmunológicas en primates, por lo que todavía no se conoce a profundidad la respuesta inmunológica ante la malaria en estos animales.

Se sabe que la respuesta inmune celular, juega un papel crucial en la defensa contra la malaria. Frente a una infección por *Plasmodium*, se desencadena una robusta respuesta inmune celular caracterizada por la activación de células T, macrófagos y otras células del sistema inmunitario, además de la subsecuente producción de mediadores proinflamatorios como las citocinas. Esta respuesta es esencial para eliminar los parásitos de la malaria y prevenir el avance de la enfermedad (Langermans et al., 2000; Pinzoñ-Charry et al., 2003).

El análisis de un perfil completo de la producción de citocinas podría proporcionar una mejor comprensión de la cinética y los parámetros cualitativos de una respuesta inmunitaria protectora versus una respuesta no protectora después de la inmunización experimental (Duque et al., 1998; Popa & Popa, 2021).

En este estudio, pretendemos analizar la respuesta inmunitaria celular frente a la infección por *P. falciparum* en infecciones *in vivo* inducidas en el mono *Aotus* y en ensayos *ex vitro* utilizando células mononucleares de sangre periférica de primates. El uso de inmunoensayos de alta tecnología, como la técnica de Luminex, nos permitirá obtener resultados precisos en cuanto a la respuesta de citocinas hacia *P. falciparum*, lo que permitirá determinar el perfil de estos biomarcadores del sistema inmunológico tanto en infecciones *in vivo* como en respuesta celular posterior a la infección.

### **1.3.2. Justificación**

Las investigaciones en primates no humanos, específicamente en monos *Aotus*, radica en su potencial para el avance en la lucha contra la malaria. Gracias a sus similitudes fisiológicas y filogenéticas con los seres humanos, los experimentos realizados en estos primates pueden ser altamente reproducibles y válidos,

proporcionando resultados confiables que pueden ser aplicados en la búsqueda de una vacuna efectiva contra la malaria.

Además, estudiar la base molecular de la inmunidad en los monos *Aotus* puede brindar valiosos conocimientos sobre los factores genéticos e inmunológicos que los hacen más resistentes a la malaria, lo que a su vez podría ser aplicado en el desarrollo de estrategias para mejorar la respuesta inmune en los seres humanos.

En este sentido, la investigación con monos *Aotus* ha demostrado ser prometedora en la identificación de blancos terapéuticos y en la evaluación de posibles vacunas contra la malaria. Su inclusión en ensayos de seguridad también permite una mejor comprensión de los posibles efectos secundarios de las vacunas, lo que contribuye a asegurar su eficacia y seguridad en humanos (S. Herrera et al., 2002; McCallum et al., 2020; Ye et al., 2013). Sin embargo, aún se requiere de más estudios para optimizar su uso y garantizar una adecuada traslación de los hallazgos a ensayos clínicos en humanos. Por ello, es necesario seguir promoviendo la investigación en monos *Aotus* y ampliar su utilización en el desarrollo de vacunas contra la malaria, ya que esta línea de investigación tiene un potencial altamente prometedor para la lucha contra esta enfermedad.

La investigación en monos *Aotus* es esencial para avanzar en el conocimiento sobre la malaria y desarrollar estrategias más efectivas en su prevención y tratamiento. Su utilización nos permite obtener datos precisos y relevantes, lo que resulta fundamental en la lucha contra una enfermedad tan devastadora como la malaria. Por ello, es necesario seguir apoyando y fomentando la investigación en primates no humanos, en particular en monos *Aotus*, como parte de nuestros esfuerzos para combatir esta enfermedad.

### 1.3.3. Objetivos

#### i. General

Evaluar la respuesta inmune celular en primates *A. l. lemurinus* infectados con parásitos *Plasmodium*.

#### ii. Específicos

- Evaluar *in vivo* el perfil de citocinas en primates *A. l. lemurinus* durante la infección inducida por *P. falciparum* o *P. vivax*.
- Evaluar el reconocimiento antigénico (IgG de primates *A. l. lemurinus*) contra a eritrocitos infectados por *P. falciparum*.
- Caracterizar *in vitro* el perfil de citocinas expresado por células mononucleares de sangre periférica obtenidas de primates *A. l. lemurinus* previamente infectados por *P. falciparum* o *P. vivax*.

## **CAPÍTULO II: ASPECTOS METODOLÓGICOS**

## **2.1. Consideraciones éticas**

Este estudio conllevó ensayos *in vitro* y *ex vivo* con manipulación de animales (PNH), por lo tanto, para garantizar el cumplimiento de las buenas prácticas en todos los procesos que conciernen a ensayos con animales vivos, el protocolo (solo metodología) se sometió a evaluación por el Comité Institucional para el Buen Uso y Cuidado de los Animales de Laboratorio (CIUCAL-ICGES) cuyo aval consta en los documentos **014-CIUCAL-ICGES-02** y **001/2023/CIUCAL-ICGES**. En el protocolo consta que los procesos de manipulación de animales se realizaron o supervisaron por el médico veterinario del bioterio.

## **2.2. Tipo de estudio**

Se llevó a cabo un estudio de investigación básica dentro del campo de las ciencias de la salud. La propuesta consistió en procedimientos y actividades observacionales y analíticas de carácter transversales. El estudio se extendió por un periodo de aproximadamente 18 meses (junio 2022 – diciembre 2023), con una adición de 3 meses para la redacción de los resultados. Su objeto fue obtener datos cualitativos y cuantitativos a través de experimentos que se realizaron en los laboratorios de malaria (109-114) y en el Bioterio de Primates No Humanos (PNH) de la Estación Biomédica Experimental del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud.

### **2.2.1. Sujetos de Estudio**

Los sujetos de estudio contemplados fueron primates de la especie *Aotus lemurinus lemurinus*, los cuales se utilizaron para el cultivo *in vitro* de *P. falciparum*., ensayos *ex vivo*

de cultivo de células mononucleares periféricas (PBMC), y ensayos de inducción de infección, según el tiempo de exposición a una infección previa por *P. falciparum*, catalogados a su vez como: individuos que estuvieron infectados una vez o dos veces, en periodos de tiempo de entre 1 a 15 años, así como un grupo control (naïve) jamás expuesto a la infección por *Plasmodium* (Tabla 2).

### **2.2.2. Muestra**

Se escogieron todas aquellas muestras de sangre periférica provenientes de 26 primates de la especie *A. l. lemurinus*, adultos, de los cuales cinco se utilizaron para cultivo e infección inducida con *P. falciparum*-FVO y los 26 restante se emplearon para los ensayos *ex vivo* de monitoreo de citoquinas en PBMC; los individuos se clasificaron según tiempo de exposición previa a *P. falciparum*/*P. vivax* y tratamientos aplicados (Tabla 3 y 4).

## **2.3. Método experimental**

### **2.3.1. Inoculación y cultivo de *Plasmodium* sp. *in vivo***

A 5 primates se les indujo infección por *P. falciparum*. La cepa utilizada para la obtención de antígenos fue *P. falciparum*-FVO (criopreservadas en nitrógeno líquido), la cual fue descongelada mediante el protocolo por gradiente salino utilizando soluciones de NaCl al 12%, 1.67% y 0.9%.

La inoculación fue realizada en los animales mediante punción directa de la vena safena utilizando una muestra de  $4 \times 10^7$  eritrocitos infectados. Se mantuvo el periodo de

infección durante 16 a 21 días. Se aplicó Mefloquina (25 mg/Kg) como tratamiento para detener la infección.

### **2.3.2. Toma de muestra para monitoreo de parasitemia**

Desde el 5to día post-infección, se llevó a cabo el monitoreo de la progresión de la parasitemia de cada individuo. Se tomaron 25-50  $\mu$ L de sangre periférica por punción de la vena marginal de la oreja de cada individuo. Este volumen de sangre fue suficiente para preparar papeles de filtro y posteriormente realizar la extracción de ADN para cuantificación de parasitemia. De igual forma se monitorizó la parasitemia por microscopía óptica en extendidos teñidos con colorante Giemsa.

Al finalizar la infección se tomaron muestras de antígeno crudo utilizando 3 mL de sangre venosa, se separaron los eritrocitos mediante centrifugación a 800 x g durante 20 minutos en un tubo cónico de 15 mL con 3 mL de Ficoll-Histopaque (o Lymphoprep como alternativa). Luego se aspiró el plasma y la capa leucocitaria, dejando solo la capa eritrocitaria, la cual fue lavada con solución isotónica salina tamponada con fosfato (PBS 1X, pH 7.4) o medio RPMI incompleto mediante centrifugaciones a 250 x g durante 10 minutos. Los antígenos obtenidos del parásito crudo se purificarán a partir de las muestras de eritrocitos utilizando un separador magnético MACS® de columna LD en 5 mL de buffer PBS 1X pH 7.2 y 0.5% BSA (Albumina de suero bovino). La concentración de los antígenos obtenidos fue determinada por espectrofotometría, los mismos se congelaron a -20°C para su uso posterior.

### 2.3.3. Extracción de ADN de *P. falciparum*-FVO y PCR

La extracción del ADN genómico se realizó a partir de las muestras de sangre en el papel filtro utilizando el kit de extracción PureLink Genomic DNA Mini (Invitrogen, N° K1820-01), siguiendo el protocolo del fabricante.

### 2.3.4. Análisis cuantitativo de la carga parasitaria por qPCR

Para cuantificar la carga parasitaria de los especímenes infectados, se construyó una curva estándar con producto de PCR de cantidad conocida (número de copias-parásito/ $\mu$ L). El producto de PCR se obtuvo mediante amplificación del gen 18S rRNA utilizando los cebadores específicos (forward: Plasmo 1 (5'-GTTAAGGGAGTGAAGACGA TCAGA-3'), reverse: Plasmo 2 (5'-AACCCAAAGACTTTGATTTC TCATAA-3')) utilizando como plantilla ADN genómico de *Plasmodium falciparum*-FVO. La mitad del producto de PCR se purificó con el Kit comercial PureLink PCR Purification (Invitrogen, no. K3100-01 y K3100-02) y siguiendo la recomendación del fabricante, con un lavado y una elución con un volumen final de 50  $\mu$ L. Se cuantificó utilizando un espectrofotómetro de UV NanoDrop 2000.

La cuantificación de la carga parasitaria se realizó por medio de una qPCR utilizando los *primers* Plasmo1/2 y sondas Taqman siguiendo el siguiente protocolo de termociclado: 95°C por 1 min. y 45 ciclos sucesivos de desnaturalización a 95°C por 10 seg., hibridación a 50°C por 15 seg., elongación a 72°C por 90 seg. y una elongación final a 72°C por 5 min., utilizando un termociclador de tiempo real Applied Biosystems Quant Studio 5. Los datos fueron procesados con el programa QuantStudio Software V1.5 y la carga parasitaria se estableció por medio de la curva estándar.

### **2.3.5. Toma de muestra para la obtención de PBMC para cultivo**

Se tomó una muestra de sangre venosa de 2 mL en tubos con CPDA (citrato fosfato dextrosa adenina) de cada animal de estudio a intervalos de tres días. En un tubo cónico de 15 mL, se agregó 2 mL de Ficoll-Histopaque (o Lymphoprep) a temperatura ambiente y se adicionó cuidadosamente los 2 mL de sangre total sobre la capa de esta solución. Cada muestra se centrifugó a 800 x g durante 20 minutos exactos a temperatura ambiente, separando plasma, capa leucocitaria y capa eritrocitaria. El plasma fue desechado cuidadosamente a 0.5 cm de la interfaz opaca (capa leucocitaria) que contiene células blancas. La capa leucocitaria se transfirió con cuidado a un tubo cónico de 15 mL limpio para su lavado, añadiendo 10 mL de solución isotónica salina tamponada con fosfato (PBS pH 7.4) o medio de cultivo RPMI suplementado con suero fetal bovino al 10% inactivado por calor, mezclando y resuspendido suavemente. Se realizó una nueva centrifugación a la muestra a 250 x g durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante. Posteriormente, se volvió a resuspender el sedimento celular con 5 mL de PBS o medio de cultivo RPMI suplementado, se centrifugó a 250 x g durante 10 minutos y se repitieron los pasos anteriores. El sobrenadante se descartó y el sedimento celular se suspendió en 0.5 mL de PBS o medio de cultivo RPMI suplementado. La muestra de PBMC se separó en 3 porciones: una para ser utilizada *in situ*, y las otras 2 se criopreservaron para su uso posterior en caso de tener que repetir algún ensayo (Fig. 2).

### **2.3.6. Criopreservación de PBMC**

A dos alícuotas de PBMC se les añadió 500 µL de medio de criopreservación compuesto por FBS (Suero fetal bovino) al 90% y DMSO (Dimetilsulfoxido) al 10%. La mezcla se homogenizó por pipeteo de forma pausada. Luego, se transfirió el homogenizado

a un criovial de forma rápida (no más de tres minutos) para evitar el estrés celular. Los crioviales se transfirieron a un sistema de enfriamiento controlado (Mr. Frosty) mientras se procesaban otras muestras. Después de este paso, las muestras se llevaron a la nevera de almacenamiento a -80 °C.

### **2.3.7. Estimulación y cultivo de PBMC**

Las PBMC se cultivarán en medio RPMI con glutamina 15 mM (Gibco), Hepes 10 mM, penicilina 200 U/mL (Gibco), estreptomicina 200 µg/mL (Gibco), gentamicina 3 mg/mL (Sigma) y bicarbonato sódico 2 g/L (Sigma) suplementado con suero fetal bovino inactivado (FCS) al 10% (Imunoquímica). Las células se tratarán con 10 µL del parásito crudo como antígeno con una cantidad aproximada de 200000 células/pocillo. Como adyuvante para potenciar la activación de las PBMC se utilizó 1µL (500 µg) de ODN (Oligodesoxinucliotidos sintéticos) 1968-TCGTCGCTGTTGTCGTTTCTT/2006, TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT (Jones et al., 1999; Mullen et al., 2008) y se separaron los cultivos entre células tratadas y no tratadas con ODN. Tanto las PBMC tratadas y no tratadas con el parásito + ODN se cultivaron a 37°C en platos de 48 pocillos en una incubadora con concentración de CO<sub>2</sub> al 5%. Las células y el sobrenadante del cultivo se analizaron después de 24, 48 y 72 horas (Fig. 2).

### **2.3.8. Ensayo inmunoenzimático, Luminex - Cuantificación de biomarcadores**

Los niveles de citoquinas se evaluaron mediante el Kit ProcartaPlex NHP Cytokine/Chemokine/GF 37plex de Invitrogen, el cual contiene perlas magnéticas para la detección de las citocinas: CD40L, G-CSF (CSF-3), IFN-α, IL-1RA, IL-7, IL-15; citocinas T helper: GM-CSF, IFN-γ, IL-1 beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 (CXCL8), IL-10, IL-

12p70, IL-13, IL-17A (CTLA-8), IL-18, IL-23, TNF- $\alpha$ ; quimiocinas: BLC (CXCL13), Eotaxin (CCL11), IP-10 (CXCL10), I-TAC (CXCL11), MCP-1 (CCL2), MIG (CXCL9), MIP-1 alpha (CCL3), MIP-1 beta (CCL4), SDF- alpha; y factores de crecimiento: BDNF, FGF-2, NGF beta, PDGF-BB, SCF, VEGF-A, VEGF-D, siguiendo el protocolo del fabricante.

