UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

“EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS IgG NATURALMENTE ADQUIRIDOS CONTRA ANTÍGENOS DE FASE PRE-ERITROCITICA DE PLASMODIUM VIVAX Y EL RIESGO DE RELAPSO EN PACIENTES INFECTADOS CON P. VIVAX EN LA SELVA AMAZÓNICA PERUANA”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO EN INMUNOLOGÍA

JULIO ALBERTO VENTOCILLA APOLAYA

LIMA-PERÚ

2024

ASESOR

Dr. José Luis Aguilar Olano

JURADO DE TESIS

DR. IVAN BEST CUBA

PRESIDENTE

DR. JOSE LUIS ROJAS

VOCAL

MG. MARCO CABELLO

SECRETARIO

DEDICATORIA.

Dedico la presente tesis a mi familia, en especial a mi madre Doña Neri Apolaya Antón que siempre me apoyó en todos los instantes de mi desarrollo profesional y que ahora está pendiente de mí desde el cielo. A mi padre Don Oscar Ventocilla que con su sacrificio sentó las bases de mi educación universitaria. A mi amada esposa Fabiola Zarate Pantoja de Ventocilla, por siempre apoyarme en mi vida profesional, laboral y personal; también por siempre estar a mi lado tanto en las derrotas como en los logros y por llenar de luz cada día de mi vida. A mis hermanas Guilliana, Kathlyn y Maritza por siempre apoyarme en todas mis metas, también a Cuto, Leo y Kimi por alegrarme cada día. Y por último a mí, por nunca rendirme y siempre seguir adelante aun en los momentos más difíciles.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco la presente tesis al U.S. Naval Medical Research Unit SOUTH Lima-Peru, por la oportunidad de realizar la tesis en sus instalaciones y por la asesoría y apoyo incondicional del Dr. Hugo Valdivia, Dr. Brandon Wilder y en especial a mi asesor de tesis en UPCH el Dr. José Luis Aguilar Olano que con sus enseñanzas tanto en el pregrado como en la maestría me orientó a la investigación inmunológica en enfermedades tropicales, lo cual fue vital para mi desarrollo profesional en la actualidad.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO.

U.S. Naval Medical Research Unit SOUTH (NAMRU SOUTH) Lima-Peru.

DECLARACIÓN DE AUTOR			
FECHA	**10**	**Noviembre**	**2024**
APELLIDOS Y NOMBRES DEL EGRESADO	**VENTOCILLA APOLAYA JULIO ALBERTO**		
PROGRAMA DE POSGRADO	**MAESTRÍA EN INMUNOLOGÍA**		
AÑO DE INICIO DE LOS ESTUDIOS	**2023**		
TITULO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN DE GRADO	"EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS IgG NATURALMENTE ADQUIRIDOS CONTRA ANTIGENOS DE *PLASMODIUM VIVAX* DE FASE PRE-ERITROCITICA Y EL RIESGO DE RELAPSO EN PACIENTES INFECTADOS CON *P. VIVAX* EN LA SELVA AMAZONICA PERUANA"		
MODALIDAD DE TRABAJO DE GRADO	**Tesis**		

Declaración del Autor

El presente Trabajo de Grado es original y no es el resultado de un trabajo en colaboración con otros, excepto cuando así está citado explícitamente en el texto. No ha sido ni enviado ni sometido a evaluación para la obtención de otro grado o diploma que no sea el presente.

Teléfono de contacto (fijo / móvil)	**992164213**
E-mail	**julio.ventocilla@gmail.com**

Firma del Egresado
DNI: 43177795

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN
ABSTRACT

I. INTRODUCCION 1-5
II. OBJETIVOS 6
III. HIPÓTESIS 7
IV. MARCO TEÓRICO 8-12
V. METODOLOGÍA 12-21
VI. RESULTADOS 22-44
VII. DISCUSIONES 45-56
VIII. CONCLUSIONES 57
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 58-60
X. ANEXOS 61

RESUMEN

Introducción: El relapso el cual se define como el causante de un nuevo evento de malaria de *P. vivax* por la activación del estadio durmiente del parásito en el hígado del huésped es una de las principales limitaciones para el control y posterior eliminación de la malaria. ***Objetivo:*** El presente proyecto de investigación tiene como objetivo determinar si los niveles de anticuerpos IgG naturalmente adquiridos contra proteínas de fase pre-eritrocitica de *P. vivax,* están asociadas con el riesgo relativo (RR) de relapso. ***Materiales y métodos:*** Se utilizaron muestras de plasma de 300 individuos los cuales tuvieron infección de *P. vivax,* posterior a un seguimiento de 6 meses post-tratamiento se identificaron 32 pacientes con relapso y 268 no tuvieron relapso, se determinó los niveles de anticuerpos por la técnica de ELISA indirecto en el día de enrolamiento para la determinación del riesgo relativo (RR) de relapso, también se realizó el análisis de Kaplan meier para la determinación de variación de proporciones de eventos de relapso entre los niveles altos y bajos de anticuerpos IgG contra las 7 proteínas pre-eritrocíticas evaluadas. Finalmente, se evaluó la cinética de anticuerpos en el día de enrolamiento versus el día de relapso. ***Resultados***: Los resultados muestran que las variables parasitemia y esquema de tratamiento están asociadas a un fututo relapso. Los niveles de anticuerpos en el día de enrolamiento fueron similares en el grupo de relapso versus no relapso, solo se observó un mayor nivel de anticuerpos en la población adulta contra las proteínas SPECT-1 y GEST. El análisis de Kaplan meier muestra que los altos niveles de anticuerpos contra las proteínas ETRAMP, SPECT-1 y CelTOS tienen una mayor proporción de eventos de relapso comparados con los bajos niveles en la población adulta. El análisis de RR muestra que las variables sexo

(hombre), parasitemia (>2900 par/ul) y esquema de tratamiento (5mg/kg por 5 días) son factores de riesgo para el desarrollo de un futuro relapso. Solo los altos niveles de anticuerpos de fase pre-eritrocitica junto con la sanguínea en la población de niños sería un factor de riesgo. La cinética de anticuerpos muestra que la proteína con mayor disminución al momento de relapso fue CSP con -56% en la población en general. ***Conclusión:*** El presente estudio identifica nuevas variables epidemiológicas que están asociadas con el desarrollo de un futuro relapso como sexo, nivel de parasitemia, esquema de tratamiento y niveles de anticuerpos las cuales pueden variar dependiendo del grupo de edad de los individuos.

PALABRAS CLAVES

Plasmodium vivax, anticuerpos IgG, proteínas pre-eritrocíticas, relapso, selva amazónica peruana

(DeCS/BIREME)

ABSTRACT

Introduction: Relapse, which is defined as the cause of a new *P. vivax* malaria event by the activation of the dormant stage of the parasite in the host liver, is one of the main limitations for the control and subsequent elimination of malaria. ***Objective:*** The present research project aims to determine whether naturally acquired IgG antibody levels against *P. vivax* pre-erythrocytic phase proteins are associated with the relative risk (RR) of relapse. ***Materials and methods:*** Plasma samples from 300 individuals who had *P. vivax* infection were used. After a 6-month post-treatment follow-up, 32 patients with relapse and 268 did not have relapse were identified. Antibody levels were determined by indirect ELISA on the day of enrollment to determine the relative risk (RR) of relapse. Kaplan-meier analysis was also performed to determine the variation in proportions of relapse events between high and low IgG antibody levels against the 7 pre-erythrocytic proteins evaluated. Finally, antibody kinetics on the day of enrollment versus the day of relapse were evaluated. ***Results:*** The results show that the variables parasitemia and treatment regimen are associated with a future relapse. Antibody levels on the day of enrollment were similar in the relapse versus non-relapse group, only a higher level of antibodies was observed in the adult population against the SPECT-1 and GEST proteins. The Kaplan-Meier analysis shows that high levels of antibodies against the ETRAMP, SPECT-1 and CelTOS proteins have a higher proportion of relapse events compared to low levels in the adult population. The RR analysis shows that the variables sex (male), parasitemia (>2900 pairs/ul) and treatment regimen (5 mg/kg for 5 days) are risk factors for the development of a future relapse. Only high levels of pre-erythrocytic phase antibodies together with

blood in the pediatric population would be a risk factor. Antibody kinetics show that the protein with the greatest decrease at the time of relapse was CSP with -56% in the general population. ***Conclusion:*** The present study identifies new epidemiological variables that are associated with the development of a future relapse such as sex, parasitemia level, treatment regimen and antibody levels which may vary depending on the age group of the individuals.

KEY WORDS

Plasmodium vivax, IgG antibodies, pre-erythrocytic antibodies, relapse and Peruvian amazon basin

(MeSH/NLM)

I. INTRODUCCION

La malaria en humanos es causada por la infección del parásito unicelular del género *Plasmodium*, este parásito es transmitido por el insecto vector del género *Anopheles* (1). La malaria es endémica en regiones geográficas que ocupan la tercera parte de la población mundial, siendo estas regiones el África, Medio oriente, Sureste de Asia y Sudamérica (1). La incidencia global de malaria reportada en el año 2023 fue aproximadamente de 250 millones casos con alrededor de 0.5 millones de muertes (2). Las dos principales especies de malaria que infectan a humanos y que tienen mayor impacto para la salud pública son *P. falciparum* y *P. vivax*, siendo *P. falciparum* la especie más relacionada a fallecimientos en poblaciones de infantes y niños en la zona del África subsahariana (3)(4). Por otro lado, *P. vivax* es la especie de malaria con mayor distribución geográfica fuera del continente africano, siendo la incidencia mayor en las zonas del Sureste asiático y Sudamérica (5). El Perú es un país endémico de malaria, siendo altamente prevalente en zonas aledañas en la cuenca amazónica, registrando anualmente cerca de 15000-50000 casos de malaria en la última década, siendo del 75-90% del total de casos, causados por *P. vivax*, produciendo un impacto significativo en la salud pública de las regiones endémicas de malaria en el Perú (6)(7).

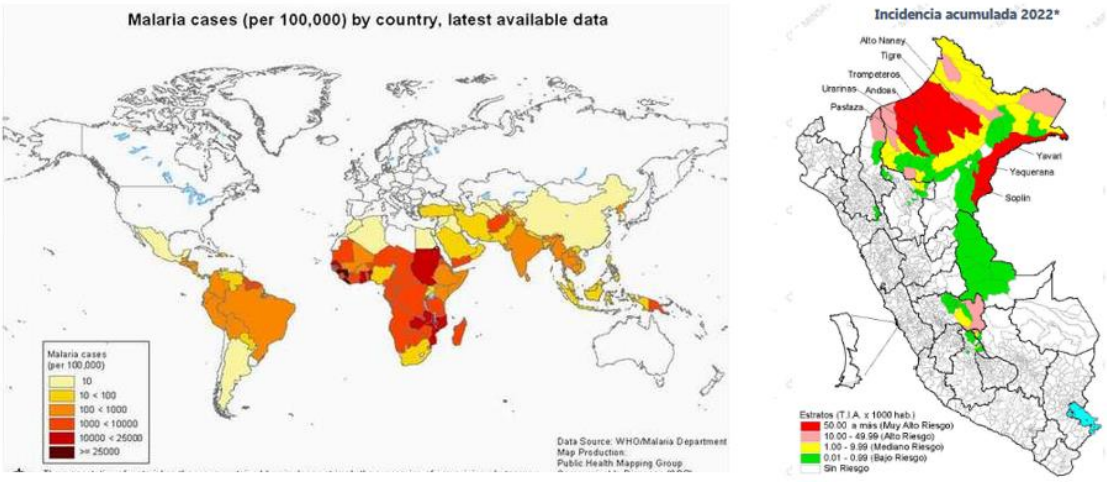

Figura 1. Distribución mundial de la malaria (izquierda), distribución en el Perú de la malaria (derecha). Fuente: OMS y CDC-Perú

El ciclo biológico de la malaria inicia con la picadura del insecto vector, el cual introduce por la piel forma unicelular llamada esporozoito, este esporozoito se traslada por el sistema sanguíneo desde la piel al hígado (fase pre-eritrocítica), luego mediante una reproducción asexual dentro de los hepatocitos en el hígado se forman los merozoitos los cuales se liberan en el torrente sanguíneo, teniendo como células blanco a los glóbulos rojos iniciando la fase sanguínea y también los cuadros de sintomatología de la enfermedad entre los cuales se encuentran dolor de cabeza, fiebre, dolor corporal, anemia, plaquetopenia, pudiéndose producir eventos severos de enfermedad y casos fatales (1).

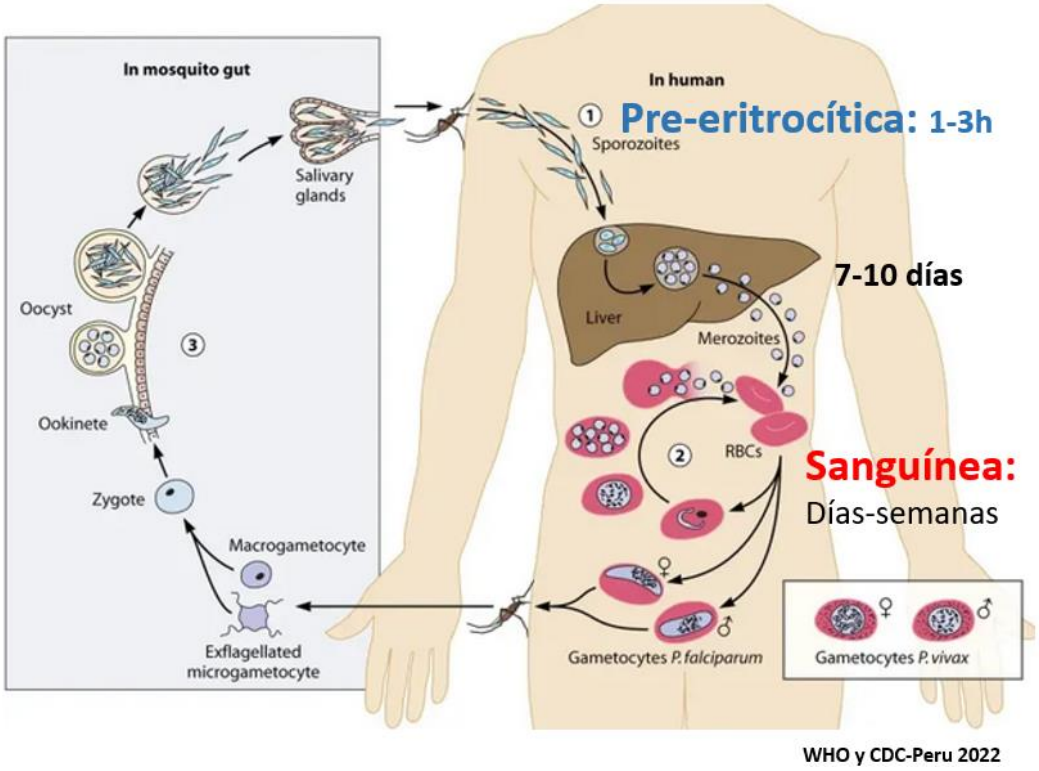

Figura 2. Ciclo biológico de la malaria, desarrollo en el mosquito (izquierda) y desarrollo en el huésped humano (derecha). Fuente: CDC

P. vivax tiene una característica biológica particular en su ciclo biológico dentro del huésped humano la cual lo diferencia de *P. falciparum*, esta característica es la capacidad de producir relapsos. Los relapsos se producen por la activación del parásito, los cuales se encuentran en estado durmiente en las células hepáticas, esta activación puede producirse meses o años después de una infección (8). Una proporción del 10-80% de nuevos eventos de *P. vivax* (posteriores a una infección) pueden ser causados por el relapso, los cuales pueden producirse dependiendo del área geográfica, insecto vector, condiciones medioambientales, esquema de tratamiento antimalárico utilizado, entre otros. (9)(10)(11). Esta característica biológica produce un impacto significativo en las estrategias de control y eliminación

de la malaria debido a que los individuos con hipnozoitos latentes pueden ser una fuente de activa de reservorio de *P. vivax*, con el potencial de producir brotes de la enfermedad en zonas en la cuales estén en vías de reducción y/o eliminación de malaria.

