

Trabajo de Fin de Máster

APELLIDOS Y NOMBRE DEL ALUMNO: Iturriaga Barrera, David
APELLIDOS Y NOMBRE DEL DIRECTOR DE LA INVESTIGACIÓN: Viera Morilla, Sara
CENTRO: Centro de I+D de Salud Global de GSK
DEPARTAMENTO/SERVICIO: Malaria <i>in vivo</i>
APELLIDOS Y NOMBRE DEL TUTOR ACADÉMICO: Gómez Sánchez, José Francisco
TÍTULO DEL TFM: Optimización de ensayos de recrudescencia de malaria: Comparación de qPCR y citometría de flujo en ratones NSG humanizados
TFM TITLE: Optimization of Malaria Recrudescence Assays: Comparison of qPCR and Flow Cytometry in Humanized NSG Mice

En MADRID, a 23 de JUNIO de 2025.

1. Resumen

La malaria es una de las enfermedades más prevalentes y mortales del mundo, y es causada por protozoos del género *Plasmodium*, siendo *Plasmodium falciparum* el responsable de su forma más grave. Aunque existen numerosos tratamientos, las resistencias amenazan su eficacia, generando la necesidad de desarrollar nuevos medicamentos.

Un desafío significativo en su tratamiento es la recrudescencia, donde el parásito reaparece en la sangre varios días después de su eliminación inicial, debiendo considerarse en los ensayos *in vivo* de nuevos medicamentos. Esto generalmente implica cuatro días de tratamiento, seguidos por un mínimo de 28 días de observación, con muestreos periódicos de sangre para detectar al parásito mediante citometría de flujo (FACS).

Este estudio buscó optimizar estos ensayos evaluando si la PCR cuantitativa (qPCR) puede detectar la recrudescencia antes que la citometría de flujo. Esto podría refinar el modelo animal al reducir la frecuencia de muestreo y permitir una intervención más temprana. Además, optimizaría los recursos al reducir la duración del mantenimiento de los ratones cuando el tratamiento provoca recrudescencia.

Se utilizó un modelo de ratón humanizado en ratones NSG (*NOD scid gamma*), que fueron transfundidos con sangre humana e infectados con *P. falciparum*. Posteriormente, se administraron dosis subterapéuticas de medicamentos antimaláricos (dihidroartemisina, atovuona, mefloquina, cloroquina y DSM265). Durante 28 días, se extrajo periódicamente sangre para su análisis con qPCR y FACS. Las muestras biológicas humanas se obtuvieron de manera ética, y su uso en la investigación se llevó a cabo conforme a los términos de los consentimientos informados bajo un protocolo aprobado por un IRB/EC. Todos los estudios con animales fueron revisados éticamente y realizados de acuerdo con la Directiva Europea 2010/63/EEC y la Política de GSK sobre el Cuidado, Bienestar y Tratamiento de Animales.

El criterio para recrudescencia con FACS es claro: detección de parásitos tras un período negativo. Sin embargo, el ADN parasitario fue detectado por qPCR por al menos 31 días después de la infección (probablemente por parásitos muertos), necesiéndose otro criterio para la qPCR. Una opción podría ser un aumento en la detección respecto al tiempo anterior. Sin embargo, hubo cuatro aumentos ocasionales que no resultaron en recrudescencia. La causa de esto es desconocida, requiriéndose investigación adicional.

Considerando estos casos, un criterio adecuado podría ser un aumento de más del 100% o dos aumentos consecutivos. Con este enfoque, ninguna técnica detecta recrudescencias antes que la otra, por lo que la selección debería basarse en otros factores. FACS es un método más rápido y requiere menos muestra. Por otro lado, la qPCR es más accesible y fácil de automatizar. Además, existen técnicas de qPCR que amplifican exclusivamente ADN de células vivas. Este enfoque podría ser prometedor para la detección temprana de la recrudescencia.

Palabras clave: *P. falciparum*, recrudescencia, modelo de ratón humanizado, PCR cuantitativa, citometría de flujo

1. Abstract

Malaria is one of the most prevalent and deadly infectious diseases in the world, caused by protozoa of the genus *Plasmodium*, with *Plasmodium falciparum* being responsible for the most severe form of the disease. Although numerous treatments exist, resistance threatens their efficacy, highlighting the need for new drug development.

A significant challenge in the treatment is recrudescence, where the parasite reappears in the bloodstream several days after initial clearance. This must be considered in in vivo trials for new drugs, which typically involve four days of treatment followed by a minimum of 28 days of observation, with periodic blood sampling to detect the parasite using flow cytometry (FACS).

This study aimed to optimize recrudescence assays by evaluating whether quantitative PCR (qPCR) could detect recrudescence earlier than flow cytometry. This could refine the animal model by reducing the frequency of blood sampling and allowing an earlier intervention. Furthermore, it would optimize resources by reducing the duration of mouse maintenance when the treatment causes recrudescence.

A humanized mouse model using NSG mice (*NOD scid gamma*) was employed, transfused with human blood and infected with *P. falciparum*. Afterwards, they were administered subtherapeutic doses of antimalarial drugs (dihydroartemisinin, atovaquone, mefloquine, chloroquine and DSM265). During a 28-day period, periodic blood extractions were performed for analysis using qPCR and FACS. The human biological samples were sourced ethically, and their research use was in accord with the terms of the informed consents under an IRB/EC approved protocol. All animal studies were ethically reviewed and carried out in accordance with the European Directive 2010/63/EEC and the GSK Policy on the Care, Welfare and Treatment of Animals.

The criterion for recrudescence with FACS is clear: parasite detection after a negative period. However, parasite DNA was detected by qPCR for at least 31 days post-infection (probably due to dead parasites), therefore another criterion is needed for qPCR. One possible option could be an increase in DNA detection compared to the previous time. However, there were four occasional increases that did not result in recrudescence. The cause of these increases is unknown, necessitating further investigation.

Considering these cases, an appropriate criterion could be an increase of more than 100% or two consecutive increases. With this approach, neither technique detects recrudescences earlier than the other. Therefore, the selection of the technique should be based on other factors. FACS is a faster method and requires a smaller sample volume. On the other hand, qPCR is more accessible and easier to automate. Additionally, there are qPCR techniques that exclusively amplify DNA from live cells. This approach could be a highly promising option for the early detection of recrudescence.

Keywords: *P. falciparum*, recrudescence, humanized mouse model, quantitative PCR, flow cytometry

2.- Introducción

2.1. Importancia global de la malaria

La malaria o paludismo es una enfermedad infecciosa que se encuentra entre las patologías con mayor prevalencia y mortalidad en todo el mundo, estimándose en 263 millones el número de afectados y en 597.000 el número de fallecidos en 2023. Los datos muestran una especial severidad en niños, siendo el 73,7% de los fallecidos menores de 5 años, observándose una incidencia muy superior entre las familias con menores recursos. Su distribución es muy amplia, siendo una enfermedad endémica en 83 países (Figura 1), pero con una clara preferencia por el continente africano, registrándose allí el 94% de los casos y el 95% de las muertes. La distribución por países es muy poco proporcional, concentrándose más de 1 de cada 4 casos en Nigeria y encontrándose más de la mitad de casos en solo los 5 países más afectados (WHO, 2024).

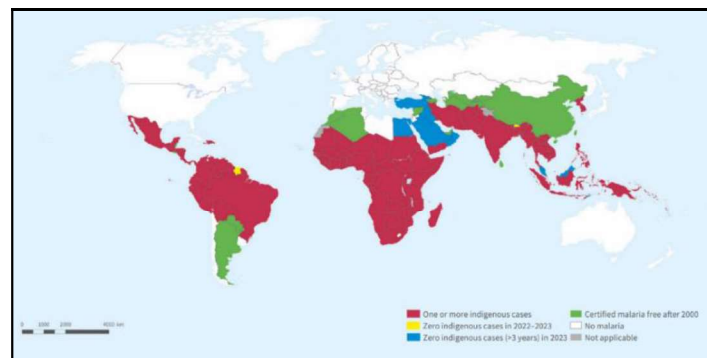


Figura 1. Distribución global de la presencia de casos autóctonos de malaria. Extraído de WHO (2024).

2.2. Características del parásito

El agente causal son los protozoos del género *Plasmodium*, parásitos intracelulares obligados. Hasta la fecha hay descritas más de 150 especies, afectando a una gran variedad de animales como mamíferos, pájaros o reptiles. El ser humano es el hospedador natural de 4 especies: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*. Además, existe otra especie denominada *P. knowlesi*, cuyo huésped principal es el macaco. Después de un gran brote en Malasia en 2004, comenzó a ser reconocida como la quinta especie que causa malaria en humanos (Singh & Daneshvar, 2013).

El parásito tiene un complejo ciclo biológico, que involucra 2 hospedadores: mosquitos del género *Anopheles*, que actúa de vector, y un vertebrado. El ciclo comienza con la picadura de un mosquito hembra infectado, que introduce esporozoitos en la circulación sanguínea del huésped vertebrado. Estos se dirigirán al hígado e invadirán los hepatocitos, iniciando

una fase asexual en la que el parásito se replica dentro de la célula, convirtiéndola en un esquizonte, que contiene miles de merozoitos. Esta fase, que no es patogénica y no produce signos ni síntomas, se denomina exoeritrocítica o hepática, y tiene una duración de 5 a 15 días según la especie. Además, si la infección es por *P. vivax* o *P. ovale*, pueden formarse hipnozoítos, formas parasitarias latentes que pueden permanecer en el hígado hasta por varios años antes de migrar a la sangre (Viera, 2017).

