

RESPUESTA INMUNE HUMORAL CONTRA LA PROTEÍNA RECOMBINANTE r200L DE *Plasmodium vivax*.

HUMORAL IMMUNE RESPONSE AGAINST THE RECOMBINANT PROTEIN OF *Plasmodium Vivax* r200L

María Fernanda Yasnot A.¹, Yeliana Lucía Sánchez L.²

Recibido para publicación: Febrero 23 de 2017 - Aceptado para publicación: Mayo 24 de 2017

RESUMEN

Objetivos: Determinar la respuesta inmune humoral contra la proteína recombinante r200L, de *Plasmodium vivax* en personas infectadas y expuestas a la enfermedad residentes en el municipio de Tierralta - Córdoba. Relacionar variables sociodemográficas (género, edad, malarias previas), con la respuesta inmune humoral contra la proteína r200L generada por *Plasmodium vivax*. **Materiales y Métodos:** El muestreo se realizó por conveniencia, tomando 84 muestras, 42 correspondieron a los pacientes infectados con *P. vivax*, en el municipio de Tierralta-Córdoba y 42 muestras de habitantes expuestos a la infección, el procedimiento fue realizado mediante la técnica de Enzimoimmunoensayo (ELISA), la cual fue relacionada con las características sociodemográficas (género, edad, malarias previas), de la población estudio. **Resultados:** En la población de pacientes y expuestos se evidenció que la respuesta inmunitaria fue mayor en títulos de 1:800, presentándose en algunos pacientes títulos altos de anticuerpos hasta 1:3200. **Conclusiones:** Existe antigenicidad natural contra la proteína r200L de *P. vivax* en la población estudiada sin encontrarse ninguna relación directa con las variables sociodemográficas estudiadas de la población.

Palabras Clave: Malaria, *Plasmodium vivax*, Tierralta, Inmunidad

ABSTRACT

Objectives: To determine the humoral immune response to recombinant protein r200L of *Plasmodium vivax* in malarial infected and exposed individuals to residing in Tierralta - Córdoba. Linking demographic variables (gender, age, previous malarial); with the humoral response to protein produced by *Plasmodium vivax* r200L. **Materials and Methods:** The sampling was done for convenience, taking 84 samples, 42 were for patients infected with *P. vivax*, and 42 samples from people exposed to infection, all collected in Tierralta-Cordoba, the procedure was done using the technique of enzyme immunoassay (ELISA), the antibodies titre was related to demographic characteristics (gender, age, previous malarial), of the study population. **Results:** In both populations, the patient and exposed it became clear that the immune response was higher in the titles of 1:800, in some patients presenting high titles of antibodies to 1:3200. **Conclusions:** There is natural antigenicity to protein r200L of *P. vivax* in the study population and found not direct relationship with sociodemographic variables studied population.

Key words: Malaria, *Plasmodium vivax*, Tierralta, Immunity

¹ Bacterióloga y Laboratorista Clínica, Magister en Ciencias Básicas Médicas, Doctora en Ciencias Biomédicas, Profesor asociado de la Facultad Ciencias de la Salud, Grupo de Investigaciones Microbiológicas y Biomédicas de Córdoba, Programa de Bacteriología de la Universidad de Córdoba. Telefax: 7860319, myasnot@correo.unicordoba.edu.co

² Bacterióloga, Grupo de Investigaciones Microbiológicas y Biomédicas de Córdoba, Programa de Bacteriología, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad de Córdoba, yeliana183@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

El paludismo o malaria es una de las enfermedades infecciosas más serias a nivel mundial, siendo responsable de más de 2 millones de muertes y 500 millones de casos clínicos al año; representando la principal enfermedad transmitida por vectores. Se presenta en más de 100 países, principalmente en las regiones tropicales más pobres de África, Asia y Latinoamérica y más del 40% de la población global (>2 mil millones de personas) se encuentra en riesgo de contraerla. La transmisión ocurre solamente mediante la picadura de mosquitos hembras del género *Anopheles*, que se encuentran presentes por debajo de los 1600 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.), y que estén infectadas con el parásito del género *Plasmodium*; solo 4 especies afectan al hombre (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*) (1). Colombia es uno de los países más afectados por esta enfermedad, convirtiéndose en uno de los problemas de mayor importancia en salud pública (2).