La respuesta inmunológica naturalmente adquirida frente a *P. vivax* ha sido descrita previamente. Se observa una respuesta mediada principalmente por anticuerpos IgG, esta respuesta ha sido principalmente evaluada contra antígenos de fase sanguínea como marcadores de exposición a *P. vivax* (12)(13)(14). En estudios de cohorte en zonas endémicas de *P. vivax* como Papua Nueva Guinea, Tailandia y Brasil se observó un menor riesgo de un posterior evento de malaria en individuos con altos títulos de anticuerpos IgG naturalmente adquiridos contra las proteínas de fase sanguínea Duffy binding protein-II (DBP-II) y la proteína de unión al Reticulocito 2b (RBP2b) (15)(16). Por otro lado, la inmunidad adquirida frente a antígenos inmunogenicos de la fase pre-eritrocítica ha sido poco explorada. En estudios transversales se describen a estos antígenos como potenciales marcadores de exposición (17). Sin embargo, el rol de los anticuerpos contra antígenos de fase pre-eritrocítica y su posible efecto sobre el riesgo de futuras infecciones de *P. vivax* es todavía limitado y aún más limitado su rol en los relapsos.

Recientemente, los avances en el desarrollo de modelos animales para el mejor entendimiento de la biología de la malaria han permitido evaluar el rol de los anticuerpos contra antígenos de fase pre- eritrocítica y su efecto sobre el relapso (18). Se observó que la administración de anticuerpos

monoclonales IgG contra la proteína Circumesporozoito (CSP) (la cual es la principal proteína de superficie del parásito en fase pre-eritrocítica, expresada en la membrana del esporozoito) redujo significativamente el número de hipnozoitos y los posteriores eventos de relapso (19). Estos resultados sugieren que los anticuerpos IgG contra antígenos de fase pre-eritrocítica podrían disminuir el riesgo de futuros relapsos.

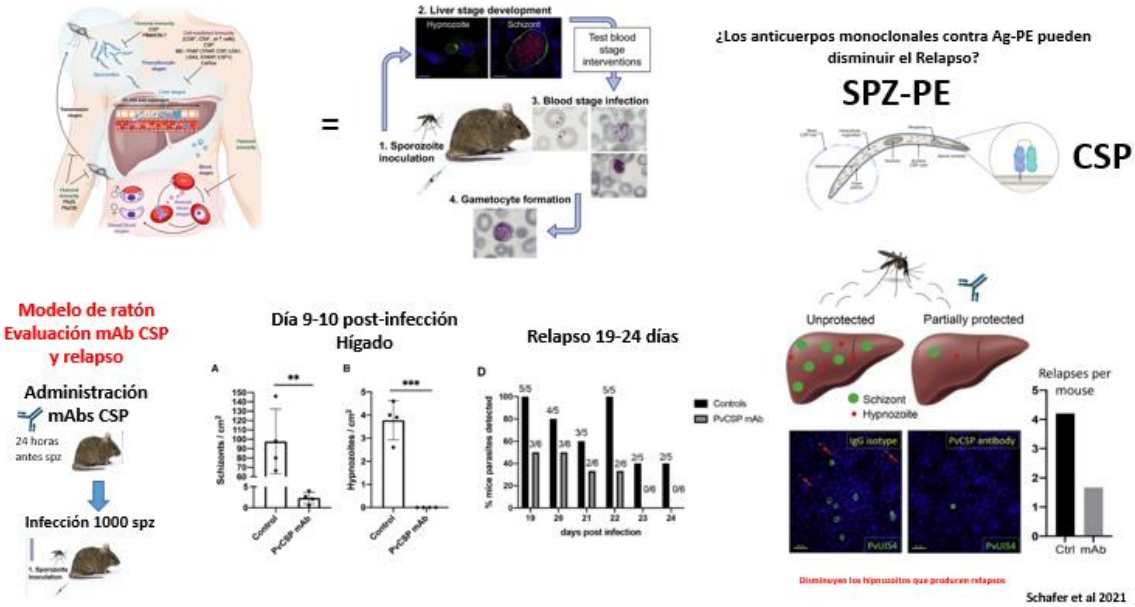

Figura 3. Evaluación de la capacidad protectora de los anticuerpos monoclonales CSP contra el desarrollo de hipnozoitos y relapso en modelo humanizado de ratón. Fuente: Schafer *et al* 2021

El presente proyecto de tesis evalúo la asociación entre los niveles de anticuerpos IgG naturalmente adquiridos contra antígenos de fase pre-eritrocítica de *P. vivax* y el riesgo relativo de relapso en pacientes infectados con *P. vivax* provenientes de la selva amazónica peruana.

II.OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluación de los niveles de anticuerpos IgG naturalmente adquiridos contra antígenos de fase Pre-eritrocítica de *P. vivax* y la determinación del riesgo relativo (RR) de relapso durante 6 meses post infección natural con *P. vivax*, en pacientes provenientes de la selva amazónica peruana durante los años 2006-2008.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Descripción general y análisis bivariado de las variables epidemiológicas entre el grupo de no relapso versus relapso.
- Evaluación de niveles de anticuerpos IgG y prevalencia contra antígenos de fase Pre-eritrocítica de *P. vivax* en el día de enrolamiento (día 0) entre los grupos de no relapso versus relapso.
- Evaluación de curvas de Kaplan meier para la determinación de diferencias en eventos de relapso entre altos y bajos niveles de anticuerpos IgG contra cada proteína de fase Pre-eritrocítica de *P. vivax*.
- Evaluación de la variación de niveles de anticuerpos IgG contra cada proteína de fase Pre-eritrocítica de *P. vivax* en el día de enrolamiento (Dia 0) versus el momento del relapso.

*Se determinó el efecto de la variable edad (niños vs adultos) en los objetivos específicos.

III. HIPÓTESIS

Altos niveles de anticuerpos IgG naturalmente adquiridos contra proteínas de fase pre-eritrocítica de *P. vivax* disminuyen el riesgo de un futuro relapso.

IV. MARCO TEÓRICO

El fenómeno de relapso en *P. vivax* ha significado una limitación fundamental para la eliminación de la malaria causada por *P. vivax* a nivel mundial, debido a la activación del estadio durmiente del parasito en el hígado (hipnozoito) el cual puede ser causante de entre el 10-80% de nuevos casos de *P. vivax* malaria dependiendo de diversos factores inherentes al huésped, al parasito, al insecto vector o al medio ambiente, con lo cual se buscan nuevas estrategias en las cuales se tomen en consideración la interacción inmunológica del huésped con biología del relapso del parasito (9,10,11).

El rol de la respuesta inmune naturalmente adquirida mediada por anticuerpos IgG en *P. vivax* ha sido explorada anteriormente contra proteínas del parasito que se expresan en el estadio sanguíneo como MSP1, DBP-II, RBP2b, entre otros (15)(16). Observándose una protección natural parcial en individuos con altos títulos de anticuerpos contra estas proteínas en zonas de alta transmisión de malaria en el continente asiático. Sin embargo, pocos estudios han evaluado la capacidad protectora de los anticuerpos IgG contra antígenos de fase pre-eritrocítica en los eventos de malaria y aún más limitada es la información sobre su capacidad inhibitoria en el fenómeno del relapso.

En la última década se ha explorado el rol protector contra la infección de malaria de anticuerpos IgG contra ciertas proteínas de fase pre-eritrocítica de *P. vivax* como CSP, CelTOS y TRAP mostrando una inmunidad parcial en modelos animales y voluntarios humanos en estudios clínicos de fase 1 y 2 post vacunación (20)(21)

Recientemente, Ntumngia *et al* en el 2024 evaluó la respuesta inmune de anticuerpos IgG naturalmente adquiridos (posterior a infección con *P. vivax*) contra las proteínas pre-eritrocíticas CSP, CelTOS, SPECT1 y SSP3 de *P. vivax* en zonas con alta transmisión de *P. vivax* como es Tailandia. Se observó que los anticuerpos IgG naturalmente adquiridos bloquearon parcialmente la infección de los esporozoitos a las células del hígado en modelos in vitro, disminuyendo la formación de formas exoeritrociticas y potencialmente los hipnozoitos (22). La evidencia de la capacidad protectora de los anticuerpos naturalmente adquiridos, junto a los ensayos en modelos animales de ratón en los cuales se observó que los anticuerpos monoclonales contra CSP también poseen un rol protectivo tanto en el desarrollo de hipnozoitos como en el número de eventos de relapso, promueven futuras investigaciones en las cuales se pueda evaluar el rol protector ante relapso de anticuerpos IgG naturalmente adquiridos contra nuevas proteínas pre-eritrociticas de *P. vivax* (19,22).

En el U.S. Naval Medical Research Unit SOUTH en Lima-Perú (NAMRU SOUTH), recientemente se evaluó la inmunogenicidad de un panel de 13 proteínas pre-eritrocíticas de *P. vivax* en individuos de la población de Iquitos después de un evento de malaria *P. vivax* entre los años 2012-2016. Los resultados mostraron que estas proteínas eran reactivas en pacientes con reciente infección con *P. vivax,* se observó una prevalencia variable de 58-99% contra este set de proteínas. La cinética de anticuerpos mostró que el mantenimiento de los anticuerpos era estable hasta 6 meses después del evento de malaria, con una variación de hasta -6% en promedio contra cada proteína. En el estudio transversal, se observó que los altos respondedores de anticuerpos IgG contra este panel de proteínas pre-eritrocíticas mostraron una menor parasitemia comparado con los bajos respondedores (1921 vs. 4663 parásitos por microlitro de sangre, $p<0.05$) (23). Este estudio muestra que las proteínas de *P. vivax* de fase pre-eritrocítica son inmunogénicas en la población de Iquitos en Perú y los altos niveles de anticuerpos IgG naturalmente adquiridos son protectivos contra la infección de malaria al disminuir la carga parasitaria. Sin embargo, el rol que cumplirían estos anticuerpos naturales en un posterior relapso todavía es desconocido.

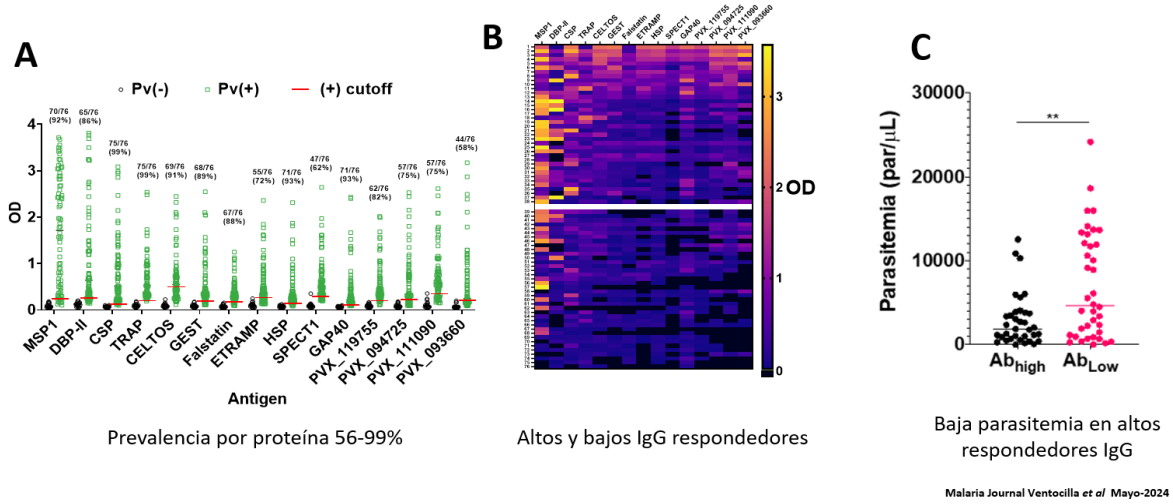

Figura 4. Evaluación de la inmunogenicidad mediada por anticuerpos IgG contra un panel de 13 proteínas de fase pre-eritrocitica en un estudio transversal en pacientes con *P. vivax* de Iquitos durante 2012-2016. **A**. Nivel de prevalencia contra proteínas de fase pre-eritrocítica. **B**. Matriz de Respuesta entre altos y bajos respondedores contra proteínas de fase pre-eritrocítica. **C**. Evaluación de parasitemia entre altos y bajos respondedores.

El presente proyecto de tesis evaluó la asociación entre los niveles de anticuerpos IgG naturalmente adquiridos contra antígenos de fase pre-eritrocítica de *P. vivax* y el riesgo relativo de relapso en pacientes infectados con *P. vivax* provenientes de la selva de un estudio previo de tipo cohorte en la selva amazónica peruana.

V. METODOLOGÍA

Estudio madre

El presente proyecto de tesis es un sub-estudio, de un estudio madre de tipo ensayo clínico de tipo cohorte en el cual se probaron 3 dosis de régimen de la droga Primaquina para determinar su efecto sobre la disminución de riesgo de relapsos de malaria *P. vivax* durante los años 2006-2008 en la selva amazónica peruana, este estudio madre se realizó en NAMRU SOUTH con aprobación del comité de ética del Instituto Nacional de Salud con código 009-2004 y del NAMRU SOUTH con código NMRCD.2005.0005.

El presente proyecto de investigación se enfocó como un estudio observacional-analítico de tipo cohorte. Las muestras de plasma de los pacientes del estudio madre estuvieron almacenadas en el criobanco a -80C en NAMRU SOUTH. Para el presente proyecto de tesis se utilizaron solo las muestras con consentimiento informado y uso futuro lo cual fue corroborado por el comité de ética del NAMRU SOUTH.

Población

La población del estudio fue la misma población del estudio madre, pero con confirmación de uso futuro de las muestras para el posterior análisis de anticuerpos en muestras de plasma. Un total de 300 pacientes fueron corroborados por el comité de ética del NAMRU SOUTH para el uso de sus muestras del plasma en el presente estudio.

Criterios de inclusión

Todos los pacientes que hayan firmado el consentimiento informado y el uso futuro de muestras.

Criterios de exclusión

Todos los pacientes que no hayan firmado el consentimiento informado y el uso futuro de muestras.