Las perlas magnéticas se prepararon a partir de los Buffer concentrados del kit A, B, C y D a 50X, y el Universal Assay Buffer (UACB, 1X) en un vial limpio, del cual 80  $\mu$ L/pocillo se agregó a un plato de 96 pocillos suplementados por el kit. Las curvas estándar (Std) se prepararon con 50  $\mu$ L del UAB al Std Mix A buffer y al Std Mix B buffer, mezcladas por vortex. Se realizaron siete diluciones seriadas en tubos rotulados como Std1 al 7, comenzando con 200  $\mu$ L transfiriendo 50  $\mu$ L a cada tubo. Los lavados se llevaron a cabo con las perlas y 50  $\mu$ L de PBS 0.5X en cada pocillo sobre un plato magnético para evitar la pérdida de las perlas mientras se decanta el líquido de lavado por inversión. En cada pocillo se agregó 50  $\mu$ L de sobrenadante de cultivo de PBMC obtenidos a las 24, 48 y 72 h y se analizó por triplicado. Se cubrió el plato con un sello y tapa y se dejó en incubación a temperatura ambiente durante 12 h. Luego de la incubación, se realizó un lavado de las perlas y se preparó la mezcla de anticuerpos de detección al 1X agregando 50  $\mu$ L de cada concentrado de anticuerpos de detección (Ab Mix A, Ab Mix B, Ab Mix C y Ab Mix D) en un recipiente de mezcla junto con 2000  $\mu$ L del diluyente de detección Ab y 300  $\mu$ L de UAB. Se añadió 25  $\mu$ L/pocillo de esta mezcla y se dejó en incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos, realizando movimientos suaves para mezclar. Posterior a esto, se realizó un nuevo lavado al plato y se agregó 50  $\mu$ L/pocillo de

Streptavidin-PE, dejándolo incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos mientras se mueve lentamente para mezclar. Luego de esto, se realizó otro lavado de las perlas y se agregó 120  $\mu$ L/pocillo de Reading buffer, resuspendido varias veces, a un nuevo plato de 96 pocillos. Se dejó incubar por 5 minutos a temperatura ambiente agitando con movimientos leves. Finalmente, las muestras se analizaron mediante el programa XPONENT solution en un Sistema Luminex<sup>TM</sup> 100/200, Magpix<sup>TM</sup>.

### **2.3.9. Actividad de anticuerpos**

Con el fin de evaluar el tiempo de generación y mantenimiento de anticuerpos IgG frente a antígenos de superficie de eritrocitos infectados con *P. falciparum* se analizó el reconocimiento serológico de eritrocitos infectados por el plasma de mono recientemente infectados. Este análisis se realizó mediante citometría de flujo, siguiendo un protocolo descrito previamente (Quelhas 2011 Immunobiol; Magallón-Tejada 2016 PLoS Pathog.).

Para este análisis, se tomaron muestras de plasma en varios puntos durante la infección y hasta aproximadamente 180 días después de la inoculación (pre-inoculación, día 5, 8, 11, 13, 16, 21, 30, 60, 90 y 197 post-inoculación). Los plasmas obtenidos de los 4-5 primates infectados, se incubaron con una mezcla de eritrocitos no infectados para eliminar anticuerpos inespecíficos. El análisis de reconocimiento antigénico se realizó frente a una mezcla de eritrocitos infectados con Pf-FVO obtenidos de los primates experimentales. Se incluyeron dos controles de primates no infectados (naïve). El procesamiento de las muestras se realizó en una placa de 96 pocillos con fondo redondo bloqueada previamente con BSA 1% durante 2 horas. Se incubó, durante la noche y a temperatura ambiente, una suspensión de 50  $\mu$ L de parásitos purificados magnéticamente

(con 40-65% de parasitemia y 2% de hematocrito) con 50  $\mu$ L de plasma a una dilución 1/10. Para marcar las IgG de primates, se incubaron durante 1 h los eritrocitos infectados con 100  $\mu$ L de IgG de cabra anti-mono rhesus conjugada con PE (ab125852) y 10  $\mu$ L de iQ SYBR Green (Bio-Rad) para teñir los núcleos de los parásitos. Las células se lavaron tres veces entre cada paso de incubación. Todos los bloqueos de placas, diluciones y lavados se realizaron utilizando solución salina tamponada con fosfato (PBS, SIGMA) con 1% de albúmina de suero bovino (BSA, SIGMA).

La adquisición de datos se llevó a cabo utilizando un citómetro de flujo Becton Dickinson LSR Fortessa y se analizaron utilizando el software FlowJo v10.8.1 (Becton Dickinson & Company). Los eritrocitos infectados y no infectados se distinguieron basándose en la señal de fluorescencia de iQ SYBR Green (canal FITC), y se evaluó la reactividad contra la superficie de los eritrocitos infectados midiendo la fluorescencia detectada en el canal PE. La reactividad contra los eritrocitos infectados se expresó como la diferencia entre la intensidad de fluorescencia media geométrica (MFI) de los eritrocitos infectados y la MFI de los eritrocitos no infectados.

#### **2.4. Análisis de datos**

La distribución de los datos obtenidos se analizó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Se aplicaron pruebas no paramétricas de Wilcoxon y Kruskal-Wallis de suma de rangos. Como post hoc se empleó la Prueba para cada par mediante Wilcoxon. Se elaboraron gráficos de caja-barras y lineal para visualizar las concentraciones de citoquinas (expresadas en pg/mL) según tiempo de medición experimental y para observar

el comportamiento del grado de parasitemia durante la infección. La asociación entre citoquinas y tiempo de infección se realizó un Biplot con un Análisis de Componentes Principales (PCA). Para determinar el efecto del tiempo previo de los monos *Aotus* sp. expuestos a *Plasmodium* en la expresión de citocinas, se elaboró un diagrama de Telaraña y la significancia se determinó mediante una prueba de Wilcoxon y Kruscal-Wallis de suma de rangos. Los análisis se llevaron a cabo utilizando los programas JUMP 14.0, Graph Pad v6.0 y Rstudio v4.3.3.

## **CAPITULO III: PRODUCTO**

### 3.1. Resultados y discusión

#### 3.1.1. Evaluación de la parasitemia en el cultivo *in vivo* de *Plasmodium*

La población de estudio analizada (n= 26 individuos) estaba compuesta por monos de la especie *Aotus lemurinus lemurinus*, todos eran machos, adultos, con edades mayores de 15 años (85%) en su mayoría. Cinco de estos animales de prueba se utilizaron para el cultivo de la cepa de *P. falciparum*-FVO en un sistema de infección *in vivo*. Luego de la inoculación, la parasitemia progresó de igual forma en los cinco individuos calculando diariamente la carga parasitaria, con una medición de tiempo total de hasta 21 días post-infección. La comparación gráfica de carga parasitaria por individuo a escala  $\text{Log}_{10}$  muestra que la infección mantuvo un comportamiento similar entre todos los sujetos de prueba, siendo que en etapas tempranas de la infección (5 días) el conteo de parásitos osciló entre 11.00 y 72.00 parásitos/ $\mu\text{L}$  y para el día 15 (infección tardía) se observó una densidad de entre 1171450.00 y 7471.00 parásitos/ $\mu\text{L}$  (Fig. 3). A pesar de mantener una carga parasitaria muy parecida, las diferencias sutiles podrían deberse a características inherentes del propio individuo, sin embargo, la técnica de qPCR utilizada, mostro ser confiable para la detección y cuantificación de *Plasmodium* en sangre, aún a bajas densidades, en etapas tempranas de la infección. Algunos autores adjudican que la qPCR es una técnica muy sensible para la detección de *Plasmodium*, pudiendo diferenciar entre monoinfecciones e infecciones mixtas por *P. falciparum*/*P. vivax*, en comparación a microscopia o pruebas de diagnóstico rápido (PDR) (Abebe et al., 2023), debido a que puede darse error humano o a la concentración de antígenos aun persistentes después de la eliminación del parásito para las PDRs (Das et al., 2017; Jang et al., 2019).

### 3.1.2. Concentración de citocinas en plasma de *A. l. lemurinus* durante la infección por *P. falciparum*-FVO

El IFN- $\gamma$  mantuvo un aumento significativo en su concentración en plasma ( $p=0.0009$ ) para el periodo medio de infección (11- 13 días) en los monos de prueba (Fig. 4), los reportes sobre infección palúdica indican que el IFN- $\gamma$  tiende a disminuir con la progresión de la enfermedad por *P. falciparum*, mencionando que la IL-10 podría inhibir la producción de IFN- $\gamma$  (Oyegue-Liabagui et al., 2017), sin embargo, dado los tiempos de infección no se observó esta relación interferente entre estos biomarcadores durante el experimento, ya que la IL-10 también mantuvo concentraciones elevadas durante el periodo de infección media y tardía ( $p= 0.0007$ ). Niveles bajo de IFN- $\gamma$  se relacionan con el aumento de la parasitemia por contribuir al control del ciclo vital y crecimiento del parásito, sin embargo, otras investigaciones afirman que la expresión de esta citocina puede ser inespecífica, por lo cual podría o no darse un aumento de esta en sangre dependiendo de la severidad de la infección y factores como el tipo de especie de *Plasmodium* infectante (Oyegue-Liabagui et al., 2017; Salwati et al., 2011).

Para el TNF- $\alpha$  se observó un cambios significativos ( $p= 0.0008$ ) desde la etapa temprana de la infección (5 – 8 días) hasta el periodo tardío (16-21 días) de la infección (Fig. 4); esta citocina inflamatoria producida por macrófagos y monocitos regula también el crecimiento del parásito en eritrocitos infectados, tanto en etapas tempranas como tardías de la infección (Lapinet et al., 2000; Lyke et al., 2004; Popa & Popa, 2021).

La IL-2 tuvo un cambio significativo para el periodo tardío de la infección ( $p= 0.0072$ ), de igual forma, la IL-6 aumentó significativamente en el periodo temprano de la infección ( $p= 0.0006$ ) disminuyendo para el periodo medio hasta el periodo tardío de la

infección. La literatura indica que niveles moderados a elevados de esta citocina es un indicativo de malaria leve, y como respuesta a la infección promueve la expresión de otros biomarcadores como IL-6, IL-8, IL-10, la IL-4 que mantuvo un aumento en la etapa tardía de la infección ( $p= 0.0051$ ), al igual que la IL-5 ( $p= 0.0017$ ), o IL-13 que aumento su concentración el periodo medio y tardío de la infección ( $p= 0.0011$ ) y células de la defensa interviniendo en su diferenciación (Costa et al., 2020; Malek, 2008; Prakash et al., 2006). La IL-10 hacia el día 15 mostró un aumento un aumento significativo (Fig. 5) que se mantuvo hacia los 20 días de infección ( $p= 0.0007$ ), este incremento se vincula al proceso de patogenia por posiblemente la supresión de la respuesta Th1 derivada del proceso de fagocitosis de la hemozoína, lo que eleva su producción para controlar la activación de los fagocitos y expresión de otras citocinas proinflamatorias (Lyke et al., 2004; Oyegue-Liabagui et al., 2017).

La IL-1 $\beta$  (Fig. 4) solo tuvo aumento en el periodo temprano de infección ( $p= 0.0108$ ), sabiendo que este es un regulador de la inflamación que participa en varias respuestas inmunes innatas principalmente (Dinarello, 2009), dado que esta interleucina proinflamatoria es sintetizada por los macrófagos, participa en procesos febriles y homeostasis celular, pero mantiene niveles elevados en malaria grave en comparación a la malaria no complicada (Mahittikorn et al., 2022), por lo que podemos deducir que los *Aotus* infectados no desarrollaron esta etapa de la infección, corroborado por la expresión de otras interleucinas estudiadas.

La IL-17A mantuvo un aumento gradual (Fig. 4) durante todo el periodo de infección ( $p= 0.0005$ ), esto debido a que, a los 20 días de experimento, por lo presentado con las demás interleucinas, los animales infectados entran en la fase aguda de la malaria,

como lo reportan algunas fuentes, citando que la expresión de IL-17 reduce la intensidad del parásito y protegen de la malaria complicada durante esta etapa (McGeachy et al., 2019; Rodrigues-da-Silva et al., 2014).

La IL-8, -15, -12, -23, el MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , VEGF-D, BLC y SDF-1 $\alpha$  no mostraron cambios significativos de concentración (Fig. 4 y 6) en plasma a lo largo de los 20 días de infección. Esto puede deberse a que por lo ya establecido de que a los 20 días los ejemplares estaban entrando a la etapa de malaria aguda, donde los reportes afirman que los valores elevados de MCP-1 indican malaria aguda, mientras que la expresión de MIP-1 $\alpha$  se asocia con actividad de quimiotaxis para las células de la defensa y también se asocia a la malaria aguda, aunque también está presente en la etapa crónica (Dechkum et al., 2006; Dobbs et al., 2020; Hojo-Souza, 2017; Stoiser et al., 2000). Mientras tanto, la IL-8 generalmente aumenta su concentración a inicios de la malaria aguda para el reclutamiento de neutrófilos en la eliminación del del parásito (Dobbs et al., 2020; McGeachy et al., 2019; Rodrigues-da-Silva et al., 2014). El factor 1 derivado de células del estroma aunque no mostro incremento indicando un posible cuadro de anemia moderada y se asocia a una restricción del reclutamiento de los neutrófilos, aunque esto no se observó en el estudio, se sabe que si es una molécula mediadora de la respuesta inflamatoria (Klei et al., 2019; Otieno, 2010).

En este ensayo se pudo observar también asociaciones entre las citocinas medidas en plasma sanguíneo y la progresión de la infección (81%), durante los 20 días de infección (Fig. 7). Los resultados muestran que hay más afinidad entre individuos expuestos por primera vez a la infección por *P. falciparum* y las citoquinas IL-18, IL-15; mientras que para los tiempos de infección temprana y media (5-15 días) hay más asociación entre individuos que previamente habían sido expuestos al parásito y las citocinas VEGF-D,

MIP-1a, MCP-1, CD40L, BLC, VEGF-A, IL-10, IL-8, IL-1b e INF- $\gamma$ , mientras que, para infecciones tardías (20 días), IL-4, IL-13, IL-17A, IL-2, IL-12P70, SDF-1A, IL-5, IL6.

Los monos del género *Aotus* sp. son el modelo de infección más empleado para el estudio de la malaria humana causada por *P. falciparum* y *P. vivax*, tanto para estudios del entendimiento de la evolución de la infección, como para la evaluación de vacunas y antimaláricos u otros modelos de susceptibilidad (ej. Virus de Epstein Barr, *C. jejuni* o *E. coli* ETEC) (Calderon et al., 2006; Epstein et al., 1973; P. Sánchez et al., 2015), por lo que los resultados de parasitemia y expresión de biomarcadores obtenidos son aceptables ya que para estudios de malaria, los mono *Aotus* sp. cumplen con una serie de características tales como 1) No ser susceptibles de forma natural a la infección, 2) Mostrar una respuesta positiva a la infección en condiciones experimentales o 3) Presentar diferencias a la susceptibilidad de la infección con diversas cepas de *Plasmodium* (Giraldo et al., 1986), por lo que la información recopilada puede ser extrapolada a la infección en el ser humano.

### **3.1.3. Medición de la actividad de anticuerpos**

Mediante citometría de flujo se logró observar la presencia y generación de inmunoglobulinas de los individuos infectados con Pf-FVO. Para todos los individuos, se pudo constatar el aumento de inmunoglobulinas a medida que aumentaban los días de infección, en total 197 días. El valor máximo de fluorescencia fue de 12352.52 MFI (Mean Fluorescence Intensity) y el valor mínimo fue de 1121.91 MFI. Estos resultados indican actividad de producción de anticuerpos a medida que progresa la malaria y posteriormente al tratamiento con la droga antimalárica (Fig. 8).

### 3.1.4. Medición de citoquinas en cultivos de PBMC

Los cultivos de PBMC mostraron un perfil de expresión de citoquinas visiblemente mediada por el tiempo de infección y por el tiempo en que el individuo estuvo previamente expuesto a la infección. Los grupos que estuvieron expuestos al parásito hace menos de 10 años mostraron más asociación a la expresión de citocinas como IL-2, IL-6, IL-4, IL-8, IL-12 e IFN- $\gamma$ , estas se expresaron en el cultivo tanto con solo el lisado de *Plasmodium* como el lisado más ODN, por lo que se puede constatar que los ODN pueden estimular la expresión de citoquinas durante los periodos de infección temprana del cultivo celular, también el número de veces de exposición influyo en los resultados ya que pudo observar asociación entre células de individuos expuestos a *Plasmodium* dos veces en más de 15 años. Por otro lado, la IL-1b, IL-4, IL-5, IL-15, IL-10 y TNF- $\alpha$  se asocia más a infecciones tardías en PBMC de sujetos que estuvieron expuestos previamente una vez entre 1 y  $\leq 5$  años a *Plasmodium*. Además, el análisis muestra que la asociación entre estas citocinas y las células con una exposición previa a *Plasmodium* es de 94.7% (Fig. 9).