La inmunidad natural producida en la malaria es compleja y poco entendida, variando de acuerdo a la edad, endemidad, el estadio y especie del parásito, y ciertos marcadores genéticos; siendo la población infantil, mujeres embarazadas, entre otros, más vulnerables para adquirirla y por tanto susceptibles a una malaria severa con un alto índice de mortalidad. En la región del alto sinú especialmente en el municipio de Tierralta- Córdoba, existen ciertas condiciones sociodemográficas que hacen de esta, una zona de alta endemidad para la malaria. Las manifestaciones clínicas en zonas de alta transmisión son más frecuentes en niños y jóvenes, mientras que las infecciones asintomáticas son más comunes en individuos mayores. Esto indica que la inmunidad es adquirida gradualmente y está relacionada con la edad en la que ocurre la primera exposición, ya que los niños no alcanzan a desarrollar mecanismos inmunes cuando entran en

contacto con el parásito, aumentando el riesgo de adquirir paludismo clínicamente manifiesto (3). Sin embargo, en regiones donde la malaria es endémica, como en la población de Tierralta-Córdoba en las cuales los individuos tienen algún grado de inmunidad, las infecciones graves son poco comunes; sólo una pequeña proporción de infecciones puede alcanzar una parasitemia elevada que conduzca a un cuadro complicado de la enfermedad (4).

La realización de este estudio es de gran importancia debido a que en el país, y particularmente en Tierralta-Córdoba, existen pocas investigaciones sobre la respuesta inmune en personas infectadas y expuestas a la malaria, ya que se ha demostrado cierto grado de inmunidad desarrollada en poblaciones de áreas endémicas después de múltiples exposiciones a la infección, que puede estar relacionada con la disminución de la frecuencia de episodios palúdicos y la reducción de la gravedad de las manifestaciones clínicas (5).

El trabajo tiene como objetivo general determinar la respuesta inmune humoral contra la proteína recombinante r200L de *Plasmodium vivax*, en personas infectadas y expuestas a la enfermedad residentes en el municipio de Tierralta – Córdoba y como objetivo específico relacionar variables sociodemográficas (género, edad, malaria previas) con la respuesta inmune humoral contra la proteína r200L generada por *Plasmodium vivax*.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación corresponde a un estudio descriptivo de corte transversal que se realizó en el municipio de Tierralta-Córdoba, Colombia.

El muestreo se realizó por conveniencia, tomando 84 muestras de la población estudio, 42 correspondientes a pacientes infectados con *P. vivax*, que acudían a la Dirección regional de Salud, en el municipio de Tierralta,

Córdoba y 42 muestras de habitantes expuestos a la infección (viven en una zona altamente endémica para malaria), teniendo en cuenta las consideraciones éticas y los criterios de selección.

Los criterios de inclusión para la selección de los pacientes fueron: pacientes que presentaran gota gruesa positiva para *P. vivax*, hombres y mujeres mayores de 18 años de edad y la aceptación y firma del consentimiento informado; para los individuos expuestos los criterios de inclusión fueron: individuos expuestos al *Plasmodium*, gota gruesa negativa para *Plasmodium spp.*, hombres y mujeres mayores de 18 años de edad y la aceptación y firma del consentimiento informado.

Las personas incluidas en el muestreo fueron caracterizadas teniendo en cuenta las siguientes variables: edad, género, número de episodios previos de malaria. Por cada paciente e individuo expuesto a *Plasmodium*, fueron colectados 7ml de sangre sin anticoagulante, después de la valoración clínica y el cumplimiento de los criterios de inclusión establecidos para el proyecto de investigación.

Para la determinación de la antigenicidad de la proteína r200L en individuos tanto expuestos como infectados con *P. vivax*, se realizó ELISA. Las placas fueron sensibilizadas con la proteína a 1.0 µg/ml diluido en buffer bicarbonato, luego se dispensaron 100µl por pozo, quedando a una concentración final de 100 ng/pozo, se incubaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente se descartó la solución contenida en las placas y se realizó el bloqueo con 200 µl/pozo con PBS 1X/Tween20 0.05% / BSA (Albúmina sérica bovina) al 1% y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. El tamizaje se realizó con una dilución 1:200, las muestras positivas a esta dilución fueron tituladas, para la titulación se realizaron diluciones 1:200, 1:400, 1:800,

1:1600, y 1:13200 con PBS 1X/Tween20 0.05%/BSA (Albúmina sérica bovina) al 1%.