Tipo de muestreo

Se incluyeron todos los pacientes enrolados en el estudio madre con el consentimiento informado y uso futuro de muestras biológicas. Después de 6 meses del enrolamiento se identificaron los pacientes con el evento de relapso y no relapso para su posterior análisis del riesgo relativo (RR).

Procedimientos del estudio

En el presente estudio solo se realizó la determinación de anticuerpos en las muestras de plasma mediante la técnica inmunológica de ELISA. También se tuvo acceso a la base epidemiológica de datos de los pacientes

para el análisis de riesgo relativo. No se tuvo acceso a la identificación de los individuos los cuales fueron codificados previamente.

Recolección de datos

No se recolectaron nuevos datos, se trabajaron con la base de datos generada por el estudio madre. Sin embargo, los datos de títulos de anticuerpos IgG y la categorización de algunas variables numéricas se obtuvieron del presente estudio

Procesamiento de muestras biológicas

No se colectaron nuevas muestras biológicas, solo se utilizaron las muestras de plasma del estudio madre con consentimiento informado y uso futuro, corroborado por el comité de ética institucional del NAMRU SOUTH. En el presente estudio las muestras de plasma fueron utilizadas para la determinación de la concentración de anticuerpos IgG contra hasta 13 proteínas de fase pre-eritrocítica de *P. vivax* utilizando la técnica inmunológica de ELISA-indirecto las cuales fueron analizadas en NAMRU SOUTH Lima-Perú.

Estas proteínas fueron incubadas en placas de ELISA (Nunc Marxisorp) a una concentración de 2ug/ml diluidas en Buffer fosfato salino 1X (PBS1X) e incubados en refrigeración (4C°) durante la noche anterior al procesamiento. Al día siguiente se eliminó la solución con las proteínas y se lavaron las placas con la solución de

lavado PBS1X/Tween20 (0.05%) por cinco veces. Luego las placas fueron bloqueadas con la solución de bloqueo TBS1X/Skim milk 5% por 1 hora. Después del bloqueo se lavaron las placas 5 veces con PBS1X/Tween20 (0.05%) y se añadieron las muestras de plasma de los pacientes a una dilución de plasma en PBS 1X de 1/200, estas muestras fueron incubadas por 2 horas. Posteriormente se lavaron las placas 5 veces y se añadió los anti-anticuerpos humanos IgG unidos con la enzima peroxidasa a una dilución de 1/6000 y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron las placas 5 veces y se añadió el sustrato o-p-phenylenediamine con peróxido de hidrogeno y se dejaron incubar durante una hora para la detección de la señal de densidad óptica (OD). Finalmente, la reacción enzimática fue detenida con Ácido clorhídrico 3N y se realizó la lectura del OD en un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 492 nanómetros.

Variables de estudio

Variable dependiente (outcome): La variable outcome "relapso" es dicotómica y responde a tener o no relapso, confirmada por diagnóstico molecular por marcadores genéticos microsatélites entre los días 35 a 210 post infección natural con *P. vivax*.

Variable independiente (exposición): La variable exposición es los niveles de anticuerpos IgG determinado por la densidad óptica (OD) en la técnica de ELISA, contra proteínas de fase pre-eritrocítica de *P. vivax*, medida al inicio del estudio (en la infección natural de *P. vivax*,

dia 0).

Otras covariables de interés:

En el presente estudio se integrarán al modelo de regresión logística multivariada las variables epidemiológicas como peso, lugar de residencia, edad, esquema de tratamiento. También otros marcadores biológicos como numero de parásitos de *P. vivax* en sangre, plaquetas, hematocrito, entre otros.

Procesamiento de datos y análisis estadístico

Análisis generales:

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa estadístico Stata versión 17.0 para MS Windows (Stata Corp. LP, College Station, TX, USA) y software Graph Pad version 7. Se procedió con la limpieza de la base de datos, evaluando valores plausibles, datos faltantes. Asimismo, se generaron co-variables que ayuden con la interpretación del análisis de interés como la posible categorización de variable numéricas como el nivel de anticuerpos, entre otros.

Análisis descriptivo y bivariado:

En el presente proyecto de tesis se compararon los niveles de anticuerpos IgG contra hasta 7 proteínas de *P. vivax* de fase pre-eritrocítica, medidos al inicio del enrolamiento (dia0) y su asociación con el evento de

recurrencia hasta 6 meses después del inicio del enrolamiento. Se determinó diferencias estadísticamente significativas de medias o distribuciones entre el grupo de relapso y no relapso, se analizó los siguientes estadísticos: Variables numéricas: T- student test y/o Mann Whitney. También se compararon las frecuencias mediante la prueba de Chi2 o test exacto de fisher, para evaluar si existe diferencia entre las proporciones de variable categóricas entre los grupos de relapso y no relapso.

Análisis de sobrevida (Kaplan-Meier):

En el presente análisis se determinó la diferencia entre las curvas de eventos de relapso en grupos de altos y bajos niveles de anticuerpos contra cada proteína de fase pre-eritrocítica de *P. vivax*, mediante el estadístico de log-rank test.

Análisis de regresión logística multivariada:

Para el análisis de la asociación de interés, se evaluó el riesgo relativo (RR), que evalúa la variable de desenlace dicotómico (relapso o no relapso) durante los 6 meses de seguimiento y los niveles de anticuerpos contras 13 proteínas de fase pre-eritrocítica. Se ajustará por las co-variables confusoras para el modelo de regresión logística multivariada.

Tamaño de muestra y Potencia estadística

El cálculo de tamaño muestral se realizó con el programa estadístico OpenEpi v3. El porcentaje de relapsos observados después de un episodio de malaria se basó en reportes previos de pacientes infectados con *P. vivax* provenientes de Brasil y Asia con recurrencias de entre 10-80%. Sin embargo, se desconoce la prevalencia de expuestos mediante la medición de anticuerpos IgG contra las proteínas de fase pre-eritrocítica, con los cual plateamos dos escenarios.

Escenario 1 (conservador, presumiendo una diferencia amplia de 60% en relapsos entre expuestos y no expuestos): Para una potencia estadística de 80%, alfa =0.05, una proporción de 2:1 de expuestos/no expuestos a positividad a anticuerpos IgG contra proteínas de fase pre-eritrocítica de *P. vivax*, una **diferencia de 60 %** de relapsos en el grupo de expuestos (20% relapsos) y no expuestos (80% relapsos). Se obtuvo que se necesitan utilizar 16 expuestos vs 8 no expuestos, obteniendo un total de 24 individuos.

Sample Size:X-Sectional, Cohort, & Randomized Clinical Trials	
Two-sided significance level(1-alpha):	95
Power(1-beta, % chance of detecting):	80
Ratio of sample size, Unexposed/Exposed:	0.5
Percent of Unexposed with Outcome:	80
Percent of Exposed with Outcome:	19
Odds Ratio:	0.06
Risk/Prevalence Ratio:	0.25
Risk/Prevalence difference:	-60

	Kelsey	Fleiss	Fleiss with CC
Sample Size - Exposed	16	14	19
Sample Size-Nonexposed	8	7	10
Total sample size:	24	21	29

References

Kelsey et al., Methods in Observational Epidemiology 2nd Edition, Table 12-15
Fleiss, Statistical Methods for Rates and Proportions, formulas 3.18 &3.19
CC = continuity correction
Results are rounded up to the nearest integer.
Print from the browser menu or select, copy, and paste to other programs.

Results from OpenEpi, Version 3, open source calculator--SSCohort
Print from the browser with ctrl-P
or select text to copy and paste to other programs.

Escenario 2 (extremo, presumiendo una diferencia corta de 30% en relapsos entre expuestos y no expuestos): Para una potencia estadística de 80%, alfa =0.05, una proporción de 2:1 de expuestos/no expuestos a positividad a anticuerpos IgG contra proteínas de fase pre-eritrocítica de *P. vivax*, **una diferencia de 30%** de relapsos en el grupo de expuestos (50% relapsos) y no expuestos (80% relapsos). Se obtuvo que se necesitan utilizar 63 expuestos vs 32 no expuestos, obteniendo un total de 95 individuos.

Sample Size:X-Sectional, Cohort, & Randomized Clinical Trials	
Two-sided significance level(1-alpha):	95
Power(1-beta, % chance of detecting):	80
Ratio of sample size, Unexposed/Exposed:	0.5
Percent of Unexposed with Outcome:	80
Percent of Exposed with Outcome:	50
Odds Ratio:	0.25
Risk/Prevalence Ratio:	0.63
Risk/Prevalence difference:	-30

	Kelsey	Fleiss	Fleiss with CC
Sample Size - Exposed	63	59	69
Sample Size-Nonexposed	32	30	35
Total sample size:	95	89	104

References

Kelsey et al., Methods in Observational Epidemiology 2nd Edition, Table 12-15
Fleiss, Statistical Methods for Rates and Proportions, formulas 3.18 &3.19
CC = continuity correction
Results are rounded up to the nearest integer.
Print from the browser menu or select, copy, and paste to other programs.

Results from OpenEpi, Version 3, open source calculator--SSCohort
Print from the browser with ctrl-P
or select text to copy and paste to other programs.

El análisis del tamaño de muestra necesaria para el presente estudio tanto para el escenario conservador y extremo calcula un total de 24 a 95 individuos para determinar que existe una diferencia de relapsos entre los grupos expuestos y no expuesto en el estudio de cohorte.

Sin embargo, al ser este escenario teórico y al no tener datos similares en el Perú o la región de Sudamérica sobre estudios de cohorte para la evaluación de niveles de anticuerpos contra **antígenos de fase pre-eritrocítica** y su potencial efecto protector sobre el relapso, se decidió incluir el total de las muestras del estudio madre que son un total de 300 individuos, con lo cual se podría aumentar la potencia estadística del estudio. Existe evaluaciones sobre la protección de anticuerpos contra **antígenos de la fase sanguínea** en malaria en los cuales utilizan estudios de cohorte para determinar el riesgo sobre una posterior

infección, en estos estudios se enrolaron entre **200-500 pacientes en estudios de cohorte**, con lo cual pudieron encontrar significancia estadística entre los grupos de expuestos y no expuestos (midiendo los niveles de anticuerpos IgG) para determinar el riesgo de un posterior evento de malaria. (15,16)

Aspectos éticos:

El estudio madre fue aprobado por el comité de ética del NAMRU SOUTH con código NMRCD.2005.0005. Para el presente proyecto de tesis se realizó un acuerdo institucional CRADA entre el tesista (Julio Ventocilla) y el NAMRU SOUTH con la finalidad de incluir el trabajo de la presente tesis dentro de sus horas laborables. El presente proyecto también ya posee registro SIDISI con código **212989**.

Presupuesto y financiamiento:

El presente proyecto fue financiado por NAMRU SOUTH y no presentó un gasto para el tesista o para UPCH.

VI. RESULTADOS

VI.1 Evaluación de variables epidemiológicas en el grupo de No Relapso vs Relapso, en la población total y por grupo de edad (Adultos y niños)

Tabla 1. Descripcion de las variables sociodemograficas, Dia 0

Variables	Total (n=300)	No relapso (n=268)	Relapso (n=32)	*p value*
Edad (Mediana, IQR)	19 (13-34)	19 (14-35)	19 (10-30)	0.220
Genero (%hombres)	150 (50%)	129 (48%)	21 (66%)	0.061
Temperatura axilar (Mediana, IQR)	36.9 (36.3 - 38.0)	36.8 (36.3 - 38.0)	37.0 (36.5 - 38.0)	0.868
Peso (Kg) (Mediana, IQR)	52 (40-60)	52 (41-60)	54 (23-62)	0.911
Hematocrito	38 (35-40)	38 (35-40)	40 (35-42)	0.279
Plaquetas	74000 (57500-92000)	74000 (58000-89000)	73000 (51000-11200)	0.631
Parasitemia (par/ul) (Mediana, IQR)	4500 (1947-9591)	**4316 (1820-9269)**	**6129 (3606-10163)**	**0.046**
Comunidades				0.609
Padre Cocha	36 (12%)	32 (12%)	4 (13%)	
Santa Clara	57 (19%)	53 (20%)	4 (13%)	
San Juan	207 (69%)	183 (68%)	24 (75%)	
Tratamiento CQ (25mg/Kg)				**0.002**
PQ (0.25mg/Kg) 14 days	103 (34%)	**94 (35%)**	**9 (28%)**	
PQ (0.5mg/Kg) 5 days	99 (33%)	**80 (30%)**	**19 (59%)**	
PQ (0.5mg/Kg) 7 days	98 (33%)	**94 (35%)**	**4 (13%)**	

Tabla 1.1 Descripcion de las variables sociodemograficas, Dia 0 en adultos (n=167)

Variables	No relapso (n=150)	Relapso (n=17)	*p value*
Edad (Mediana, IQR)	33 (22-43)	29 (22-35)	0.360
Genero (%hombres)	76 (51%)	12 (71%)	0.119
Temperatura axilar (Mediana, IQR)	36.9 (36.4 - 38.0)	37.0 (36.8 - 37.7)	0.999
Peso (Kg) (Mediana, IQR)	58 (52-64)	62 (59-65)	0.058
Hematocrito	38(36-41	40 (39-43)	0.083
Plaquetas	77000 (61000-89000)	62000 (51000-111000)	0.908
Parasitemia (par/ul) (Mediana, IQR)	4492 (1672-9188)	5326 (3600-9224)	0.228
Comunidades			0.398
Padre Cocha	11(7%)	2(12%)	
Santa Clara	27(18%)	1(6%)	
San Juan	112(75%)	14(82%)	
Tratamiento CQ (25mg/Kg)			**0.026**
PQ (0.25mg/Kg) 14 days	**53 (35%)**	**2 (12%)**	
PQ (0.5mg/Kg) 5 days	**49 (33%)**	**11 (64%)**	
PQ (0.5mg/Kg) 7 days	**48 (32%)**	**4 (23%)**	

Tabla 1.2 Descripcion de las variables sociodemograficas, Dia 0 en niños (n=133)

Variables	No relapso (n=118)	Relapso (n=15)	*p value*
Edad (Mediana, IQR)	**13 (9-15)**	**10 (7-14)**	**0.051**
Genero (%hombres)	53 (45%)	9 (60%)	0.270
Temperatura axilar (Mediana, IQR)	36.8 (36.3 - 38.0)	36.8 (36.4 - 38.8)	0.819
Peso (Kg) (Mediana, IQR)	**40 (24-48)**	**21 (19-45)**	**0.027**
Hematocrito	38 (35-40)	37 (34-40)	0.836
Plaquetas	73000 (55000-89000)	85500 (60000-126000)	0.406
Parasitemia (par/ul) (Mediana, IQR)	**4145 (2067-9284)**	**7254 (5135-12670)**	**0.072**
Comunidades			0.609
Padre Cocha	32(12%)	4(13%)	
Santa Clara	53(20%)	4(13%)	
San Juan	183(68%)	24(75%)	
Tratamiento CQ (25mg/Kg)			**0.008**
PQ (0.25mg/Kg) 14 days	**41 (35%)**	**7 (47%)**	
PQ (0.5mg/Kg) 5 days	**31 (26%)**	**8 (53%)**	
PQ (0.5mg/Kg) 7 days	**46 (39%)**	**0 (0%)**	

Las variables epidemiológicas parasitemia y esquema de tratamiento de la droga antimalárica Primaquina muestras diferencias significativas en la población total (Tabla 1). Se observa que el valor de la mediana de la parasitemia de *P. vivax* en sangre es mayor en el grupo de Relapso vs el No Relapso (6129 vs 4316 par/ul, $p<0.05$). Por, otro lado el esquema de tratamiento utilizado que presento menor número de eventos de relapso (13% vs 28% o 59%, $p<0.05$) fue el de Primaquina (PQ) a dosis de 0.5miligramos por Kilogramos de paciente durante 7 días.