Tras la rotura de los esquizontes, los merozoitos se liberan a la circulación sanguínea y comienza una segunda fase llamada eritrocítica, la responsable de las manifestaciones clínicas. Los merozoitos invaden los eritrocitos del hospedador y empiezan una segunda fase de replicación asexual. *P. vivax* y *P. ovale* invaden eritrocitos jóvenes, mientras que *P. malariae* eritrocitos senescentes. *P. falciparum* y *P. knowlesi* invaden ambos tipos (Fikadu & Ashenafi, 2023).

Después de la invasión, el plasmodio adopta una forma característica de anillo y crece hasta ocupar casi todo el eritrocito. Esto da lugar al trofozoíto, una forma parasitaria metabólicamente muy activa que digiere la hemoglobina para obtener nutrientes. La degradación de los grupos hemo genera desechos citotóxicos, por lo que el parásito los polimeriza en un cristal inerte llamado hemozoína. Después, el trofozoíto se convierte en esquizonte, sufriendo replicación asexual para dar lugar a merozoitos. Estos, tras la lisis del esquizonte, serán liberados a la circulación sanguínea e infectarán nuevos eritrocitos (Viera, 2017).

Además, algunos de los trofozoítos sufren un proceso de gametocitogénesis formando gametocitos masculinos o femeninos. Estos pueden permanecer varios días en la sangre hasta que un mosquito del género *Anopheles* los ingiera cuando pique a la persona infectada. Dentro del intestino del insecto, los gametocitos lisan el eritrocito hospedador y se diferencian en 8 gametos masculinos o 1 gameto femenino. Así, cuando se fusione un gameto de cada sexo, se formará un cigoto que se diferenciará en un ooquineto móvil. Este atraviesa el epitelio intestinal y forma un oocisto, que sufre repetidos ciclos de replicación asexual para dar lugar a esporozoitos. Estas formas parasitarias son liberadas a la hemolinfa y colonizan las glándulas salivares del mosquito, para ser inoculadas en una nueva persona con su picadura (Venugopal et al., 2020). En la Figura 2 se aprecia un esquema de todo el ciclo biológico.

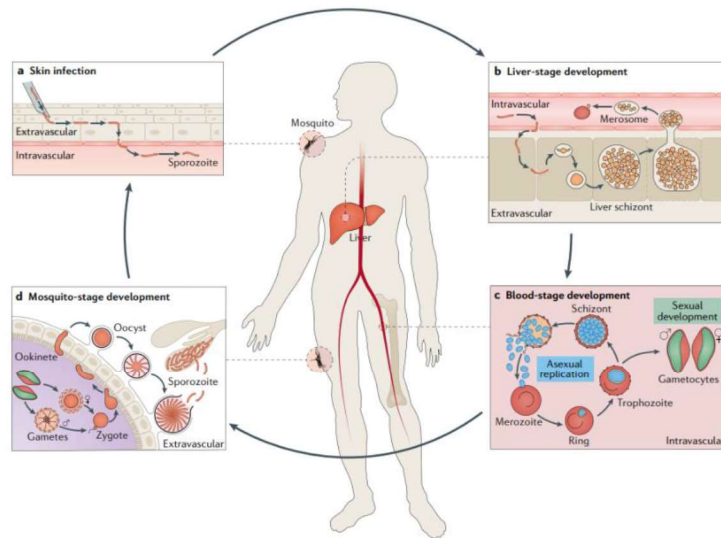


Figura 2. Ciclo biológico de *P. falciparum*. Extraído de Venugopal et al. (2020)

De las 5 especies que pueden infectar al humano, *P. falciparum* es la que tiene mayor prevalencia y mortalidad. Así, en todas las regiones de la Organización Mundial de la Salud de África, es responsable de como mínimo, el 85% de los casos (WHO, 2024). Sus síntomas son variados, produciendo en la mayoría de los casos fiebre, malestar, dolor de cabeza y letargo, seguidos de una recuperación espontánea. (Beeson & Brown, 2002).

Las fiebres suelen producirse con la rotura de eritrocitos, que al principio es irregular pero que, en ausencia de tratamiento, se sincroniza generando fiebres cíclicas. En el caso de *P. malariae*, cada 3 días, en el caso de *P. falciparum*, *P. vivax* y *P. ovale* cada 2 días, y, en el caso de *P. knowlesi*, cada 24 horas (Singh & Daneshvar, 2013).

2.3. Severidad de *P. falciparum*

Sin embargo, en algunos casos la infección avanza a malaria severa. Las manifestaciones clínicas pueden ser muy variadas y graves, destacándose convulsiones y coma (indicando malaria cerebral, Figura 3), anemia normocítica severa, insuficiencia respiratoria que genera acidosis metabólica, insuficiencia o fallo renal, hipoglucemia, colapso circulatorio, coagulación intravascular diseminada, hemorragias espontáneas o hemoglobinuria severa (Beeson & Brown, 2002). Estas manifestaciones clínicas generan una letalidad muy elevada. Por ejemplo, la malaria cerebral causa una mortalidad del 12-20%, aunque se ha conseguido reducir en un 30% gracias al tratamiento con artesunato parenteral (White, 2022).

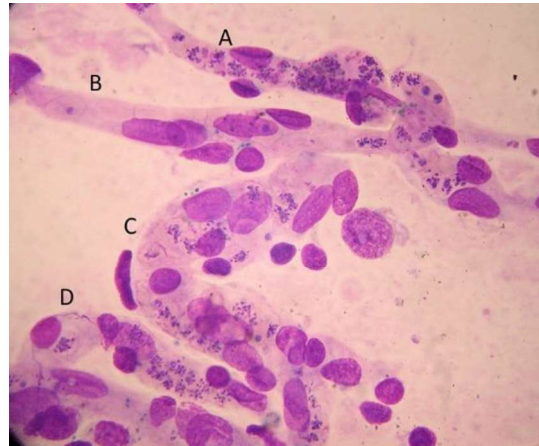


Figura 3. Frotis de la microvasculatura cerebral en un caso de malaria cerebral letal. En todos los vasos sanguíneos observados se encuentran esquizontes de *P. falciparum*. Extraído de White (2022).

La principal característica patológica de la malaria severa es el secuestro de los eritrocitos infectados en la microvasculatura, dificultando la perfusión en órganos vitales. (White, 1998). En malaria cerebral, para poder difundir al cerebro, el parásito es capaz de inducir la ruptura de la barrera hematoencefálica. Este fenómeno de secuestro parece deberse a que *P. falciparum* muestra una gran variación antigénica mediante el cambio de los antígenos del eritrocito, y algunos de los antígenos cambiados son ligandos de receptores que median la adhesión dentro de los vasos sanguíneos (Chen et al., 2000).

2.4. Diagnóstico

Para detectar el parásito, y cuantificar el porcentaje de eritrocitos infectados (parasitemia), se disponen de múltiples métodos:

2.4.1. Frotis sanguíneo

Históricamente el *gold standard* ha sido la observación microscópica del parásito en frotis sanguíneo con alguna tinción como Giemsa. A través de criterios visuales, esta técnica permite detectar el parásito, cuantificarlo y, en algunos casos, determinar la especie de plasmodio. Es una técnica muy económica que requiere materiales muy accesibles, algo especialmente importante considerando la prevalencia de la enfermedad en países con menos recursos. Las desventajas de este método radican en que su fiabilidad depende mucho de la formación del técnico, y en su baja sensibilidad. Esto es problemático porque un paciente infectado puede presentar sintomatología con una baja parasitemia. Por este motivo, si el resultado de la prueba es negativo, el frotis sanguíneo se debe repetir cada 12 o 24 horas, hasta un total de 3 resultados negativos (CDC, 2024).

2.4.2. Pruebas de diagnóstico rápido

Por otro lado, también existen tests inmunocromatográficos que constituyen una alternativa muy rápida y sencilla, lo cual es especialmente beneficioso en aquellas zonas más remotas que no pueden disponer de personal especializado. Se basan en la detección en sangre de antígenos presentes en todas las especies que infectan humanos y/o exclusivos de *P. falciparum*. Por contraparte, su sensibilidad es inferior a la de la microscopía, no permiten cuantificar la parasitemia y no hay suficiente información para determinar su fiabilidad frente a *P. ovale* o *P. malariae*. Por estos motivos, por el momento no pueden reemplazar la microscopía (CDC, 2024).

2.4.3. PCR cuantitativa (qPCR)

También se puede detectar directamente el material genético del parásito mediante técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta permite la amplificación exponencial de ADN a partir de cantidades ínfimas de una cierta secuencia molde. Derivada de esta, surgió la PCR cuantitativa (qPCR), a la que se añade un método para cuantificar la amplificación. El método más sencillo es mediante un agente intercalante fluorescente (como SYBR Green), pero también se puede utilizar una sonda TaqMan, más específica. Esta está diseñada para hibridarse con la región a ser amplificada, y contiene un fluoróforo y un *quencher* (inhibidor de fluorescencia) que, cuando la sonda está intacta, se encuentra cercano al fluoróforo inhibiendo la señal. Cuando la polimerasa amplifica la región se rompe la sonda, liberando así al fluoróforo de la inhibición del *quencher* e incrementando en consecuencia la fluorescencia.

Si aplicamos la técnica en el ADN extraído de una muestra de sangre, y amplificamos un gen presente en *P. falciparum* (como el gen 18S), se puede detectar y cuantificar la presencia de parásito aun cuando la parasitemia sea muy baja.

Al detectar directamente el ADN, la técnica es más sensible que la microscopía y permite diferenciar la especie de plasmodio. Sin embargo, es costosa y poco accesible al requerir equipos y materiales muy especializados. Esto, además de la tardanza en la obtención de resultados, dificulta su adopción en los sistemas de salud (CDC, 2024).