Una vez terminado el tiempo de incubación, se lavaron las placas 3 veces por inmersión con PBS 1X pH 7.2-7.4/Tween20 0.05%, y se sacudieron sobre papel toalla sin dejar secar los pozos. Posteriormente, se agregaron 100 µl por pozo de las diluciones correspondientes, se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Una vez terminado el tiempo de incubación, se lavaron las placas 6 veces con PBS 1X pH 7.2-7.4/Tween20 0.05%, y se sacudieron sobre papel toalla sin dejar secar los pozos. Al mismo tiempo, se hizo una dilución 1:5000 del conjugado anti-Human IgG polivalente marcado con Fosfatasa Alcalina en PBS 1X/Tween20 0.05%/ BSA (Albúmina sérica bovina) al 1%. De la cual se adicionó 100µl por pozo, se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. La dilución del sustrato p-NPP (para-Nitrofenilfosfato) (1 tableta de p-NPP por cada 5 ml de buffer dietanolamina) se realizó 15 minutos antes de que se terminara el tiempo de incubación. Luego del tiempo de incubación, se lavaron las placas 6 veces con PBS 1X pH 7.2-7.4/Tween20 0.05%, y se sacudieron sobre papel toalla sin dejar secar los pozos. Finalmente, se dispensaron 100 µl por pozo del sustrato y se incubó 45 minutos a temperatura ambiente, protegiendo la placa de la luz. La lectura se realizó en un Lector de ELISA a una longitud de onda de 405 nanómetros.

La información colectada a partir de las características sociodemográficas de los pacientes y expuestos (género, edad, antecedentes de malaria previas), y de los títulos de anticuerpos, que cumplieron los criterios para éste estudio, fueron almacenadas en una base de datos realizada en Excel, de la cual se obtuvieron frecuencias y comparaciones basadas en las tablas y gráficas realizadas para cada una de las relaciones.

RESULTADOS

En la determinación de los títulos de anticuerpos contra la proteína r200L de *Plasmodium vivax* tanto en pacientes como en personas expuestas se evidenció que la respuesta inmunitaria fue mayor en títulos de 1:800, presentándose en algunos pacientes títulos altos de anticuerpos hasta 1:3200. (Figura 1)

Al evaluar la respuesta inmunitaria humoral de los pacientes con infección por *P. vivax*, se demostró que la mayoría de pacientes, un

38%, presentó títulos de anticuerpos en 1:800; sin embargo ésta población de pacientes está presentando títulos de anticuerpos altos contra la proteína r200L evidenciándose hasta la dilución 1:3200. (Figura 2)

En la respuesta inmunitaria humoral de las personas expuestas a *P. vivax*, se demostró que en su mayoría (85.70%) presentaron títulos de anticuerpos 1:800; siendo una respuesta inmunitaria alta para estas personas que están en exposiciones repetidas al parásito. (Figura 3).

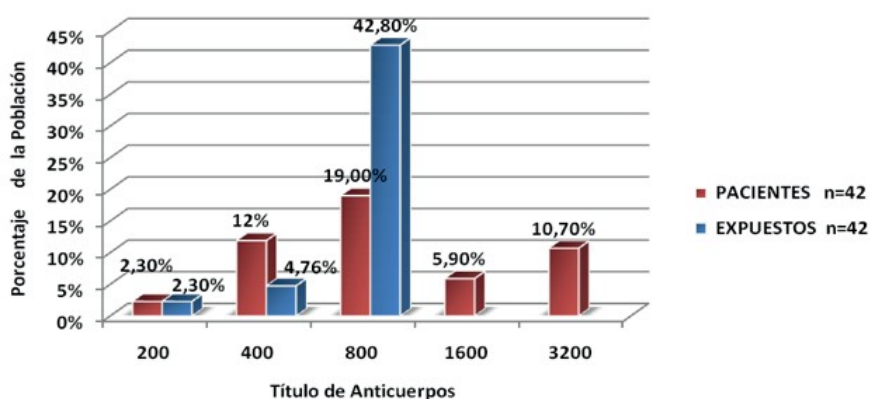


Figura 1. Títulos de anticuerpos contra la proteína r200L en pacientes y expuestos

