

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

Inmunómica, genética y proteómica de la malaria humana:
descubrimiento de biomarcadores de diagnóstico y tolerancia en zonas
endémicas de África

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Paloma Abad González

DIRECTORES

José Manuel Bautista Santa Cruz
Isabel González Azcárate

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

INMUNÓMICA, GENÉTICA Y PROTEÓMICA DE LA MALARIA HUMANA:
DESCUBRIMIENTO DE BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO Y TOLERANCIA
EN ZONAS ENDÉMICAS DE ÁFRICA

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Paloma Abad González

DIRECTORES

José Manuel Bautista Santa Cruz

Isabel González Azcárate



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de doctorado Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina

TESIS DOCTORAL

INMUNÓMICA, GENÉTICA Y PROTEÓMICA DE LA MALARIA HUMANA:

DESCUBRIMIENTO DE BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO Y

TOLERANCIA EN ZONAS ENDÉMICAS DE ÁFRICA

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

PALOMA ABAD GONZÁLEZ

BAJO LA DIRECCIÓN DE

JOSÉ MANUEL BAUTISTA SANTA CRUZ

ISABEL GONZÁLEZ AZCÁRATE

Madrid, 2022

*A todos los que disfrutaban del
placer de descubrir*

AGRADECIMIENTOS

Empecé mi tesis emocionada poniendo en mi puesto un cartel que decía “No molestar, erradicación de la malaria en proceso”. Esas ganas y pasión con las que empecé este camino me han acompañado en todo el recorrido y aún siguen intactas mientras escribo estas líneas. La principal razón por la que ha sido así ha sido toda la gente que me ha acompañado en este largo viaje. Personas que me han apoyado en todo momento y que han conseguido que tuviera el mejor ambiente de trabajo posible. Por ello, quizás estas sean las palabras más sencillas de mi tesis. Siempre me he sentido extraordinariamente afortunada por lo querida que me siento en todos los ámbitos de mi vida. Pero en esta etapa, especialmente dura y cansada, he recibido tanto apoyo que estaba deseando escribir esta sección, mis gracias plasmadas en esta tesis, por fin finalizada.

No podía empezar por otros que no fuerais vosotros, Chema e Isa. Sois verdaderos coautores de este trabajo y no puedo estar más agradecida por todo lo que me habéis ayudado y animado en todo el proceso. Chema, gracias por responder a todas mis preguntas y por tu dedicación. Siempre me has transmitido tu optimismo y vitalidad y eres uno de los principales responsables de que me apasione la ciencia. Todos los que hemos pasado por este laboratorio creo que llevamos un poquito de tu legado, de tu forma de trabajar y de ver la vida. Isa, gracias por ser, además de mi directora, mi fan número uno y principal apoyo. Eres luz, de verdad que sí. Pasaste de ser familia a directora y sobre todo amiga. Esta tesis nos dio la oportunidad de conocernos y no puedo estar más feliz por ello. A la Isa directora, sin ti esto no habría sido posible, gracias por dedicar tantísimas horas a este trabajo. A la Isa amiga, que nunca dejemos de compartir risas y lágrimas. Gracias por ser mi desahogo.

Amalia, gracias por enseñarnos todo lo que sabes y cuidarnos como lo haces. Esté donde esté, siempre te recordaré con cariño. Antonio, gracias por ser la voz de la serenidad y la razón, transmites sabiduría. Susi, eres el corazón de este laboratorio. Nunca te podremos agradecer todo lo que nos has ayudado, sin ti todos estaríamos mucho más perdidos con nuestros experimentos. Eres una persona maravillosa. Armando, he aprendido muchísimo desde que estás con nosotros. Abriste un nuevo camino en nuestras investigaciones y en nuestra forma analizar nuestros resultados. Gracias, especialmente, por estar siempre disponible para ayudarme siempre que lo he necesitado.

No podría dejar de mencionar al resto de compañeras, que han acabado siendo verdaderas amigas, con las que he compartido tantas y tantas horas de trabajo, pero también de risas y confidencias. Sandra, gracias por acompañarme y hacerme reír durante tantos años. Eres el

mejor desestresante posible. Recorrimos juntas gran parte de este camino y mi día a día en el laboratorio fue mejor gracias a que tú estabas ahí. Gracias por cuidar tanto de mí y de toda la gente que te rodea. Montse, qué bonito fue encontrarte. Gracias por confiar en mí desde el principio y ser como eres. Espero que podamos compartir nuestro amor por los perros y las plantas durante muchos más años. Afri, gracias por transmitir esa paz, generas un ambiente genial en el labo. Ana, gracias por esa alegría que siempre impera en ti, transmites vitalidad ante la vida y eso se contagia. Lauras, gracias por esos cafés y cervezas que han venido tras vuestro paso por el laboratorio, sois amor.

Los inicios de esta tesis me llevaron a Ghana, un país de gente maravillosa. Uno de los agradecimientos más especiales es para todo el equipo del laboratorio de *Our Lady of Grace Hospital* de Ghana. Nunca podré devolveros la ayuda que me brindasteis al llegar a Ghana, un lugar completamente nuevo para mí. Gracias por enseñarme vuestra cultura, vuestro idioma, hacer de traductores de Fanti con los pacientes y mostrarme vuestra forma de vivir. ¡Medaase! Marcos, gracias por acompañarme en ese viaje tan especial, fue una experiencia fantástica.

A toda la Unidad de proteómica, en especial a Lola, María Luisa y Felipe, que siempre me han guiado en uno de los campos más complejos y en los que menos conocimientos tenía al iniciar este proyecto. Este agradecimiento también va para todos los alumnos que he tenido el honor de tutorizar durante sus TFG. Gracias por enseñarme a enseñar y ser siempre tan agradecidos, habéis hecho que mi experiencia docente sea maravillosa.

A Alberto, mi compañero de vida, mi amigo y mi amor. Gracias por ser mi apoyo y abrazo constante y, sobre todo, por hacer que esta etapa sea infinitamente más feliz y tranquila. Como siempre te digo: “¡esto hay que celebrarlo!” y no se me ocurre ninguna persona mejor con la que hacerlo. Gracias por entender tan bien y acompañarme en mi encierro de los últimos meses, todo es más fácil cuando estás a mi lado. A mi Brumita, ha sido precioso verte crecer los primeros meses, gracias por ser mi fuente de paseos y relax en esta última etapa, estoy muy feliz de que formes parte de esta pequeña familia.

A mis padres, GRACIAS. Estoy tan orgullosa de vosotros... No sé si sois del todo conscientes de la familia tan estupenda que habéis creado. Nos lo habéis dado todo, espero poder devolveros todo el cariño y apoyo que me habéis transmitido siempre. A Car, mi hermana y mejor amiga. Gracias por ser mi fiel acompañante en todos los ámbitos de la vida y mi editora de tesis particular. Y a Abraham, a ti también, no podríamos haber incorporado a la familia nadie mejor persona que tú. A Ignacio, Carmen, María, Jaime, Tati, Isabel y los niños. Gracias por estar,

por mantener ese vínculo que tenemos y hacerme saber que puedo contar con vosotros siempre que lo necesite.

A mis chicas, Mer, Clara, Clemen, Bravo, Sofi, Méndez, Silvi, Moral, Uzq, Marta y Marina, gracias por ser mi distracción y fuente de risa siempre que lo he necesitado. No sé cómo lo hacéis, pero conseguís que se me olvide todo cuando os tengo enfrente. Lleváis años diciéndome que sacaréis una pancarta el día que lea esta tesis. Gracias por estar orgullosas de mí, somos un equipo genial.