2.4.4. Citometría de flujo (FACS)

Por último, algunos grupos de investigación preclínica utilizan la citometría de flujo (FACS) para detectar y cuantificar el parásito en modelos animales. Su funcionamiento se basa en forzar el paso de las células por un conducto lo suficientemente estrecho como para que

circulen de una en una e incidirlas con láseres. Mediante marcadores fluorescentes se puede detectar la presencia de alguna molécula de estudio.

Ya que los eritrocitos de mamíferos carecen de núcleo, un marcador fluorescente de ADN (como SYTO-16) permite diferenciar los eritrocitos normales de los parasitados. Aunque requiere de equipamiento muy costoso, se alcanza una sensibilidad mayor que con la microscopía de frotis sanguíneos y permite una detección muy rápida y sencilla con muestras pequeñas de sangre (Jimenez-Diaz et al., 2009).

También se ha realizado algún estudio para comprobar su aplicabilidad en diagnóstico clínico. Se concluyó que era, al menos, igual de sensible y específica que la microscopía, además de tener menos variabilidad según el personal. Aunque la técnica muestra un gran potencial, todavía hay que solucionar algunos problemas como la variabilidad entre pacientes o hemólisis durante el procesado de muestras para su aplicación (Campo et al., 2011).

2.5. Tratamiento

Actualmente se dispone de una gran variedad de fármacos contra el parásito. El tratamiento es muy importante puesto que, si la enfermedad no se trata, el paciente puede desarrollar malaria severa.

La mayoría de los fármacos aprobados se dirigen a las formas asexuales del ciclo eritrocítico, las causantes del cuadro clínico, aunque también existen algunas moléculas capaces de eliminar el plasmodio en la fase hepática o los gametocitos. (Belete, 2020). Para dificultar la aparición de resistencias, se administran de forma combinada. Según su mecanismo de acción, los fármacos más comunes se pueden dividir en:

- Derivados de la quinolina: Son el grupo históricamente más utilizado y presentan actividad contra las fases eritrocíticas, aunque algunos también actúan contra la fase hepática. Su mecanismo de acción se basa en impedir la formación de la hemozoína, retardando la deposición de los grupos hemo y formando complejos para evitar su polimerización. Algunos ejemplos serían la cloroquina, la piperquina o la mefloquina (Fikadu & Ashenafi, 2023).

- Derivados de la artemisina: Actualmente son recomendados por la OMS como los antipalúdicos de primera línea frente a *P. falciparum*. Se usan en forma de derivados, siendo los más comunes arteméter, artesunato y arteéter (artemotil), que se transforman en la forma activa, la dihidroartemisina (DHA). Su mecanismo de acción no está completamente descrito, pero la teoría más aceptada es que reacciona con los grupos hemo liberados por el

plasmodio para generar radicales libres que dañan sus proteínas (Tse et al., 2019). Tienen una acción muy rápida, produciendo la eliminación del parásito y reemisión de la fiebre antes que cualquier otro fármaco autorizado. Sin embargo, también tienen una vida media baja, por lo que la monoterapia provoca frecuentemente recidivas. Por ello se combinan con otros fármacos de vida media más larga, formando terapias de combinación basadas en artemisinina (ACTs) (Eastman & Fidock, 2009).

- Antifolatos: Su mecanismo de acción se basa en el bloqueo de la síntesis de ácido fólico, esencial para la síntesis de nucleótidos y aminoácidos. Estos fármacos bloquean la división nuclear del parásito, secuestrándolos en la forma de esquizonte en hepatocitos y eritrocitos. Algunos ejemplos son la pirimetamina, la sulfadoxina o el proguanil (Belete, 2020). Son fármacos potentes contra *P. falciparum* y fueron muy utilizadas combinaciones como la pirimetamina y sulfadoxina, pero aparecieron rápidamente resistencias. Actualmente se siguen utilizando en las ACTs (Gregson & Plowe, 2005).

- Inhibidores de la síntesis de pirimidinas:

- *Inhibidores del transporte electrónico*: Bloquean la cadena de transporte de electrones mitocondrial en el complejo bc1, impidiendo así la función de la mitocondria. Esto impide la síntesis de orotato, necesario para la síntesis de pirimidina. Por otro lado, el bloqueo de la mitocondria por el fármaco también parece inhibir la síntesis de purina (Nixon et al., 2013). El fármaco más relevante es la atovaquona, y se suele utilizar como profiláctico por su capacidad para actuar frente a la fase hepática, permitiendo periodos de tratamiento postexposición más cortos. También se ha utilizado en zonas con altas tasas de fallo con ACTs, o en áreas no endémicas como segunda línea de tratamiento, cuando las ACTs no están disponibles o no son efectivas (Schlagenhauf et al., 2003). Debido a su baja velocidad de absorción y acción lenta, la monoterapia genera muy rápidamente resistencias. El principal fármaco con el que se combina es el proguanil, ya que potencia la acción de la atovaquona (Srivastava & Vaidya, 1999).

- *Inhibidores de la dihidroorotato deshidrogenasa*: Se está estudiando su potencial para usarlos en clínica. La enzima inhibida interviene en la síntesis de pirimidinas. Tienen un gran potencial para eliminar *P. falciparum* a la vez que son poco nocivos para los humanos (que tienen vías alternativas para sintetizar pirimidinas) (Boschi et al., 2019). El fármaco más avanzado en los ensayos clínicos es el DSM265. Ha demostrado ser muy eficaz contra *P. falciparum* y tener una gran vida media, que podría permitir su administración en dosis única (Llanos-Cuentas et al., 2018).

- **Antibióticos:** Algunos antibióticos también poseen propiedades antipalúdicas. Entre los más administrados con este fin están las tetraciclinas, utilizadas para profilaxis y como adyuvante de la quinina en zonas con multirresistencias. Aunque su mecanismo de acción en malaria no está claro, algunos estudios sugieren que pueden inhibir la síntesis mitocondrial de proteínas e inhibir algunas enzimas como la dihidroorotato deshidrogenasa (Gaillard et al., 2015).

2.6. Resistencias y necesidad de nuevos fármacos

A pesar de la existencia de una gran variedad de fármacos disponibles, el tratamiento de la enfermedad sigue siendo un gran desafío por la aparición de múltiples resistencias. Según la OMS, una resistencia es la habilidad de una cepa parasitaria para sobrevivir o multiplicarse a pesar de la absorción de un medicamento en dosis iguales o mayores a las recomendadas (WHO, 2021).

El uso inadecuado y continuado de fármacos antimaláricos ha provocado la aparición de resistencias a prácticamente todos los fármacos. La primera resistencia a la cloroquina, el fármaco más utilizado por décadas, se descubrió en 1957 en Tailandia. Las cepas resistentes fueron surgiendo a lo largo de pocos años, hasta el punto de que, actualmente, la cloroquina solo es eficaz en algunas partes de América Central (Sinha et al., 2014). Como se puede ver en la Tabla 1, han ido apareciendo progresivamente resistencias a prácticamente todos los fármacos. Entre ellas se incluyen varios derivados de la artemisinina, los actuales fármacos de primera línea.

Fármaco	Introducción	Primera resistencia detectada
Quinina	1632	1910
Cloroquina	1945	1957
Proguanil	1948	1949
Sufadoxina + Pirimetamina	1967	1967
Mefloquina	1977	1982
Halofantrina	1988	1993
Atovaquona	1996	1996
Artemisinina	1971	1980
Artesunato	1975	2008
Artesunato + Mefloquina	2000	2009

Tabla 1. Comparación entre fecha de introducción y fecha de descubrimiento de resistencia de algunos fármacos antimaláricos. Creado a partir de los datos de Sinha et al. (2014).

El surgimiento y expansión de estas resistencias constituyen un gran peligro frente a la lucha contra la enfermedad, y crean la necesidad de descubrir nuevos fármacos antipalúdicos. De esta forma los estudios para encontrar nuevos fármacos que ataquen nuevas dianas del parásito deben ser una prioridad sanitaria (Fikadu & Ashenafi, 2023). Actualmente, estas investigaciones están siendo realizadas en varios centros de investigación, entre los cuales se encuentra el Centro de I+D de Salud Global de GSK.

2.7. Modelos animales

Aunque los experimentos *in vitro* son muy útiles para estimar la capacidad antimalárica de un fármaco, actualmente la experimentación animal es estrictamente necesaria para que una nueva molécula pueda entrar en ensayos preclínicos. Un modelo animal aporta una aproximación mucho más exacta de la enfermedad al incluir factores imposibles de replicar *in vitro* como el efecto del sistema inmune, el metabolismo del fármaco y el efecto combinado de todos los órganos. De entre todos los animales disponibles, el ratón de laboratorio (*Mus musculus*) es el más utilizado en investigación de malaria por su accesibilidad, versatilidad, facilidad de cuidado y uso.

Sin embargo, *P. falciparum* no es capaz de desarrollarse en eritrocitos murinos. Por ello, muchos experimentos se realizan con otras especies de plasmodios que sí infectan ratones (como *P. yoelii* o *P. berghei*), con la expectativa de que los resultados sean extrapolables a la especie humana. Ante la necesidad de un modelo más preciso, algunos investigadores desarrollaron y validaron un modelo de ratón humanizado capaz de sostener una infección de *P. falciparum*. Para conseguirlo, se inyecta regularmente concentrados de eritrocitos humanos, que van progresivamente sustituyendo los eritrocitos murinos. Para evitar el rechazo inmunológico, se utilizan ratones NSG, una cepa con inmunodeficiencia severa. Una vez se alcanza un porcentaje de quimerismo de al menos un 50%, *P. falciparum* es capaz de infectar de forma estable al ratón y se puede testar la capacidad antimalárica de los fármacos (Viera, 2017).