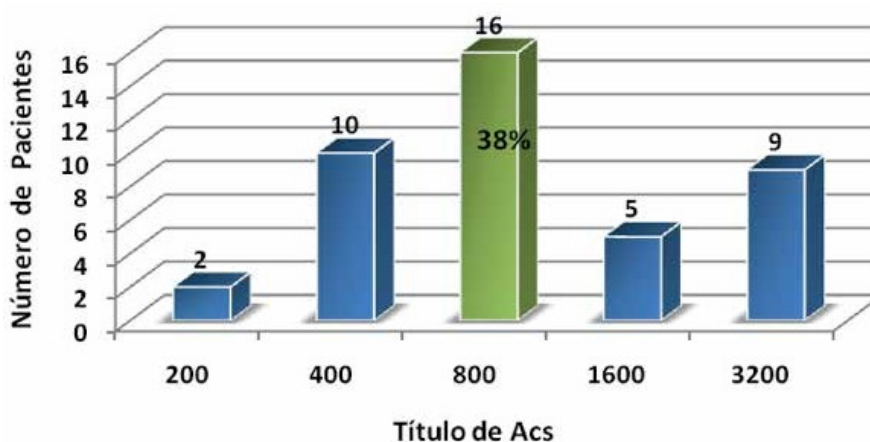


Figura 2. Títulos de anticuerpos contra la proteína r200L en pacientes con infección por *p. vivax*

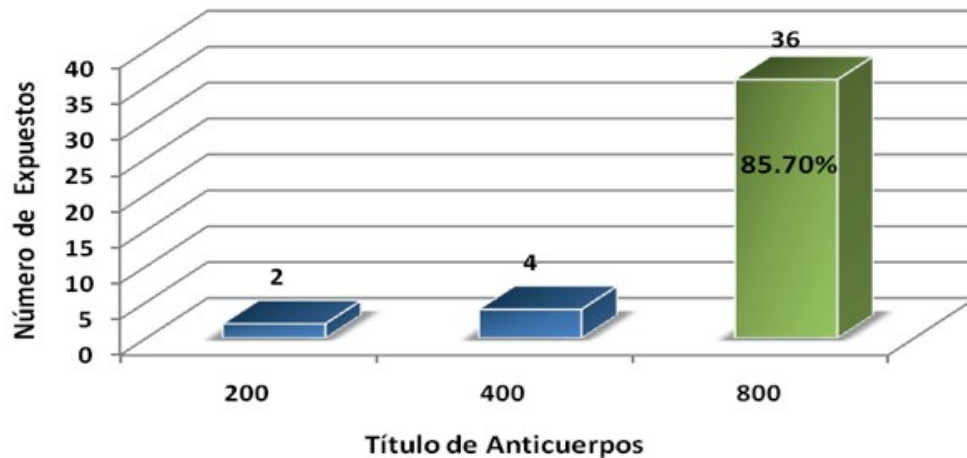


Figura 3. Títulos de anticuerpos contra la proteína r200L en personas expuestas

En las características sociodemográficas en la población total estudiada, se encontró que 55 (65,40%) eran de sexo Masculino y 29 (34,50%) correspondieron al total de Mujeres (Tabla 1)

En la clasificación de la población total estudiada según los rangos de edades, se presentó un mayor porcentaje en personas entre los 18 y los 30 años de edad, representado en 47 personas (55,90%). (Tabla 2)

Otra de las características sociodemográficas que se estudiaron en el proyecto, fue el número de malarias previas, obteniendo que sólo una persona (2,30%) se sometió al estudio sin haber presentado antecedentes de malaria; el 83.30% presentaron de 1 a 10 episodios maláricos. (Tabla 3).

Tabla 1. Característica Sociodemográficas (Género) de la población total estudiada.