A la ciencia, podrías ser un poco menos dura y frustrante, pero te he disfrutado tanto que no me quejaré. Eres un camino tan apasionante que siempre merecerás la pena. Gracias por hacerme descubrir y encontrar. Por ti llevo tatuada la palabra curiosidad en la piel.

Financiación: Esta tesis ha sido financiada por el Ministerio de Economía y Competitividad (BIO2016-77430-R) y por el Programa de Financiación de la Universidad Complutense de Madrid – Banco Santander mediante los Contratos predoctorales de personal investigador en formación, convocatoria 2018.

ÍNDICE

1. RESUMEN / SUMMARY	1
2. INTRODUCCIÓN	9
2.1. LA MALARIA HUMANA Y SU IMPACTO SANITARIO	11
2.1.1. Distribución geográfica de malaria falciparum.....	13
2.1.2. Biología de la malaria: el ciclo de vida de <i>P. falciparum</i>	15
2.1.3. Manifestaciones clínicas y patogenia de la malaria humana	17
2.1.4. La malaria subclínica como reservorio del parásito	20
2.1.5. Diagnóstico de malaria	21
2.2. POLIMORFISMOS GENÉTICOS Y TOLERANCIA A LA MALARIA.....	22
2.3. RESPUESTA INMUNITARIA A LA MALARIA EN HUMANOS	26
2.3.1. El linfocito B como parte esencial de la respuesta inmunitaria.....	29
2.3.2. Respuesta humoral frente a la malaria: producción de anticuerpos específicos de <i>P. falciparum</i>	33
2.3.3. Proteínas antigénicas de <i>P. falciparum</i>	37
3. OBJETIVOS	43
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
4.1. MUESTRAS CLÍNICAS	49
4.1.1. Ghana	50
4.1.2. RDC.....	51
4.1.3. Malaria importada	51
4.2. DETERMINACIÓN DEL ESTADO INFECCIOSO E INMUNITARIO DE INDIVIDUOS PROCEDENTES DE REGIONES ENDÉMICAS DE ÁFRICA	51
4.2.1. Diagnóstico de malaria y estimación de la parasitemia.....	52
4.2.1.1. Detección de <i>P. falciparum</i> mediante PCR cuantitativa	52
4.2.1.2. Detección de <i>P. falciparum</i> mediante TDR y microscopía y recuentos sanguíneos en hospital local	54
4.2.2. Cuantificación de inmunoglobulinas	54
4.2.2.1. Elución de anticuerpos a partir de DSS	56
4.2.2.2. Estrategia de ELISA	56
4.2.3. Análisis estadísticos.....	57
4.3. ANÁLISIS GENÉTICOS.....	58
4.3.1. Hemoglobina S y C.....	58
4.3.2. G6PD A-	60
4.3.3. PIEZO E756del	61

4.3.4.	<i>PKLR</i>	62
4.4.	IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS DE <i>P. FALCIPARUM</i> RECONOCIDOS POR IgM Y DE SUS EPÍTOPOS INMUNODOMINANTES.....	65
4.4.1.	<i>Inmunoprecipitación de antígenos IgM</i>	65
4.4.1.1.	Elución de anticuerpos a partir de DSS	65
4.4.1.2.	Inmunocaptura y elución de antígenos de <i>P. falciparum</i> reconocidos por IgM	66
4.4.1.3.	Controles negativos.....	68
4.4.2.	<i>Optimización del método de inmunoprecipitación</i>	69
4.4.2.1.	Detección de IgM mediante electroforesis unidimensional e inmunotransferencia	69
4.4.2.2.	Cuantificación de IgM mediante ELISA.....	70
4.4.3.	<i>Identificación de antígenos</i>	71
4.4.3.1.	Análisis de antígenos IgM mediante espectrometría de masas	71
4.4.3.2.	Desarrollo de un flujo de trabajo computacional para la identificación de antígenos.....	72
4.4.4.	<i>Microarray de péptidos para la identificación de epítomos inmunodominantes</i>	74
4.4.4.1.	Sustracción de regiones de baja complejidad y de hélices transmembrana	74
4.4.4.2.	Microarray de péptidos.....	76
4.4.5.	<i>Análisis estadísticos</i>	76
5.	RESULTADOS	79
5.1.	ESTADO DE INFECCIÓN E INMUNITARIO EN POBLACIONES HIPERENDÉMICAS DE MALARIA....	81
5.2.	TOLERANCIA GENÉTICA A LA MALARIA EN REGIONES HIPERENDÉMICAS	95
5.2.1.	<i>Frecuencias alélicas y genotípicas de variantes polimórficas que confieren tolerancia a la malaria en Ghana y RDC</i>	95
5.2.2.	<i>¿Se puede relacionar polimorfismos tolerantes y nivel de parasitemia?</i>	98
5.3.	IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS IgM DE <i>P. FALCIPARUM</i> Y DE SUS EPÍTOPOS INMUNODOMINANTES.....	102
5.3.1.	<i>Nuevo método de identificación y cuantificación de antígenos IgM de P. falciparum a gran escala</i>	103
5.3.2.	<i>Reconocimiento antigénico de la IgM en una región endémica de malaria según la edad, el embarazo y el estado infeccioso de los individuos</i>	106
5.3.3.	<i>Caracterización biológica de los antígenos de P. falciparum reconocidos por IgM</i>	111
5.3.4.	<i>Reconocimiento IgM-antígeno según la presencia de regiones de baja complejidad</i>	113
5.3.5.	<i>Antígenos IgM reconocidos diferencialmente entre grupos de infección</i>	113
5.3.6.	<i>Epítomos inmunodominantes de P. falciparum reconocidos por IgM</i>	118
6.	DISCUSIÓN	131
6.1.	DINÁMICA POBLACIONAL DE LA MALARIA Y LA RESPUESTA HUMORAL FRENTE A <i>P. FALCIPARUM</i>	133
6.1.1.	<i>Estado de infección y respuesta humoral frente a P. falciparum en poblaciones endémicas de malaria</i>	133

6.1.2.	<i>Afectación de los parámetros hematológicos tras la infección por <i>P. falciparum</i> y su asociación con los niveles de inmunoglobulinas</i>	138
6.1.3.	<i>Comparación de métodos de diagnóstico de malaria</i>	139
6.2.	TOLERANCIA GENÉTICA A LA MALARIA	139
6.3.	DESCUBRIMIENTO DE PROTEÍNAS ANTIGÉNICAS RECONOCIDAS POR IgM Y SUS EPÍTOPOS	144
6.3.1.	<i>Nuevo método de inmunoprecipitación para el aislamiento de antígenos reconocidos por IgM</i>	144
6.3.2.	<i>Proteínas antigénicas de <i>P. falciparum</i> reconocidas por IgM</i>	146
6.3.3.	<i>Epítomos de <i>P. falciparum</i> reconocidos por IgM</i>	150
7.	EPÍLOGO	155
8.	CONCLUSIONES	161
9.	BIBLIOGRAFÍA	165
10.	ANEXOS	193
10.1.	ANEXO I	195