Las células de los individuos expuesto una vez en a *P. falciparum* más de 15 años, menos de 10 años o una vez expuesto a *P. vivax* en menos de cinco años, no mostraron asociación relevante en la expresión de citocinas durante los periodos de infección, indicando que la memoria celular, en cuanto a la secreción de citocinas, si esta influenciada por los tiempos y número de veces de exposición previa al parasito, siendo que para que se expresen citocinas en un periodo de 15 años de exposición previa, la misma debió darse al menos dos veces.

Para las asociaciones antes mencionadas, a fin de encontrar el periodo de tiempo que influye en una alta expresión de citocinas, se corroboró de forma descriptiva mediante un diagrama de telaraña (Fig. 10). Los datos muestran que una respuesta efectiva de citoquinas se da de forma eficaz para individuos que tuvieron una infección previa a malaria y se reinfectan en un periodo de tiempo menor a un año, además esta respuesta se puede ver potenciada por el uso de ODN. En segundo lugar, los grupos infectados una vez en menos de 5 años, y dos veces en menos de 10 años, para los grupos donde la exposición previa fue mayor a 15 años, la respuesta de citocinas es moderada, pero en el experimento, fue evidente el aporte de los ODN, que aumento la expresión de citocinas. Para determinar la significancia de estas afirmaciones, se realizó una prueba de Wilcoxon y Kruscal-Wallis de suma de rangos y como post hoc una prueba para cada par por Wilcoxon. Cada prueba se realizó con cada citocina medida encontrando diferencias entre los grupos elys, elysodn y elysodnc (grupos con una exposición previa a la infección menor a un año) así como entre los grupos g3lys, g3lysodn, g4lysodn, g5lys y g5lysodn (grupos con una exposición previa al parasito en menos de 5 años y 2 exposiciones menos de 10 años), además de evidenciar que los ODN en cada grupo aumentó la expresión de citocinas de forma significativa ( $p < 0.05$ ) para cada grupo por cada citocina medida (Fig. 11-23).

En cuanto al uso de ODN, se pudo observar que hubo un aumento significativo en la producción de TNF- $\alpha$  en presencia de ODN ( $p = 0.03$ ), principalmente para los cultivos de las células de primates infectados hace menos de un año (elys), también se dio el mismo comportamiento para IL-4 en este grupo. Para los primates infectados una vez en cinco o menos años (g3lys), también se observó un cambio en cuanto a la expresión de IL-17A con ODN ( $p = 0.003$ ). En las demás interleucinas no se registraron cambios significativos de su

expresión en presencia o no de ODN ( $p > 0.05$ ). Debemos tener en cuenta que el TNF- $\alpha$  se secreta durante los procesos de fagocitosis y en etapas tardías de la malaria por lo cual es una de las principales citocinas inflamatorias del cuerpo que regula la reproducción del parásito, más aún la presencia de ODN, mismo patrón que se observó en IL-4 que regula la producción de anticuerpos, lo que indica que en menos de un año, aun los linfocitos guardan memoria para su producción y IL-17A que reduce la intensidad del parásito (Lapinet et al., 2000; Lyke et al., 2004; McGeachy et al., 2019; Popa & Popa, 2021; Rodríguez Pin & López Anchundia, 2020). Por otro lado, los ODN parecen solo aumentar la respuesta de estas interleucinas en periodos reinfecciones donde la primera exposición haya sido menor a cinco años, además de contribuir de mejor forma en el aumento de TNF- $\alpha$  en reinfecciones cuya exposición anterior sea menor a un año.

## Conclusión y Recomendaciones

En este trabajo se alcanzaron los siguientes objetivos: **i)** Evaluar *in vivo* el perfil de citocinas en primates *A. l. lemurinus* durante la infección inducida por *P. falciparum* o *P. vivax*, **ii)** Evaluar el reconocimiento antigénico (IgG de primates *A. l. lemurinus*) contra a eritrocitos infectados por *P. falciparum*, **iii)** Caracterizar *in vitro* el perfil de citocinas expresado por células mononucleares de sangre periférica obtenidas de primates *A. l. lemurinus* previamente infectados por *P. falciparum* o *P. vivax*.

Por lo que podemos concluir:

- El modelo *A. l. lemurinus* es robusto para estudiar la progresión de la malaria y respuesta inmune, con resultados satisfactorios y extrapolables al ser humano.
- La respuesta inmune humoral de memoria mediada por citocinas se ve influenciada por la exposición previa al parásito para cuadros infecciosos más recientes.
- El número de veces que un organismo ha estado expuesto a la infección por *Plasmodium* también influye en la expresión de citocinas.
- Para que la expresión de citocinas sea efectiva en el caso de reinfecciones, el tiempo previo a la exposición a la malaria debe haber sido menor a 5 años.
- Para individuos que tuvieron un cuadro de malaria en un tiempo mayor a 15 años, si la exposición al parásito se dio más de una vez, la expresión de citocinas será efectiva en el caso de exponerse nuevamente a *Plasmodium*.
- Para casos de reinfección donde la exposición previa sea menor a uno o cinco años, el uso de ODN aumenta la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-17A.

## Literatura citada

- Arias, A. A., & Soto Bigot, M. A. (2009). Malaria (Revisión Bibliográfica). *Revista Medica de Costa Rica y Centroamerica*, LXVI(587), 89–93.
- Beauperthuy, L. D. (1854). Transmision de Fiebre Amarilla y otras enfermedades por mosquitos. *Gaceta Oficial de Cumana*, 57(4).
- Boddey, J. A., & Cowman, A. F. (2013). *Plasmodium* nesting: Remaking the erythrocyte from the inside out. *Annual Review of Microbiology*, 67, 243–269. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155730>
- Boyd, M. F. (1949). *Malariology* (2 Vols.). Saunders.
- Buery, J. C., de Alencar, F. E. C., Duarte, A. M. R. de C., Loss, A. C., Vicente, C. R., Ferreira, L. M., Fux, B., Medeiros, M. M., Cravo, P., Arez, A. P., & Cerutti Junior, C. (2021). Atlantic forest malaria: A review of more than 20 years of epidemiological investigation. *Microorganisms*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010132>
- Burns, J. M., Miura, K., Sullivan, J., Long, C. A., & Barnwell, J. W. (2016). Immunogenicity of a chimeric *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein vaccine in *Aotus* monkeys. *Malaria Journal*, 15(1).
- Calderon, M., Parra-López, C., Alfonso, R., Barato, P., Giraldo, D., Pinto, M., & Patarroyo, M. A. (2006). Mycobacterium tuberculosis ESAT-6 antigen immunogenicity in Owl Monkeys. *Nova*, 4(5), 14–26. <https://doi.org/10.22490/24629448.344>
- Cawthon Lang, K. (2005). *Primate Factsheets: Owl monkey (Aotus) Taxonomy, Morphology & Ecology*.
- Chavatte, J. M., Chiron, F., Chabaud, A., & Landau, I. (2007a). [Probable speciations by “host-vector ‘fidelity’”: 14 species of *Plasmodium* from magpies]. *Parasite (Paris, France)*, 14(1), 21–37. <https://doi.org/10.1051/parasite/2007141021>
- Chavatte, J. M., Chiron, F., Chabaud, A., & Landau, I. (2007b). [Probable speciations by “host-vector ‘fidelity’”: 14 species of *Plasmodium* from magpies]. *Parasite (Paris, France)*, 14(1), 21–37. <https://doi.org/10.1051/parasite/2007141021>
- Coatney, R. (1971). *The Primate Malarias* (National I). U.S. Department of Health, Education and Welfare.

- Collins, W. E. (2002). Nonhuman primate models. II. Infection of *Saimiri* and *Aotus* monkeys with *Plasmodium vivax*. *Methods in Molecular Medicine*, 72, <https://doi.org/10.1385/1-59259-271-6:85>.
- Costa, A. G., Chaves, Y. O., Teixeira-Carvalho, A., Ramasawmy, R., Ribeiro Valle Antonelli, L., Barbosa, L., Balieiro, A., Wuelton Monteiro, M., Mourão, M. P., Guimarães Lacerda, M. V., Martins-Filho, O. A., Maranhão Costa, F. T., Malheiro, A., & Nogueira, P. A. (2020). Increased platelet distribution width and reduced IL-2 and IL-12 are associated with thrombocytopenia in *Plasmodium vivax* malaria. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 115, e200080.
- Cowman, A. F., Berry, D., & Baum, J. (2012). The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *Journal of Cell Biology*, 198(6), 961–971. <https://doi.org/10.1083/jcb.201206112>
- Cowman, A. F., & Crabb, B. S. (2006). Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell*, 124(4), 755–766. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.006>
- Cowman, A. F., Healer, J., Marapana, D., & Marsh, K. (2016). Malaria: Biology and Disease. In *Cell* (Vol. 167, Issue 3, pp. 610–624). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.055>
- Cowman, A. F., Tonkin, C. J., Tham, W. H., & Duraisingh, M. T. (2017). The Molecular Basis of Erythrocyte Invasion by Malaria Parasites. In *Cell Host and Microbe* (Vol. 22, Issue 2, pp. 232–245). <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.07.003>
- Craig, A. G., Grau, G. E., Janse, C., Kazura, J. W., Milner, D., Barnwell, J. W., Turner, G., & Langhorne, J. (2012). The role of animal models for research on severe malaria. *PLoS Pathogens*, 8(2).
- Dechkum, N., Hananantachai, H., Patarapotikul, J., Ohashi, J., Krudsood, S., Looareesuwan, S., & Tokunaga, K. (2006). Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) gene polymorphism is not associated with severe and cerebral malaria in Thailand. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 59(4), 239–244.
- Dobbs, K. R., Crabtree, J. N., & Dent, A. E. (2020). Innate immunity to malaria-The role of monocytes. *Immunological Reviews*, 293(1), 8–24.
- Duque, S., Montenegro-James, S., Arévalo-Herrera, M., Praba, A. D., Villinger, F., Herrera, S., & James, M. A. (1998). Expression of cytokine genes in *Aotus* monkeys immunized with synthetic and recombinant *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* antigens. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 92(5), 553–559.
- Egan, A. F., Fabucci, M. E., Saul, A., Kaslow, D. C., & Miller, L. H. (2002). *Aotus* New World monkeys: model for studying malaria-induced anemia. *Blood*, 99(10), 3863–3866.

- Epstein, M., Hunt, R., & Rabin, H. (1973). Pilot experiments with EB virus in owl monkeys (*Aotus trivirgatus*). I. reticuloproliferative disease in an inoculated animal. *International Journal of Cancer*, *12*, 309–318.
- Finlay, C. (1881). El Mosquito hipotéticamente considerado como agente de transmisión de la Fiebre Amarilla. *Anales de La Real Academia de Ciencias Médicas Físicas y Naturales de La Habana*, *18*, 147–152.
- Florens, L., Washburn, M. P., Raine, J. D., Anthony, R. M., Grainger, M., Haynes, J. D., Moch, J. K., Muster, N., Sacci, J. B., Tabb, D. L., Witney, A. A., Wolters, D., Wu, Y., Gardner, M. J., Holder, A. A., Sinden, R. E., Yates, J. R., & Carucci, D. J. (2002). A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature*, *419*(6906), 520–526. <https://doi.org/10.1038/nature01107>
- Flores, F. A. (1886). Historia de la Medicina en México: desde la época de los indios hasta la presente. In *Ciudad de México Editorial*.
- Galaway, F., Yu, R., Constantinou, A., Prugnolle, F., & Wright, G. J. (2019). Resurrection of the ancestral RH5 invasion ligand provides a molecular explanation for the origin of *P. falciparum* malaria in humans. *PLoS Biology*, *17*(10), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000490>
- Giraldo, A., Buenos, M., Silva, E., Ramírez, J., Umaña, J., & C, E. (1986). Estudio citogenético de 288 *Aotus* colombianos (1). *Biomédica*, *6*(1–2), 5–13.
- Gorgas, M. D., & Hendrick, B. J. (1924). William Crawford Gorgas, his life and work. In *Lea Febiger*.
- Guerrero, J. E., Pacheco, D. P., Suárez, C. F., Martínez, P., Aristizabal, F., Moncada, C. A., Patarroyo, M. E., & Patarroyo, M. A. (2003). Characterizing T-cell receptor  $\gamma$ -variable gene in *Aotus nancymae* owl monkey peripheral blood. *Tissue Antigens*, *62*(6), 472–482.
- Hernández, E., Suárez, C., Méndez, J., Echeverry, S., Murillo, L., & Patarroyo, M. (2002). Identification, cloning, and sequencing of different cytokine genes in four species of owl monkey. *Immunogenetics*, *54*(9), 645–653.
- Herrera, M. A., Rosero, F., Herrera, S., Caspers, P., Rotmann, D., Sinigaglia, F., & Certa, U. (1992). Protection against malaria in *Aotus* monkeys immunized with a recombinant blood-stage antigen fused to a universal T-cell epitope: correlation of serum gamma interferon levels with protection. *Infection and Immunity*, *60*(1), 154–158.

- Herrera, S., Perlaza, B., Bonelo, A., & Arévalo-Herrera, M. (2002). *Aotus* monkeys: their great value for antimalaria vaccines and drug testing. *Int J Parasitol* 2002, 32, 1625–1635.
- Hojo-Souza, N. S. (2017). On the cytokine/chemokine network during *Plasmodium vivax* malaria: new insights to understand the disease. *Malaria Journal*, 16(1), 42.
- Huff, C. G. (1945). A consideration of the problems of evolution of malaria parasites. *Rev. Inst. Salud. Enferm Trop. Mex*, 6, 253–258.
- Jones, T. R., Obaldia, N., Gramzinski, R. A., Charoenvit, Y., Kolodny, N., Kitov, S., Davis, H. L., Krieg, A. M., & Hoffman, S. L. (1999). Synthetic oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance immunogenicity of a peptide malaria vaccine in *Aotus* monkeys. *Vaccine*, 17(23–24), 3065–3071. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(99\)00145-0](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(99)00145-0)
- Josling, G. A., & Llinás, M. (2015). Sexual development in *Plasmodium* parasites: Knowing when it's time to commit. *Nature Reviews Microbiology*, 13(9), 573–587. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3519>
- Kalantari, N., & Ghaffari, S. (2013). Identification and characterization of the antigens expressed on the surface of human erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Iranian Journal of Parasitology*, 8(2), 197–206.
- 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.
- Karen, K. A., Deal, C., Adams, R. J., Nielsen, C., Ward, C., Espinosa, D. A., Xie, J., Zavala, F., & Ketner, G. (2015). A replicating adenovirus capsid display recombinant elicits antibodies against *Plasmodium falciparum* sporozoites in *Aotus nancymaae* monkeys. *Infection and Immunity*, 83(1), 268–275.
- Katsumura, T., Fukuyo, Y., Kawamura, S., & Oota, H. (2016). A comparative study on the regulatory region of the PERIOD1 gene among diurnal/nocturnal primates. *Journal of Physiological Anthropology*, 35(1), 21.
- Langermans, J. A. M., Vervenne, R. A. W., Hersbach, J., & Thomas, A. W. (2000). Reactivity of human T-lymphocyte-specific antibodies with peripheral blood mononuclear cells and spleen of *Aotus azarae* ssp. *boliviensis* (owl monkey). *Journal of Medical Primatology*, 29(6), 397–401.
- Lapinet, J. A., Scapini, P., Calzetti, F., Pérez, O., & Cassatella, M. A. (2000). Gene expression and production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta (IL-1beta), IL-8, macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha), MIP-1beta, and

gamma interferon-inducible protein 10 by human neutrophils stimulated with group B meningococci. *Infection and Immunity*, 68 (12), 6917–6923.

Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B. M., Leedale, G. F., Loeblich, A. R. 3rd, Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E. G., Page, F. C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J., & Wallace, F. G. (1980). A newly revised classification of the protozoa. *The Journal of Protozoology*, 27(1), 37–58. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1980.tb04228.x>

Lyke, K., Burges, R., Cissoko, Y., Sangare, L., Dao, M., Diarra, I., Kone, A., Harley, R., Plowe, C., Doumbo, O., & Sztein, M. (2004). Serum Levels of the Proinflammatory Cytokines Interleukin-1 Beta (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-8, IL-10, Tumor Necrosis Factor Alpha, and IL-12(p70) in Malian Children with Severe *Plasmodium falciparum* Malaria and Matched Uncomplicated Malaria or Healthy Controls. *Infection and Immunity*, 72(10), 5630–5637.