Los estudios de inmunidad natural en malaria muestran que la variable edad está correlacionada con la exposición y por ende al desarrollo de una inmunidad parcial protectiva contra los eventos de malaria en zonas de alta transmisión, con lo cual en el presente estudio se decidió evaluar el efecto de esta variable para los objetivos principal y secundarios, categorizando la variable edad en mayores de

18 años (adultos) y menores de 18 años (niños),

La comparación de los valores de las variables epidemiológicas en la población de adultos muestra que solo la variable tratamiento muestras diferencias en el número de eventos de Relapso, obteniendo un mayor número de relapsos (64% vs 12% o 23%) cuando se utiliza el esquema de tratamiento de Primaquina (PQ) a dosis de 0.5miligramos por Kilogramos de paciente durante 5 días (Tabla 1.1.).

En la población de niños se muestra variación de las variables epidemiológicas peso y esquema de tratamiento. Se observó que los niños que presentaron un posterior Relapso presentaron un menor valor de peso (21 vs 40 Kg, $p<0.05$), el esquema de tratamiento de Primaquina (PQ) que no presento ningún evento de Relapso fue el de dosis de 0.5miligramos por Kilogramos de paciente durante 7 días ($p<0.05$) (Tabla 1.2.). Por otro lado, también se observó tendencias marginales para las variables edad y parasitemia, presentado en el grupo de niños con un futuro relapso una mayor parasitemia (7254 vs 4145 par/ul, $p=0.072$) y una menor edad (10 vs 13, $p=0.051$) comparado con los que no presentaron Relapso.

VI.2 Evaluación de niveles de anticuerpos IgG y prevalencia contra antígenos de fase Pre-eritrocítica de *P. vivax* en el día de enrolamiento (día 0) entre los grupos de no relapso versus relapso.

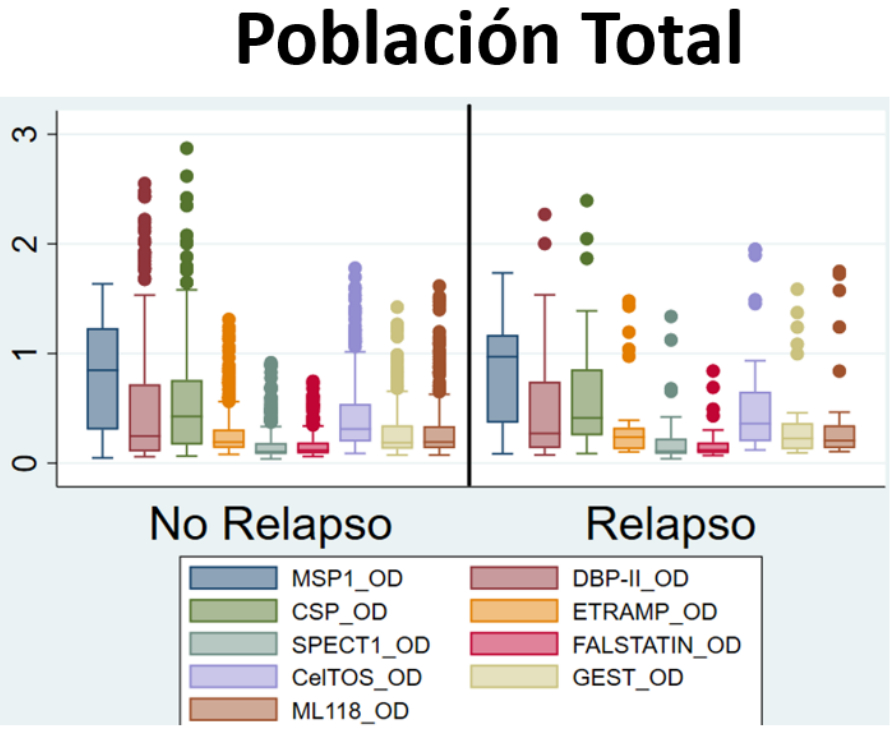

Figura 5. Evaluación de niveles de anticuerpos IgG contra un panel de proteínas de fase pre-eritrocítica, boxplot. Eje "y" muestra los niveles de anticuerpos determinados por densidad óptica (OD) y el eje "x" los grupos de no relapso (n=268) y relapso (n=32) en la población total

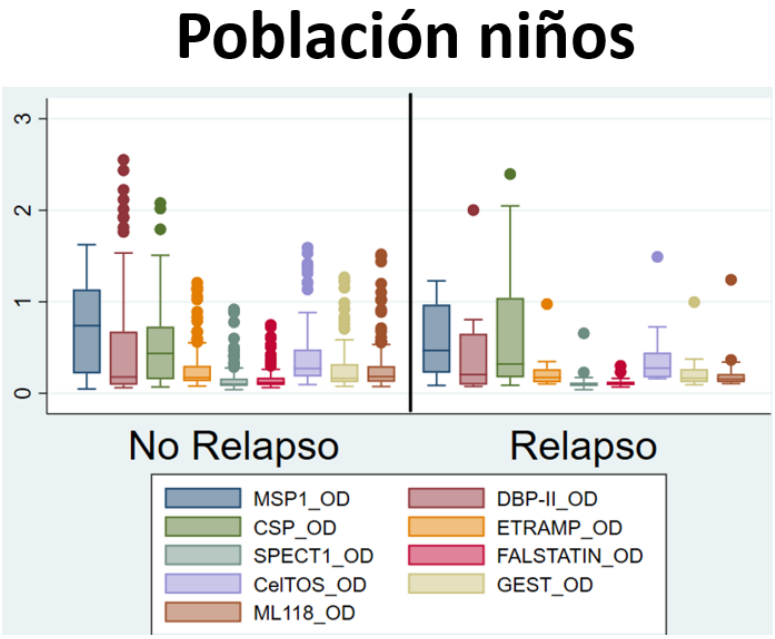

Figura 6. Evaluación de niveles de anticuerpos IgG contra un panel de proteínas de fase pre-eritrocítica, boxplot. Eje "y" muestra los niveles de anticuerpos determinados por densidad óptica (OD) y el eje "x" los grupos de no relapso (n=118) y relapso (n=15) en la población de niños

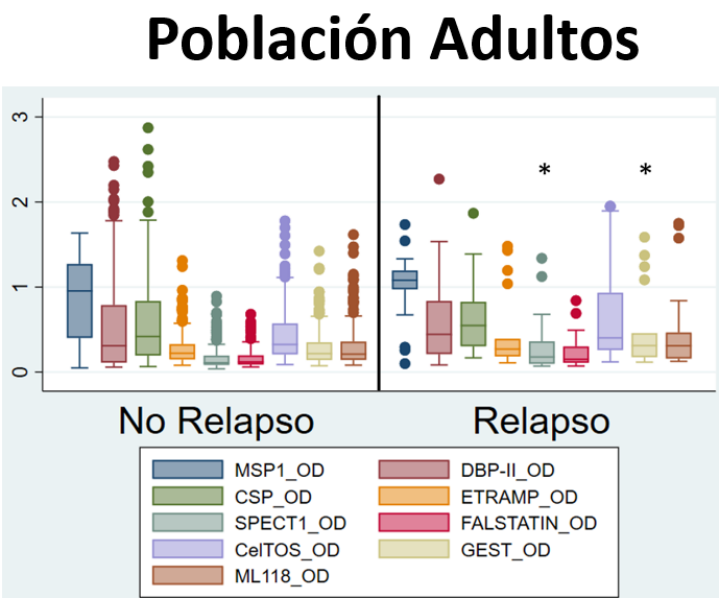

Figura 7. Evaluación de niveles de anticuerpos IgG contra un panel de proteínas de fase pre-eritrocítica, boxplot. Eje "y" muestra los niveles de anticuerpos determinados por densidad óptica (OD) y el eje "x" los grupos de no relapso (n=150) y relapso (n=17) en la población de adultos. *Representan diferencia significativa en valor de medianas

Se evaluó los niveles de anticuerpos IgG (valores de densidad óptica (OD) en eje Y de cada gráfico) entre el grupo de No Relapso vs Relapso, contra 7 proteínas de Fase Pre-eritrocitica (CSP, ETRAMP, SPECT1, FALSTATIN, CelTOS, GEST y ML118), también se utilizaron 2 proteínas de fase sanguínea (MSP1 y DBP-II) las cuales según la literatura están asociadas con la protección de inmunidad natural contra eventos de malaria.

Los resultados muestran que no hay diferencia entre los niveles de anticuerpos entre los grupos de No Relapso y Relapso, tanto en la población en general como en la población de niños. Sin embargo, se observó que los valores de anticuerpos IgG contra las proteínas de Fase Pre-eritrocitica SPECT1 y GEST tuvieron mayor valor de medianas de OD en la población adulta que presentaron un posterior Relapso.

Tabla 3. Prevalencia contra Antigenos de *P. vivax* en el Dia 0, poblacion total (n=300)

P. vivax antigens	All subjects (n=300)	No Relapse (n=268)	Relapse (n=32)	*p value*
DBP-II	179 (60%)	156 (58%)	23 (72%)	0.136
MSP1	248 (83%)	220 (82%)	28 (88%)	0.445
CSP	226 (75%)	199 (75%)	27 (84%)	0.209
ETRAMP	138 (46%)	121 (45%)	17 (53%)	0.392
SPECT1	166 (56%)	146 (54%)	20 (63%)	0.388
FALSTATIN	125 (42%)	108 (40%)	17 (53%)	0.164
CelTOS	185 (62%)	163 (61%)	22 (69%)	0.383
GEST	149 (49%)	132 (49%)	17 (53%)	0.679
ML118	195 (65%)	176 (66%)	19 (59%)	0.480

Tabla 3.1. Prevalencia contra Antigenos de *P. vivax* en el Dia 0, poblacion niños (n=133)

P. vivax antigens	All subjects (n=133)	No Relapse (n=118)	Relapse (n=15)	*p value*
DBP-II	68 (51%)	59 (50%)	9 (60%)	0.466
MSP1	188 (81%)	96 (81%)	12 (80%)	0.899
CSP	94 (71%)	83 (70%)	11 (73%)	0.810
ETRAMP	49 (37%)	44 (37%)	5 (33%)	0.765
SPECT1	67 (50%)	61 (52%)	6 (40%)	0.393
FALSTATIN	49 (37%)	46 (39%)	3 (20%)	0.151
CelTOS	74 (56%)	66 (56%)	8 (53%)	0.849
GEST	55 (41%)	66 (56%)	8 (53%)	0.849
ML118	79 (59%)	72 (61%)	7 (45%)	0.286

Tabla 3.2. Prevalencia contra Antigenos de *P. vivax* en el Dia 0, poblacion Adultos (n=167)

P. vivax antigens	All subjects (n=167)	No Relapse (n=150)	Relapse (n=17)	*p value*
DBP-II	111 (67%)	97 (65%)	14 (82%)	0.143
MSP1	140 (84%)	124 (83%)	16 (94%)	0.224
CSP	132 (79%)	116 (77%)	16 (94%)	0.107
ETRAMP	89 (53%)	77 (51%)	12 (71%)	0.132
SPECT1	98 (59%)	86 (57%)	12 (71%)	0.293
FALSTATIN	74 (44%)	64 (43%)	10 (59%)	0.204
CelTOS	111 (67%)	97 (65%)	14 (82%)	0.143
GEST	94 (56%)	82 (55%)	12 (71%)	0.210
ML118	116 (70%)	104 (69%)	12 (71%)	0.915

La prevalencia contra cada proteína evaluada en el presente estudio se determinó mediante los niveles de cutoff contra cada proteína. Se utilizaron un total de 24 muestras de sueros de pacientes no expuestos a malaria provenientes de la región de la costa peruana (Piura). Mediante la técnica de ELISA se obtuvo el promedio de los valores de OD del total de los 24 pacientes más 3 desviaciones estándar contra cada proteína evaluada, obteniendo valores de cutoff en un rango de 0.1 a

0.25 de OD. Los individuos que presentaron valores superiores al cutoff contra cada proteína fueron considerados como positivos a exposición a malaria *P. vivax*.

En el presente estudio, mostró que los niveles de prevalencia contra cada proteína estuvieron en un rango de 42-83% en la población en general, en adultos de 44-84% y en niños de 37-81%. Al comparar los niveles de prevalencia entre los grupos de No Relapso vs Relapso no se encontraron diferencias significativas en la población en general, población de adultos o población en niños.

VI.3 Evaluación de curvas de Kaplan meier para la determinación de diferencias en eventos de relapso entre altos y bajos niveles de anticuerpos IgG contra cada proteína de fase Pre-eritrocítica de *P. vivax.*

El análisis de Kaplan-meier se realizó mediante la utilización de la variable tiempo al evento de relapso, el cual fue obtenido durante el seguimiento de infección de malaria durante los 6 meses posteriores al evento inicial de malaria *P. vivax* del estudio madre. Del total de los 300 individuos en el presente estudio, 32 de ellos presentaron Relapso. El análisis de Kaplan-meier tuvo como objetivo determinar si los niveles de anticuerpos IgG (los cuales se categorizaron en niveles altos o bajos) contra las proteínas de *P. vivax* tienen algún efecto en los eventos de Relapso.

En el eje de la "x" de los gráficos se muestran los días de seguimiento del estudio y en el eje de la "y" la proporción de casos con eventos de relapso. Las líneas rojas muestran a los individuos con altos niveles de anticuerpos y las líneas azules los individuos con bajo niveles de anticuerpos contra cada proteína de *P. vivax*. Nuestra hipótesis inicial postuló que los pacientes con altos niveles (líneas rojas) tendrían menor cantidad de eventos de relapsos.