Población	HOMBRES	MUJERES	TOTAL
PACIENTES	28	14	42
EXPUESTOS	27	15	42
TOTAL	55	29	84
PORCENTAJE	65,40%	34,50%	100%

En la relación del género con los títulos de anticuerpos obtenidos en los pacientes y expuestos, se observó que la mayor respuesta inmunitaria presentada en ambos géneros fue hasta en títulos de 1:800, sin embargo, tantos hombres como mujeres mostraron respuesta inmunitaria humoral hasta títulos de 1:3200. (Figura 4) (Figura 5).

Tabla 2. Clasificación de la población total según el rango de edades.

Edad	18-30	31-50	51-70	TOTAL
PACIENTES	25	10	7	42
EXPUESTOS	22	17	3	42
TOTAL	47	27	10	84
PORCENTAJE	55,90%	32,10%	11,90%	100%

Tabla 3. Porcentaje de Malaria Previas en los pacientes.

Malaria Previas	0	1 - 10	11 - 20	> 21	TOTAL
PACIENTES	1	35	5	1	42
PORCENTAJE	2,30%	83,30%	11,90%	2,30%	100%

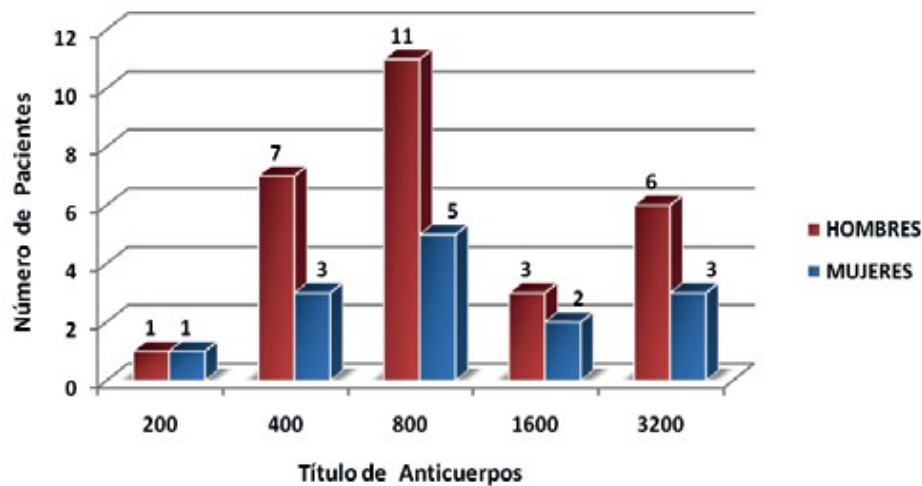


Figura 4. Relación género vs títulos de anticuerpos en pacientes.

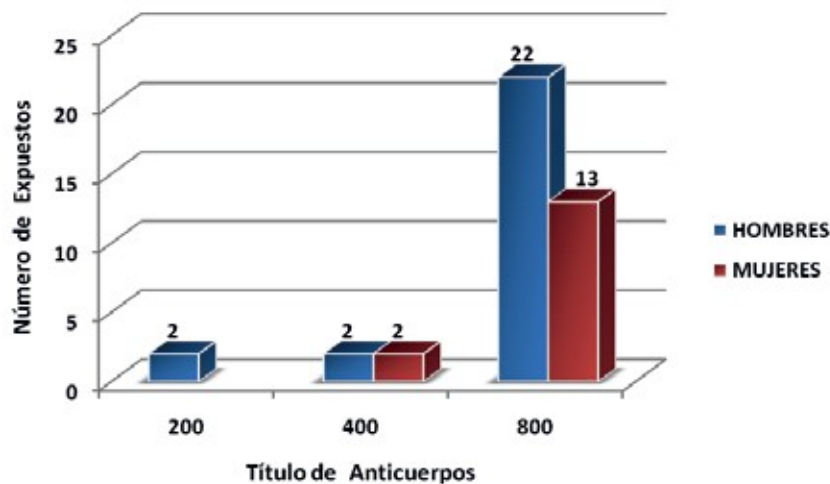


Figura 5. Relación género vs títulos de anticuerpos en personas expuestas.