Malek, T. R. (2008). The biology of interleukin-2. *Annual Review of Immunology*, 26, 453–479.

May, H. O., & White, N. J. (1999). Molecular mechanisms of cytoadherence in malaria. *American Journal of Physiology*, 276(6 PART 1).

McCallum, F. J., Birrell, G. W., Chavchich, M., Harris, I., Obaldia, N., Van Breda, K., Heffernan, G. D., Jacobus, D. P., Shanks, D., & Edstein, M. D. (2020). In vivo Efficacy and Pharmacokinetics of the 2-Aminomethylphenol Antimalarial JPC-3210 in the *Aotus* Monkey-Human Malaria Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(3).

McGeachy, M. J., Cua, D. J., & Gaffen, S. L. (2019). The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. *Immunity*, 50(4), 892–906.

Mullen, G. E. D., Ellis, R. D., Miura, K., Malkin, E., Nolan, C., Hay, M., Fay, M. P., Saul, A., Zhu, D., Rausch, K., Moretz, S., Zhou, H., Long, C. A., Miller, L. H., & Treanor, J. (2008). Phase 1 trial of AMA1-C1/Alhydrogel plus CPG 7909: An asexual blood-stage vaccine for *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS ONE*, 3(8).

Navarro, M. A., Arbonés, J. M., Acín, S., Carnicer, R., Sarría, A. J., Surra, J. C., Arnal, C., Martínez, M. V., & Osada, J. (2005). Animales de experimentación utilizados como modelos en la investigación de la arteriosclerosis. *Clínica e Investigación En Arteriosclerosis*, 17(2), 82–93. [https://doi.org/10.1016/s0214-9168\(05\)73320-9](https://doi.org/10.1016/s0214-9168(05)73320-9)

Nguee, S. Y. T., Júnior, J. W. B. D., Epiphanyo, S., Rénia, L., & Claser, C. (2022). Experimental Models to Study the Pathogenesis of Malaria-Associated Acute Respiratory Distress Syndrome. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 12.

- Obaldia, N. III. (2007). Clinico-pathological observations on the pathogenesis of severe thrombocytopenia and anemia induced by *Plasmodium vivax* infections during antimalarial drug efficacy trials in *Aotus* monkeys. *Am J Trop Med Hyg*, 77, 3–13.
- Obaldia, N., Stockelman, M. G., Otero, W., Cockrill, J. A., Ganeshan, H., Abot, E. N., Zhang, J., Limbach, K., Charoenvit, Y., Doolan, D. L., Tang, D. C. C., & Richie, T. L. (2017). A *Plasmodium vivax* plasmid DNA- and adenovirus-vectored malaria vaccine encoding blood-stage antigens AMA1 and MSP142 in a prime/boost heterologous immunization regimen partially protects *Aotus* monkeys against blood-stage challenge. *Clinical and Vaccine Immunology*, 24(4).
- OMS. (1957). *Sexto Informe. Serie de Informes Técnicos. N° 123*.
- OMS. (1969). Nuevo estudio sobre la Estrategia Mundial de la Erradicación del Paludismo. In *22° Asamblea Mundial de la Salud*.
- OMS. (1978). *Alma-Ata 1978. Informe de la Conferencia Internacional sobre Atención Primaria de Salud*.
- OMS. (1992). *Estrategia Mundial de la lucha contra el Paludismo. Conferencia Ministerial sobre el Paludismo*.
- Oyegue-Liabagui, S. L., Bouopda-Tuedom, A. G., Lady, C. K., Sydney, M.-N., Nzoughe, H., Tchitoula-Makaya, N., & Lekana-Douki, J. B. (2017). Pro- and anti-inflammatory cytokines in children with malaria in Franceville, Gabon. *Am J Clin Exp Immunol*, 6(2), 9–20.
- Penna, J., & Barbieri, A. (1925). *El Paludismo. Etiología. Patología. Sintomatología. Profilaxis: El Paludismo en América* (2da ed.). El Ateneo.
- Perlaza, B. L., Valencia, A. Z., Zapata, C., Castellanos, A., Sauzet, J. P., Blanc, C., Cohen, J., Arévalo-Herrera, M., Corradin, G., Herrera, S., & Druilhe, P. (2008). Protection against *Plasmodium falciparum* challenge induced in *Aotus* monkeys by liver-stage antigen-3- derived long synthetic peptides. *European Journal of Immunology*, 38(9), 2610–2615.
- Perlaza, B. L., Zapata, C., Valencia, A. Z., Hurtado, S., Quintero, G., Sauzet, J. P., Brahimi, K., Blanc, C., Arévalo-Herrera, M., Druilhe, P., & Herrera, S. (2003). Immunogenicity and protective efficacy of *Plasmodium falciparum* liver-stage Ag-3 in *Aotus lemurinus griseimembra* monkeys. *European Journal of Immunology*, 33(5), 1321–1327.
- Pico de Coaña, Y., Barrero, C., Cajiao, I., Mosquera, C., Patarroyo, M., & Patarroyo, M. (2004). Quantifying *Aotus* monkey cytokines by real-time quantitative RT-PCR. *Cytokine*, 27(4), 129–133.

- Pinder, J. C., Fowler, R. E., Bannister, L. H., Dluzewski, A. R., & Mitchell, G. H. (2000). Motile systems in malaria merozoites: How is the red blood cell invaded? *Parasitology Today*, 16(6), 240–245. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(00\)01664-1](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(00)01664-1)
- Popa, G. L., & Popa, M. I. (2021). Recent Advances in Understanding the Inflammatory Response in Malaria: A Review of the Dual Role of Cytokines. *Journal of Immunology Research*, 2021(Figure 1), 10–12. <https://doi.org/10.1155/2021/7785180>
- Prakash, D., Fesel, C., Jain, R., Cazenave, P. A., Mishra, G. C., & Pied, S. (2006). Clusters of cytokines determine malaria severity in *Plasmodium falciparum*-infected patients from endemic areas of Central India. *The Journal of Infectious Diseases*, 194(2), 198–207.
- Ramasamy, R. (2014). Zoonotic malaria - global overview and research and policy needs. *Frontiers in Public Health*, 2(AUG), 123. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00123>
- Rodrigues-da-Silva, R., Lima-Junior, J. C., Fonseca, B. P., Antas, P., Baldez, A., Storer, F., Santos, F., Banic, D., & Oliveira-Ferreira, Jd. (2014). Alterations in cytokines and haematological parameters during the acute and convalescent phases of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 109(2), 154–162.
- Rug, M., Prescott, S. W., Fernandez, K. M., Cooke, B. M., & Cowman, A. F. (2006). The role of KAHRP domains in knob formation and cytoadherence of P falciparum-infected human erythrocytes. *Blood*, 108(1), 370–378. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-11-4624>
- Salwati, E., Minigo, G., Woodberry, T., Piera, K. A., de Silva, H. D., Kenangalem, E., & Plebanski, M. (2011). Differential cellular recognition of antigens during acute *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria. *The Journal of Infectious Diseases*, 203(8), 1192–1199.
- Sánchez, N., Gálvez, H., Montoya, E., & Gozalo, A. (2006). Mortalidad en crías de *Aotus* sp. (primates: Cebidae) en cautiverio: Una limitante para estudios biomédicos con modelos animales. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 23(3), 221–224.
- Sánchez, P., Arias, B., Gálvez, C., Carranza, V., & RA, R. (2015). *Escherichia coli* enteropatógena en crías de primate *Aotus* (Aotidae) con diarrea en cautiverio. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 26(4), 657–663.
- Sato, S. (2021). *Plasmodium*—a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology. In *Journal of Physiological Anthropology* (Vol. 40, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40101-020-00251-9>

- Sharma, A., Jenkins, B., Akue, A., Lambert, L. E., Orr-Gonzalez, S., Thomas, M. L., Mahamar, A., Diarra, B. S., Dicko, A., Fried, M., & Duffy, P. E. (2022). *Plasmodium falciparum* in *Aotus nancymaae*: A New Model for Placental Malaria. *The Journal of Infectious Diseases*, 226(3), 521–527.
- Sherman, I. W., Eda, S., & Winograd, E. (2003). Cytoadherence and sequestration in *Plasmodium falciparum*: Defining the ties that bind. *Microbes and Infection*, 5(10), 897–909. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(03\)00162-X](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(03)00162-X)
- Silvestrini, F., Tibúrcio, M., Bertuccini, L., & Alano, P. (2012). Differential adhesive properties of sequestered asexual and sexual stages of *Plasmodium falciparum* on human endothelial cells are tissue independent. *PLoS ONE*, 7(2), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031567>
- Stoiser, B., Looareesuwan, S., Thalhammer, F., Daxböck, F., Chullawichit, S., El-Menyawi, I., & Burgmann, H. (2000). Serum concentrations of granulocyte-colony stimulating factor in complicated *Plasmodium falciparum* malaria. *European Cytokine Network*, 11(1), 75–80.
- Subramani, R., Quadt, K., Jeppesen, A. E., Hempel, C., Vang Petersen, J. E., Hassenkam, T., Hviid, L., & Barfod, L. (2015). *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte knob density is linked to the pfemp1 variant expressed. *MBio*, 6(5), 1–7. <https://doi.org/10.1128/mBio.01456-15>
- Talman, A. M., Domarle, O., McKenzie, F. E., Arie, F., & Robert, V. (2004). Gametocytogenesis: The puberty of *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal*, 3, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-3-24>
- Thomas, G., Wang, R., Puri, A., Harris, R., & Raveendran, M. (2018). Reproductive longevity predicts mutation rates in primates. *Current Biology*, 28(19), 3197.
- Tibúrcio, M., Sauerwein, R., Lavazec, C., & Alano, P. (2015). Erythrocyte remodeling by *Plasmodium falciparum* gametocytes in the human host interplay. *Trends in Parasitology*, 31(6), 270–278. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.02.006>
- Tibúrcio, M., Silvestrini, F., Bertuccini, L., Sander, A. F., Turner, L., Lavstsen, T., & Alano, P. (2013). Early gametocytes of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* specifically remodel the adhesive properties of infected erythrocyte surface. *Cellular Microbiology*, 15(4), 647–659. <https://doi.org/10.1111/cmi.12062>
- Vargas Madrid, M. (2013). Evaluación de la población de monos nocturnos (*Aotus* spp.) en la región de frontera colombia-perú: Densidad poblacional y conservación de *Aotus nancymaae* en Loreto, Perú. *Universidad Nacional de Colombia*, 1.

- Venugopal, K., Hentzschel, F., Valkiūnas, G., & Marti, M. (2020). *Plasmodium* asexual growth and sexual development in the haematopoietic niche of the host. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(3), 177–189. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0306-2>
- Villinger, F., Brar, S., Mayne, A., Chikkala, N., & Ansari, A. (1995). Comparative sequence analysis of cytokine genes from human and nonhuman primates. *J Immunol*, *155*(8), 3946–3954.
- Voinson, M., Nunn, C. L., & Goldberg, A. (2022). Primate malaras as a model for cross-species parasite transmission. *ELife*, *11*, e69628. <https://doi.org/10.7554/eLife.69628>
- Volz, J. C., Yap, A., Sisquella, X., Thompson, J. K., Lim, N. T. Y., Whitehead, L. W., Chen, L., Lampe, M., Tham, W. H., Wilson, D., Nebl, T., Marapana, D., Triglia, T., Wong, W., Rogers, K. L., & Cowman, A. F. (2016). Essential Role of the PfRh5/PfRipr/CyRPA Complex during *Plasmodium falciparum* Invasion of Erythrocytes. *Cell Host and Microbe*, *20*(1), 60–71. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.06.004>
- Warncke, J. D., & Beck, H.-P. (2019). Host Cytoskeleton Remodeling throughout the Blood Stages of *Plasmodium falciparum*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *83*(4), 1–21. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00013-19>
- World Health Organization. (2020). *World Malaria Report*.
- Yadava, A., Hall, C. E., Sullivan, J. A. S., Nace, D., Williams, T., Collins, W. E., Ockenhouse, C. F., & Barnwell, J. W. (2014). Protective efficacy of a *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein-based vaccine in *Aotus nancymae* is associated with antibodies to the repeat region. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *8*(10).
- Ye, Z., Van Dyke, K., & Rossan, R. N. (2013). Effective treatment with a tetrandrine/chloroquine combination for chloroquine-resistant falciparum malaria in *Aotus* monkeys. *Malaria Journal*, *12*(1).

## Anexos

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica del género *Plasmodium*

<b>Reino:</b>	Protista	<b>Fuente</b>
<b>Phylum:</b>	Apicomplexa	
<b>Clase:</b>	Sporozoa	
<b>Sub-clase:</b>	Coccidia	
<b>Orden:</b>	Eucoccidia	
<b>Sub-orden:</b>	Haemosporidiidea	(Chavatte et al., 2007; Levine et al., 1980)
<b>Familia:</b>	Plasmodiidae	
<b>Género:</b>	<i>Plasmodium</i>	
<b>Sub-género:</b>	<i>Plasmodium</i>	
<b>Especies:</b>	<i>P. malariae</i> , <i>P. ovale</i> , <i>P. vivax</i> y <i>P. knowlesi</i>	
<b>Sub-género:</b>	<i>Laverania</i>	
<b>Especies:</b>	<i>P. falciparum</i>	

**Tabla 2.** Clasificación taxonómica del género *Aotus* sp.

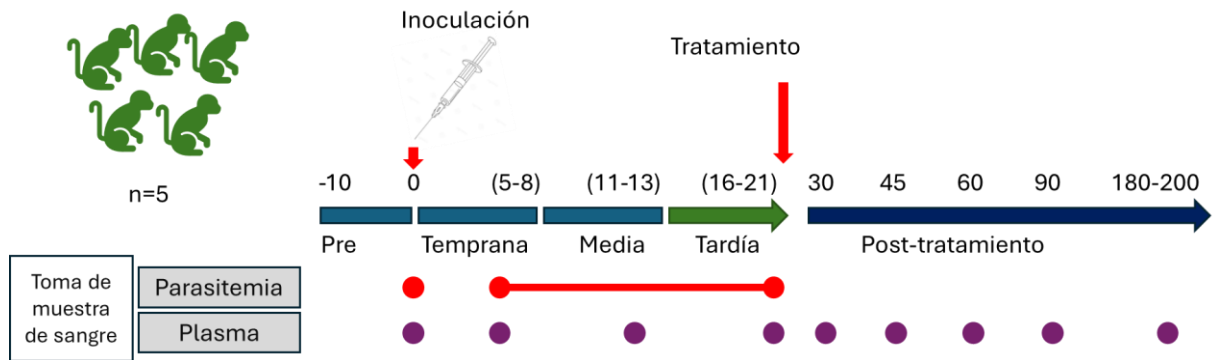
<b>Reino:</b>	Animalia	<b>Fuente</b>
<b>Phylum:</b>	Chordata	
<b>Clase:</b>	Mammalia	
<b>Orden:</b>	Primates	(Cawthon Lang, 2005; Vargas Madrid, 2013)
<b>Sub-orden:</b>	Haplorrhini	
<b>Familia:</b>	Aotidae	
<b>Género:</b>	<i>Aotus</i>	
<b>Especies:</b>	<i>A. azarae</i> , <i>A. hershkovitzi</i> , <i>A. lemurinus</i> , <i>A. miconax</i> , <i>A. nancymae</i> , <i>A. nigriceps</i> , <i>A. trivirgatus</i> , <i>A. vociferans</i> , <i>A. zonalis</i> , <i>A. griseimembra</i> , <i>A. jorgehernandezii</i> , <i>A. brumbacki</i>	