Aunque este modelo tiene algunas limitaciones, como no permitir considerar el papel del sistema inmune, proporciona una aproximación más cercana a la infección humana.

2.8. Recrudescencias y su importancia en investigación

Un gran reto en la lucha contra el paludismo, especialmente en el caso de *P. falciparum*, es la aparición de recrudescencias. Estos eventos son definidos como un resurgimiento de la parasitemia asexual después de haber sido eliminada con fármacos, por parte de la misma población que la infección primaria. Esto ocurre por un tratamiento incompleto o inadecuado

(Viera, 2017) y es diferente de la aparición de las recidivas, que ocurren cuando se reactivan los hipnozoítos generados por *P. vivax* y *P. ovale*. Las recrudescencias pueden generar grandes perjuicios para el paciente (que vuelve a presentar el cuadro clínico), la comunidad (ya que el enfermo podrá infectar a nuevos mosquitos) y el sistema sanitario (al tener que tratar de nuevo a la persona afectada).

2.9. Ensayos *in vivo* de recrudescencia y necesidad de mejora

Por estos motivos, dichos eventos deben ser considerados en los ensayos preclínicos. En los modelos animales, según los criterios de la OMS, se considera que un fármaco, a una determinada dosis, no genera recrudescencia si, tras 4 días de tratamiento, no se detecta parásito en, al menos, los 28 días posteriores al tratamiento (Viera, 2017).

Así, los animales deben mantenerse un mínimo de 28 días con extracciones periódicas de sangre para verificar si hay presencia del parásito. Esto requiere de una gran cantidad de tiempo y recursos por cada molécula estudiada. Además, tiene potencial de mejora desde el punto de vista del refinamiento en experimentación animal, ya que implica la necesidad de mantenerle varias semanas más con administraciones de eritrocitos periódicas y extracciones de sangre frecuentes.

3.- Hipótesis y Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es optimizar los ensayos *in vivo* de recrudescencia mediante su detección temprana con una técnica distinta a la actualmente utilizada. Esto permitiría refinar el modelo animal al reducir la frecuencia de muestreo de sangre y posibilitar una intervención más temprana antes del inicio de los síntomas de la malaria. Además, optimizaría los recursos al reducir la duración del mantenimiento de los ratones cuando el tratamiento causa recrudescencia.

La hipótesis es que la PCR cuantitativa permite detectar las recrudescencias de *P. falciparum* significativamente antes que la citometría de flujo.

4.- Materiales y Métodos

4.1. Animales utilizados e instalaciones

Se utilizaron 33 ratones hembra libres de patógenos específicos de la cepa NOD-scid IL2Ry^{null}, de 8 a 12 semanas y criados por Charles Rivers Laboratories (L'Arbresle, Francia).

Fueron alojados en jaulas Tecniplast® tipo IV con hasta cinco animales por jaula, utilizando lecho de mazorca de maíz libre de polvo y esterilizado por autoclave (Panlab, Barcelona, España). La instalación mantuvo un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, con una temperatura ambiente de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 40-70% de humedad relativa y 20 cambios de aire por hora. Se proporcionó agua de grifo filtrada y una dieta estándar a base de pellets γ -irradiada *ad libitum*. Las jaulas se cambiaron una vez a la semana y el agua potable se renovó dos veces por semana.

Los ratones tuvieron acceso a material para anidar, un iglú y una rueda en sus jaulas. Después de cada intervención experimental, los ratones eran colocados en jaulas de juego con hasta 12 ratones durante al menos 20 minutos para socializar. Estas jaulas de juego incluían material para anidar, ruedas y juguetes.

Los animales de laboratorio eran observados diariamente por personal cualificado en busca de cualquier signo clínico de angustia, y un veterinario estaba disponible las 24 horas del día, los 7 días de la semana, para cualquier intervención de emergencia necesaria.

4.2. Humanización

Como se ha comentado, *P. falciparum* no es capaz de infectar naturalmente a los eritrocitos murinos, por lo que los ratones deben ser quimerizados con eritrocitos humanos para sostener la infección. Se utilizó esta cepa para evitar el rechazo inmune, ya que está inmunodeprimida al carecer de linfocitos B y T, y de células NK (Shultz et al., 2005).

Para ello, se administraron concentrados de eritrocitos humanos (HRBC) provenientes de donaciones. Las muestras biológicas humanas se obtuvieron de manera ética y su uso en la investigación estuvo de acuerdo con los términos del consentimiento informado bajo un protocolo aprobado por el IRB/REC. Los HRBC de donantes negativos para malaria fueron proporcionados por Biobancos de Castilla y León y el Centro de Transfusiones de Madrid, España.

Con el fin de eliminar los conservantes de los HRBC, se lavaron con un medio a base de RPMI (Sigma-Aldrich, Ref. R0883), HEPES (Sigma-Aldrich, Ref. H0887) e hipoxantina (Sigma-Aldrich, Ref. H9636). Para favorecer el crecimiento del parásito, se añadió al preparado un 30% de suero humano descomplementado (Sigma-Aldrich, Ref. H4522) y un 30% del medio de lavado utilizado. Para descomplementar el suero, se sometió a un baño a 56°C durante 30 minutos y fue filtrado al vacío con un filtro de $0,2 \mu\text{m}$ (Thermofisher, Ref. 450-0020).

La preparación se administró en un máximo de 6 días tras su elaboración según la programación indicada en la Tabla 2.

Días desde el inicio de quimerización	Volumen (μL)	Vía de administración
1 a 5	750	IV
8 y 9	750	IV
10 a 12	1000	IP
16 a 20	1000	IP
23, 25 y 27	750	IV
30 y 33	750	IV

Tabla 2. Esquema de administración de concentrados de eritrocitos.

La quimerización es más segura por vía intravenosa, pero puede dañar temporalmente las venas caudales del ratón. Por este motivo, la vía de preferencia en los días anteriores y posteriores a la infección, que debe ser intravenosa, es la intraperitoneal. Los sábados y domingos no se quimerizó para permitir descansar al animal.

Una vez se alcanza al menos el 50% de eritrocitos humanos respecto al total de células, el ratón es capaz de sostener una infección por *P. falciparum*. Se siguió administrando durante todo el periodo de seguimiento para asegurarse de que el parásito tuviera siempre eritrocitos para poder desarrollarse.

4.3. Infección y tratamiento

El día 12 después de inicio de quimerización, se infectó por vía intravenosa a todos los ratones con 15 millones de eritrocitos infectados con *P. falciparum* 3D7^{0087/N9}. Esta es una cepa derivada de *P. falciparum* 3D7, la más utilizada para los ensayos *in vitro* de nuevos fármacos, pero adaptada para desarrollarse en ratones humanizados (Angulo-Barturen et al., 2008).

Los ratones fueron distribuidos mediante una doble aleatorización por un software interno en 11 grupos y tratados oralmente con los fármacos indicados en la Tabla 3. Se eligieron 5 fármacos antimaláricos, a dos dosis subterapéuticas distintas que causaron recrudescencias en ensayos anteriores del grupo. Antes de ser tratados, cada ratón fue pesado para calcular el volumen a administrar.

Grupo	Nº de ratones	Fármaco	Dosis (mg/Kg)	Concentración (mg/mL)	Volumen administrado (mL/kg)
1	3	Vehículo (1% metilcelulosa + 0,5% Tween)	-	-	20
2	3	DHA	25	1,25	20
3	3	DHA	40	2	20
4	3	Atovaquona	0,5	0,025	20
5	3	Atovaquona	1	0,05	20
6	3	Mefloquina	8	0,4	20
7	3	Mefloquina	10	0,5	20
8	3	Cloroquina	10	0,5	20
9	3	Cloroquina	20	1	20
10	3	DSM265	50	2,5	20
11	3	DSM265	75	3,75	20

Tabla 3. Grupos experimentales. Por cada grupo se indica el fármaco antimalárico utilizado, la dosis administrada a cada ratón (mg/kg) y su concentración en las preparaciones administradas (mg/mL).

4.4. Cuantificación del quimerismo y de la parasitemia por citometría de flujo (FACS)

Desde el inicio del experimento, todos los lunes, miércoles y viernes se extrajo 2 μ L de sangre a cada ratón por punción en la cola. Las muestras fueron depositadas en placas de 96 pocillos conteniendo 94 μ L de suero salino al 0,9% (Oxoid, Ref. BR0053G), 5 μ L de SYTO-16 (Invitrogen, Ref. S-7578) y 1 μ L de anticuerpo monoclonal anti-TER119 conjugado con el fluoróforo PE (eBioscience, Ref. 12-5921-81). TER119 es un antígeno presente en los eritrocitos murinos, pero no en los humanos.

Tras una incubación de 15 minutos, las muestras fueron fijadas con 10 μ L de glutaraldehído al 0,25% (Sigma, Ref. G-6257). 30 μ L de cada mezcla resultante fueron diluidos en 300 μ L de suero salino al 0,9% y adquirido en un citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson, Ref. E4256).

Se visualizó un *dot plot* del canal *forward scatter* (luz reflejada con 180°, indicativa de tamaño) frente al canal *side scatter* (luz reflejada con 90°, indicativa de complejidad) y se seleccionó la región donde, en base a experimentos previos (Jimenez-Diaz et al., 2009), se conoce que se encuentran los eritrocitos (Figura 4).