Relacionando la edad con el título de anticuerpos en pacientes se demostró que en su mayoría ésta población presentó títulos de 1:400 y 1:800; en el rango de edades (18 – 30 años) fue donde más se evidenció respuesta

inmunitaria humoral en títulos de 1:800 y 1:3200, las personas con edades entre los 31 y 50 años mostraron respuesta inmune hasta en títulos 3:200. (Figura 6).

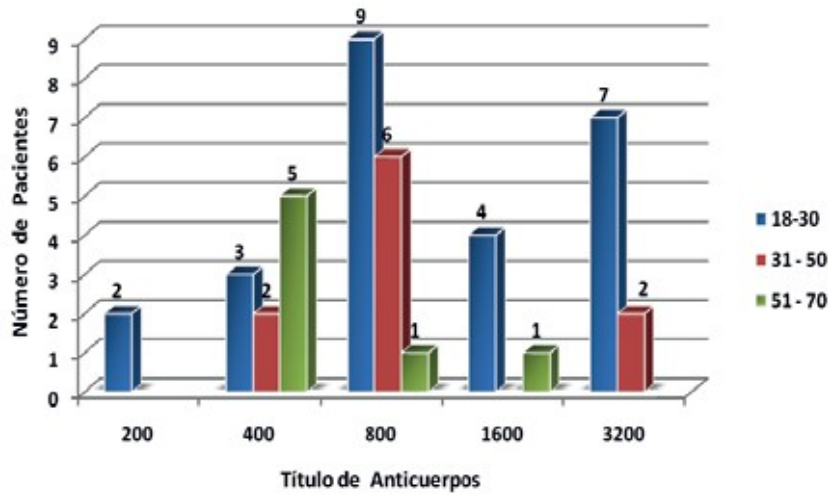


Figura 6. Relación género vs títulos de anticuerpos en pacientes.

En la relación de la edad con el título de anticuerpos en personas expuestas, se demostró que en todas las edades de las personas expuestas se está presentando títulos altos contra la proteína r200L hasta en títulos de 1:800. (Figura 7)

Otra de las características sociodemográficas a relacionar fueron los episodios de Malaria previas con los títulos de anticuerpos en los pacientes, se observó que la respuesta inmunitaria en pacientes con antecedentes de malaria de 1 a 10 fue alta hasta títulos en 1:3200. Sólo un paciente refirió haber presentado más de 21 episodios de malaria previamente, con respuesta inmunitaria hasta 1:400. (Figura 8)