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Primeras observaciones del parásito de la malaria en sangre fresca	12
Figura 2	Distribución de la malaria y la malaria falciparum en el mundo	14
Figura 3	Distribución de la pobreza en el mundo	15
Figura 4	Ciclo de vida de <i>P. falciparum</i>	16
Figura 5	Manifestaciones clínicas y síntomas de la malaria	18
Figura 6	Gravedad de la malaria según la edad	20
Figura 7	Distribución de la endemidad de la malaria, la HbS y la α -talasemia en África	23
Figura 8	Diagrama de una inmunoglobulina	29
Figura 9	Localización de los principales antígenos de <i>P. falciparum</i> con capacidad protectora o diagnóstica	38
Figura 10	Antígenos de merozoíto asociados a protección frente a la malaria sintomática	40
Figura 11	Lugar de recogida de los tres sets de muestras utilizados a lo largo de la tesis	49
Figura 12	Disposición de las muestras de sangre y plasma en tarjetas FTA	50
Figura 13	Comparación de recta patrón de distintas parasitemias de <i>P. falciparum</i> obtenida con sangre fresca o tras su desecación	53
Figura 14	Modelo de ELISA para cuantificación de Ig específica de <i>P. falciparum</i> y total	55

Figura 15 Patrón de restricción obtenido tras la digestión con Ddel y BseRI según el genotipo de HBB.....	59
Figura 16 Patrón de restricción obtenidos tras la digestión de NlaIII según el genotipo de G6PD	61
Figura 17 Posibles resultados de la secuenciación del fragmento amplificado según el genotipo de PIEZO1	63
Figura 18 Posibles resultados de la secuenciación del fragmento amplificado según el genotipo de PKLR.....	64
Figura 19 Representación esquemática del método de inmunoprecipitación y elución de antígenos de <i>P. falciparum</i>	67
Figura 20 Flujo de trabajo computacional para la identificación de antígenos a partir de los datos crudos del espectrómetro de masas	73
Figura 21 Diseño del microarray de péptidos para la identificación de epítomos inmunogénicos	75
Figura 22 Niveles de parasitemia en la población infectada de Ghana y RDC	83
Figura 23 Disminución de la parasitemia con la edad de los individuos en Ghana y RDC	84
Figura 24 Prevalencia de cada tipo de infección por malaria por grupo de edad o embarazo en Ghana y RDC.....	85
Figura 25 Porcentaje de individuos diagnosticados de malaria mediante TDR con respecto al método de referencia (PCR).....	86
Figura 26 Comparación de la estimación de la parasitemia mediante microscopía y PCR.....	87
Figura 27 Variaciones de los niveles de IgG, IgM e IgA específicas de <i>P. falciparum</i> , totales y su porcentaje según la edad y el estado de infección	88
Figura 28 Variaciones de los niveles de IgG, IgM e IgA totales, específicas de <i>P. falciparum</i> y su porcentaje en mujeres en edad fértil dependiendo del estado de embarazo	90
Figura 29 Prevalencia de anemia por grupo de edad, embarazo e infección	93
Figura 30 Correlación entre la parasitemia, los niveles de inmunoglobulinas y los parámetros hematológicos en individuos infectados de malaria y no infectados	94
Figura 31 Proporción de individuos con malaria microscópica, submicroscópica y no infectados en individuos portadores de variantes polimórficas protectoras.....	98
Figura 32 Nivel de parasitemia según la presencia o ausencia de variantes polimórficas que confieren tolerancia a la malaria por grupos de edad y embarazo	100
Figura 33 Variaciones en el tipo de infección y la prevalencia de malaria según el número de variantes potencialmente protectoras	102

Figura 34 Optimización de la eficacia de unión IgM-esfera según el ratio plasma/esfera y el tipo de elución	104
Figura 35 Comparación del número de proteínas identificadas tras la elución a pH ácido y mediante ebullición.....	106
Figura 36 Número de proteínas de <i>P. falciparum</i> y humanas identificadas tras las IP clasificadas por grupos de infección.....	107
Figura 37 Número de antígenos de <i>P. falciparum</i> , abundancia media y máxima por grupo de edad, embarazo e infección	108
Figura 38 Solapamientos entre los antígenos identificados por grupos de edad, embarazo e infección	110
Figura 39 Correlación entre el número de antígenos reconocidos, su abundancia media y máxima	110
Figura 40 Análisis de enriquecimiento de términos de ontología genética del total de antígenos identificados.....	111
Figura 41 Reconocimiento antigénico por IgM de acuerdo al estadio parasitario de expresión	112
Figura 42 Reconocimiento de antígenos con regiones de baja complejidad por IgM	114
Figura 43 Abundancia de los antígenos más inmunodominantes (n = 82) en la población...	115
Figura 44 Análisis de abundancia diferencial de antígenos entre grupos de infección	117
Figura 45 Agrupamiento de antígenos IgM según su correlación.....	118
Figura 46 Análisis exploratorio de la señal de IgM a los péptidos del microarray	121
Figura 47 Criterio de positividad establecido para la intensidad de señal del microarray	122
Figura 48 Número de péptidos reconocidos por IgM e intensidad de señal media por grupos de infección	123
Figura 49 Frecuencia de reconocimiento de los péptidos de cada antígeno según el estado infeccioso de los individuos	124
Figura 50 Número de péptidos con intensidad de señal significativamente diferente entre grupos de infección clasificados por antígeno.	125
Figura 51 Número de péptidos de cada antígeno con intensidad de señal significativamente diferente entre grupos de parasitemia	126
Figura 52 Intensidad de señal de la IgM específica de los péptidos con potencial protección inmunitaria	127
Figura 53 Intensidad de señal de la IgM a lo largo de la secuencia de los antígenos más representativos	128

Figura 54 Composición de aminoácidos de los péptidos con mayor y menor reconocimiento por IgM en el microarray en comparación con el proteoma de <i>P. falciparum</i> y el total de péptidos analizados.....	129
Figura 55 Correlación entre la intensidad de señal, la repetitividad, el reconocimiento y la presencia de aminoácidos en el total de péptidos	130

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Propiedades de los distintos isotipos de Inmunoglobulinas.....	33
Tabla 2 Relación de ensayos en los que se ha utilizado cada set de muestras	49
Tabla 3 Distribución de la población por parámetros demográficos	82
Tabla 4 Comparación de resultados diagnósticos de malaria mediante los métodos TDR y PCR	86
Tabla 5 Efecto de la infección por malaria en los parámetros hematológicos por grupo de edad y embarazo	91
Tabla 6 Efectos del embarazo en los parámetros hematológicos de mujeres en edad fértil por grupo de infección.....	92
Tabla 7 Probabilidad de detectar malaria microscópica y anemia grave en niños con alta vs. baja concentración de anticuerpos específicos	94
Tabla 8 Frecuencias alélicas y genotípicas de polimorfismos potencialmente asociados a tolerancia frente a la malaria	97
Tabla 9 Probabilidad de padecer malaria microscópica al infectarse en los portadores de mutaciones tolerantes vs. ausencia de mutaciones	99
Tabla 10 Antígenos seleccionados para la identificación de epítomos inmunodominantes ..	120
Tabla 11 Péptidos inmunogénicos candidatos para diagnóstico serológico mediante IgM ..	127

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
APC	Célula presentadora de antígenos (del inglés <i>Antigen-Presenting Cell</i>)
BC	Baja complejidad