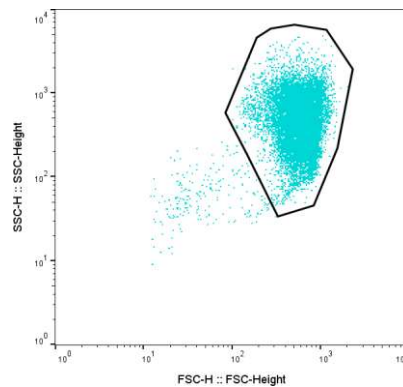


Figura 4. Dot plot entre FSC y SSC. En base a experimentos previos (Jimenez-Diaz et al., 2009), se conoce que los eritrocitos y los leucocitos se encuentran en la región seleccionada. Se excluyen las plaquetas y el debris.

Dentro de esta, se visualizó otro *dot plot* enfrentando el canal de FITC (SYTO-16, que marca ADN) frente al canal PE (anti-TER-119, que marca eritrocitos murinos) (Figura 5). De este modo, los eritrocitos murinos se seleccionaron como la población PE+, los eritrocitos humanos como población PE- y FITC-, y los eritrocitos humanos parasitados como PE- y FITC+.

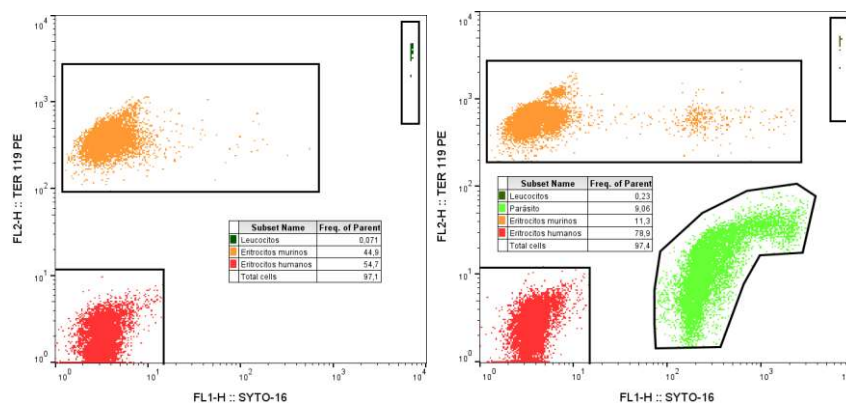


Figura 5. Dot plot entre el canal de SYTO-16 y el de TER-119 de la región seleccionada anteriormente, resaltando las distintas poblaciones por colores. La población FITC+ son eritrocitos murinos, la población PE- y FITC- son eritrocitos humanos, y la población PE- y FITC+ son eritrocitos humanos parasitados. Se muestran los gráficos de un ratón humanizado sin infectar (izquierda) y de un ratón humanizado tras 7 días de infección (derecha).

Ya que la imagen puede variar levemente entre muestras por las características de la tinción, se ajustaron los voltajes en cada una para lograr un *dot plot* con una media geométrica del eje X para eritrocitos humanos en torno a 3,3.

4.5. Extracción de ADN

A partir del día 10 después de la infección, todos los lunes y los viernes, se extrajo 50 μ L de sangre por punción submandibular y se depositaron en 1 mL de PBS (Gibco, Ref. 12559069). Inmediatamente se centrifugó a 5.000 rpm durante 5 minutos a temperatura

ambiente y se desecharon 850 µL del sobrenadante. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su procesamiento.

Para la extracción, se utilizó el kit comercial GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific, Ref. K0782), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, en cada eppendorf se añadió 20 µL de proteinasa K y se vorteo. Después se añadió 400 µL de tampón de lisis y se volvió a vortear. Las muestras fueron incubadas a 56°C durante 10 minutos con agitación. Después, se añadió 200 µL de etanol absoluto y se mezcló con la pipeta.

Cada muestra fue depositada en una columna de extracción y centrifugada a 6000 g por 1 minuto. Se descartó el tubo de recolección y se añadió 500 µL del primer buffer de lavado. Tras otra centrifugación a 8.000 g durante 1 minuto, se volvió a descartar el tubo de recolección y se añadió 500 µL del segundo buffer de lavado. Las columnas fueron centrifugadas a 20.000 g durante 3 minutos y fueron transferidas a eppendorfs de 1,5 mL.

Para diluir el ADN unido a las columnas, se añadió 100 µL de buffer de elución a cada columna y se centrifugó a 8000 g durante 1 minuto. Tras volver a añadir otros 50 µL de buffer de elución y repetir la misma elución, se desechó la columna y se verificó que contuvieran ADN mediante un espectrofotómetro de ácidos nucleicos (Thermo Scientific, Ref. NanoDrop 1000). Las muestras fueron conservadas a -20°C hasta su procesamiento.

4.6. PCR cuantitativa (qPCR)

Para cuantificar la parasitemia de cada ratón se detectó un fragmento del gen 18S de *P. falciparum*. Para ello, se preparó una mezcla con los productos indicados en la Tabla 4.

Producto	Volumen (µL/muestra)
TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, Ref. 4444557)	10
Sonda TaqMan (10 µM)	0,5
Primer Forward (10 µM)	0,3
Primer Reverse (10 µM)	0,3
Agua con DEPC (Invitrogen, Ref. 46-2224)	6,9

Tabla 4. Relación de los productos y las cantidades utilizados para elaborar la mezcla de qPCR.

Las sondas y primers utilizados se indican en la Tabla 5.

Forward	5' - TAATTGGAATGATAGGAATTTACAAGGT - 3'
Reverse	5' - TCAACTACGAACGTTTTAACTGCAA - 3'
Sonda TaqMan	5' - FAM - TGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCA - TAMRA - 3'

Tabla 5. Secuencias de los primers y la sonda TaqMan utilizados. Propuestos en Lamikanra et al. (2012).

Se utilizó una placa de 96 pocillos de 0,1 mL para qPCR (Applied Biosystems, Ref. 434690 6), a la que se añadió 18 μ L de la mezcla preparada anteriormente y 2 μ L de cada muestra de ADN. Se tapó con un film (Applied Biosystems, Ref. 4311971) y se amplificó con un termociclador para qPCR (Applied Biosystems, Ref. QuantStudio 7). La programación fue la siguiente: una desnaturalización inicial de 20 segundos a 95°C y 40 ciclos consistentes en 3 segundos a 95°C y 30s a 60°C.

Se estableció un umbral de fluorescencia en un incremento de 0,13 unidades relativas de fluorescencia normalizada. Llamamos Ct (umbral de ciclo) al número de ciclo en el que la muestra llega al umbral.

En cada qPCR, se incluyó cada muestra a cuantificar por triplicado y estándares con una parasitemia conocida de 100.000, 10.000, 1.000, 100, 10, 5 y 1 parásitos/ μ L. Como controles negativos, también se añadió un pocillo sin ADN (solo agua con DEPC) y otro con ADN de ratón sin infectar. Con los estándares se realizó una recta patrón en la que se interpoló la media del Ct de las réplicas de cada muestra. En aquellas muestras cuyas réplicas tuvieron una desviación estándar mayor de 0,3, se descartó la más lejana a las otras dos.

4.7. Softwares utilizados

Para la citometría de flujo se utilizó BD CellQuest Pro 5.2.1, mientras que para la qPCR QuantStudio Real-Time PCR Software 1.7.2. Los resultados fueron graficados con GraphPad Prism 6.07, RStudio 4.3 y FlowJo 10.10.

5.- Resultados

5.1. Quimerización de los ratones

Los resultados de la citometría de flujo mostraron que todos los ratones alcanzaron el umbral del quimerismo del 50% necesario para una infección idónea de *P. falciparum* (Figura 6). Esto se mantuvo a lo largo de todo el periodo de seguimiento, por lo que los cambios en la parasitemia no se debieron a la cantidad de eritrocitos humanos disponibles.

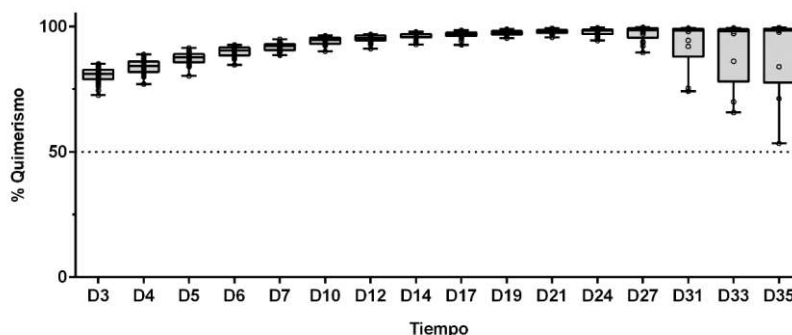


Figura 6. Porcentaje de quimerismo medido por FACS a lo largo del experimento. El eje X indica los días desde la infección. El eje Y indica el porcentaje de eritrocitos humanos respecto al total de células. Los círculos representan los valores individuales de cada ratón. La línea de puntos representa el límite del 50% al partir del cual *P. falciparum* puede desarrollarse correctamente.

5.2. Detección de la parasitemia por FACS

El día 3 post infección (primer muestreo tras la infección) todos los animales mostraron una parasitemia de entre 0,56 y 0,91%, por lo que la infección fue exitosa. La técnica tiene un límite de detección de 0,01% (Jimenez-Diaz et al., 2009).

Como era esperable, el grupo 1 (que solo recibió vehículo) muestra un aumento sostenido en la parasitemia, por lo que se tuvo que retirar todo el grupo el día 7 post infección.

El resto de los grupos mostraron una reducción de la parasitemia con el tratamiento antimalárico hasta descender por debajo del umbral de detección, mostrando velocidades distintas según el producto y su dosis. Algunos ratones del grupo 10 y 11 (tratados con DSM265) no llegaron a mostrar eliminación completa en ningún momento, por lo que tuvieron que ser retirados.