**Tabla 3.** Clasificación de monos *Aotus* por grupo experimental

Grupo	Cepa	Tiempo de infección	n
<b>Control</b>	<i>c</i>	-	2
<b>Experimental</b>	<i>e</i>	<i>P. falciparum</i> -FVO	≤1 años
<b>Grupo 1</b>	<i>g1</i>	<i>P. falciparum</i> -FVO	≥15 años
<b>Grupo 2</b>	<i>g2</i>	<i>P. falciparum</i> -FVO	5 - ≤10 años
<b>Grupo 3</b>	<i>g3</i>	<i>P. falciparum</i> -FVO	≤5 años
<b>Grupo 4</b>	<i>g4</i>	<i>P. falciparum</i> -FVO	≥15 años
<b>Grupo 5</b>	<i>g5</i>	<i>P. falciparum</i> -FVO	≤10 años
<b>Grupo 6</b>	<i>g6</i>	<i>P. vivax</i> AMRU-1	≤5 años

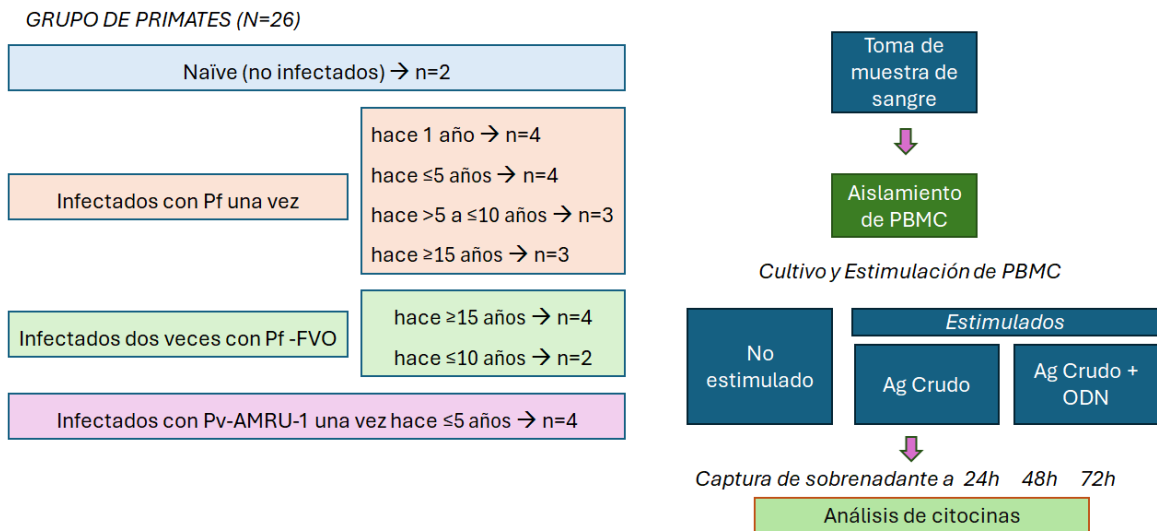
**Tabla 4.** Clasificación de los tratamientos aplicados a los cultivos de PBMC

<b>Cultivo</b>	<b>Grupo</b>	<b>Tratamiento/Estímulo de PBMC</b>
ccells	Control	no estimulados
ecells	Experimental	no estimulados
cuer	Control	eritrocitos no infectados
euer	Experimental	eritrocitos no infectados
cODN	grupo control	ODN
epdn	Grupo experimental	ODN
clysODNc	Grupo control	ODN - control
elysODNc	Grupo experimental	ODN - control
clys	Grupo control	<i>Pf</i>
clysODN	Grupo control	<i>Pf</i> + ODN
elys	Grupo experimental	<i>Pf</i>
elysODN	Grupo experimental	<i>Pf</i> + ODN
g3lys	Grupo 3	<i>Pf</i>
g3lysODN	Grupo 3	<i>Pf</i> + ODN
g2lys	Grupo 2	<i>Pf</i>
g2lysODN	Grupo 2	<i>Pf</i> + ODN
g1lys	Grupo 1	<i>Pf</i>
g1lysODN	Grupo 1	<i>Pf</i> + ODN
g5lys	Grupo 5	<i>Pf</i>
g5lysODN	Grupo 5	<i>Pf</i> +ODN
g4lys	Grupo 4	<i>Pf</i>
g4lysODN	Grupo 4	<i>Pf</i> + ODN
g6lys	Grupo 6	<i>Pv</i>
g6lysODN	Grupo 6	<i>Pv</i> + ODN



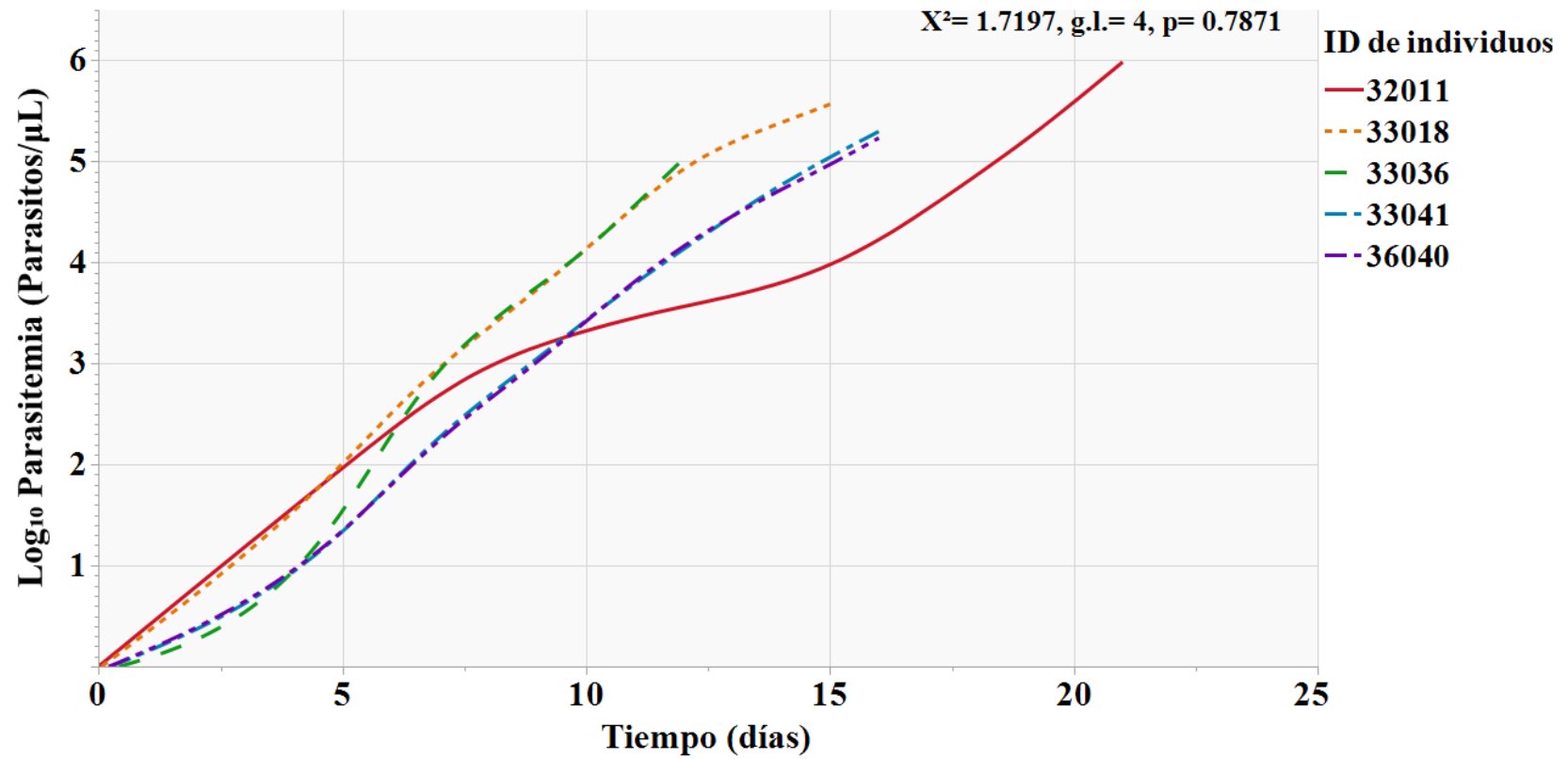
**Figura 1.** Esquema de toma de muestras en procedimientos de infección in vivo.

En la imagen se muestra los procesos seguidos para la toma de muestra durante la experimentación, **Pre**= preinfección, **Mid**= infección temprana, **Late**= infección tardía.



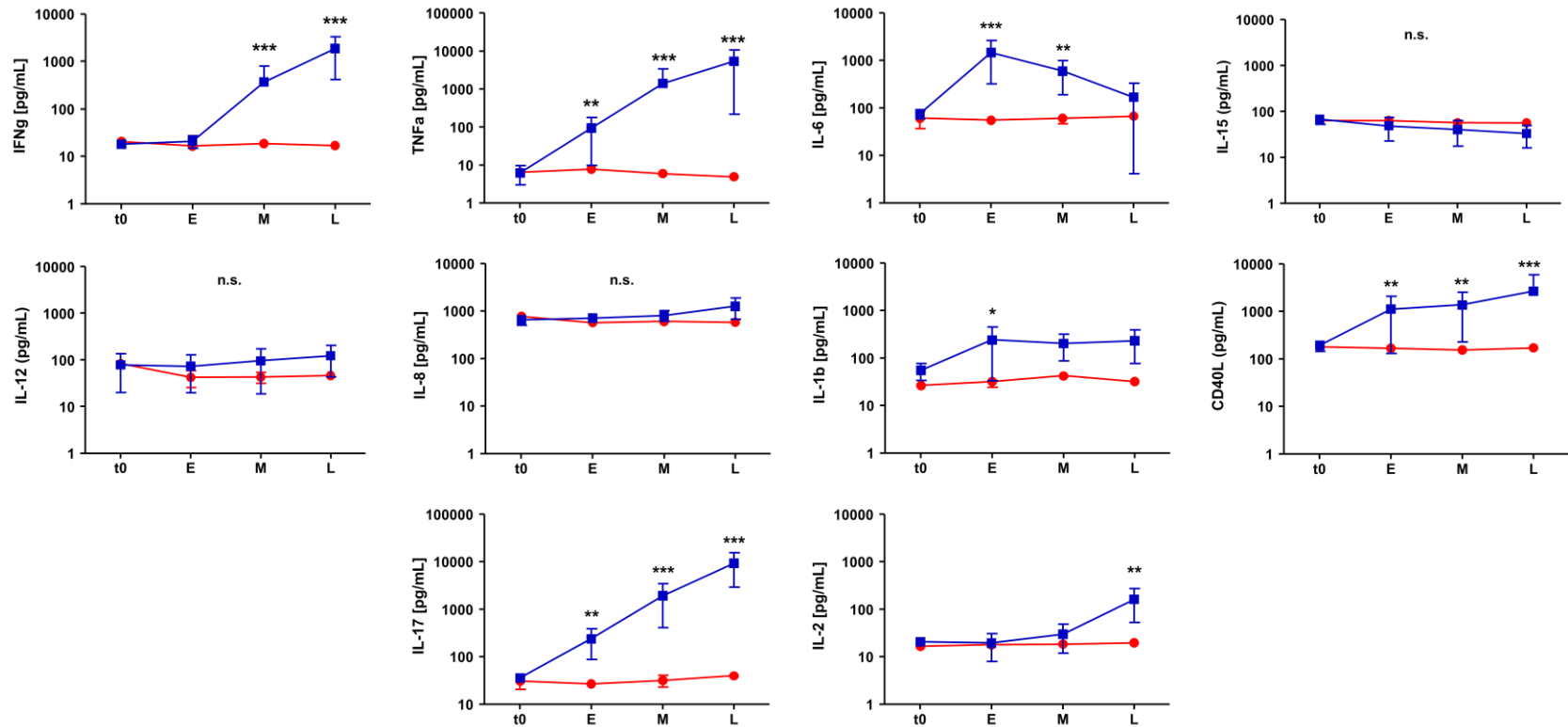
**Figura 2.** Esquema de grupos y toma de muestras en procedimientos análisis de citocinas *ex vivo*.

En la imagen se muestran los grupos de primates de los cuales se obtuvieron las células mononucleares de sangre periférica. Estas células fueron estimuladas con antígeno crudo de *P. falciparum* y con antígeno crudo más CpG ODN para evaluar su respuesta de citocinas a 24, 48, 72 horas.



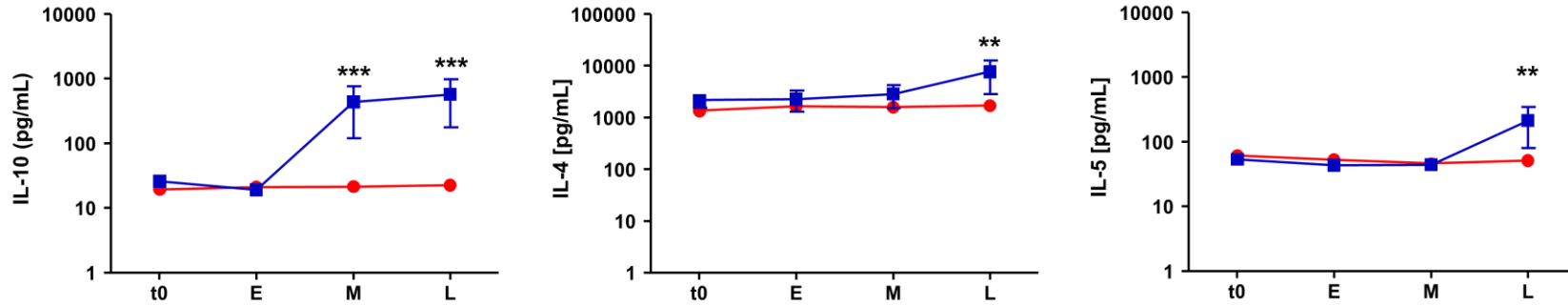
**Figura 3.** Densidad parasitaria de *P. falciparum*-FVO en modelo de infección in vivo.

La figura presenta la concentración de parásitos/μL en base logarítmica según tiempo de infección medido en días.



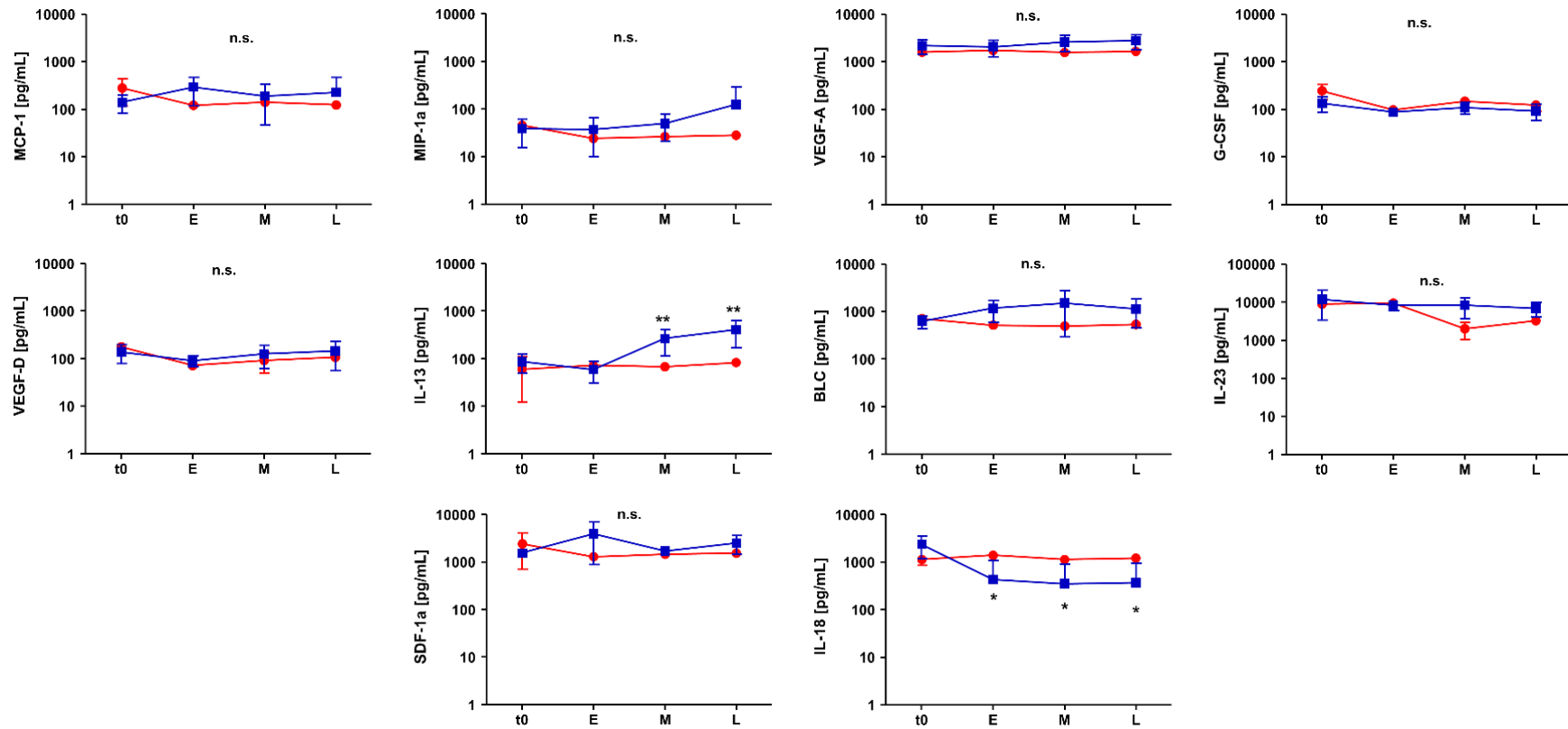
**Figura 4.** Concentración de citocinas proinflamatorias en plasma de monos *A. l. lemurinus* durante la infección por *P. falciparum*-FVO.