BCR	Receptor de linfocitos B (del inglés <i>B Cell Receptor</i>)
BSA	Albúmina de suero bovino (del inglés <i>Bovine Serum Albumin</i>)
CT	Ciclo umbral (del inglés <i>Cycle Threshold</i>)
DBS	Mancha de sangre seca (del inglés <i>Dried Blood Spot</i>)
DE	Desviación estándar
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
DSS	Mancha de plasma seco (del inglés <i>Dried Serum Spot</i>)
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FDR	Tasa de descubrimientos falsos (del inglés <i>False Discovery Rate</i>)
G6PD	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GAMA	Antígeno del micronema anclado a GPI (del inglés <i>GPI-Anchored Micronemal Antigen</i>)
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa
GO	Ontología genética (del inglés, <i>Gene Ontology</i>)
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
Hb	Hemoglobina
HBB	Gen de la hemoglobina β
HRP	Peroxidasa de rábano (del inglés <i>HorseRadish Peroxidase</i>)
HRP2	Proteína rica en histidina 2 (del inglés <i>Histidine Rich Protein 2</i>)
ID	Identificador
Ig	Inmunoglobulina
IP	Inmunoprecipitación
IPTp	Tratamiento preventivo intermitente (del inglés <i>Intermittent Preventive Treatment of malaria in pregnancy</i>)
LC	Cromatografía líquida (del inglés <i>Liquid Chromatography</i>)
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tandem
LDD	Límite de detección
LDH	Lactato deshidrogenasa
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés <i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MM	Malaria microscópica
MS	Malaria submicroscópica
MSP	Proteína de superficie de merozoíto (del inglés <i>Merozoite Surface Protein</i>)
NE	No expuesto a la malaria
NI	No infectado
NK	Linfocito citolítico natural (del inglés <i>Natural Killer</i>)
OR	Oportunidad relativa (del inglés <i>Odds Ratio</i>)
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (del inglés <i>PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>)
pb	Pares de bases de nucleótidos
PBS	Solución salina tamponada con fosfato (del inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCA	Análisis de componentes principales (del inglés <i>Principal Component Analysis</i>)
PfEMP1	Proteína de membrana eritrocitaria 1
Pf-IgA	IgA específica de <i>P. falciparum</i>
Pf-IgG	IgG específica de <i>P. falciparum</i>
Pf-IgM	IgM específica de <i>P. falciparum</i>
PK	Piruvato quinasa (del inglés <i>Piruvate Kinase</i>)
Q	Cuartil

RAMA	Antígeno de membrana asociado a las roptrias (del inglés <i>Rhoptry-Associated Membrane Antigen</i>)
RDC	República Democrática del Congo
RFLP	Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (del inglés <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
RIC	Rango intercuartílico
RIFIN	Proteínas de repetición intercalada
SDS	Dodecil sulfato sódico (del inglés <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SERA	Proteínas ricas en serina (del inglés <i>SERine Repeat Antigen</i>)
STEVAR	Proteínas variantes subteloméricas de marco de lectura abierto (del inglés <i>SubTelomeric Variable Open Reading frame</i>)
Tc	Linfocito T citotóxico
TCR	Receptor de linfocitos T (del inglés <i>T Cell Receptor</i>)
TDR	Test de diagnóstico rápido
TEMED	Tetrametiletilendiamina
Th	Linfocito T cooperador (del inglés <i>T helper</i>)
TL	Tampón de unión/lavado
TMB	Tetrametilbencidina
Treg	Linfocito T regulador
UCM	Universidad Complutense de Madrid
VSA	Antígeno de superficie variable (del inglés <i>Variant Surface Antigen</i>)

1. RESUMEN / SUMMARY



La malaria, causada por parásitos protozoarios del género *Plasmodium*, es una de las enfermedades infecciosas con mayor impacto en la salud pública de las regiones en desarrollo. Su cuadro clínico es muy heterogéneo y engloba desde la malaria grave con riesgo para la vida, hasta la malaria subclínica, caracterizada por bajos niveles de parasitemia y ausencia de sintomatología. Existen dos factores principales que influyen en la gravedad de la infección. El primero es el desarrollo de una inmunidad adaptativa, que se adquiere gradualmente con los años y con las sucesivas exposiciones al parásito, dejando en un estado de vulnerabilidad a los niños menores de cinco años. La segunda es la genética del individuo, existiendo una selección positiva de ciertos polimorfismos genéticos que confieren tolerancia a la malaria en regiones endémicas. Con esta perspectiva, la identificación de biomarcadores de tolerancia a la malaria, tanto inmunitarios como genéticos, que permitan identificar dianas de protección inmunológica y de diagnóstico del estado infeccioso, constituye un objetivo científico para contribuir a eliminar esta enfermedad.

El control de la malaria en los países endémicos sigue enfrentándose a la ausencia de sistemas de diagnóstico sensibles y asequibles y de vacunas efectivas. Así, la identificación de antígenos inmunogénicos de *Plasmodium* constituye también un objetivo principal en la lucha antimalárica, ya que aumentaría el arsenal de moléculas candidatas para el diseño de vacunas y de mejores sistemas diagnósticos. Hasta la fecha, la mayoría de los estudios se han enfocado en el descubrimiento de antígenos reconocidos por IgG. Sin embargo, aunque la IgM tiene también ventajas diagnósticas y se ha demostrado su papel protector, los antígenos de *Plasmodium* reconocidos por IgM permanecen ignorados.

En este contexto multifactorial, nos propusimos como objetivo evaluar el estado inmunitario y de tolerancia genética de individuos procedentes de regiones endémicas de malaria y asociarlo con el estado de infección por *P. falciparum*. Con ello se esperaría identificar biomarcadores de tolerancia a la malaria asociados a infecciones leves. Además, considerando que la IgM ha quedado relegada en el estudio de la respuesta inmunitaria frente a la malaria, nos propusimos identificar los antígenos y epítomos inmunodominantes de *P. falciparum* reconocidos por IgM con el fin de aumentar el número de candidatos para vacunación y diagnóstico serológico complementarios a los previamente identificados reconocidos por IgG.

Para alcanzar los objetivos propuestos, recogimos muestras de sangre y plasma de tres conjuntos de individuos procedentes de Ghana, de la República Democrática del Congo y de individuos con malaria importada. Tras diagnosticar la infección por *P. falciparum*, las muestras se clasificaron en función de la edad, estado de embarazo y grado de infección. Para la evaluación del estado inmunitario, se determinaron los niveles de IgG, IgM e IgA, tanto totales

como específicas de *P. falciparum*, y se analizaron las diferencias entre los diferentes grupos. También se analizaron parámetros hematológicos para relacionarlos con el estado de infección e inmunidad humoral. El genotipado de polimorfismos frecuentes en los genes PIEZO1, G6PD, hemoglobina beta y piruvato quinasa en las muestras procedentes de los países endémicos permitió conocer la extensión de una potencial tolerancia genética a la malaria en esas regiones. La identificación de nuevos antígenos de *P. falciparum* a gran escala se desarrolló mediante un nuevo método de inmunoprecipitación de aquellos reconocidos por IgM que, mediante LC-MS/MS y el desarrollo original de un flujo de trabajo computacional, fueron identificados y semicuantificados. Por último, mediante microarrays de péptidos con la secuencia de los antígenos inmunodominantes, se identificaron los epítomos inmunogénicos de los antígenos mayoritariamente reconocidos tras la infección.