Después, entre el día 12 y 31 post infección, se detectan progresivamente 17 casos de recrudescencias, evidenciadas por la vuelta a la detección de eritrocitos parasitados.

5.3. Detección de la parasitemia por PCR cuantitativa

A partir del día 10 post infección, se comienza a analizar la parasitemia por qPCR además de FACS. Se consiguió un límite de detección de 15 parásitos por mL. La media del porcentaje de desviación típica entre réplicas fue de 6,12%.

A diferencia de la citometría, mediante qPCR se detecta en todo momento parásito (Figura 7), exceptuando 5 ratones el último día. Sin embargo, esto no ha estado siempre asociado a futuras recrudescencias, habiendo ratones en los que esto no ocurre en los 35 días de seguimiento.

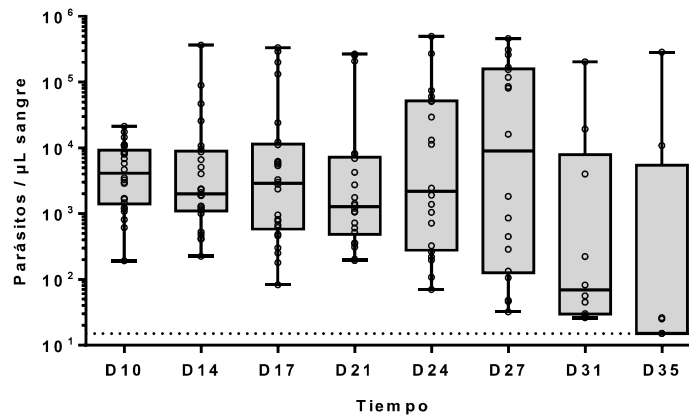


Figura 7. Evolución de las parasitemias detectadas por qPCR. La línea de puntos indica el límite de detección (15 parásitos por μL) y los círculos representan los valores individuales de cada ratón. La parte superior e inferior de cada caja indican el cuartil 75 y 25 respectivamente, mientras que los bigotes representan los valores máximos y mínimos. Se puede observar cómo en ningún animal se deja de detectar parásito, excepto en 5 ratones el último día.

En aquellos animales en los que se detecta recrudescencia por FACS, también se encuentra incrementos en el ADN detectado por qPCR (Figura 8).

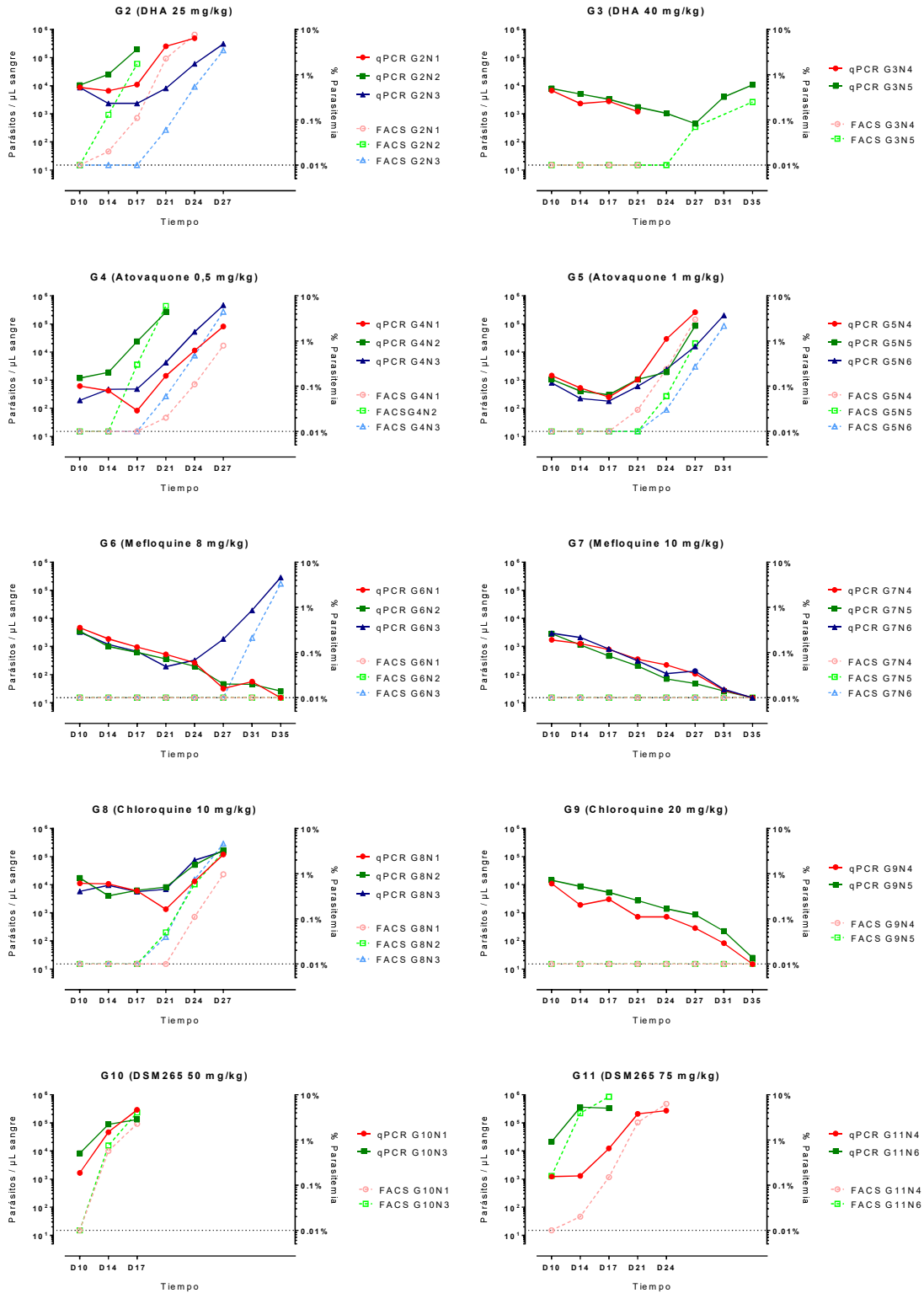


Figura 8. Evolución de los parásitos detectados en sangre por grupo y ratón mediante qPCR (eje izquierdo) y FACS (eje derecho). El tiempo se indica en días después de la infección. La línea de puntos indica el límite de detección para ambas técnicas.

5.4. Prontitud en la detección de la recrudescencia

El criterio para definir una recrudescencia por FACS es claro, detección del parásito tras un periodo sin hacerlo. Sin embargo, esto no es posible con la qPCR debido a la detección continua del ADN del plasmodio. Esto obliga a utilizar un criterio alternativo.

Una posible propuesta es un incremento de la parasitemia detectada respecto al tiempo anterior. Este evento se da en la mayoría de los ratones en los que se detecta una recrudescencia con la citometría de flujo. Sin embargo, hay 4 casos en los que ocurren incrementos que no están asociados a tal suceso (Figura 9).

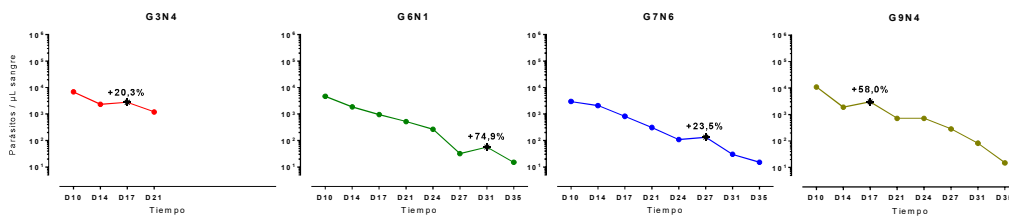


Figura 9. Evolución de resultados por qPCR de los 4 animales que sufrieron aumentos en el ADN detectado que no estaban asociados a recrudescencias. Dichos eventos están destacados con un asterisco negro y el número arriba indica el porcentaje de aumento respecto al tiempo anterior. El tiempo se indica en días desde la infección.

Para salvaguardar estos casos, el criterio utilizado ha sido un incremento de más del 100% respecto al tiempo anterior o dos incrementos consecutivos. Esto ha ocurrido en todos los ratones que han sufrido recrudescencia. Aplicando el criterio, se puede comparar si se detecta antes la recrudescencia con una técnica o con otra (Figura 10).

Como se puede ver, en la mayoría de los ratones con recrudescencia ambas técnicas han detectado la recrudescencia al mismo tiempo. El resto de los casos se distribuyen equitativamente entre detección más temprana (1 o 2 tiempos) por qPCR o por FACS (Figura 10).

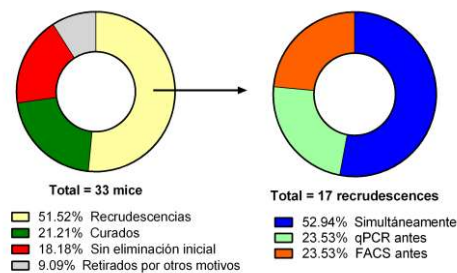


Figura 10. Ratones clasificados por aparición o no de recrudescencias. Entre los ratones con recrudescencia se indica que técnica la detectó antes según los criterios comentados, o si se detectó al mismo tiempo.

5.5. Correspondencia entre ambas técnicas

Para confirmar la intercambiabilidad de las dos técnicas, se realizó una regresión lineal (Figura 11). Dada que la qPCR detectó parásito incluso cuando FACS no, se eliminaron aquellos valores menores al límite de detección por FACS.