El análisis de Kaplan-meier muestra que no hay diferencias significativas en las curvas de los eventos de Relapso contra cada proteína de *P. vivax* en la población en general o la población de niños. Sin embargo, en la población de adultos se observan que los individuos con altos niveles de anticuerpos contra las proteínas ETRAMP, SPECT1 y CelTOS presentaron mayores eventos de Relapso en comparación con los que tuvieron bajos niveles de anticuerpos (p=0.06-0.07)

Kaplan meier en población en general

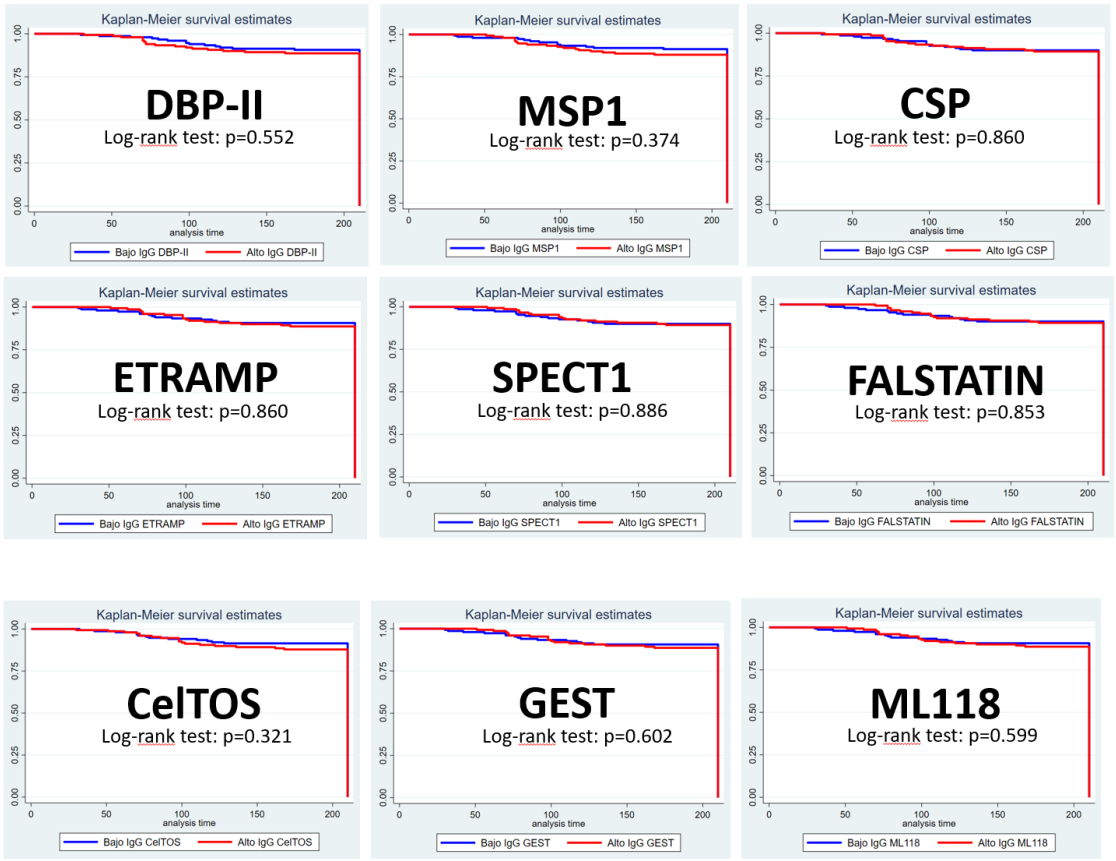

Figura 8. Evaluación de niveles de anticuerpos contra proteínas de fase eritrocítica y pre-eritrocítica en los eventos de relapso, representación de curvas de Kaplan meier. Líneas rojas representan los altos niveles de anticuerpos y las líneas azules a los bajos niveles de anticuerpos contra capa proteína. Eje "y" muestra la proporción de eventos de relapso y el eje "x" día del evento de relapso en la población total

Kaplan meier en población en niños

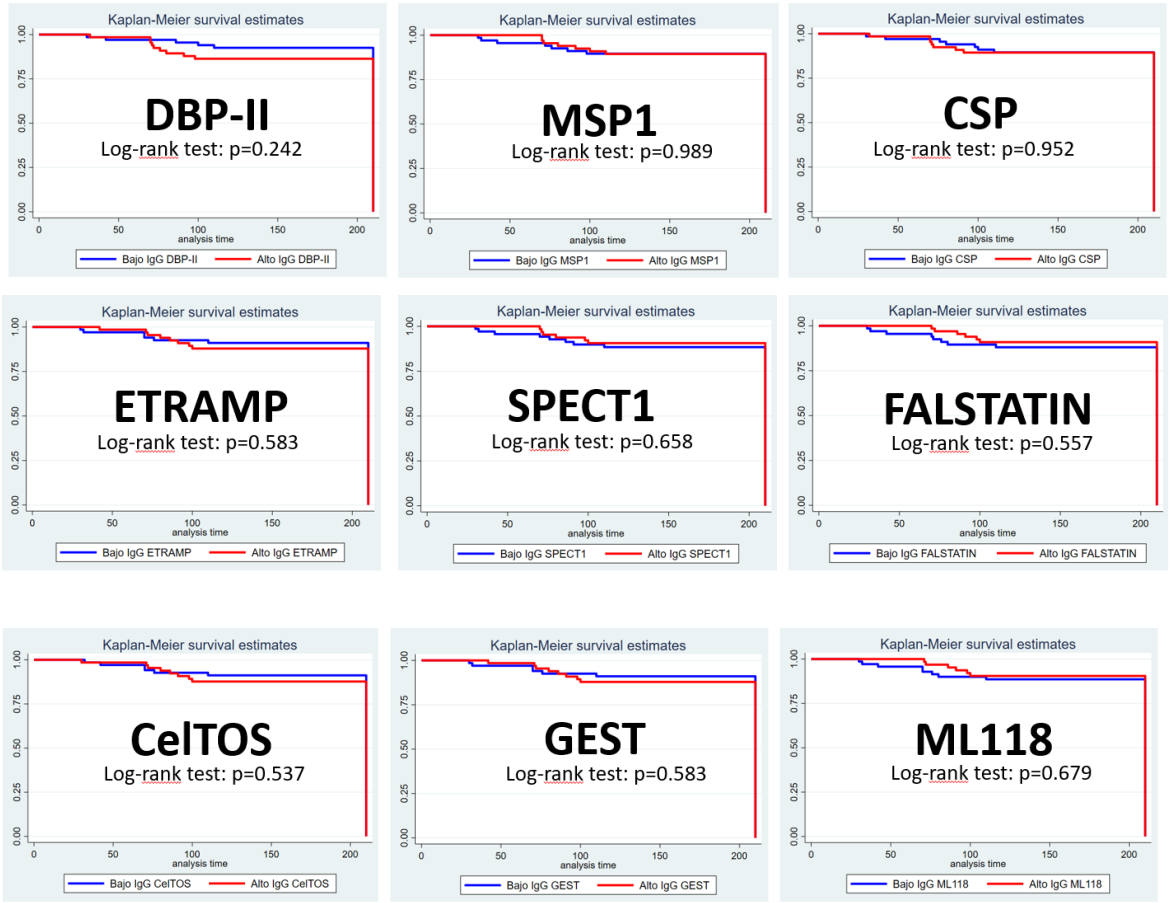

Figura 9. Evaluación de niveles de anticuerpos contra proteínas de fase eritrocítica y pre-eritrocítica en los eventos de relapso, representación de curvas de Kaplan meier. Líneas rojas representan los altos niveles de anticuerpos y las líneas azules a los bajos niveles de anticuerpos contra capa proteína. Eje “y” muestra la proporción de eventos de relapso y el eje “x” día del evento de relapso en la población en niños.

Kaplan meier en población en Adultos

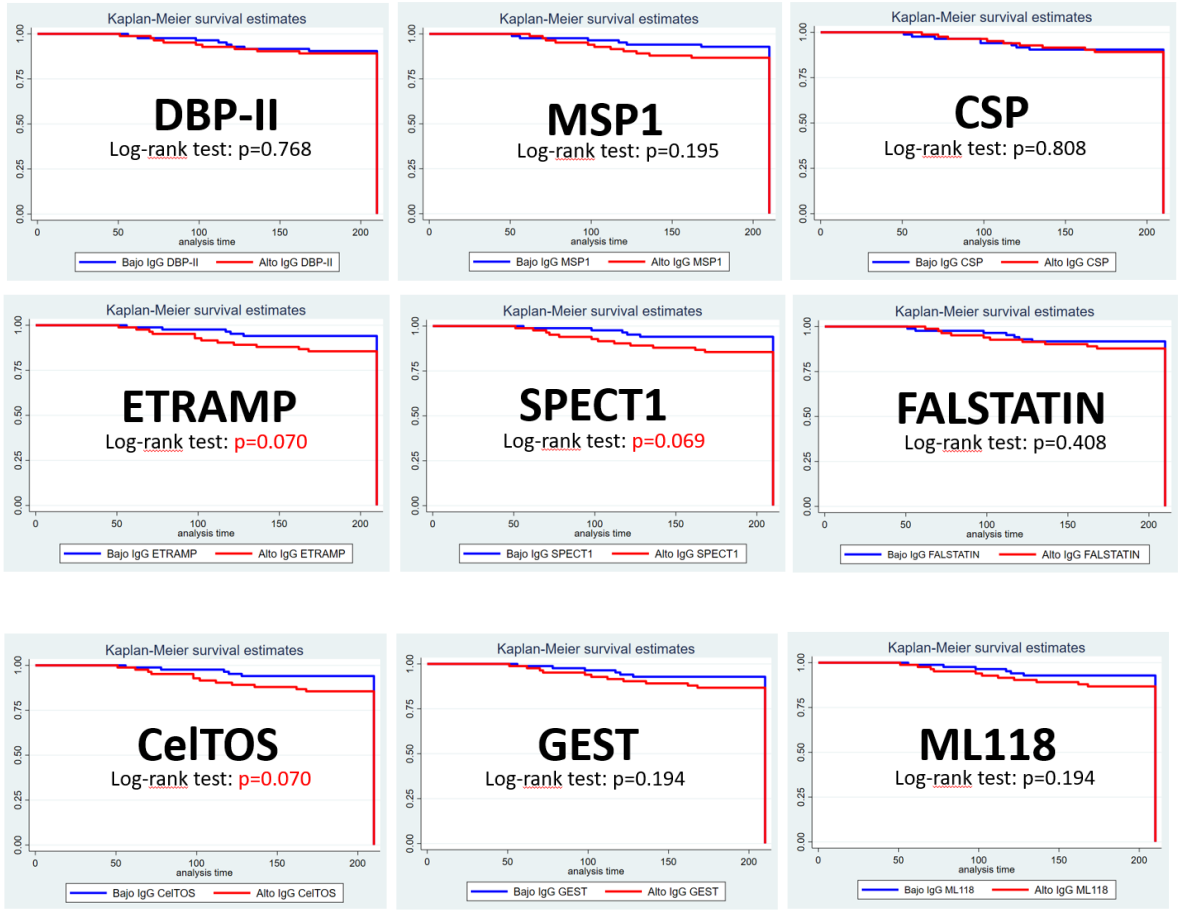

Figura 10. Evaluación de niveles de anticuerpos contra proteínas de fase eritrocítica y pre-eritrocítica en los eventos de relapso, representación de curvas de Kaplan meier. Líneas rojas representan los altos niveles de anticuerpos y las líneas azules a los bajos niveles de anticuerpos contra capa proteína. Eje “y” muestra la proporción de eventos de relapso y el eje “x” día del evento de relapso en la población en adultos.

VI.4 Evaluación de los niveles de anticuerpos IgG naturalmente adquiridos contra antígenos de fase Pre-eritrocítica de *P. vivax* y la determinación del riesgo relativo (RR) de relapso durante 6 meses post infección natural con *P. vivax*

El presente estudio tuvo como objetivo principal determinar el riesgo relativo (RR) de los eventos de relapsos mediados por los niveles de anticuerpos contra proteínas de fase pre-eritrocítica. El enfoque fue el de un estudio de cohorte en el cual se evaluó los niveles de anticuerpos al inicio del estudio (los cuales se categorizaron en niveles altos y bajos) y el riesgo relativo del futuro evento de relapso, ajustado por las variables epidemiológicas.

Como una primera aproximación del modelo de regresión multivariado, se evaluó los niveles de anticuerpos y el riesgo individual de cada proteína en el evento de relapso, en una segunda aproximación se evaluó el efecto de los clusters de proteínas de fase pre-eritrocitica (7 proteínas), fase eritrocítica (2 proteínas) y ambos al mismo tiempo (9 proteínas). Los modelos fueron ajustados por las variables epidemiológicas sexo, edad, parasitemia y esquema de tratamiento antimalárico.

Análisis de Riesgo Relativo por proteína en población total

Modelo de regresion logistica simple y multivariada en la determinacion del riesgo de Relapso

Variables	Regresion simple RR	*p-value*	Regresion multiple RR	*p-value*
Niveles de Anticuerpos IgG				
CSP (PVX_119355)				
Alto	1.00	1.000	0.80	0.527
Bajo	Ref.			
ETRAMP (PVX_121950)				
Alto	1.13	0.709	1.38	0.716
Bajo	Ref.			
SPECT1 (PVX_083025)				
Alto	1.00	1.000	0.68	0.553
Bajo	Ref.			
FALSTATIN (PVX_099035)				
Alto	1.01	0.968	1.23	0.636
Bajo	Ref.			
CELTOS (PVX_123510)				
Alto	1.32	0.410	1.27	0.587
Bajo	Ref.			
GEST (PVX_118040)				
Alto	1.13	0.709	0.97	0.973
Bajo	Ref.			
Hypothetical (PVX_119755)				
Alto	1.13	0.709	0.85	0.857
Bajo	Ref.			
DBP-II / Sal-I				
Alto	1.33	0.709	1.06	0.866
Bajo	Ref.			
MSP1 (PVX_099980)				
Alto	1.28	0.456	1.12	0.742
Bajo	Ref.			
Variables Epidemiologicas				
Sexo				
Hombre	**1.91**	**0.068**	**1.92**	**0.064**
Mujer	Ref.			
Edad				
Adultos	0.90	0.759	0.77	0.456
Ninos	Ref.			
Parasitemia/ul				
Alta parasitemia (7529-83053)	**3.28**	**0.032**	**3.34**	**0.030**
Media parasitemia (2913-7433)	**3.82**	**0.014**	**4.03**	**0.013**
Baja parasitemia (351-2881)	Ref.			
Tratamiento				
PQ (0.5mg/Kg) 5 days	**4.70**	**0.004**	**4.78**	**0.003**
PQ (0.25mg/Kg) 14 days	**2.14**	**0.193**	**2.28**	**0.155**
PQ (0.5mg/Kg) 7 days	Ref.			

Análisis de Riesgo Relativo por clusters de proteínas en población total

Modelo de regresion logistica simple y multivariada en la determinacion del riesgo de Relapso

Variables	Regresion simple RR	*p-value*	Regresion multiple RR	*p-value*
Niveles de Anticuerpos IgG				
PE stage (n=7)				
Alto	1.46	0.266	1.46	0.367
Bajo	Ref.			
Blood stage (n=2)				
Alto	1.46	0.266	1.57	0.251
Bajo	Ref.			
PE + BS (n=9)				
Alto	1.46	0.266	0.85	0.744
Bajo	Ref.			
Variables Epidemiologicas				
Sexo				
Hombre	1.91	0.068	**2.02**	**0.037**
Mujer	Ref.			
Edad				
Adultos	0.90	0.759	0.77	0.428
Ninos	Ref.			
Parasitemia/ul				
Alta parasitemia (7529-83053)	**3.28**	**0.032**	**3.00**	**0.043**
Media parasitemia (2913-7433)	**3.82**	**0.014**	**3.54**	**0.019**
Baja parasitemia (351-2881)	Ref.			
Tratamiento				
PQ (0.5mg/Kg) 5 days	**4.70**	**0.004**	**4.97**	**0.002**
PQ (0.25mg/Kg) 14 days	2.14	0.193	2.29	0.151
PQ (0.5mg/Kg) 7 days	Ref.			