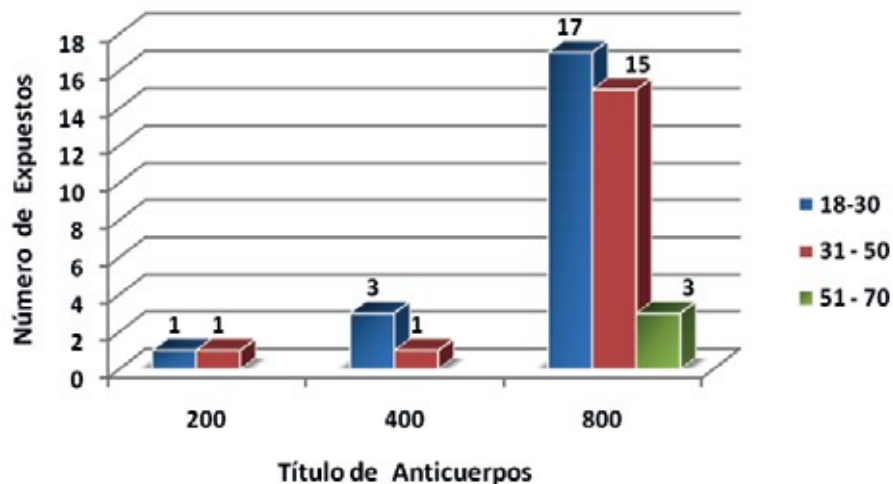


Figura 7. Relación género vs títulos de anticuerpos en personas expuestas

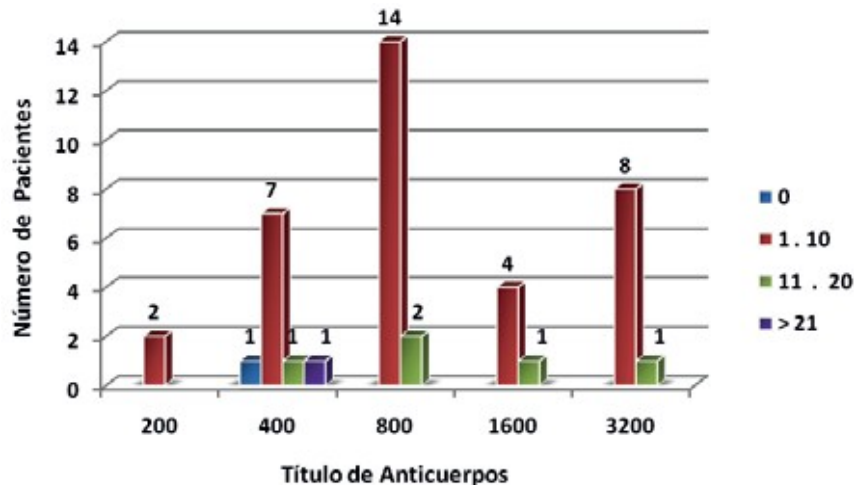


Figura 8. Relación de malaria previas vs título de anticuerpos en pacientes

DISCUSIÓN

La inmunidad natural producida en malaria es compleja y poco entendida, variando de acuerdo a la edad, endemidad, estadio, especie parasitaria, y ciertos marcadores genéticos (3), en este trabajo de investigación fue posible evidenciar que la proteína r200L esta siendo antigénica de manera natural, tanto en la población de pacientes como en la de expuestos; encontrándose que el título de anticuerpos con mayor predominio dentro de estas poblaciones fue de 1:800, lo que demuestra que la mayoría de la población positiva está presentando títulos de anticuerpos tres veces por encima del punto de corte frente a esta proteína, y se demostró la producción de respuesta inmune humoral hasta en títulos de 1:3200; la literatura cita que en áreas donde la malaria es endémica, la inmunidad clínica relativa es gradualmente adquirida por individuos repetitivamente expuestos a la picadura del mosquito infectado, la inmunidad inhibiría la invasión y multiplicación del parásito (6).

En otros estudios realizados por el Instituto de inmunología del Valle y la Fundación Centros

de primates (7), en Buenaventura, principal puerto en la costa pacífica de Colombia y un área endémica en malaria, se demostró la alta capacidad antigénica, determinada por los niveles de anticuerpos producidos tanto en pacientes infectados con *P. vivax* como en los individuos asintomáticos con anterioridad expuestos a la infección por *P. vivax* y con frecuencia tenían anticuerpos contra esta proteína recombinante, estos resultados también mostraron concordancia con estudios seroepidemiológicos realizados en Brasil con fragmentos de la región N terminal de la proteína r200L(8). Es de gran importancia la identificación de que estas poblaciones residentes en las áreas endémicas para malaria, están presentando altos títulos de anticuerpos contra la proteína r200L de *P. vivax*, siendo blanco para los futuros ensayos clínicos como candidata a vacuna para la enfermedad malárica.

En la caracterización de los pacientes, se demostró que hubo mayor respuesta inmunitaria en hombres que en mujeres, en ambas poblaciones de pacientes y de expuestos; sin embargo aún no se ha descrito una relación directa entre el género y la respuesta inmunitaria contra la malaria.

Las relaciones de edad con los títulos de anticuerpos, mostraron que la población tanto de pacientes como de expuestos de edades comprendidas entre los 18 y los 30 años de edad presentaron la mejor respuesta inmunitaria hasta en títulos 1:3200 en los pacientes; pero no existe relación directa entre la edad de la población estudiada y el título de anticuerpos; la inmunidad es adquirida gradualmente y está relacionada con la edad en la que ocurre la primera exposición, sin embargo en regiones como Tierralta – Córdoba donde la malaria es endémica los individuos de cualquier edad tienen algún grado de inmunidad (3).