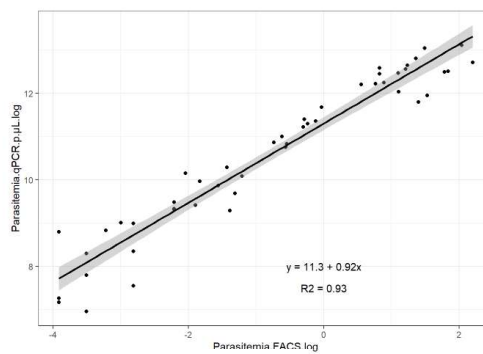


Figura 11. Regresión lineal entre los resultados de qPCR y FACS para muestras con valores de parasitemia por FACS mayores a 0.01%. El eje X representa el logaritmo de la parasitemia por FACS en porcentaje. El eje Y representa el logaritmo de la parasitemia por qPCR en parásitos por mL de sangre. Valor $p < 0,001$; $R^2=0,93$

La regresión tiene una R^2 alta, con una pendiente muy significativa, por lo que se puede afirmar que, para aquellos valores de parasitemia superiores a 0 por FACS, ambas técnicas detectan el desarrollo del parásito de forma lineal.

6.- Discusión

6.1. Dosis de los fármacos

Con las dosis utilizadas se ha conseguido una recrudescencia en más de la mitad de los ratones del experimento, lo que podríamos considerar exitoso. Por tanto, estas dosis pueden ser utilizadas como referencia para futuros experimentos de la materia.

6.2. Detección prolongada del ADN del parásito por qPCR

Con los resultados de la qPCR se puede afirmar que hay una gran prevalencia del ADN del parásito en sangre. Ya que esto no se ha traducido siempre en una recrudescencia, parece deberse a los parásitos muertos. Como *Plasmodium* es un parásito intracelular, la membrana del eritrocito podría estar protegiendo el ADN del parásito muerto de ser degradado, explicándose así la lenta velocidad de degradación.

Estos resultados coinciden con los publicados en Haanshuus and Morch (2020). En este trabajo se encontró que, en pacientes, el ADN del parásito se detectaba hasta 49 días después del tratamiento (en este caso se analizó un fragmento del gen del citocromo b).

6.3. Criterio de recrudescencia en qPCR

Algo destacable de los resultados de la qPCR son los incrementos puntuales en el ADN del parásito detectados en 4 ratones que no estuvieron asociados a una posterior recrudescencia. Un aumento del ADN parasitario solo podría explicarse por la proliferación de *P. falciparum*, algo que no parece ocurrir dada la evolución posterior.

Una posible explicación podría ser la precisión de la técnica. Sin embargo, dado que el porcentaje de desviación típica entre réplicas fue del 6,12%, esto no podría explicar algunos incrementos de hasta el 74,9%.

Otra propuesta sería que se trataran de atisbos de recrudescencia que el ratón pudo controlar rápidamente. Sin embargo, los incrementos son tan grandes que el parásito vivo debería haberse detectado en la citometría.

Finalmente, la explicación más plausible por ahora serían fallos al extraer el ADN o al realizar la qPCR. No obstante, esto tampoco parece probable porque las muestras que han presentado estos incrementos son de grupos experimentales distintos y se han procesado en días diferentes. Por tanto, es necesario investigar más profundamente estos incrementos para entender sus causas.

En base a los resultados del experimento, se utilizó un criterio de recrudescencia más restrictivo (aumento de más del 100% o dos aumentos consecutivos), disminuyendo la rapidez de detección de la técnica. Para poder utilizarse la qPCR sin FACS, sería necesario investigar más para confirmar o corregir el criterio. Este debe determinar recrudescencia lo antes posible en aquellos ratones que la sufran, mientras que no lo haga en ninguno de estos incrementos puntuales.

6.4. Elección de la técnica

Con los resultados anteriores se ha demostrado que ambas técnicas detectan las recrudescencias aproximadamente al mismo tiempo, sin ofrecer ninguna ventaja sobre la otra. También se ha comprobado con la regresión lineal que ambas técnicas tienen una evolución lineal con la parasitemia. Por tanto, la elección de la técnica deberá realizarse en función de otros factores:

6.4.1. Volumen de muestra

La citometría de flujo necesita poco volumen de muestra (solo 2 uL de sangre), y se puede extraer con una punción en la cola sin necesidad de calentamiento previo (evitando el tiempo y estrés que esto supondría).

La qPCR en cambio requiere una cantidad mucho mayor (50 μ L de sangre). Esto limita la frecuencia con la que se puede realizar la técnica y requiere de punción en la cola con calentamiento previo (con el tiempo que esto requiere) o de punción submandibular (que necesita personal muy especializado).

6.4.2. Tiempo requerido

La citometría de flujo es una técnica muy rápida que solo requiere los 10 minutos de incubación con el anticuerpo y otros 15 de incubación con el agente fijador, tiempos que se cumplen a menudo mientras se extrae el resto de las muestras. En cambio, la qPCR requiere tiempos mayores (para la preparación inicial de la muestra, la extracción de ADN y la qPCR en sí misma).

Sin embargo, aunque el tiempo por muestra individual sea mayor en la qPCR, esta técnica permite el análisis simultáneo de las muestras. Además, se puede optimizar mucho, ya se podrían cambiar los tubos con columnas individuales por placas de extracción de 96 pocillos, permitiendo el uso de micropipetas multicanal. En cuanto a FACS, aunque algunos citómetros poseen un dispensador de placas, no hemos obtenido buenos resultados debido a que en ocasiones se requieren pequeños ajustes en los voltajes por diferencias en la tinción.

6.4.3. Coste económico

Uno de los mayores inconvenientes de la citometría radica en el uso de marcadores fluorescentes, que son muy costosos. Por otro lado, la qPCR también tuvo un coste elevado por el uso de una sonda TaqMan. Sin embargo, es probable que se pueda sustituir con un agente intercalante (como el SYBR Green), reduciendo mucho el coste.

6.4.4. Accesibilidad

La qPCR es una técnica muy popular y accesible actualmente, siendo probable que la mayoría de grupos de investigación puedan llevarla a cabo. La citometría de flujo, aunque también extendida, no es tan accesible y necesita conocimientos y personal más especializados.

6.5. Futuros pasos

Como se ha discutido, la principal limitación de la qPCR ha sido la detección prolongada de ADN de células muertas, obligando a utilizar criterios alternativos para determinar recrudescencia. Para perfeccionar la técnica, en futuros experimentos se podría optar por la RT-qPCR. En lugar de ADN, esta técnica utiliza ARN como muestra, sometiéndolo a un

proceso de retrotranscripción para poder ser amplificado por la ADN polimerasa. Dado que el ARN es menos estable que el ADN, es probable que deje de detectarse mucho antes. En humanos, esto ha permitido reducir significativamente el periodo en el que se sigue detectando el parásito (Haanshuus & Morch, 2020).

Otra posible solución sería la qPCR de viabilidad. Existen ciertos reactivos, como la monoazida de propidio (PMA), que permiten detectar solo el ADN de células vivas. Esta molécula se une covalentemente al ADN, impidiendo su amplificación y por tanto detección en la qPCR. Su selectividad se debe a que es impermeable a las membranas intactas (células sanas), pero permeable a las dañadas (células muertas) (Nocker et al., 2006). En el caso de *P. falciparum*, las células parasitarias están contenidas dentro de eritrocitos, lo que podría evitar el acceso del PMA al ADN del parásito muerto. Sin embargo, esto se podría solucionar con algunas técnicas que lisan específicamente las membranas de los eritrocitos pero no la de los plasmodios (Quadt et al., 2020). Su aplicación podría ser muy prometedora, ya que permitiría solucionar el principal problema de la qPCR modificando muy poco el protocolo.

Además, sería muy interesante estudiar más profundamente los incrementos en la qPCR que no han estado asociados a recrudescencias, anteriormente comentados en el apartado 6.3. Ninguna de las teorías propuestas parece explicarlos correctamente. Sería de interés observar si se repite este comportamiento en próximos experimentos, por si se pudiera tratar de una característica propia de la infección por *P. falciparum*. En caso de que estos eventos se mantuvieran, sería necesario confirmar cuál es el criterio más idóneo para determinar las recrudescencias por qPCR.

7. Conclusiones (límite de 250 palabras): *Tipología y tamaño de letra: Arial Narrow-11, Interlineado: 1,5*

- La PCR cuantitativa (qPCR) tiene un límite de detección inferior al de la citometría de flujo (FACS).
- El ADN de *P. falciparum* permanece en ratones durante al menos 31 días después de la infección.
- El criterio para la recrudescencia con FACS es la detección de parásitos después de un periodo negativo. Sin embargo, la persistencia del ADN parasitario impide su misma aplicación en qPCR. Se necesita un criterio alternativo.
- Algunos ratones muestran incrementos puntuales en la parasitemia por qPCR no asociados a recrudescencias. Las causas no están claras por lo que se requiere de mayor investigación.
- Considerando estos casos, un criterio adecuado según nuestros resultados sería un aumento de más del 100% o dos aumentos consecutivos.
- Con este enfoque, ninguna técnica detecta recrudescencias significativamente antes que la otra. La elección de la técnica debe depender de otros motivos. La citometría es más rápida y requiere menos muestra, mientras que la qPCR es más accesible y fácilmente automatizable.

7. Conclusions (maximum 250 words): *Tipología y tamaño de letra: Arial Narrow-11, Interlineado: 1,5*

- Quantitative PCR (qPCR) has a lower detection limit compared to flow cytometry (FACS).
- *P. falciparum* DNA remains in mice for at least 31 days after infection.
- The criterion for recrudescence with FACS is the detection of parasites after a negative period. However, the persistence of parasitic DNA prevents the same application in qPCR. An alternative criterion is needed.
- Some mice show sporadic increases in parasitemia by qPCR not associated with recrudescences. The causes are unclear, requiring further investigation.
- Considering these cases, an appropriate criterion according to our results could be an increase of more than 100% or two consecutive increases.
- With this approach, neither technique detects recrudescences significantly earlier than the other. The choice of technique should depend on other reasons. Cytometry is faster and requires less sample, while qPCR is more accessible and easily automatable.