Para la población total, no se observó ninguna asociación entre los niveles de anticuerpos IgG altos contra las proteínas de forma individual y el riesgo de relapso. Sin embargo, se observó que las variables epidemiológicas como sexo (hombre) y nivel de parasitemia (>2913 parásitos/ul) y esquema de tratamiento (Primaquina 0.5 mg/kg, durante 5 días) aumentan el riesgo relativo de relapso.

Se realizó un segundo análisis, agrupando las proteínas en clustes de proteínas de solo fase pre-eritrocitica (n=7), solo fase sanguínea (n=2) y juntado ambas fases (n=9). El análisis muestra que los agrupamientos por clusters tampoco tienen una asociación con el riesgo relativo de relapso. Las variables epidemiológicas sexo,

nivel de parasitemia y esquema de tratamiento mantienen su significancia estadística como factores de riesgo relativo de relapso.

Análisis de Riesgo Relativo por proteína en población niños

Modelo de regresion logistica simple y multivariada en la determinacion del riesgo de Relapso, poblacion niños

Variables	Regresion simple RR	*p-value*	Regresion multiple RR	*p-value*
Niveles de Anticuerpos IgG				
CSP (PVX_119355)				
Alto	0.88	0.888	0.84	0.771
Bajo	Ref.			
ETRAMP (PVX_121950)				
Alto	1.16	0.761	1.47	0.607
Bajo	Ref.			
SPECT1 (PVX_083025)				
Alto	0.71	0.507	0.57	0.547
Bajo	Ref.			
FALSTATIN (PVX_099035)				
Alto	0.67	0.433	0.54	0.481
Bajo	Ref.			
CELTOS (PVX_123510)				
Alto	1.19	0.714	1.67	0.422
Bajo	Ref.			
GEST (PVX_118040)				
Alto	1.16	0.761	3.21	0.163
Bajo	Ref.			
Hypothetical (PVX_119755)				
Alto	1.16	0.761	0.35	0.257
Bajo	Ref.			
DBP-II / Sal-I				
Alto	1.52	0.398	2.15	0.247
Bajo	Ref.			
MSP1 (PVX_099980)				
Alto	0.88	0.808	0.74	0.623
Bajo	Ref.			
Variables Epidemiologicas				
Sexo				
Hombre	1.71	0.277	2.02	0.192
Mujer	Ref.			
Parasitemia/ul				
Alta parasitemia (7337-42507)	2.38	0.185	2.13	0.294
Media parasitemia (3198-7254)	1.70	0.445	1.62	0.538
Baja parasitemia (351-3118)	Ref.			
Tratamiento				
PQ (0.5mg/Kg) 5 days	1.0 (Omitted)			
PQ (0.25mg/Kg) 14 days	0.71	0.468		
PQ (0.5mg/Kg) 7 days	1.0 (Empty)			

Análisis de Riesgo Relativo por clusters de proteínas en población niños

Modelo de regresion logistica simple y multivariada en la determinacion del riesgo de Relapso, poblacion niños

Variables	Regresion simple RR	*p-value*	Regresion multiple RR	*p-value*
Niveles de Anticuerpos IgG				
PE stage (n=7)				
Alto	0.86	0.761	0.32	0.104
Bajo	Ref.			
Blood stage (n=2)				
Alto	0.86	0.761	0.34	0.064
Bajo	Ref.			
PE + BS (n=9)				
Alto	1.47	0.433	**4.95**	**0.038**
Bajo	Ref.			
Variables Epidemiologicas				
Sexo				
Hombre	1.71	0.277	1.87	0.183
Mujer	Ref.			
Parasitemia/ul				
Alta parasitemia (7337-42507)	2.38	0.185	2.93	0.140
Media parasitemia (3198-7254)	1.70	0.445	2.80	0.097
Baja parasitemia (351-3118)	Ref.			
Tratamiento				
PQ (0.5mg/Kg) 5 days	1.0 (Omitted)		1.0 (Omitted)	
PQ (0.25mg/Kg) 14 days	0.71	0.468	0.43	0.117
PQ (0.5mg/Kg) 7 days	1.0 (Empty)		1.0 (Empty)	

Para la población en niños, no se observó ninguna asociación entre los niveles de anticuerpos IgG altos contra las proteínas de forma individual y el riesgo de relapso. Tampoco se observó que las variables epidemiológicas como sexo, nivel de parasitemia y esquema de tratamiento presenten alguna asociación con el riesgo relativo de relapso.

El análisis por agrupamiento por clusters, muestra que juntando ambas fases (PE+BS) tienen una asociación significativa con el riesgo relativo de relapso, aumentando en casi 5 veces el riesgo relativo de relapso ($p<0.05$) en los niños que presenten altos niveles de anticuerpos IgG tanto para proteínas de fase pre-eritrocitica como sanguínea. Las variables epidemiológicas no mostraron ninguna

asociación significativa como factores de riesgo relativo de relapso en niños.

Análisis de Riesgo Relativo por proteína en población Adultos

Modelo de regresion logistica simple y multivariada en la determinacion del riesgo de Relapso, en poblacion Adultos

Variables	Regresion simple RR	*p-value*	Regresion multiple RR	*p-value*
Niveles de Anticuerpos IgG				
CSP (PVX_119355)				
Alto	1.13	0.778	0.54	0.357
Bajo	Ref.			
ETRAMP (PVX_121950)				
Alto	2.42	0.081	13.09	0.072
Bajo	Ref.			
SPECT1 (PVX_083025)				
Alto	2.43	0.081	2.41	0.489
Bajo	Ref.			
FALSTATIN (PVX_099035)				
Alto	1.48	0.401	0.97	0.978
Bajo	Ref.			
CELTOS (PVX_123510)				
Alto	2.42	0.081	1.66	0.545
Bajo	Ref.			
GEST (PVX_118040)				
Alto	1.85	0.201	0.09	0.141
Bajo	Ref.			
Hypothetical (PVX_119755)				
Alto	1.85	0.201	0.69	0.763
Bajo	Ref.			
DBP-II / Sal-I				
Alto	1.13	0.778	0.60	0.457
Bajo	Ref.			
MSP1 (PVX_099980)				
Alto	1.85	0.201	1.75	0.420
Bajo	Ref.			
Variables Epidemiologicas				
Sexo				
Hombre	2.15	0.132	2.88	0.105
Mujer	Ref.			
Parasitemia/ul				
Alta parasitemia (7634-83053)	6.10	0.089	7.32	0.100
Media parasitemia (2836-7612)	**10.00**	**0.026**	**14.76**	**0.028**
Baja parasitemia (353-2735)	Ref.			
Tratamiento				
PQ (0.5mg/Kg) 5 days	2.38	0.116	2.41	0.110
PQ (0.25mg/Kg) 14 days	0.47	0.375	0.49	0.351
PQ (0.5mg/Kg) 7 days	Ref.		Ref.	

Análisis de Riesgo Relativo por clusters de proteínas en población Adultos

Modelo de regresion logistica simple y multivariada en la determinacion del riesgo de Relapso

Variables	Regresion simple RR	*p-value*	Regresion multiple RR	*p-value*
Niveles de Anticuerpos IgG				
PE stage (n=7)				
Alto	1.81	0.219	1.44	0.527
Bajo	Ref.			
Blood stage (n=2)				
Alto	0.87	0.778	0.86	0.778
Bajo	Ref.			
PE + BS (n=9)				
Alto	0.18	0.219	1.27	0.695
Bajo	Ref.			
Variables Epidemiologicas				
Sexo				
Hombre	2.15	0.132	2.22	0.122
Mujer	Ref.			
Parasitemia/ul				
Alta parasitemia (7634-83053)	6.10	0.089	4.68	0.150
Media parasitemia (2836-7612)	**10.00**	**0.026**	**7.88**	**0.045**
Baja parasitemia (353-2735)	Ref.			
Tratamiento				
PQ (0.5mg/Kg) 5 days	2.38	0.116	2.23	0.132
PQ (0.25mg/Kg) 14 days	0.47	0.375	0.49	0.407
PQ (0.5mg/Kg) 7 days	Ref.			

En la población en Adultos, no se observó ninguna asociación entre los niveles altos de anticuerpos IgG contra las proteínas de forma individual y el riesgo de relapso. Sin embargo, se observó que solo la variable epidemiológica nivel de parasitemia presento asociación con el riesgo relativo de relapso.

El análisis de la respuesta de anticuerpos por agrupamiento de clusters, no mostraron alguna asociación significativa con el riesgo relativo de relapso en la población adulta, solo la variable epidemiológica nivel de parasitemia mayor a 2836 par/ul de sangre mostró un incremento significativo de 7.8 veces el riesgo de relapso en comparación con bajos niveles de parasitemia ajustado por la variables inmunológicas y epidemiológicas.

VI.5 Evaluación de la variación de niveles de anticuerpos IgG contra cada proteína de fase Pre-eritrocítica de *P. vivax* en el día de enrolamiento (Dia 0) versus el momento del relapso.

Se evaluó la variación de niveles de anticuerpos en los individuos que tuvieron Relapso, comparando los valores de OD en el día que ingresaron al estudio y el día en el cual presentaron el Relapso, también se comparó el porcentaje de variación de los niveles de anticuerpos.

En la población en total, se observó una disminución significativa en los niveles de anticuerpos contra 7 de las 9 proteínas utilizadas, el porcentaje de disminución de anticuerpos estuvo en un rango de 0 a -56%, observándose una mayor disminución (-56%, $p<0.001$) de los anticuerpos contra la proteína pre-eritrocitica CSP.

En la población en niños, solo se observó una disminución significativa en los niveles de anticuerpos contra 1 de las 9 proteínas utilizadas, el porcentaje de disminución de anticuerpos de -29% para la proteína pre-eritrocitica CelTOS ($p<0.05$).

En la población de Adultos, se observó una disminución significativa en los niveles de anticuerpos contra 5 de las 9 proteínas utilizadas, el porcentaje de disminución de anticuerpos estuvo en un rango de 0 a -69%, observándose una mayor disminución (-69%, $p<0.001$) de los anticuerpos contra la proteína pre-eritrocitica CSP.

Análisis de variación de anticuerpos de individuos con relapso, población total

Figura 10. Evaluación de la variación de niveles de anticuerpos contra proteínas de fase eritrocítica y pre-eritrocítica en el día de enrolamiento vs día de relapso, representación de boxplot. Eje "y" muestra los valores de anticuerpos IgG representados por OD y el eje "x" representa los valores en el día del enrolamiento (Box azul) y el día de relapso (Box rojo) en la población total.

Tabla 4. Variacion de niveles de anticuerpos IgG en Dia 0 vs Dia de Relapso, (n=32)

P. vivax antigenos	Abs OD Dia 0	Abs OD Dia de Relapso	Variacion %	*p value*
DBP-II	0.27 (0.13-0.74)	0.36 (0.12-0.63)	33	0.598
MSP1	0.97 (0.36-1.17)	0.55 (0.33-0.88)	-43	**0.018**
CSP	0.41(0.25-0.85)	0.18(0.11-0.31)	-56	**0.000**
ETRAMP	0.24(0.13-0.32)	0.19(0.13-0.27)	-21	**0.047**
SPECT1	0.11(0.08-0.22)	0.11(0.08-0.23)	0	0.354
FALSTATIN	0.12(0.09-0.19)	0.10(0.08-0.12)	-17	**0.000**
CelTOS	0.36 (0.20-0.65)	0.23 (0.15-0.47)	-36	**0.002**
GEST	0.23 (0.13-0.37)	0.16 (0.12-0.32)	-30	**0.003**
ML118	0.21 (0.14-0.35)	0.15 (0.11-0.28)	-29	**0.000**

*** La mediana del dia de Relapso fue 89 (IQR: 70-115)**

*** La mediana de edad fue 19 (IQR: 10-30)**

Análisis de variación de anticuerpos de individuos con relapso, población niños

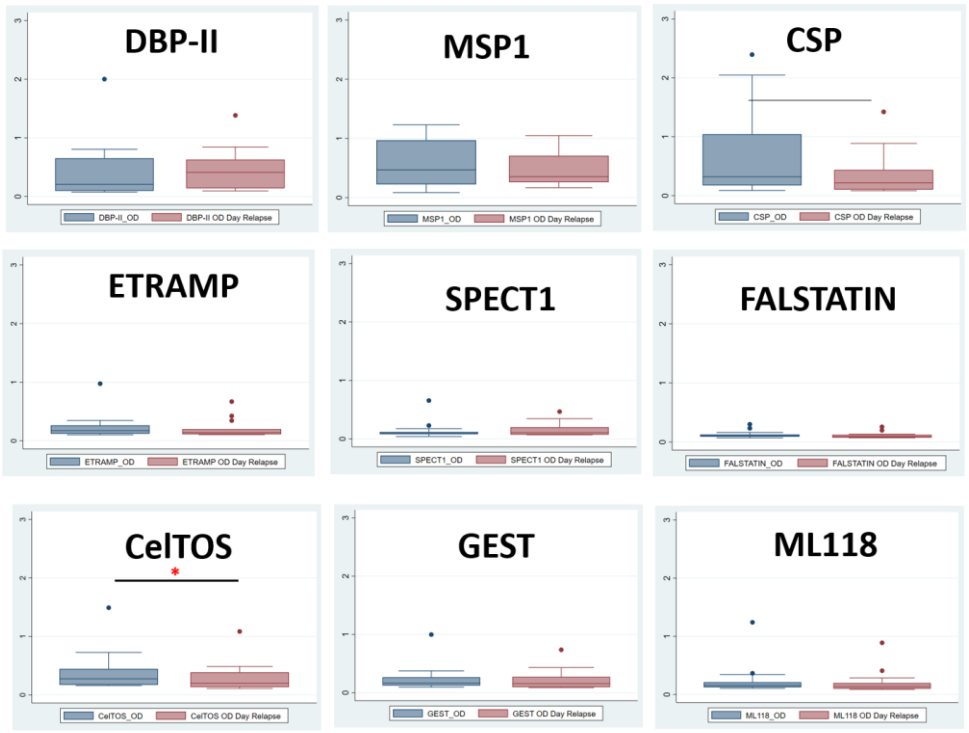

Figura 11. Evaluación de la variación de niveles de anticuerpos contra proteínas de fase eritrocítica y pre-eritrocítica en el día de enrolamiento vs día de relapso, representación de boxplot. Eje "y" muestra los valores de anticuerpos IgG representados por OD y el eje "x" representa los valores en el día del enrolamiento (Box azul) y el día de relapso (Box rojo) en la población de niños.