Nuestros resultados refuerzan que, en regiones endémicas, la edad incrementa un estado de semi-inmunidad frente a la malaria, reflejada por un aumento de la concentración sérica de inmunoglobulinas específicas de los adultos con respecto a los niños que conlleva una reducción de la parasitemia en los adultos. En los niños, los niveles elevados de IgA e IgM específicas se asociaron con malaria a elevada parasitemia y con anemia grave, mostrando su capacidad de actuar como marcadores de intensidad de la infección o pronóstico. De los individuos infectados, el 65% padecía malaria submicroscópica. Este tipo de infección resultó ser indetectable con los sistemas de diagnóstico rápido usados en regiones endémicas, mostrando la necesidad de identificar marcadores de diagnóstico para la malaria submicroscópica. El análisis de tolerancia genética a la malaria demostró que las variantes E756del del gen PIEZO1, la hemoglobina AS y la variante A- de la G6PD generan protección frente la malaria de alta parasitemia. Además, nuestros resultados también demuestran que es frecuente la coexistencia o selección de más de una de estas variantes en un mismo individuo y que los portadores de dos o más de ellas desarrollan malaria con menores niveles de parasitemia que los que tienen una o ninguna variante.

Por último, mediante una nueva metodología, se identificaron un total de 237 antígenos de *P. falciparum* reconocidos por IgM. Los antígenos implicados en la invasión del eritrocito o en la interacción con el hospedador fueron las principales dianas de la respuesta humoral mediada por IgM. Entre ellos, los expresados en el esquizonte y los que carecían de regiones de baja complejidad fueron los más inmunogénicos. Al comparar por grupos de edad, se observó que los niños reconocían menor cantidad de antígenos y que las mujeres gestantes tenían un repertorio de anticuerpos mayor que el resto de grupos. Gracias a la identificación de epítomos inmunorreactivos, se identificaron 22 péptidos reconocidos por IgM con potencial para realizar

diagnóstico serológico y 10 péptidos cuya respuesta IgM podría ser inmunoprotectora. Además, esta tesis demuestra que la secuencia de un epítipo influye en su grado de inmunogenicidad y que los más repetitivos tienen una mayor respuesta IgM.

Así pues, los resultados de esta tesis abren perspectivas para mejorar el control de la malaria gracias a la identificación de una batería de marcadores de tolerancia a la infección tanto inmunitarios como genéticos. También, con este estudio, se ha ampliado la información biológica disponible sobre el reconocimiento de *Plasmodium* por IgM, identificándose anticuerpos potencialmente protectores, así como nuevos candidatos para diagnóstico serológico.

Malaria, caused by protozoan parasites of the genus *Plasmodium*, is one of the infectious diseases with greatest public health impact in developing regions. Its clinical manifestations are highly diverse ranging from severe and life-threatening malaria to subclinical malaria, characterised by low levels of parasitaemia and absence of symptoms. Two main factors influence infection severity. First, the development of adaptive immunity, which is gradually acquired over the years by repeated exposures to the parasite, results in a vulnerability state for children under 5 years of age. Secondly, human evolutionary adaptation, including positive selection of certain genetic polymorphisms that confer tolerance to malaria in endemic regions. From this standpoint, the identification of biomarkers of tolerance to malaria, both immunological and genetic, to identify targets of immune protection and diagnosis of the infectious state, is a scientific goal to contribute to the elimination of this disease.

Malaria control in endemic countries is still facing the lack of sensitive and affordable diagnostic systems and effective vaccines. Thus, the identification of immunogenic *Plasmodium* antigens is also a major goal in the fight against malaria, as it would increase the collection of candidate molecules for vaccine design and improved diagnostic tests. To date, most studies have focused on the discovery of antigens recognised by IgG. However, although IgM also has diagnostic advantages and its protective role has been demonstrated, IgM-recognised *Plasmodium* antigens remain overlooked.

In this multifactorial context, we aimed assessing the immune and genetic tolerance status of individuals from malaria-endemic regions to associate it with *P. falciparum* infections. By doing so, we would expect to identify biomarkers of malaria tolerance connected with mild infections. Furthermore, considering that IgM has been relatively neglected in the study of the immune response to malaria, we aimed to identify *P. falciparum* immunodominant antigens and epitopes recognised by IgM to increase the arsenal of candidates for vaccination and serological diagnosis complementary to those previously identified by IgG.

To achieve these objectives, we collected blood and plasma samples from three different malaria settings: Ghana, Democratic Republic of Congo and imported malaria cases into Spain. After diagnosis of *P. falciparum* infection, samples were classified according to age, pregnancy status and degree of infection. Immune status was assessed by determining total and *P. falciparum*-specific IgG, IgM and IgA levels, and differences between groups were analysed. Haematological parameters were also determined to correlate with infection and humoral immunity status. Genotyping of frequent polymorphisms in *PIEZO1*, *G6PD*, haemoglobin beta and pyruvate kinase genes at all samples from both endemic countries provided insights into the extent of potential genetic tolerance to malaria in these regions. Large-scale discovery of

new *P. falciparum* IgM-antigens was performed by a new method of immunoprecipitation that subsequently, upon LC-MS/MS and an in-house developed computational pipeline, allowed their identification and semi-quantification. Finally, using peptide-microarrays carrying the sequence of the discovered immunodominant antigens, we identified its major immunogenic epitopes recognised upon infection.

Our results support that, in endemic regions, age increases a state of semi-immunity to malaria, reflected by increased concentration of serum specific immunoglobulins in adults compared to children, leading to a reduction in parasitaemia in adults. High levels of specific IgA and IgM in children were associated with high parasitaemia malaria and severe anaemia, showing their potential as markers of infection intensity and/or prognosis. From the total amount of infected individuals, 65% had submicroscopic malaria. This type of infection was found to be undetectable with the rapid diagnostic tests used in endemic regions, showing a need to identifying diagnostic markers for submicroscopic malaria. Analysis of genetic tolerance to malaria showed that the E756del variant of PIEZO1 gene, haemoglobin AS and G6PD A- confer protection against high-parasitaemia malaria. In addition, our results showed that the coexistence or selection of more than one of these variants together in the same individual is frequent so carriers of two or more of them develop malaria with lower parasitaemia than those with one or none of the variants.

Finally, by a new developed methodology, a total of 237 *P. falciparum* antigens recognised by IgM were identified. Antigens involved in erythrocyte invasion or host interaction were the main targets of the IgM-mediated humoral response. Among them, those expressed in the schizont and those lacking low-complexity regions were the most immunogenic. Comparison by age groups showed that children sera recognised the fewest antigens and that pregnant women sera identified a larger antibody repertoire than the other groups. Analyses of immunoreactive epitopes showed 22 IgM-recognised peptides with potential for serological diagnosis and 10 peptides whose IgM response could provide immunoprotection. Furthermore, this study demonstrates that epitope sequence influences its degree of immunogenicity as more repetitive epitopes showed high IgM response.

Thus, the results here presented provide insights to improve malaria control through the identification of a collection of immune and genetic markers of tolerance to infection. This study has also increased available biological information on human IgM recognition of *Plasmodium falciparum*, identifying potentially protective antibodies, as well as new candidates for serological diagnosis.