8.- Bibliografía

1. Angulo-Barturen, I., Jimenez-Diaz, M. B., Mulet, T., Rullas, J., Herreros, E., Ferrer, S., Jimenez, E., Mendoza, A., Regadera, J., Rosenthal, P. J., Bathurst, I., Pompliano, D. L., Gomez de las Heras, F., & Gargallo-Viola, D. (2008). A murine model of falciparum-malaria by in vivo selection of competent strains in non-myelodepleted mice engrafted with human erythrocytes. *PLoS One*, 3(5), e2252. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002252>
2. Beeson, J. G., & Brown, G. V. (2002). Pathogenesis of Plasmodium falciparum malaria: the roles of parasite adhesion and antigenic variation. *Cell Mol Life Sci*, 59(2), 258-271. <https://doi.org/10.1007/s00018-002-8421-y>
3. Belete, T. M. (2020). Recent Progress in the Development of New Antimalarial Drugs with Novel Targets. *Drug Des Devel Ther*, 14, 3875-3889. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S265602>
4. Boschi, D., Pippione, C. A., Sainas, S., & Lolli, L. M. (2019). Dihydroorotate dehydrogenase inhibitors in anti-infective drug research. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 183, 111681. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111681>
5. Campo, J. J., Aponte, J. J., Nhabomba, A. J., Sacarlal, J., Angulo-Barturen, I., Jimenez-Diaz, M. B., Alonso, P. L., & Dobano, C. (2011). Feasibility of flow cytometry for measurements of Plasmodium falciparum parasite burden in studies in areas of malaria endemicity by use of bidimensional assessment of YOYO-1 and autofluorescence. *J Clin Microbiol*, 49(3), 968-974. <https://doi.org/10.1128/JCM.01961-10>
6. CDC. (2024). *Malaria Diagnostic Tests*. <https://www.cdc.gov/malaria/hcp/diagnosis-testing/malaria-diagnostic-tests.html>
7. Chen, Q., Schlichtherle, M., & Wahlgren, M. (2000). Molecular aspects of severe malaria. *Clin Microbiol Rev*, 13(3), 439-450. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.3.439>
8. Eastman, R. T., & Fidock, D. A. (2009). Artemisinin-based combination therapies: a vital tool in efforts to eliminate malaria. *Nat Rev Microbiol*, 7(12), 864-874. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2239>
9. Fikadu, M., & Ashenafi, E. (2023). Malaria: An Overview. *Infect Drug Resist*, 16, 3339-3347. <https://doi.org/10.2147/IDR.S405668>
10. Gaillard, T., Madamet, M., & Pradines, B. (2015). Tetracyclines in malaria. *Malar J*, 14, 445. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0980-0>
11. Gregson, A., & Plowe, C. V. (2005). Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates. *Pharmacol Rev*, 57(1), 117-145. <https://doi.org/10.1124/pr.57.1.4>
12. Haanshuus, C. G., & Morch, K. (2020). Detection of remaining Plasmodium DNA and gametocytes during follow up after curative malaria treatment among returned travellers in Norway. *Malar J*, 19(1), 296. <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03367-6>
13. Jimenez-Diaz, M. B., Mulet, T., Gomez, V., Viera, S., Alvarez, A., Garuti, H., Vazquez, Y., Fernandez, A., Ibanez, J., Jimenez, M., Gargallo-Viola, D., & Angulo-Barturen, I. (2009). Quantitative measurement of Plasmodium-infected erythrocytes in murine models of malaria by flow cytometry using bidimensional assessment of SYTO-16 fluorescence. *Cytometry A*, 75(3), 225-235. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20647>
14. Lamikanra, A. A., Dobano, C., Jimenez, A., Nhabomba, A., Tsang, H. P., Guinovart, C., Manaca, M. N., Quinto, L., Aguilar, R., Cistero, P., Alonso, P. L., Roberts, D. J., & Mayor, A. (2012). A direct comparison of real time PCR on plasma and blood to detect Plasmodium falciparum infection in children. *Malar J*, 11, 201. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-201>
15. Llanos-Cuentas, A., Casapia, M., Chuquiyauri, R., Hinojosa, J.-C., Kerr, N., Rosario, M., Toovey, S., Arch, H. R., Phillips, A. M., Rozenberg, D. F., Bath, J., Ng, L. C., Cowell, N. A., Winzeler, A. E., Fidock, A. D., Baker, M., Möhrle, J. J., Huijsduijnen, V. H. R., Gobeau, N.,...Duparc, S. (2018). Antimalarial activity of single-dose DSM265, a novel plasmodium dihydroorotate dehydrogenase inhibitor, in patients with uncomplicated

Plasmodium falciparum or *Plasmodium vivax* malaria infection: a proof-of-concept, open-label, phase 2a study. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(8), 874-883. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(18\)30309-8](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(18)30309-8)

16. Nixon, G. L., Moss, D. M., Shone, A. E., Laloo, D. G., Fisher, N., O'Neill, P. M., Ward, S. A., & Biagini, G. A. (2013). Antimalarial pharmacology and therapeutics of atovaquone. *J Antimicrob Chemother*, 68(5), 977-985. <https://doi.org/10.1093/jac/dks504>

17. Nocker, A., Cheung, C. Y., & Camper, A. K. (2006). Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J Microbiol Methods*, 67(2), 310-320. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.04.015>

18. Quadt, K. A., Smyrnakou, X., Frischknecht, F., Bose, G., & Ganter, M. (2020). *Plasmodium falciparum* parasites exit the infected erythrocyte after haemolysis with saponin and streptolysin O. *Parasitol Res*, 119(12), 4297-4302. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06932-9>

19. Schlagenhauf, P., Tschopp, A., Johnson, R., Nothdurft, H. D., Beck, B., Schwartz, E., Herold, M., Krebs, B., Veit, O., Allwinn, R., & Steffen, R. (2003). Tolerability of malaria chemoprophylaxis in non-immune travellers to sub-Saharan Africa: multicentre, randomised, double blind, four arm study. *BMJ*, 327(7423), 1078. <https://doi.org/10.1136/bmj.327.7423.1078>

20. Shultz, L. D., Lyons, B. L., Burzenski, L. M., Gott, B., Chen, X., Chaleff, S., Kotb, M., Gillies, S. D., King, M., Mangada, J., Greiner, D. L., & Handgretinger, R. (2005). Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol*, 174(10), 6477-6489. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.10.6477>

21. Singh, B., & Daneshvar, C. (2013). Human infections and detection of *Plasmodium knowlesi*. *Clin Microbiol Rev*, 26(2), 165-184. <https://doi.org/10.1128/CMR.00079-12>

22. Sinha, S., Medhi, B., & Sehgal, R. (2014). Challenges of drug-resistant malaria. *Parasite*, 21, 61. <https://doi.org/10.1051/parasite/2014059>

23. Srivastava, I. K., & Vaidya, A. B. (1999). A mechanism for the synergistic antimalarial action of atovaquone and proguanil. *Antimicrob Agents Chemother*, 43(6), 1334-1339. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.6.1334>

24. Tse, E. G., Korsik, M., & Todd, M. H. (2019). The past, present and future of anti-malarial medicines. *Malar J*, 18(1), 93. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2724-z>

25. Venugopal, K., Hentzschel, F., Valkiunas, G., & Marti, M. (2020). *Plasmodium* asexual growth and sexual development in the haematopoietic niche of the host. *Nat Rev Microbiol*, 18(3), 177-189. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0306-2>

26. Viera, S. (2017). *P. falciparum* humanized mouse model: characterization and further studies for antimalarial drug development Universidad Autónoma de Madrid. Madrid.

27. White, N. J. (1998). Not much progress in treatment of cerebral malaria. *Lancet*, 352(9128), 594-595. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(05\)79572-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(05)79572-6)

28. White, N. J. (2022). Severe malaria. *Malar J*, 21(1), 284. <https://doi.org/10.1186/s12936-022-04301-8>

29. WHO. (2021). WHO Malaria Terminology, 2021 Update. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240038400>

30. WHO. (2024). World Malaria Report 2024. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240104440>

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todos mis compañeros, y ahora amigos, de GSK. Gracias por haberme acogido desde el primer día con los brazos abiertos y asegurarnos de que estuviera lo más cómodo posible. Venía con las expectativas muy altas, pero habéis conseguido superarlas. En especial, quiero dar las gracias a Sara, mi tutora, por su implicación y dedicación constantes. Siempre te has asegurado de que pudiera aprender al máximo y de que este TFM alcanzara la mejor calidad posible. Echaré de menos nuestros *catch up*, en los que siempre conseguías hacer que todo fuera más manejable.

También me gustaría agradecer a todos los profesores de este máster en Biología Sanitaria. Gracias por compartir no solo vuestros amplios conocimientos, sino vuestra pasión por la ciencia y el aprendizaje. Terminó este máster con una formación muy completa, que, sin duda, me será de gran utilidad en el futuro. Este año y medio ha sido una experiencia de aprendizaje continuo que ha reafirmado una vez más mi interés científico y, especialmente, por la Biología Sanitaria.

Por último, pero no por ello menos importante, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi familia, especialmente a mis padres, que son un pilar fundamental en mi vida y a lo largo de este camino. Gracias por vuestro apoyo incondicional y por estar siempre ahí, animándome para seguir adelante. Sin vosotros este logro habría sido imposible.