Tabla 4.1. Variacion de niveles de anticuerpos IgG en Dia 0 vs Dia de Relapso, niños (n=15)

P. vivax antigenos	Abs OD Dia 0	Abs OD Dia de Relapso	Variacion %	*p value*
DBP-II	0.21 (0.09-0.65)	0.41 (0.13-0.62)	95	0.306
MSP1	0.47 (0.22-0.97)	0.35 (0.26-0.71)	-26	0.233
CSP	0.32 (0.18-1.04)	0.21 (0.10-0.43)	-34	0.053
ETRAMP	0.17 (0.12-0.26)	0.14 (0.11-0.20)	-18	0.211
SPECT1	0.09 (0.08-0.12)	0.11 (0.07-0.20)	22	0.761
FALSTATIN	0.11 (0.09-0.13)	0.09 (0.08-0.12)	-18	0.181
CelTOS	0.28 (0.17-0.45)	0.20 (0.13-0.39)	-29	**0.017**
GEST	0.17 (0.12-0.27)	0.16 (0.10-0.27)	-6	0.348
ML118	0.16 (0.12-0.21)	0.14 (0.10-0.20)	-13	0.125

* La mediana del dia de Relapso fue 76 (IQR: 70-98)

* La mediana de edad fue 10 (IQR: 7-14)

Análisis de variación de anticuerpos de individuos con relapso, población Adultos

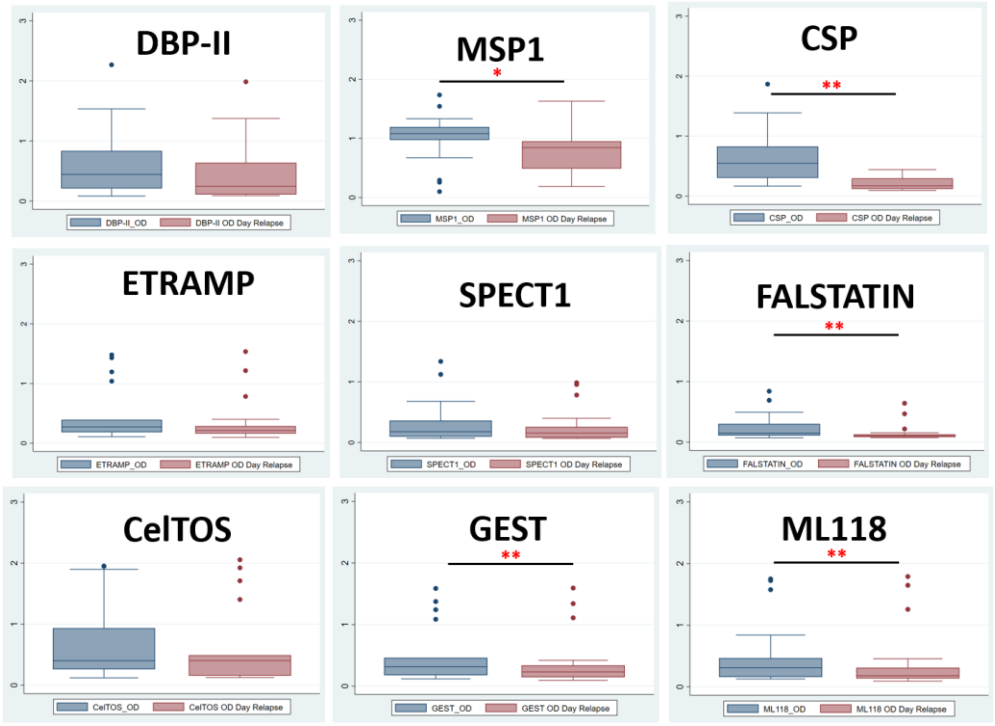

Figura 11. Evaluación de la variación de niveles de anticuerpos contra proteínas de fase eritrocítica y pre-eritrocítica en el día de enrolamiento vs día de relapso, representación de boxplot. Eje "y" muestra los valores de anticuerpos IgG representados por OD y el eje "x" representa los valores en el día del enrolamiento (Box azul) y el día de relapso (Box rojo) en la población de adultos.

Tabla 4.2. Variacion de niveles de anticuerpos IgG en Dia 0 vs Dia de Relapso, Adultos (n=17)

P. vivax antigenos	Abs OD Dia 0	Abs OD Dia de Relapso	Variacion %	*p value*
DBP-II	0.44 (0.21-0.84)	0.25 (0.11-0.64)	-43	0.068
MSP1	1.08 (0.97-1.19)	0.85 (0.49-0.95)	-21	**0.035**
CSP	0.55 (0.30-0.83)	0.17 (0.12-0.30)	-69	**0.000**
ETRAMP	0.27 (0.18-0.39)	0.21 (0.16-0.29)	-22	0.123
SPECT1	0.17 (0.10-0.36)	0.16 (0.08-0.26)	-6	0.155
FALSTATIN	0.15 (0.11-0.30)	0.11 (0.08-0.13)	-27	**0.000**
CelTOS	0.40 (0.26-0.93)	0.40 (0.16-0.49)	0	0.055
GEST	0.31 (0.18-0.46)	0.23 (0.14-0.34)	-26	**0.001**
ML118	0.31 (0.16-0.47)	0.18 (0.14-0.31)	-42	**0.001**

* La mediana del dia de Relapso fue 102 (IQR: 72-122)

* La mediana de edad fue 29 (IQR: 22-35)

VII. DISCUSION

El fenómeno de relapso en la malaria causada por *P. vivax* es una de las mayores limitaciones para su control y su futura eliminación a nivel mundial. Los mecanismos por los cuales los parásitos forman los estadios durmientes llamados hipnozoitos y su posterior activación meses o años después todavía son desconocidos, con lo cual el entendimiento de las características biológicas del parasito durante el relapso y la respuesta inmunológica del huésped son cruciales para el desarrollo de nuevas estrategias enfocadas en disminuir el riesgo del desarrollo del relapso en pacientes infectados con *P. vivax.*

La presente tesis tuvo como objetivo principal determinar si los niveles de anticuerpos adquiridos naturalmente contra antígenos de fase pre-eritrocítica posterior a una infección con *P. vivax* están asociados con la protección de un futuro relapso. Esta posible asociación se fundamenta en estudios pre-clínicos en los cuales se observó que la administración de anticuerpos monoclonales contra la principal proteína del Circumesporozoito (CSP) reducían el riesgo de relapso de hasta un 60% en modelo de malaria en ratones.

El presente estudio, es un sub estudio de un estudio madre el cual fue de tipo cohorte en el cual se evaluaron 3 dosis del antimalárico primaquina. La presente tesis evaluó los niveles de anticuerpos en

el día de enrolamiento (día 0) y el riesgo de desarrollar un posterior relapso el cual se identificó por análisis genético (marcadores microsatélites) en un periodo de seguimiento de 6 meses.

En el primer objetivo secundario, se evaluaron las características de las variables epidemiológicas de los individuos que posteriormente presentaron relapso (n=32) versus los que no presentaron relapso (n=268). Se observó que existe una diferencia significativa entre ambos grupos para las variables parasitemia y esquema de tratamiento. En el grupo individuos que posteriormente tuvieron un relapso se observa que en el momento del enrolamiento tuvieron una mayor parasitemia (6129 vs 4316, $p<0.05$), también se observó una mayor proporción de futuros relapsos (59% vs 28% o 13%) en el tratamiento de 5 días a dosis de 0.5mg/kg versus 0.25mg/kg por 14 días o 0.5mg/kg por 7 días. La información sobre estas variables y su asociación con el relapso todavía es limitada. Sin embargo, el nivel de parasitemia podría estar correlacionado con la carga de infección de esporozoitos y el posterior nivel de parasitemia en sangre, esto se podría evaluar con ensayos preclínicos en modelos animales o ensayos de infección con esporozoitos controlados en humanos en los cuales se evalúen diferentes dosis de infección y su posterior asociación con el riesgo de desarrollar hipnozoitos y relapsos. Por otro lado, con respecto a la variable esquema de tratamiento se ha reportado en la literatura

que tratamientos cortos con antimaláricos podrían no tener la suficiente biodisponibilidad del antimalárico en sangre, con lo cual la dosis del antimalárico Primaquina en el estudio madre estaría en una cantidad subóptima para un adecuado tratamiento y eliminación de parásitos que puedan desarrollar las formas de hipnozoitos (24).

El estudio del desarrollo de la inmunidad natural y su posible efecto en el bloqueo de la infección del parasito de la malaria, depende de múltiples factores entre los que sobresalen la edad del individuo y la intensidad de exposición al parasito. Se ha observado que en individuos adultos con varias exposiciones previas a *P. vivax* en Sudamérica y Asia pueden reducir los futuros eventos de malaria en comparación con la población infantil. En el presente estudio de tesis, los objetivos secundarios fueron analizados en la población en general, la población de niños y la población de adultos para determinar si existe alguna diferencia relacionada al grupo etario en los que tuvieron relapso versus lo que no tuvieron relapso.

La comparación de las variables epidemiológicas en la población adulta solo muestra a la variable tratamiento con significancia estadística entre los individuos con un futuro relapso versus lo que no presentaron relapso, siendo la dosis de 14 días la que presento menor proporción de relapsos (12%) versus tratamiento de 5 días a

dosis de 0.5mg/kg (64%) o 7 días a dosis de 0.5mg/kg (23%).

Por otro lado, en la comparación de las variables epidemiológicas en la población infantil, se observó que las variables edad, peso y tratamiento mostraron significancias estadísticas. La diferencia de la variable edad y peso muestra valores normales en el grupo que no presentaron un futuro relapso. Sin embargo, en el grupo que presentaron relapso se observa valores de las medianas para edad y peso por debajo de lo normal, reportando valores de mediana de 21 kilos para una edad de 10 años, al comparar estos valores con las referencias nacionales e internacionales se observa que está muy por debajo de los valores normales de peso que debería de ser de 28-33kilos para la edad promedio de 10 años, lo cual podría sugerir un estado de malnutrición que podría estar asociada con el fenómeno de relapso. Sin embargo, no se tiene la variable talla para determinar con exactitud el estado de desnutrición, tampoco se tiene análisis de laboratorio en el cual se puedan observar la concentración de vitaminas en sangre de esta población infantil (25). Otra variable que muestra significancia estadística en esta población infantil es la del esquema de tratamiento, se observó un aumento en la significancia estadística ($p=0.008$) comparada con la población adulta ($p=0.02$) asociada a no presentar ningún evento de relapso para la dosis de 0.5mg/kg en esquema de 7 días. Se observó que este esquema es altamente eficaz en niños en comparación con adultos, los cuales en adultos mostraron casos de

relapso de un 23% a esta misma dosis. Estos datos sugieren que la droga primaquina a la dosis de 0.5mg/kg en esquema de 7 días seria más eficaz en niños comparado con adultos. Estos hallazgos sugieren que existen diferencias significativas que son más relevante en niños en comparación con los adultos lo cual justificó el análisis estratificado por categoría de edad para los siguientes objetivos.

La evaluación de los niveles de anticuerpos IgG contra los antígenos de fase pre-eritrocítica de *P. vivax* en el día de enrolamiento entre los individuos que presentaron relapso y los que no presentaron relapso muestra que no hay diferencias significativas en la población en general o en la población niños. Sin embargo, se muestra que en la población de adultos los niveles de anticuerpos contra las proteínas SPECT1 y GEST presentaron mayores valores de anticuerpos en el grupo de relapso versus lo que no tuvieron relapso. Estos hallazgos van en sentido opuesto a nuestra hipótesis original en la cual se esperaba encontrar mayores valores de niveles de anticuerpos en la población que no presentaría relapso versus la que si presentaría relapso. Estos datos sugieren que la inmunidad natural mediada por anticuerpos IgG en este estudio podría ser asociada más a ser marcadores de exposición/riesgo en lugar de como marcadores de protección. Por otro lado, el encontrar más niveles de anticuerpos contra las

proteínas SPECT1 y GEST podrían ser utilizadas potencialmente como marcadores de futuro relapso.

En el presente estudio, se analizó si la variable nivel de anticuerpo categorizada en bajo o alto nivel (valor medio hacia abajo o valor medio hacia arriba) tenía algún efecto en la proporción de casos de eventos de malaria analizado contra cada proteína pre-eritrocitica durante el seguimiento de 6 meses, para este fin se utilizó el análisis de curvas de Kaplan-Meier. No se observó ninguna diferencia estadística en las dinámicas de las curvas y los eventos de relapso entre los niveles altos y bajos en la población en general o en la población de niños. Sin embargo, se observó que hay una mayor proporción de casos de relapsos en los individuos adultos con altos niveles de ETRAMP, SPECT1 y CelTOS (p=0.06-0.07). Estos datos cercanos a la significancia estadística, sugiere que los altos niveles de anticuerpos contra ciertas proteínas de fase pre-eritrocítica podrían ser potencialmente asociados como marcadores de futuros relapsos.

El análisis de regresión logística multivariada para el cálculo de riesgo relativo (RR) integrando todas las variables analizadas, muestran que en la población en general los marcadores de riesgo a tener un futuro relapso serian género, nivel de parasitemia y esquema de tratamiento. Siendo el perfil con más riesgo a

desarrollar relapso el ser de sexo masculino, con parasitemia >2913 par/ul y que tengan tratamiento a dosis de 0.5mg/kg por 5 días de primaquina. Los altos niveles de anticuerpos contra las proteínas de manera individual o por clúster (PE o BS) de estadio de infección no mostraron significancia estadística con el aumento o disminución de riesgo de relapso.

El análisis de regresión logística multivariada en la población en niños muestra que las variables epidemiológicas como sexo y nivel de parasitemia no están asociadas con riesgo a relapso. Por otro lado, la variable niveles de anticuerpos tanto para proteínas pre-eritrociticas (PE) como sanguíneas (BS) tiene una asociación significativa para el riesgo de desarrollar relapso en niños. Estos datos sugieren que los niños con alta niveles de anticuerpos están asociados con un mayor riesgo de desarrollar relapsos, estos anticuerpos no serían protectivos siendo considerados como potenciales marcadores de riesgo.

El análisis de regresión logística multivariada en la población de adultos muestra que la variable epidemiológica nivel de parasitemia está asociada con riesgo a desarrollar relapso. Por otro lado, la variable niveles de anticuerpos tanto para proteínas pre-eritrociticas (PE) como sanguíneas (BS) no muestra ninguna asociación significativa para el futuro riesgo de desarrollar relapso en adultos. Solo la proteína ETRAMP muestra una tendencia de incrementar el riesgo 13 veces en niveles altos de anticuerpos

comparado con los niveles bajos, siendo no significativa (p=0.072). El principal factor de riesgo para un futuro relapso sería el nivel de parasitemia > 2836 par/ul en sangre en la población adulta.