2. INTRODUCCIÓN



2.1. LA MALARIA HUMANA Y SU IMPACTO SANITARIO

La malaria o paludismo es una de las enfermedades infecciosas más amenazantes en términos de salud pública e impacto socioeconómico. A pesar de ser una enfermedad prevenible y curable, sus efectos en la salud de las personas continúan siendo devastadores. En el año 2020, la Organización Mundial de la Salud estima que hubo 241 millones de casos en el mundo y se produjeron al menos 627 000 muertes, de las cuales el 77% fueron en niños menores de cinco años¹. Además de los niños, otros grupos especialmente vulnerables a la malaria grave son las mujeres embarazadas, los pacientes con VIH y las personas con baja inmunidad que se desplazan a regiones con transmisión intensa de malaria¹. En cuanto a su distribución, a pesar de que casi la mitad de la población mundial está en riesgo de malaria, África soporta una carga desproporcionadamente alta con un 95% de los casos y 96% de las muertes por malaria¹. Gracias a los esfuerzos por el control de la malaria a nivel mundial, entre los años 2000 y 2019 las muertes por malaria se redujeron constantemente. Sin embargo, en el año 2020 aumentaron un 12% debido a la paralización de los servicios por la pandemia del COVID-19¹.

El agente causal de la malaria es un parásito protozoario del género *Plasmodium* que se transmite mediante la picadura de mosquitos hembra del género *Anopheles* (orden *Diptera*, familia *Culicidae*) infectados². Otras vías de transmisión ocasionales son las transfusiones sanguíneas³, los trasplantes⁴ o la vía materno-fetal⁵. El descubrimiento del agente causal de la malaria se considera un hito científico en la historia y es atribuido a Charles Louis Alphonse Laveran, quien en 1880 observó, por primera vez, parásitos protozoarios en la sangre de militares fallecidos por malaria⁶ ([Figura 1](#)). Unos años después, en 1899, Ronald Ross⁷ y Giovanni Batista Grassi⁸ fueron los primeros en describir que el mosquito era el vector transmisor de la infección gracias a estudios realizados con malaria aviar y humana.

Existen más de 170 especies de *Plasmodium* que infectan mamíferos, reptiles, aves y anfibios⁹. Sin embargo, únicamente cinco de ellas son causantes de malaria en humanos. Históricamente, se conocían *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae* como las cuatro especies de *Plasmodium* causantes de malaria humana, siendo la malaria falciparum la más extendida y mortal de ellas^{1,10}, seguida por *P. vivax* que cuenta con un 2% de los casos¹. Sin embargo, en 1965 se describió por primera vez la infección por *P. knowlesi* en humanos, una zoonosis cuya infección hasta el momento solo se había observado en distintas especies de simios¹¹.

La lucha por el control de la malaria en el mundo aún se enfrenta a numerosos retos. La rápida aparición de resistencias a tratamientos clásicos como la cloroquina¹² o los antifolatos¹³

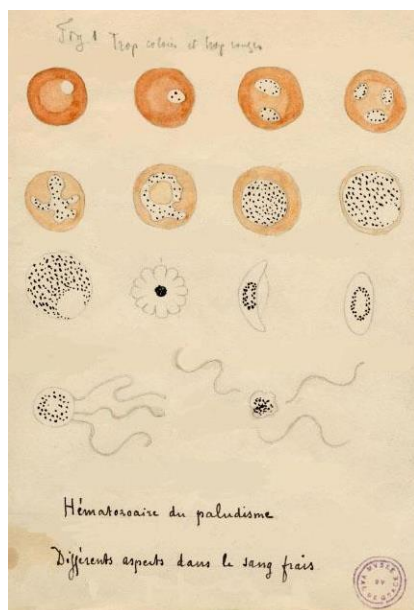


Figura 1 | Primeras observaciones del parásito de la malaria en sangre fresca. Ilustración realizada por Laveran en 1880.

llevaron a la utilización de tratamientos combinados de derivados de la artemisina. Sin embargo, la resistencia a estos ya se ha extendido en la región del Mekong, dando lugar a numerosos fracasos en los tratamientos^{1,14,15} y se han detectado los primeros casos de resistencia parcial en África¹. El desarrollo de vacunas es otra vía para combatir las enfermedades infecciosas. Así, tras 30 años de investigación y ensayos clínicos, en el año 2021 se autorizó el uso de la vacuna RTS,S/AS01, la primera vacuna antimalárica aprobada en la historia, que se ha recomendado para su uso pediátrico desde el primer año de vida. Sin embargo, esta vacuna se enfrenta a problemas como su baja eficacia, en torno al 30%, la necesidad de cuatro dosis, lo que disminuye la adherencia al tratamiento, y una baja duración de la protección inmunitaria¹⁶. Estos datos evidencian la necesidad de desarrollar nuevas vacunas con una eficacia más realista para su uso en África. Por otra parte, la malaria se enfrenta también a la escasez de métodos diagnósticos sensibles y de infraestructuras sanitarias, lo que limita en gran medida la detección de la infección en regiones de bajos recursos. Este aspecto es de relevancia en esta tesis y se detallará más adelante.

En la estrategia mundial para el control de la malaria 2015-2030¹⁰ se establecieron metas ambiciosas como reducir la tasa de mortalidad e incidencia mundial en un 90% respecto al año 2015, eliminarla por lo menos en 35 países y evitar el restablecimiento de la malaria en todos los países exentos de la enfermedad. Para lograr tales avances se definieron tres pilares básicos a los que enfocar los esfuerzos. El primero de ellos es lograr un acceso universal a la prevención, diagnóstico y tratamiento de la malaria, que incluye acciones como el control vectorial, ampliar

el tratamiento preventivo mediante quimioprofilaxis, lograr un acceso universal a las pruebas de diagnóstico y tratamientos adecuados o disminuir la farmacoresistencia a los antimaláricos. También se incluye como pilar esencial acelerar la eliminación y alcanzar el estado exento de malaria solicitando a los países que intensifiquen los esfuerzos para evitar la propagación de las nuevas infecciones mediante soluciones innovadoras. Por último, el tercer pilar consiste en transformar la vigilancia malárica en una intervención básica en las estrategias de nacionales y subnacionales contra la enfermedad.

La realización de estas intervenciones conlleva un notable impacto económico. En el año 2020, la financiación para el control de la malaria fue de unos 3300 millones de dólares en el mundo, de los cuales más de la mitad procedieron de países no endémicos¹. En los últimos años, debido al estancamiento en la reducción de casos y muertes por malaria en el mundo, se ha incidido en la necesidad de aumentar la inversión en malaria. Los recursos necesarios para alcanzar los hitos definidos para los próximos años se estiman en al menos 6800 millones de dólares anuales¹⁰.

2.1.1. Distribución geográfica de malaria falciparum

La malaria se concentra en las regiones tropicales y subtropicales del planeta ([Figura 2A](#)), cuyas condiciones climatológicas caracterizadas por elevada temperatura, humedad y lluvias favorecen el crecimiento del vector y, por tanto, una mayor dispersión de la enfermedad. Generalmente, las regiones más cálidas, de mayor vegetación y humedad, tienen una transmisión de malaria elevada y continua a lo largo del año. En regiones templadas, sin embargo, la transmisión es estacional coincidiendo con la época de lluvias y puede ser de menor intensidad. La temperatura medioambiental es especialmente crucial en la transmisión de la malaria, ya que *P. falciparum* ve reducida su supervivencia en el mosquito *Anopheles* al disminuir la temperatura¹⁷.

A pesar de que la distribución geográfica de la malaria se extiende por la mitad del globo, las desigualdades en el impacto de la infección en los distintos territorios son muy notables. Únicamente 29 de los 85 países endémicos de malaria concentran el 96% de los casos y muertes, estando seis de ellos localizados en África - Nigeria, República Democrática del Congo (RDC), Uganda, Mozambique, Angola y Burkina Faso - responsables del 55% de todos los casos mundiales¹. La mortalidad por malaria también varía mucho entre regiones. La especie de *Plasmodium* predominante en cada región es uno de los principales factores que moldean la

letalidad producida, siendo las regiones con mayor prevalencia de *P. falciparum* (Figura 2B), localizadas en África subsahariana y central, en las que más fallecimientos se registran.