Se muestran la media  $\pm$  error estándar de los niveles [pg/mL] de citocinas evaluadas durante los tiempos de toma de muestra: **t0**, pre-infección; **E**: periodo temprano (5-8 días post-infección); **M**: periodo medio (11-13 días post-infección); **L**: periodo tardío (16-21 días post-infección). Línea roja indica los controles no infectados. Línea azul muestra primates infectados.



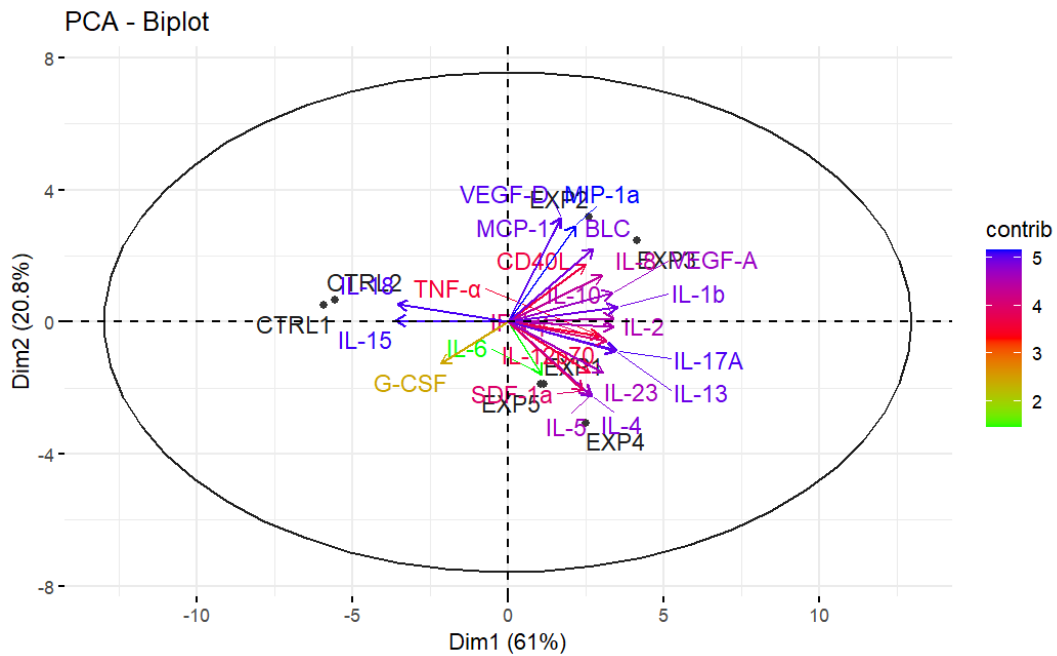
**Figura 5.** Concentración de citocinas anti-inflamatorias en plasma de monos *A. l. lemurinus* durante la infección por *P. falciparum*-FVO.

Se muestran la media  $\pm$  error estándar de los niveles [pg/mL] de citocinas evaluadas durante los tiempos de toma de muestra: **t0**, pre-infección; **E**: periodo temprano (5-8 días post-infección); **M**: periodo medio (11-13 días post-infección); **L**: periodo tardío (16-21 días post-infección). Línea roja indica los controles no infectados. Línea azul muestra primates infectados.



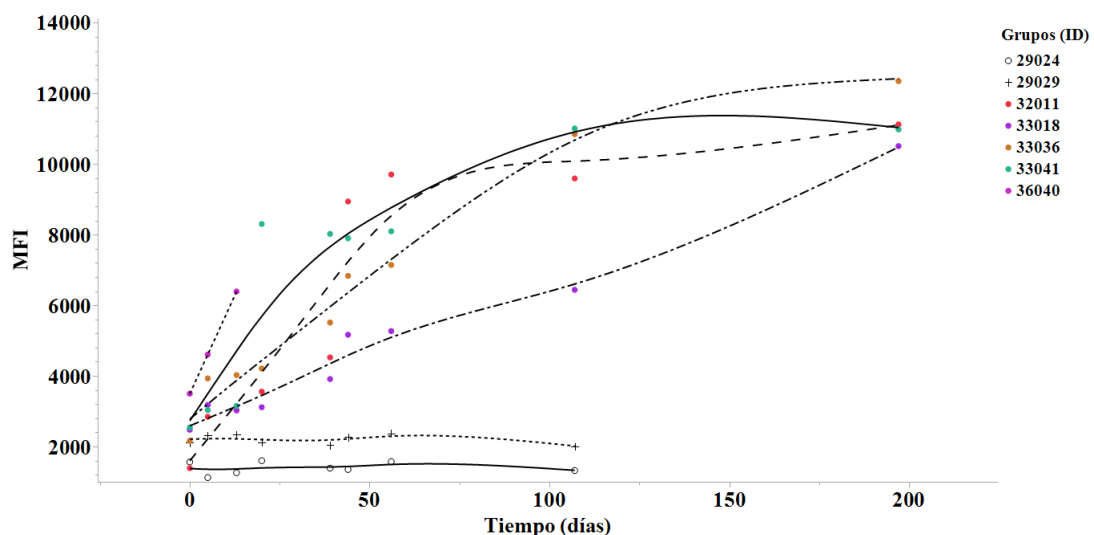
**Figura 6.** Concentración de quimiocinas, factores de crecimiento y otras citocinas en plasma de monos *A. l. lemurinus* durante la infección por *P. falciparum*-FVO.

Se muestran la media  $\pm$  error estándar de los niveles [pg/mL] de citocinas evaluadas durante los tiempos de toma de muestra: **t0**, pre-infección; **E**: periodo temprano (5-8 días post-infección); **M**: periodo medio (11-13 días post-infección); **L**: periodo tardío (16-21 días post-infección). Línea roja indica los controles no infectados. Línea azul muestra primates infectados.



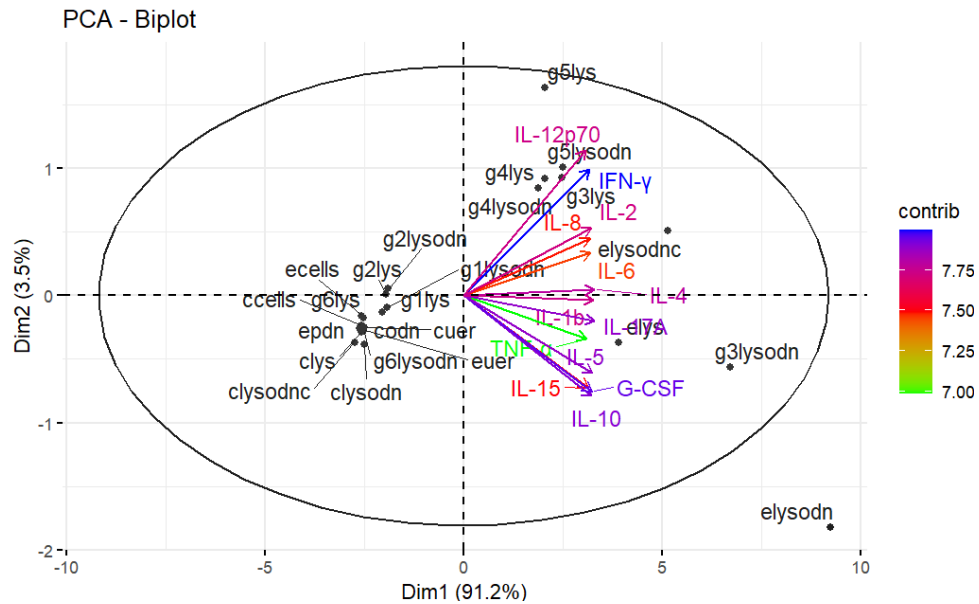
**Figura 7.** Asociación de citocinas, según tiempo de infección.

El biplot muestra la expresión de citocinas por individuo por tiempo de infección, cada cuadrante representa un evento de infección temprana (15 días, Q1), tardía (20 días), así como eventos de inicio de la infección (0 días, Q4). En un mapa de colores se presenta la contribución de cada citoquina al evento infeccioso (contrib).



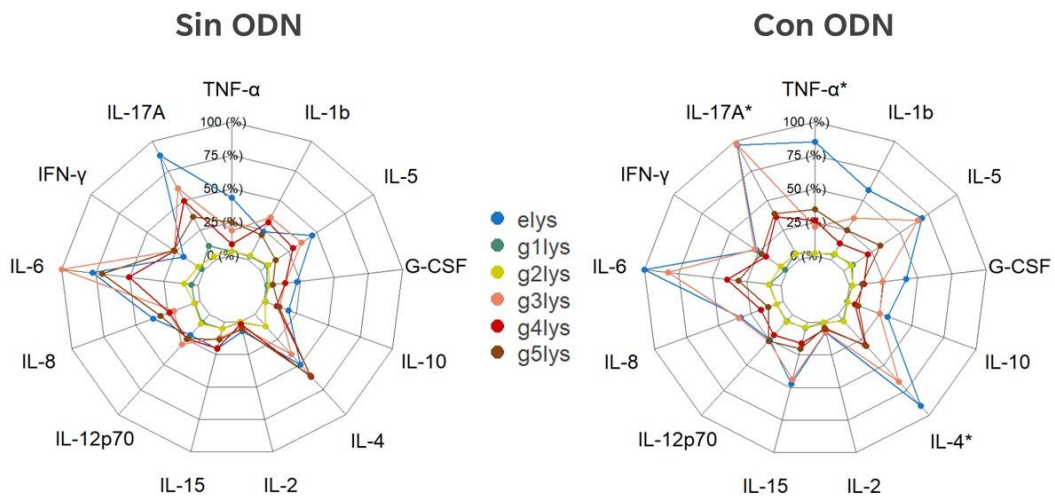
**Figura 8.** Reconocimiento antigénico hacia eritrocitos infectados con *P. f-FVO* de plasma de primates *A. lemurinus l.*

La gráfica muestra los niveles de reconocimiento en intensidad media de fluorescencia durante la infección y hasta 197 días post inoculación.



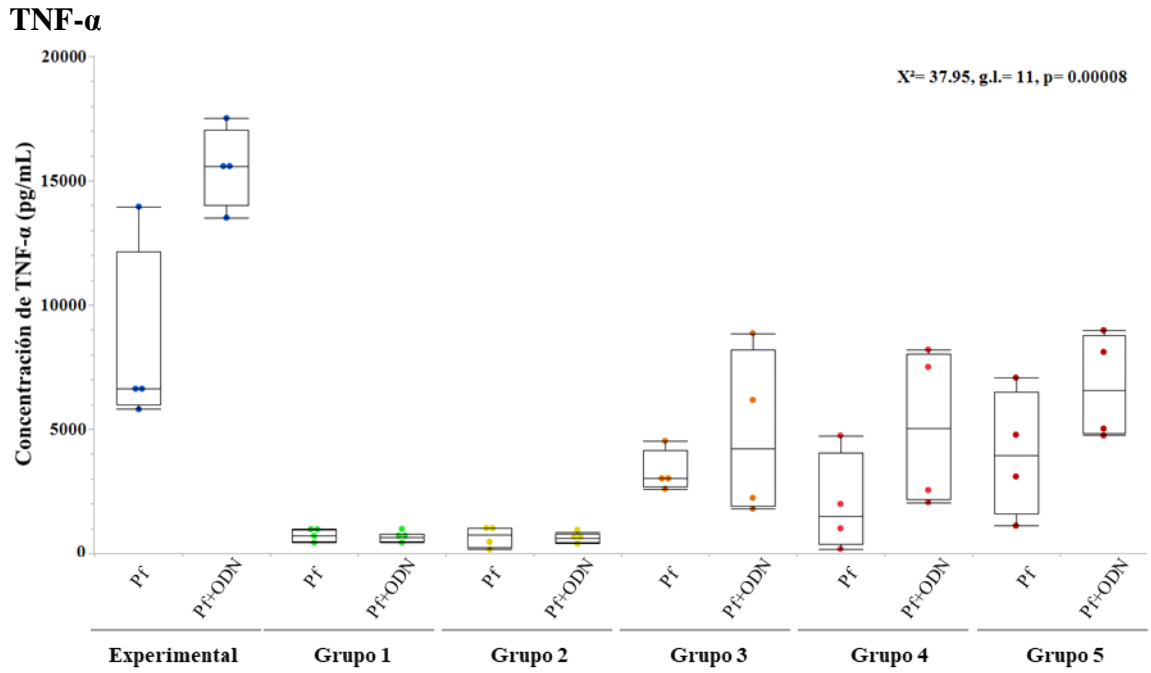
**Figura 9.** Asociación de citocinas, según tiempo de infección en cultivo de PBMC.

El biplot muestra la expresión de citocinas por grupo de cultivo por tiempo de infección, cada cuadrante representa un evento de infección temprana (15 días, Q1), tardía (20 días), así como eventos de inicio de la infección (0 días, Q4). En un mapa de colores se presenta la contribución de cada citoquina al evento infeccioso (contrib).

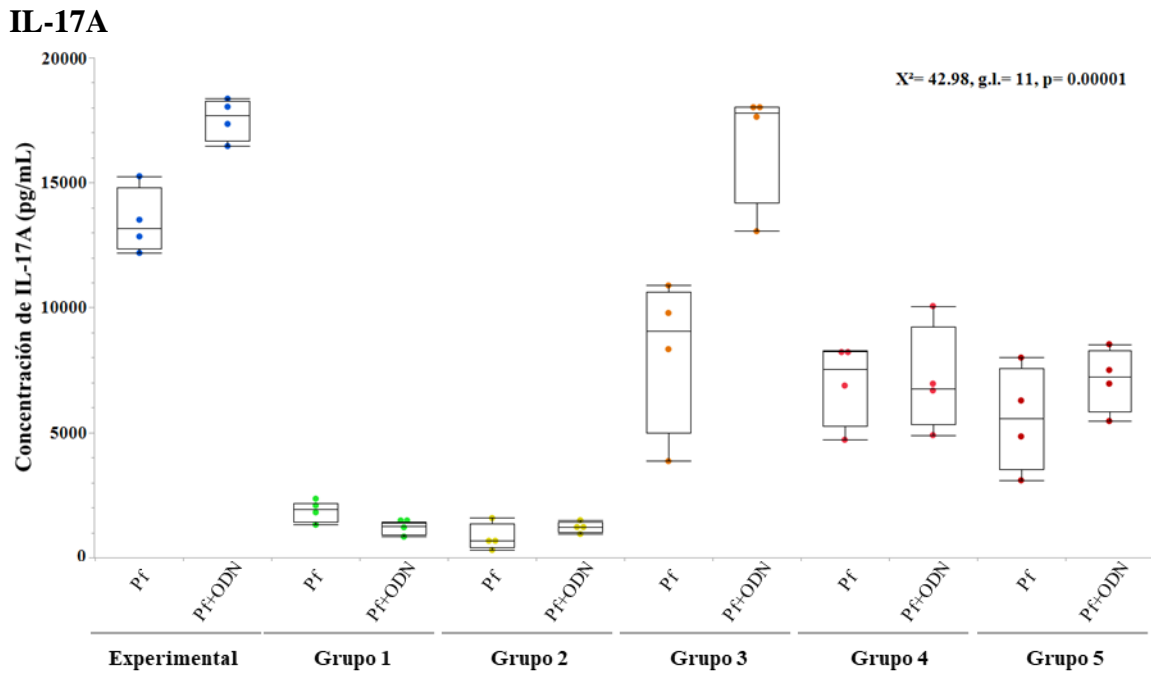


**Figura 10.** Asociación de citocinas por grupos de PBMC expuesto entre una y dos veces a la infección por *Plasmodium*.