Nuestros resultados muestran que existen diferencias significativas en las variables epidemiológicas y el riesgo de desarrollo de relapso entre niños y adultos. Siendo las variables importantes sexo, parasitemia, esquema de tratamiento y niveles de anticuerpos. Sin embargo, hay pocos estudios en los cuales evalúen el riesgo de desarrollo de relapso asociado a variables epidemiológicas o niveles de anticuerpos, estos estudios la mayoría de corte transversal solo los han evaluado como marcadores de exposición siendo relevantes las proteínas CSP, CelTOS y TRAP. El rol de los anticuerpos naturalmente adquiridos contra fase pre-eritrocitica siguen en evaluación, el aislamiento de anticuerpos IgG contra proteínas pre-eritrocíticas CSP, CelTOS, SPECT1 y SSP3 de pacientes provenientes lugares con alta transmisión de malaria como Tailandia muestran un rol protector bloqueando la infección de esporozoitos en modelos in-vitro. Nuestros resultados muestran discrepancias con los trabajos antes publicados, estos trabajos han utilizado sistemas de cultivos in vitro y modelos de infección de malaria en ratones con hígados humanizados e inmunosuprimidos, ambos modelos poseen ciertas limitaciones como son el no tener un sistema inmunocompetente como son los de los humanos en

condiciones normales, con lo cual se necesitarían de modelos animales que reflejen la complejidad de la inmunidad naturalmente adquirida y el fenómeno de relapso para elucidar esta pregunta de investigación.

El estudio de la cinética de anticuerpos contra proteínas de fase pre-eritrocítica después de la infección de malaria es limitado y aún más limitado en el fenómeno de relapso. Nosotros previamente en un estudio recién publicado evaluamos la cinética de anticuerpos contra un set de 13 proteínas pre-eritrocíticas en un seguimiento de 6 meses (sin eventos de malaria), la variación de los niveles de anticuerpos estuvo en un promedio de disminución de un -6% a -28%, lo cual evidencia una variación no significativa de los niveles de anticuerpos IgG durante el periodo 2012-2016 en pacientes de la región periurbana de Iquitos en Perú. Sin embargo, nuestros resultados muestran que existen variaciones significativas en los niveles de anticuerpos cuando comparamos el día de enrolamiento versus el momento del relapso (entre 3-4 meses posterior al enrolamiento), en el momento de relapso se observa un rango de variación de -17% a -56% durante los años 2006-2008. Se observó una mayor variación de la proteína CSP tanto en adultos (-69%) como en niños (-34%) al momento de relapso, esta proteína es el mayor blanco vacunal contra la invasión de esporozoitos en fase pre-eritrocitica. Se ha reportado en la literatura que la protección natural contra la malaria depende de una continua exposición y

altos niveles de transmisión de la enfermedad. En nuestro estudio recientemente publicado el cual se realizó durante el periodo 2012-2016 se observó un aumento constante de los casos de malaria a nivel nacional de 22000 a 44000 casos anuales, se observó que en la población adulta con un promedio de edad de 35 años (n=76) los altos niveles de anticuerpos tuvieron un rol protector cuando se evaluó de forma transversal, lo cual sugirió que estas proteínas podrían tener un rol protectivo contra la infección de malaria y/o potenciales relapsos. Por otro lado, en la presente tesis, la cual utilizó muestras de pacientes enrolados durante los años 2006-2008 se observó un continuo decrecimiento de los casos de malaria de 55000 a 30000 debido a las campañas del ministerio de salud, con lo cual la transmisión de malaria *P. vivax* pudo ser afectada y por ende la inmunidad natural de estos individuos continuamente expuestos (Figura suplementaria 1).Esto podría explicar con ciertas limitaciones la razón por la cual estos anticuerpos no son protectivos, pero sí podrían ser utilizados como marcadores de exposición y riesgo.

Entre las limitaciones de nuestro estudio, se encuentra el tamaño de muestra, si bien podemos realizar inferencias con un tamaño de 300 individuos (268 no relapso vs 32 relapsos), el análisis para adultos (n=167) y niños (n=133) tiene algunas limitaciones al observarse algunas tendencias con valores p de 0.055-0.080 que

probablemente podrían cambiar a significativas aumentando el tamaño de muestra y la potencia del estudio. Sin embargo, observando que el número de eventos de relapso son el rededor de un 10%, se tendrían que diseñar nuevos estudios de cohorte en los cuales se puedan enrolar alrededor o mayor a 500 pacientes para poder aumentar el poder del análisis estadístico.

La temporalidad del estudio debería de tener condiciones estables de la dinámica de malaria. Sin embargo, la dinámica de la malaria en la última década ha tenido una tendencia a la reducción de los casos entre 18000-22000 casos anuales (años 2021-2023), con lo cual podrían existir demoras en la captación de casos de *P. vivax*, otra opción sería la de identificar hotspots de casos de *P. vivax* en Perú o en otros lugares a nivel mundial con alta transmisión donde se puedan realizar estudios de cohortes parecidos para poder aumentar la extrapolación de los resultados.

En el estudio de la cinética de anticuerpos se tuvo la limitación de solo mostrar los resultados del grupo de relapso, observándose disminuciones significativas. Sin embargo no se comparó con un grupo control donde se evalúe la cinética de los anticuerpos en personas sin eventos de relapso, esto representaría un diseño un poco más complejo debido a que se necesitaría tomar muestra de un paciente de la corte en el mismo día en que una persona

evidencie el relapso con características similares por lo menos de edad y sexo, aumentando la complejidad del análisis pero dando información relevante de la dinámica de anticuerpos de pacientes sin eventos de malaria.

En general, nuestros datos muestran que existen variables epidemiológicas asociadas al relapso las cuales pueden aumentar su significancia dependiendo del grupo etario. Por otro lado, nuestro estudio sugiere que la respuesta de anticuerpos contra ciertas proteínas de fase pre-eritrocitica podrían ser utilizadas como marcadores de riesgo para un futuro relapso. Este nuevo conocimiento podría ser utilizado para el diseño de nuevas investigaciones y estrategias de salud pública, las cuales ayuden al mejor entendimiento del fenómeno de relapso en áreas de baja transmisión de malaria como es el Perú.

VIII. CONCLUSIONES

1. Se observa diferencias significativas en las variables epidemiológicas entre los grupos de No relapso vs Relapso, aumentando la diferencia en el grupo de niños.

2. Tanto los niveles de anticuerpos y prevalencia son similares en el día de enrolamiento entre los grupos de No relapso vs Relapso.

3. El análisis de Kaplan meier para los eventos de Relapso, mostraron tendencias en la población adulta, siendo los altos niveles de Abs IgG contra las proteínas ETRAMP, SPECT1 y CelTOS asociadas con un mayor número de eventos de relapsos (potenciales marcadores de relapso)

4. El análisis de riesgo relativo, mostró que los altos niveles de Abs contra antígenos de etapa sanguínea junto con etapa pre-eritrocitica son un factor de riesgo de relapso en niños. Por otro lado, en adultos no se observa una asociación con el riesgo de Relapso asociado con los niveles de Abs, se observa a la parasitemia como una variable relevante en el riesgo de Relapso.

5. La proteína que más disminuye (-34% a -69 %) al momento de Relapso es CSP. Por otro lado, se observó una estabilidad de ETRAMP, SPECT1 y CelTOS, podrían ser analizados como potenciales marcadores de Relapso.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Venugopal K, Hentzschel F, Valkiūnas G, Marti M. Plasmodium asexual growth and sexual development in the haematopoietic niche of the host. Nat Rev Microbiol. 2020;18(3):177-89.

2. Rosenthal PJ. Malaria in 2022: Challenges and progress. Am J Trop Med Hyg. 2022;106(6):1565.

3. Gething PW, Casey DC, Weiss DJ, Bisanzio D, Bhatt S, Cameron E, et al. Mapping Plasmodium falciparum mortality in Africa between 1990 and 2015. N Engl J Med. 2016;375(25):2435-45.

4. Patel H, Dunican C, Cunnington AJ. Predictors of outcome in childhood Plasmodium falciparum malaria. Virulence. 2020;11(1):199-221.

5. Howes RE, Battle KE, Mendis KN, Smith DL, Cibulskis RE, Baird JK, et al. Global epidemiology of Plasmodium vivax. Am J Trop Med Hyg. 2016;95(6 Suppl):15.

6. Rosas-Aguirre A, Gamboa D, Manrique P, Conn JE, Moreno M, Lescano AG, et al. Epidemiology of Plasmodium vivax malaria in Peru. Am J Trop Med Hyg. 2016;95(6 Suppl):133.

7. Sanchez-Castro EE, Cahuana GM, García-Ríos CJ, Guerra-Duarte C, Chauca P, Tapia-Limonchi R, et al. Health and economic burden due to malaria in Peru over 30 years (1990–2019): Findings from the global burden of diseases study 2019. Lancet Reg Health-Am. 2022;15:100347.

8. Schäfer C, Zanghi G, Vaughan AM, Kappe SH. Plasmodium vivax latent liver stage infection and relapse: biological insights and new experimental tools. Annu Rev Microbiol. 2021;75:87-106.

9. Commons RJ, Simpson JA, Watson J, White NJ, Price RN. Estimating the proportion of Plasmodium vivax recurrences caused by relapse: a systematic review and meta-analysis. Am J Trop Med Hyg. 2020;103(3):1094.

10. White NJ. Determinants of relapse periodicity in Plasmodium vivax malaria. Malar J. 2011;10(1):1-36.

11. Battle KE, Karhunen MS, Bhatt S, Gething PW, Howes RE, Golding N, et al. Geographical variation in Plasmodium vivax relapse. Malar J. 2014;13(1):1-16.

12. Longley RJ, França CT, White MT, Kumpitak C, Sa-Angchai P,

Gruszczyk J, et al. Asymptomatic Plasmodium vivax infections induce robust IgG responses to multiple blood-stage proteins in a low-transmission region of western Thailand. Malar J. 2017;16(1):1-13.

13. Rosado J, White MT, Longley RJ, Lacerda M, Monteiro W, Brewster J, et al. Heterogeneity in response to serological exposure markers of recent Plasmodium vivax infections in contrasting epidemiological contexts. PLoS Negl Trop Dis. 2021;15(2):e0009165.

14. Longley RJ, White MT, Takashima E, Brewster J, Morita M, Harbers M, et al. Development and validation of serological markers for detecting recent Plasmodium vivax infection. Nat Med. 2020;26(5):741-9.

15. Nicolete VC, Frischmann S, Barbosa S, King CL, Ferreira MU. Naturally acquired binding-inhibitory antibodies to Plasmodium vivax Duffy binding protein and clinical immunity to malaria in rural Amazonians. J Infect Dis. 2016;214(10):1539-46.

16. França CT, He WQ, Gruszczyk J, Lim NT, Lin E, Kiniboro B, et al. Plasmodium vivax reticulocyte binding proteins are key targets of naturally acquired immunity in young Papua New Guinean children. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(9):e0005014.

17. Longley RJ, Reyes-Sandoval A, Montoya-Díaz E, Dunachie S, Kumpitak C, Nguitragool W, et al. Acquisition and longevity of antibodies to Plasmodium vivax preerythrocytic antigens in Western Thailand. Clin Vaccine Immunol. 2016;23(2):117-24.

18. Minkah NK, Schafer C, Kappe SH. Humanized mouse models for the study of human malaria parasite biology, pathogenesis, and immunity. Front Immunol. 2018;9:807.

19. Schäfer C, Dambrauskas N, Reynolds LM, Trakhimets O, Raappana A, Flannery EL, et al. Partial protection against P. vivax infection diminishes hypnozoite burden and blood-stage relapses. Cell Host Microbe. 2021;29(5):752-6.

20. Arévalo-Herrera M, Vásquez-Jiménez JM, Lopez-Perez M, Vallejo AF, Amado-Garavito AB, Céspedes N, et al. Protective Efficacy of Plasmodium vivax Radiation-Attenuated Sporozoites in Colombian Volunteers: A Randomized Controlled Trial. PLOS Neglected Tropical Diseases. 2016;10(10):e0005070.

21. Atcheson E, Bauza K, Salman AM, Alves E, Blight J, Viveros-Sandoval ME, et al. Tailoring a Plasmodium vivax Vaccine To Enhance Efficacy through a

Combination of a CSP Virus-Like Particle and TRAP Viral Vectors. Infection and immunity. 2018;86(9).

22. Ntumngia FB, Kolli SK, Annamalai Subramani P, Barnes SJ, Nicholas J, Ogbondah MM, et al. Naturally acquired antibodies against Plasmodium vivax pre-erythrocytic stage vaccine antigens inhibit sporozoite invasion of human hepatocytes in vitro. Scientific reports. 2024;14(1):1260.

23. Ventocilla JA, Tapia LL, Ponce R, Franco A, Leelawong M, Aguiar JC, et al. Evaluation of naturally acquired immune responses against novel pre-erythrocytic Plasmodium vivax proteins in a low endemic malaria population located in the Peruvian Amazon Basin. Malar J. 2024 May 23;23(1):163

24. White NJ. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations in antimalarial dose optimization. Antimicrob Agents Chemother. 2013 Dec;57(12):5792-807.

25. Chu CS, White NJ. Management of relapsing Plasmodium vivax malaria. Expert Rev Anti Infect Ther. 2016 Oct;14(10):885-900.

X. ANEXOS

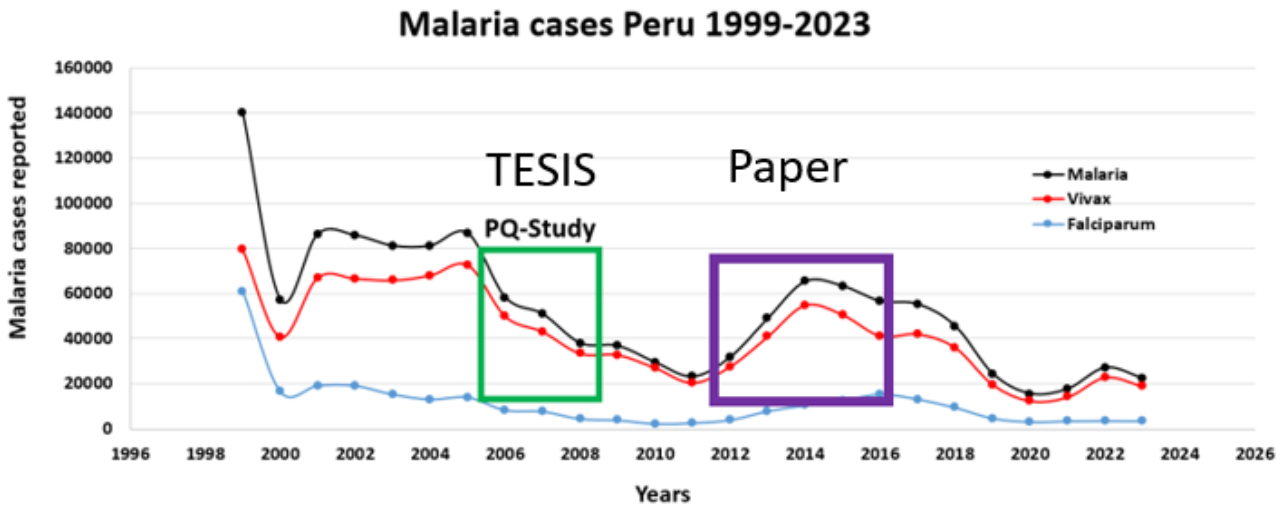

Figura suplementaria 1. Dinámica de la transmisión (casos) de malaria en el Perú desde 1996-2023.Fuente: Minsa y CDC-Peru 1998-2023