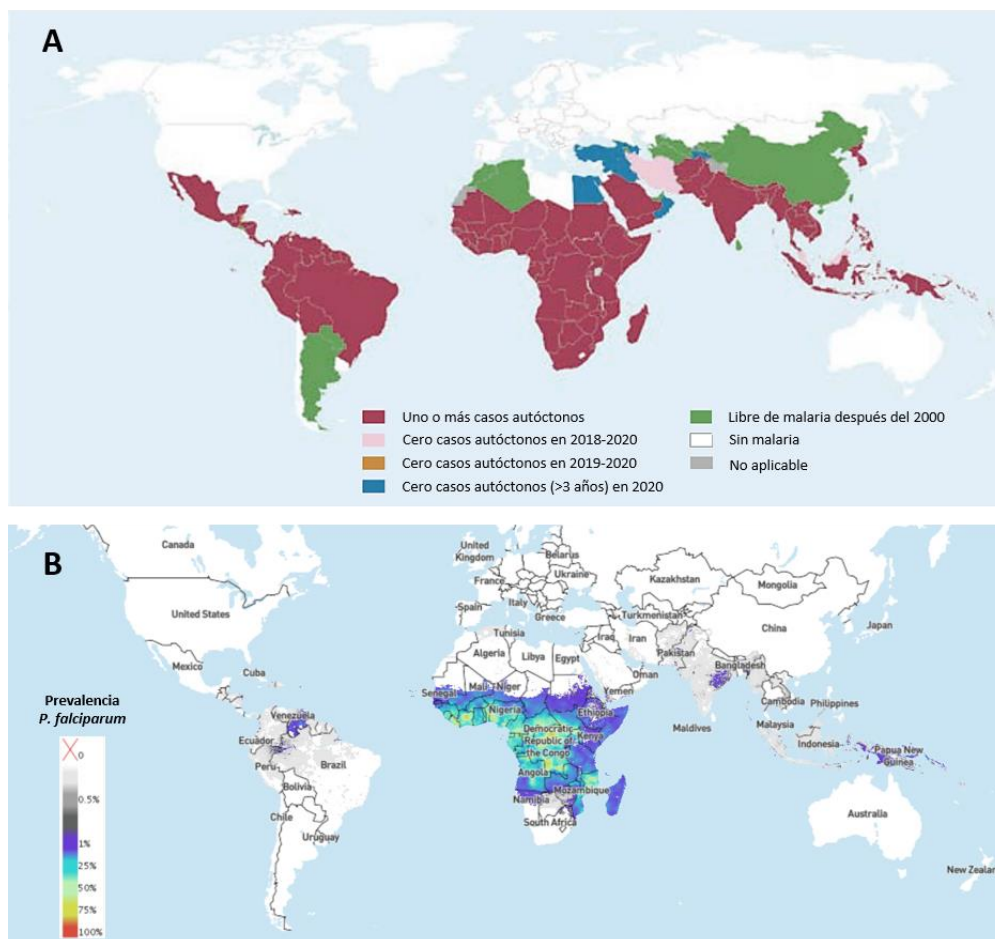


Figura 2 | Distribución de la malaria y la malaria falciparum en el mundo. A, países en los que la malaria es endémica teniendo en cuenta las cinco especies de *Plasmodium* (rojo) y países en los que se ha eliminado la malaria recientemente (rosa, azul y verde). B, prevalencia de malaria causada por *P. falciparum* en el mundo.

Otra de las cuestiones que marcan el difícil control de la malaria, es el claro solapamiento entre los países endémicos de malaria y las regiones más empobrecidas del planeta (Figuras 2 y 3). Las condiciones socioeconómicas y el bajo nivel de recursos de los países endémicos ponen en jaque el avance en las estrategias de control y eliminación de la malaria. Además, la carga económica que supone la enfermedad tanto para las familias como para la economía estatal perpetúa el ciclo de la pobreza en estas regiones. Muchos de estos países constituyen también un atractivo turístico y son visitados por más de 125 millones de turistas al año, de los cuales se estima que unos 30 000 enfermarán de malaria¹⁸. Este hecho, junto con el aumento de los casos de malaria importada en países no endémicos en los últimos años¹⁹, implica la necesidad de que

todos los países del mundo, independientemente de su nivel de endemicidad, conozcan e implementen estrategias de control y prevención de la malaria.

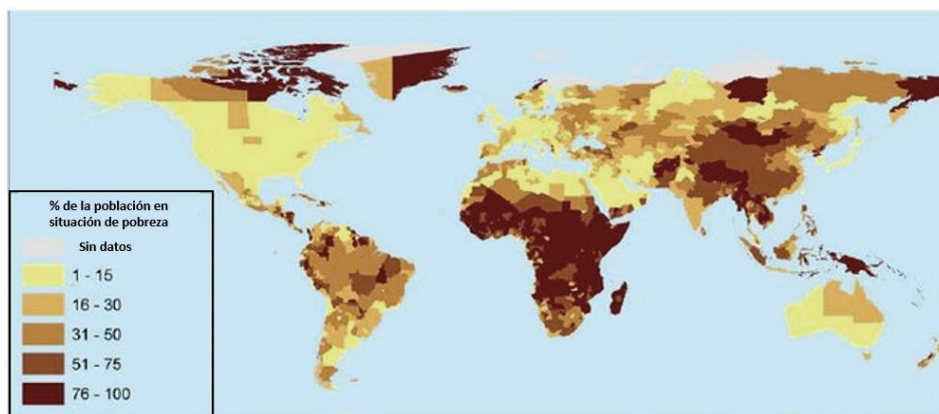


Figura 3 | Distribución de la pobreza en el mundo. Obtenido y adaptado de Elvidge *et al.*, 2009²⁰

2.1.2. Biología de la malaria: el ciclo de vida de *P. falciparum*

El ciclo de vida de *P. falciparum* implica a dos hospedadores, el hombre y el mosquito hembra de género *Anopheles*. La transmisión del parásito entre personas depende del mosquito vector, considerado el hospedador definitivo, ya que en él ocurre la reproducción sexual del parásito, mientras que el hombre actúa como hospedador intermediario donde ocurre únicamente la multiplicación asexual del mismo²¹. El ciclo comienza cuando los parásitos producidos en el mosquito, conocidos como esporozoítos, penetran a través de la dermis en la sangre humana tras la picadura del mosquito infectado²². Entonces, los esporozoítos migran hasta el hígado, donde invaden los hepatocitos iniciando la fase hepática o exoeritrocítica ([Figura 4A](#)). En los hepatocitos, los esporozoítos comienzan a multiplicarse por reproducción asexual, formando la esquizogonia y generando hasta 40 000 merozoítos por cada célula hepática infectada en un periodo de unos seis días²³. En el final de la fase hepática, los merozoítos acaban liberándose de nuevo al torrente sanguíneo en forma de vesículas llamadas merosomas²³.