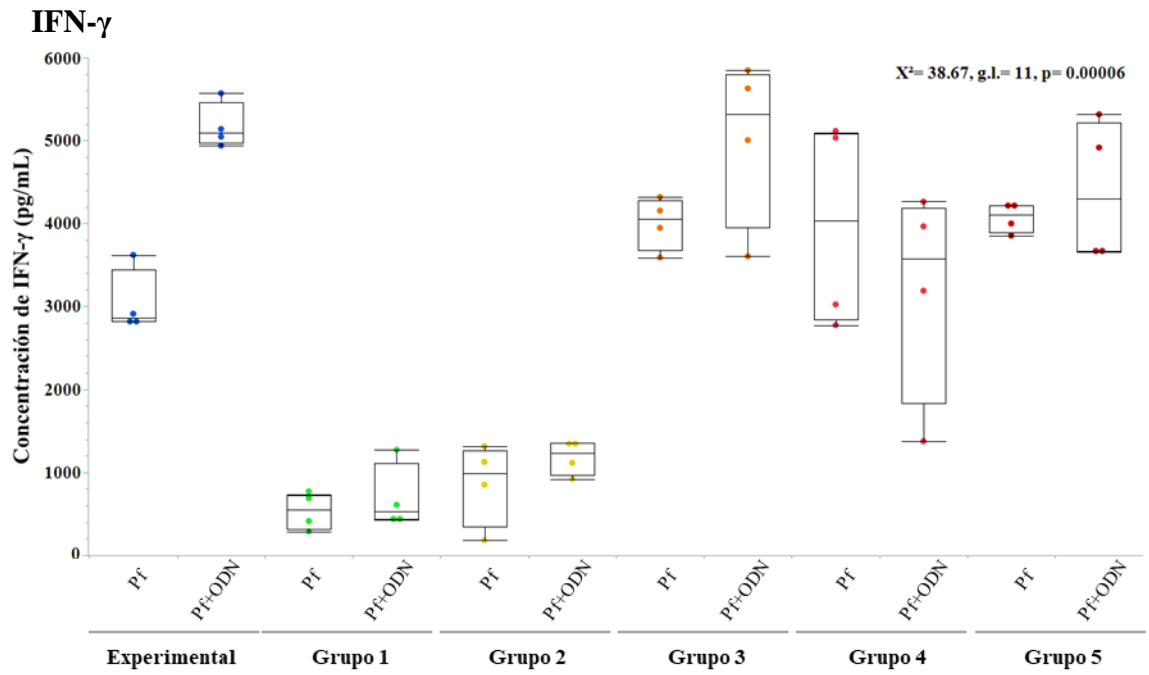
El diagrama de telaraña muestra la expresión la mediana de citocinas (pg/mL) por grupo de cultivo según número de veces y años de exposición previa a *Plasmodium* y el uso o no del tratamiento ODN en el cultivo. Cada grupo de experimental de células está representado por un punto de color en el diagrama.



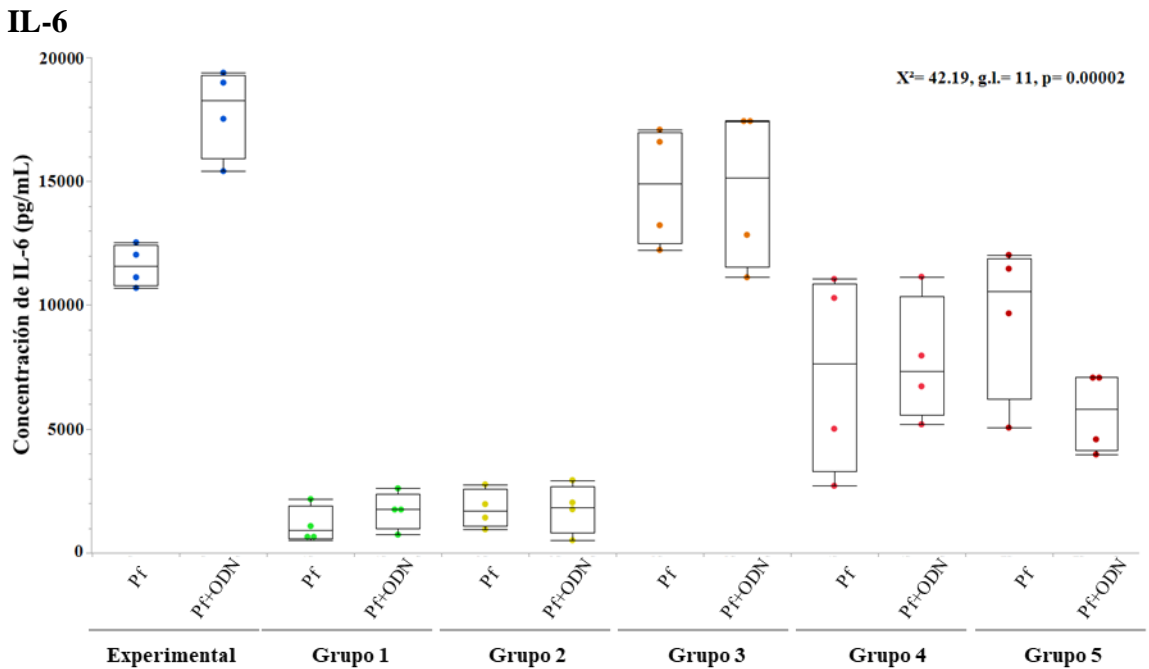
**Figura 11.** Diferencias en la concentración de TNF- $\alpha$  en los cultivos de PBMC de los diferentes grupos experimentales.



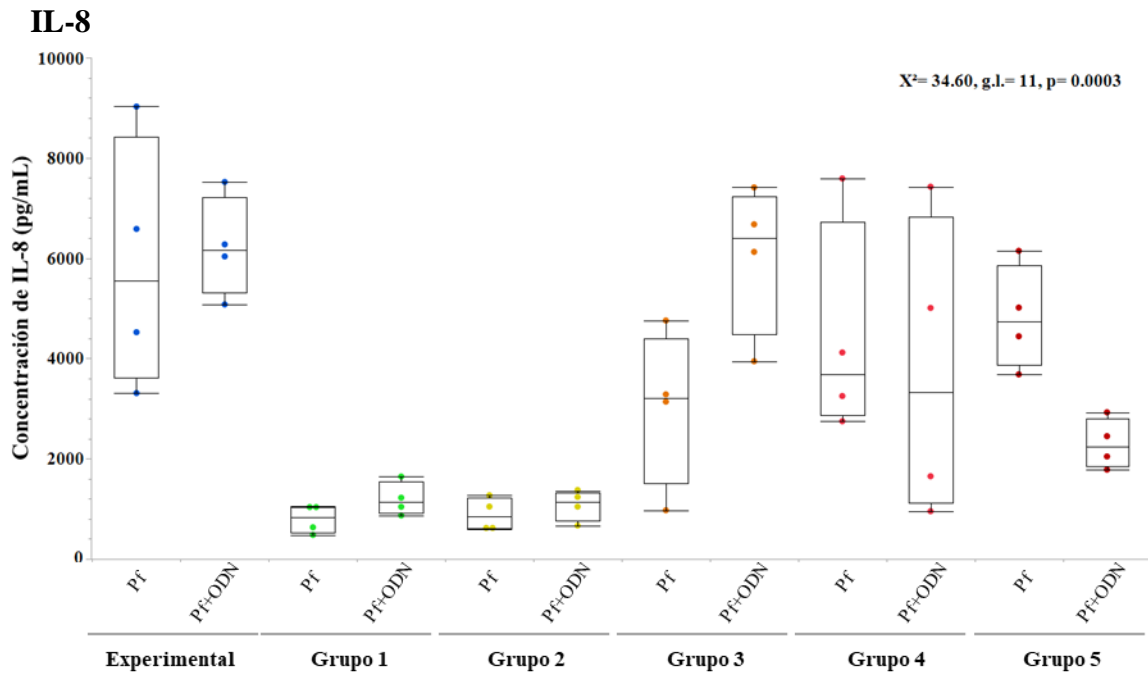
**Figura 12.** Diferencias en la concentración de IL-17A en los cultivos de PBMC de los diferentes grupos experimentales.



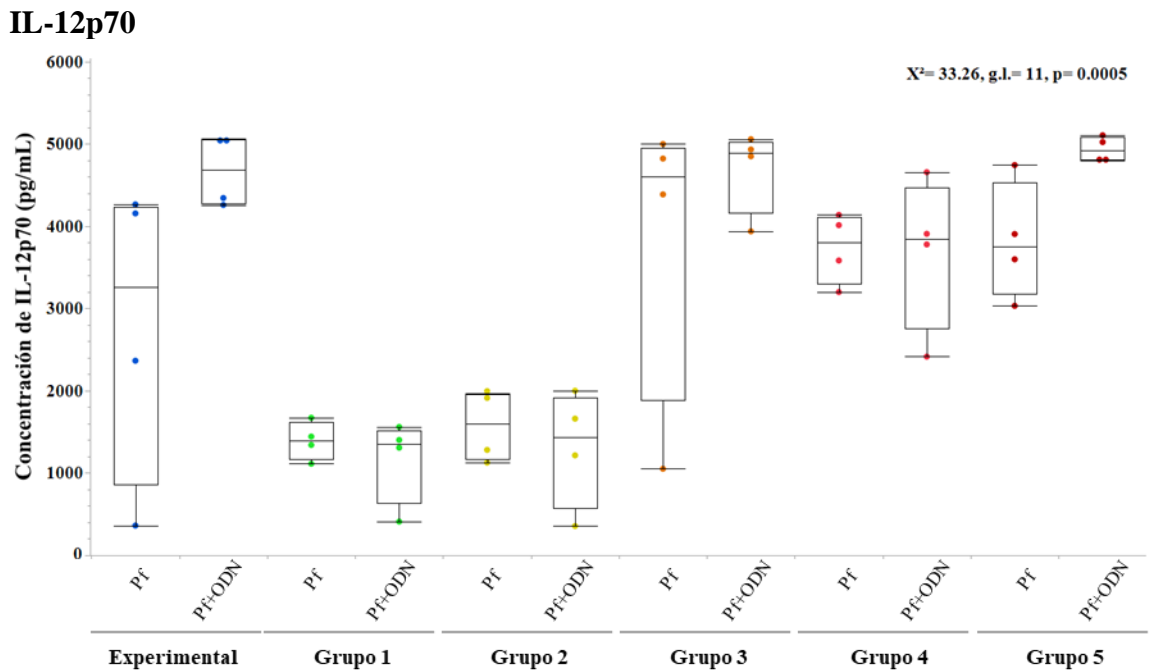
**Figura 13.** Diferencias en la concentración de IFN- $\gamma$  en los cultivos de PBMC de los diferentes grupos experimentales.



**Figura 14.** Diferencias en la concentración de IL-6 en los cultivos de PBMC de los diferentes grupos experimentales.

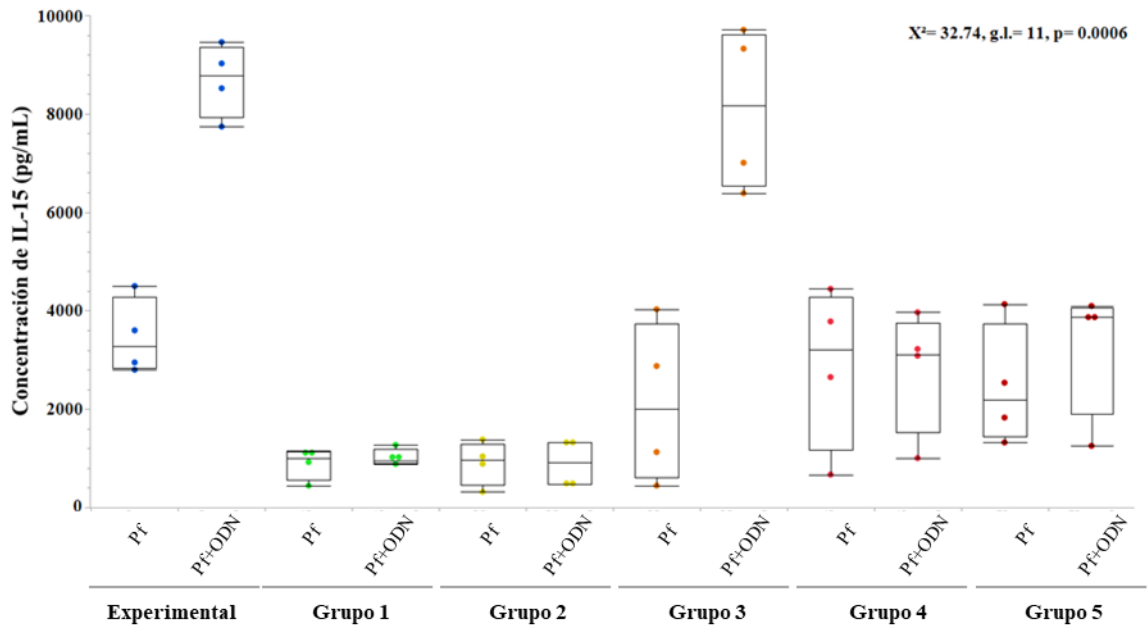


**Figura 15.** Diferencias en la concentración de IL-8 en los cultivos de PBMC de los diferentes grupos experimentales.



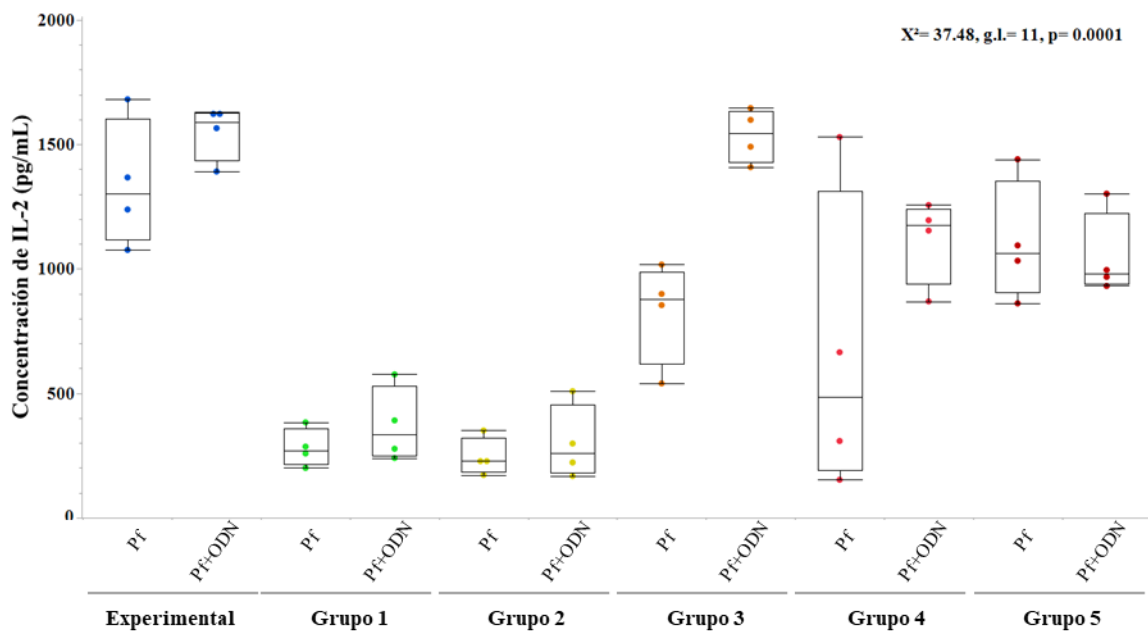
**Figura 16.** Diferencias en la concentración de IL-12p70 en los cultivos de PBMC de los diferentes grupos experimentales.