En este estudio se determinó que los pacientes que refirieron haber presentado episodios maláricos entre 1 y 10, fueron los que mayor respuesta inmunitaria presentaron; el título de anticuerpos para la proteína r200L de la población en relación con el número de malarias previas no tiene una relación directa, esto se puede evidenciar en que no existe un aumento de estos a medida que se han tenido mayores episodios de enfermedad palúdica.

CONCLUSIÓN

Existe antigenicidad natural contra la proteína r200L de *P. vivax* en la población estudiada, esto se pudo establecer al evaluar el título de anticuerpos que presentaban tanto los pacientes como las personas expuestas a la enfermedad.

La infección natural puede proveer ventajas para el refuerzo de la respuesta de anticuerpos inducidas por la vacunación, ya que una vez se induce la respuesta inmunitaria a partir de la aplicación de una vacuna, si existe una memoria inmunitaria parcial, que fue producida naturalmente, la intensidad de la respuesta será mucho mayor, de la que se produciría si no existiera una memoria previa.

No se encontró ninguna relación directa entre el título de anticuerpos y las variables

sociodemográficas estudiadas, (género, edad, antecedentes de malaria); lo que demuestra que la respuesta inmune humoral en estos pacientes no está ligada a una condición específica del mismo.

Los resultados presentados proporcionan evidencia de que la proteína r200L de *P. vivax* es una opción potencial a vacuna en infecciones por *P. vivax*, la cual presenta características similares a otras péptidos y proteínas candidatas a vacuna en malaria, sin embargo no se puede lograr una protección sólida con una sola proteína del parásito, y se necesitaría emplear en conjunto de proteínas multiantigénicas para generar una mejor respuesta en la población.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos al Grupo de investigaciones Microbiológicas y Biomédicas de Córdoba “GIMBIC”, por el apoyo y la colaboración en tan importante investigación.

Al Centro de Investigación Científica Caucaseco, liderado por el Dr. Sócrates Herrera, por la donación de la proteína recombinante.

A la Dirección regional de Salud, del municipio de Tierralta, por permitir tomar las muestras en sus instalaciones.

Y a todos los voluntarios de la población de Tierralta – Córdoba; por aceptar hacer parte de éste estudio y colaborar en la realización de él.

REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud. Informe sobre el paludismo en el mundo 2005. Ginebra: OMS/UNICEF; 2006.
2. Agudelo, C. Corredor, A. Echeverry, M.A. Salcedo, H. Murraín, B. Malaria: fundamentos y alcances del control Características en Colombia. revisión

de temas. Dep. medicina universidad nacional.1995

3. Artavanis-Tsakonas K, Tongren JE, Riley EM. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immuno- pathology. Clin Exp Immunol. 2003; 133:145-52.
4. Mombo LE, Ntoumi F, Bisseye C, Ossari S, Lu CY, Nagel RL, et al. Human genetic polymorphisms and asymptomatic *Plasmodium falciparum* malaria in Gabonese schoolchildren. Am J Trop Med Hyg. 2003;68:186-90.
5. Tobón C,A. Giraldo, C. Pineros, J. Arboleda, M. Blair, S. Carmona-Fonseca, J. *The epidemiology of complicated falciparum malaria: case and controls study in Tumaco and Turbo, Colombia, 2003.* Rev Bras Epidemiol 2006; 9(3): 283-96.
6. Luty AJF, Mayonbo J, Lekoulou F, Mshana R. Immunologic responses to soluble exoantigens of *Plasmodium falciparum* in Gabonese children exposed to continuous intense infection. Am JTropmedHyg 1994;51(6):720-729.
7. Valderrama A., Quintero G., Castellanos A., Perez Y; Mendez F.;Arévalo-Herrera M; Herrera S. Antigenicity, immunogenicity, and protective efficacy of *Plasmodium vivax* MSP1 PV200I: a potential malaria vaccine subunit. Am JTropmedHyg 2005;73 (Supl 5):16-24.
8. Valderrama A., Hurtado S., Perez Y., Quintero G., Arévalo-Herrera M., “Antigenicity and Immunogenicity of *Plasmodium vivax* MSP-1 PV200L A Potencial Malaria Vaccine Subunit” NIAID International Centers for Tropical Disease Research Network. 2005. p:16-24