### IL-15



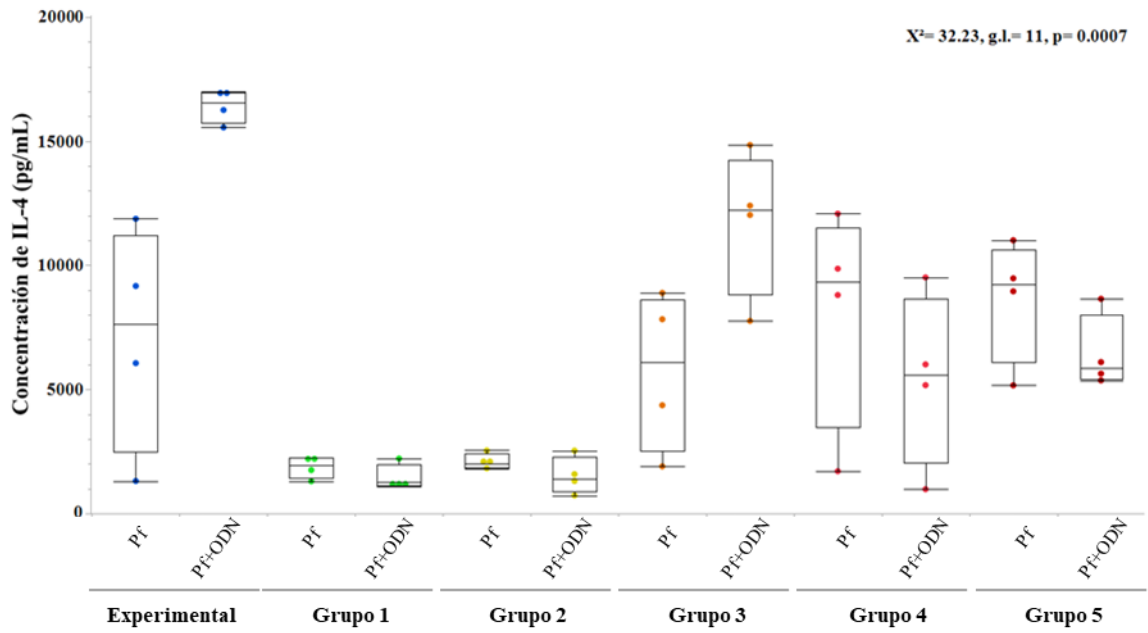
**Figura 17.** Diferencias en la concentración de IL-15 en los cultivos de PBMC de los diferentes grupos experimentales.

### IL-2



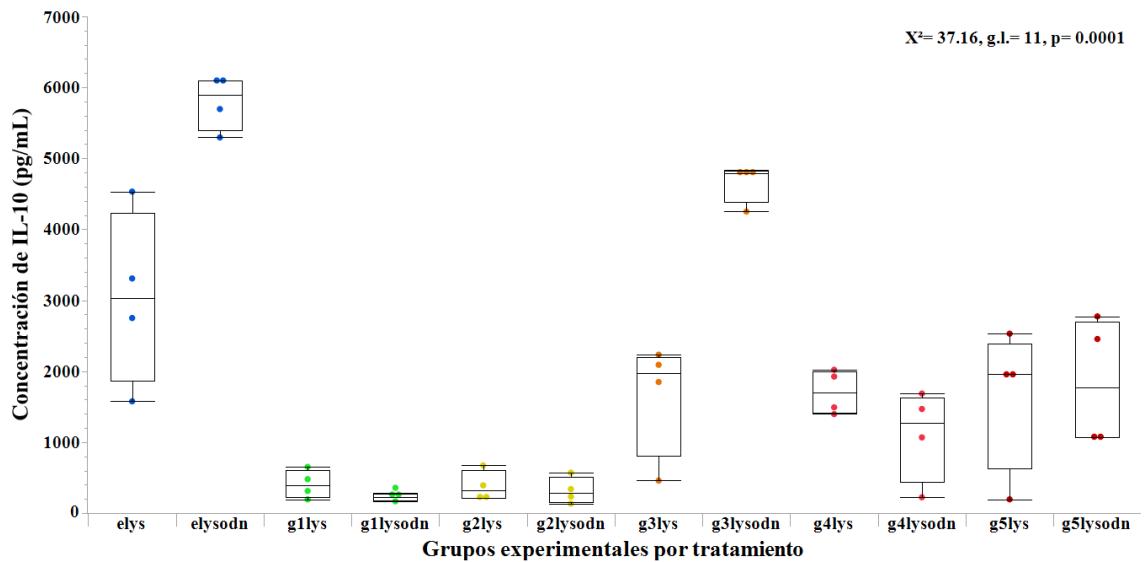
**Figura 18.** Diferencias en la concentración de IL-2 en los cultivos de PBMC de los diferentes grupos experimentales.

## IL-4



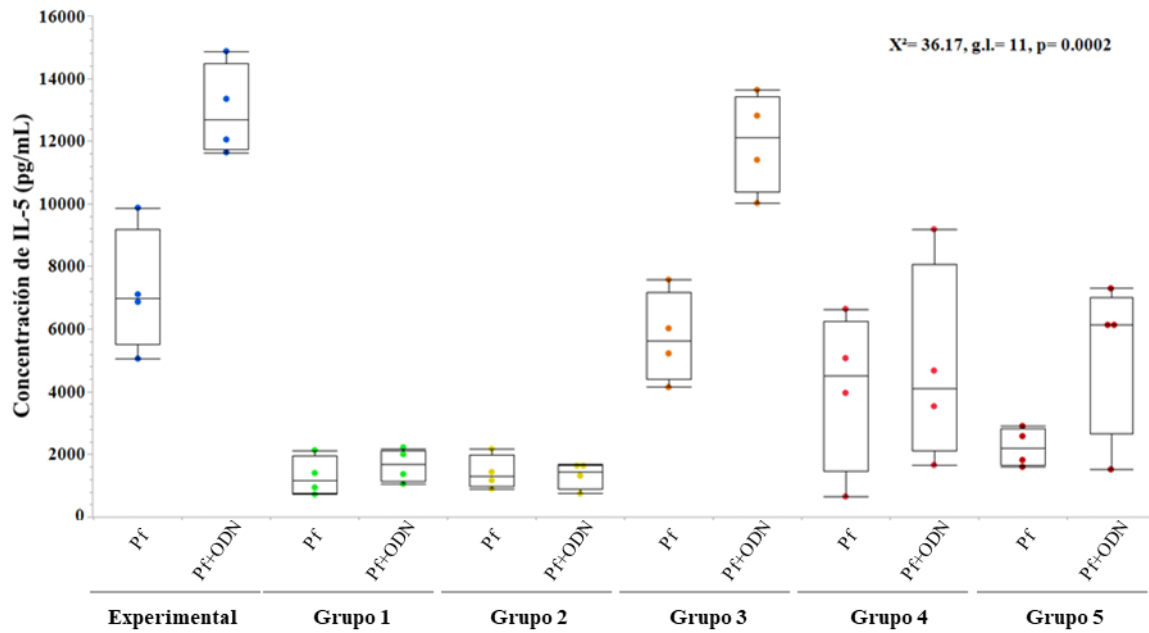
**Figura 19.** Diferencias en la concentración de IL-4 en los cultivos de PBMC de los diferentes grupos experimentales.

## IL-10



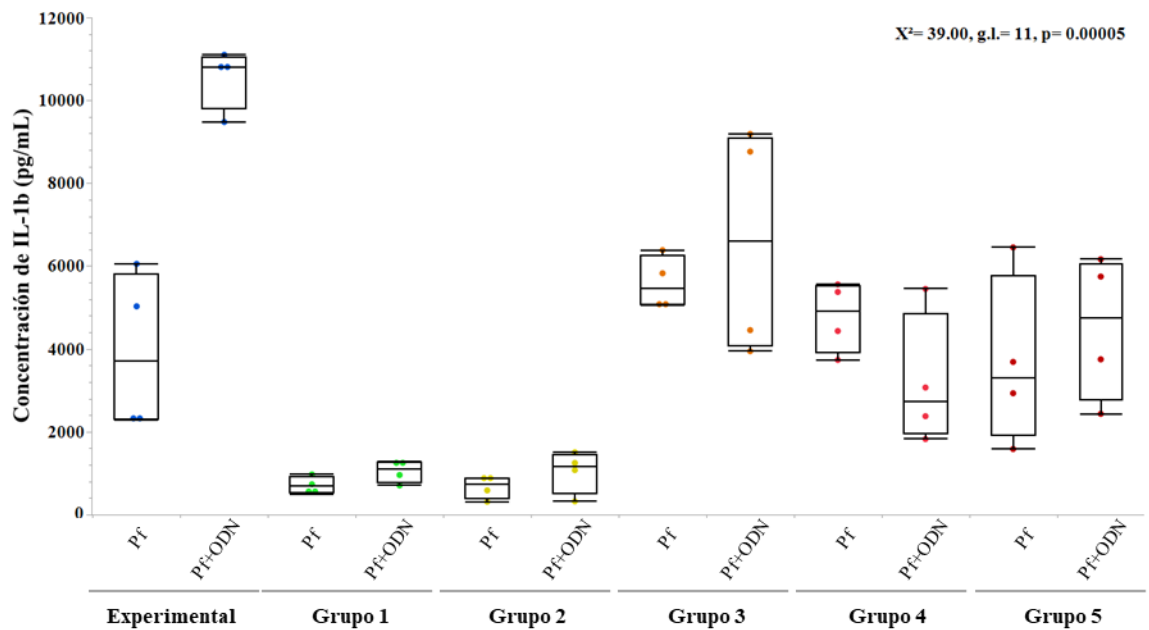
**Figura 20.** Diferencias en la concentración de IL-10 en los cultivos de PBMC de los diferentes grupos experimentales.

## IL-5



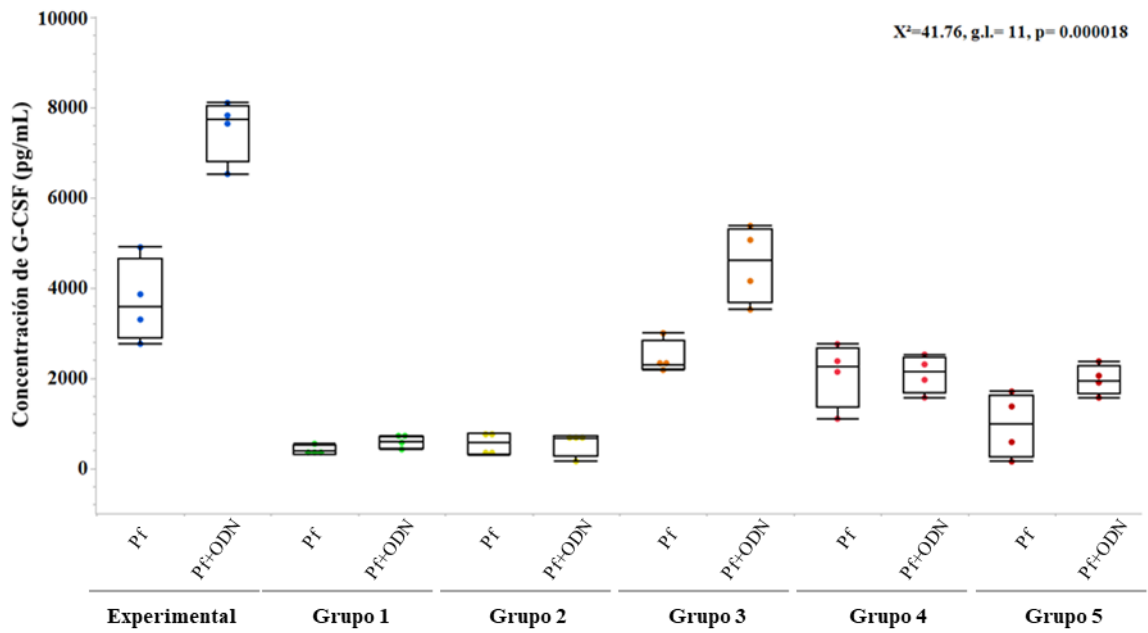
**Figura 21.** Diferencias en la concentración de IL-5 en los cultivos de PBMC de los diferentes grupos experimentales.

## IL-1b



**Figura 22.** Diferencias en la concentración de IL-1b en los cultivos de PBMC de los diferentes grupos experimentales.

## G-CSF



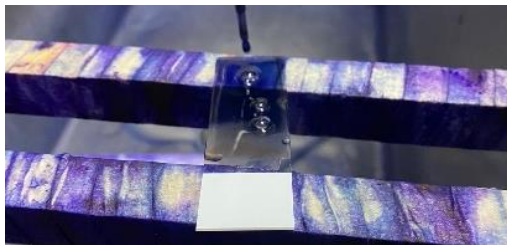
**Figura 23.** Diferencias en la concentración de G-CSF en los cultivos de PBMC de los diferentes grupos experimentales.



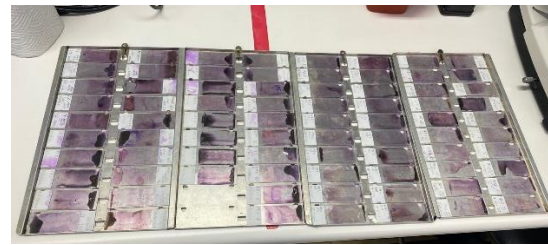
**Figura 24.** Cultivo de la cepa Pf-FVO.



**Figura 25.** Preparación de medio de cultivo para pases de la cepa Pf-FVO.



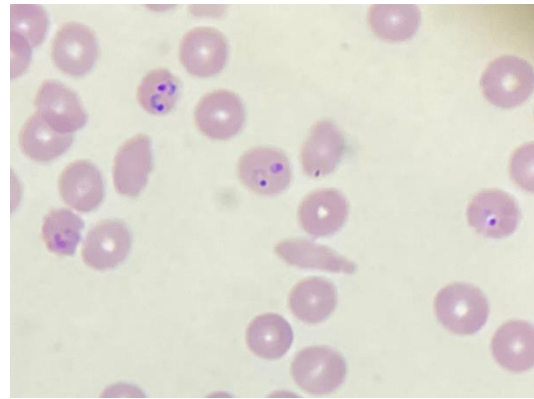
**Figura 26.** Proceso de tinción de frotis de cultivo con Giemsa.



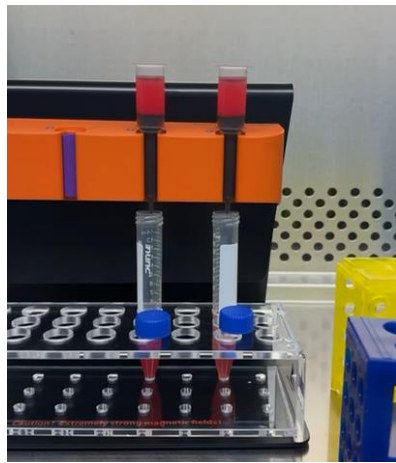
**Figura 27.** Placas teñidas para el proceso de medición de la parasitemia por microscopia.



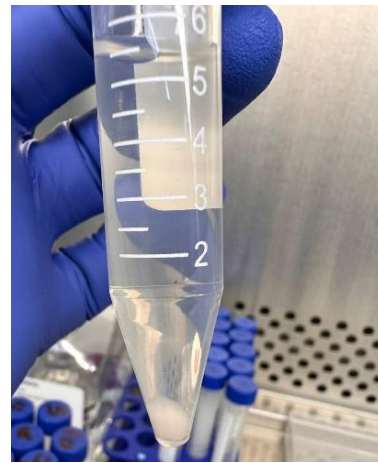
**Figura 28.** Monitoreo de la parasitemia de Pf-FVO por microscopia.



**Figura 29.** Observación de placas de cultivo de Pf-FVO donde se observa la presencia de anillos.



**Figura 30.** Proceso de purificación de eritrocitos infectados por separación magnética.



**Figura 31.** Pelet con PBMC para su cultivo.