Una vez liberados a la circulación hepática, los merozoítos invaden eritrocitos sanos en un proceso complejo, pero rápido, que dura unos dos minutos²⁴ e inician así la fase eritrocítica ([Figura 4B](#)). Tras la invasión del eritrocito, el merozoíto inicia su desarrollo como anillo y progresa a trofozoíto y, por último, tras cinco rondas de mitosis y división del núcleo mediante esquizogonia, se genera el denominado esquizonte, la forma más madura que contiene hasta 32 células hijas^{25,26}. Los nuevos merozoítos generados son liberados de forma sincrónica a la

sangre repitiendo el ciclo de propagación intraeritrocítico cada 48 horas, coincidentes con los picos de fiebre característicos de la malaria falciparum.

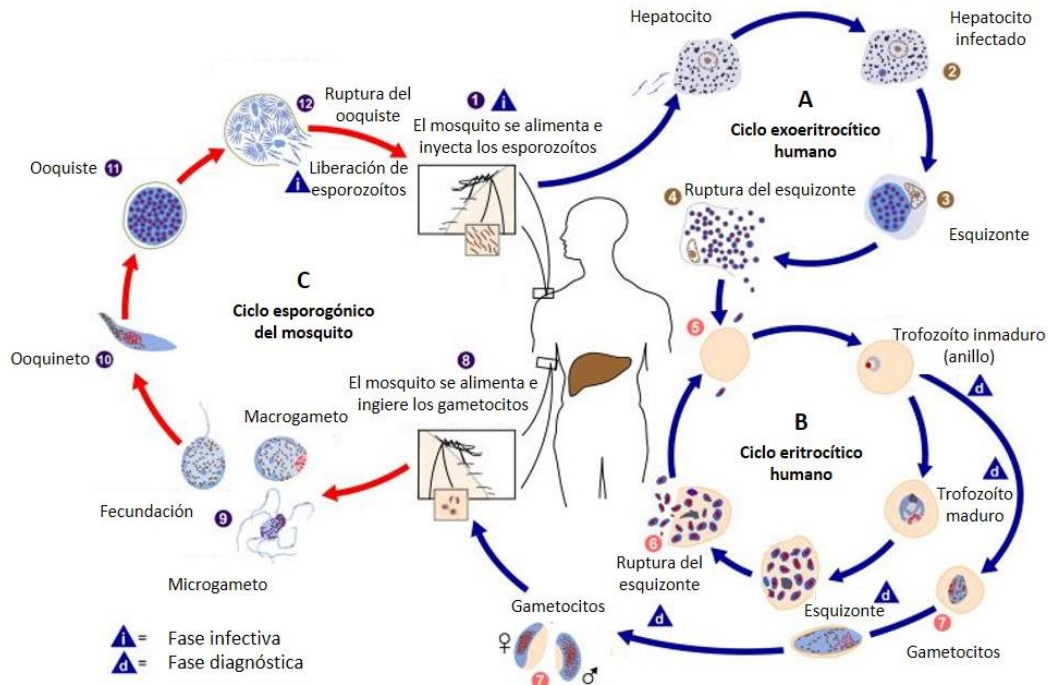


Figura 4 | Ciclo de vida de *P. falciparum*. A, ciclo hepático o exoeritrocítico llevado a cabo en los hepatocitos humanos. B, ciclo eritrocítico sucedido en el interior de los eritrocitos humanos. C, ciclo esporogónico en el que ocurre la reproducción sexual de *Plasmodium* en el mosquito. Imagen obtenida y adaptada del Centro de control y prevención de enfermedades (CDC) <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>

Tras varias rondas de división intraeritrocítica, algunos de los merozoítos liberados al torrente sanguíneo inician un proceso de diferenciación en gametocitos, capaces de realizar reproducción sexual²⁷. El estímulo exacto que lleva a que unos merozoítos continúen su ciclo de reproducción asexual y otros se diferencien en células sexuales aún se desconoce. No obstante, algunos estudios indican que el estrés microambiental sanguíneo, como una elevada parasitemia y ciertas drogas antimaláricas, están asociadas a un aumento en la producción de gametocitos²⁴. Una vez generados los gametocitos, estos deben madurar durante un periodo de unos once días para ser infectivos para los mosquitos. Este proceso se lleva a cabo en la médula ósea, donde permanecen secuestrados hasta completar la maduración y ser liberados de nuevo a la sangre²⁸. La formación de gametos tanto femeninos como masculinos completa el ciclo realizado en humanos y constituye una parte esencial del ciclo de vida de *Plasmodium*, ya que sin ella no se produciría la transmisión entre el humano y el mosquito vector.

El ciclo esporogónico ([Figura 4C](#)) es la fase de vida de *P. falciparum* que ocurre en el mosquito vector y que se inicia tras la ingesta de gametocitos por parte del mosquito tras alimentarse de un hospedador humano infectado. Los gametocitos son activados en el intestino del mosquito y comienzan a diferenciarse en microgametos o macrogametos, células masculinas y femeninas respectivamente²⁹. Entonces, los microgametos fecundan a los macrogametos produciendo un cigoto que, mediante meiosis, se diferencia en una célula motil llamada ooquinet³⁰. A medida que el ooquinet crece, atraviesa la célula epitelial del intestino del mosquito y desarrolla una pared adquiriendo una forma esférica sin motilidad propia llamada ooquiste³¹. El núcleo del ooquiste comienza a dividirse mediante esporogonia formando miles de esporozoítos que acaban rompiendo el ooquiste. Algunos de los esporozoítos liberados a la hemolinfa alcanzan las glándulas salivares del mosquito³², donde se convierten en infectivos y pueden volver al hospedador humano cuando el mosquito infectado vuelva a alimentarse, cerrando así el ciclo completo del parásito.

2.1.3. Manifestaciones clínicas y patogenia de la malaria humana

Los síntomas clínicos de la malaria se presentan durante la fase eritrocítica en la que el parásito se replica en el interior de los eritrocitos en la medida que el sistema inmunitario se lo permita. El periodo de incubación de *P. falciparum* es el más corto en comparación con otras especies de *Plasmodium* y varía entre 9 y 14 días en personas inmunes y entre 6 y 14 días en no inmunes, habiéndose registrado un mínimo de cuatro días de periodo de incubación en un caso excepcional³³. Las manifestaciones clínicas son muy variables entre individuos ([Figura 5](#)) y habitualmente se clasifican en malaria no complicada o malaria grave. Los síntomas de la malaria no complicada son inespecíficos e incluyen fiebre paroxística, escalofríos, vómitos, dolor corporal, dolor de cabeza, tos o diarrea, lo que dificulta en gran medida el diagnóstico clínico de la enfermedad^{34,35}. La infección puede progresar a fases avanzadas, generalmente en niños o personas con una respuesta inmunitaria limitada, causando malaria grave, que es potencialmente mortal y que conlleva manifestaciones como anemia grave, acidosis láctica, hipoxia, esplenomegalia, daño hepático o renal o, en los casos más graves, malaria cerebral³⁵, que puede derivar en coma y finalmente la muerte³⁶.

Uno de los principales mecanismos patogénicos asociados a una mayor gravedad de la infección y al daño multiorgánico son los fenómenos de citoadherencia caracterizados por la adhesión de los eritrocitos infectados a las células del hospedador³⁷. Entre ellos se encuentran las rosetas, agrupamientos de células formadas por la adhesión de eritrocitos infectados a

| Introducción

eritrocitos sanos^{38,39}, y el secuestro de los eritrocitos infectados en la microvasculatura, causado por la adherencia de los eritrocitos portadores de las fases más maduras del parásito al endotelio vascular³⁹. Este tipo de formaciones se encuentran habitualmente en los aislados de pacientes con malaria grave y son infrecuentes en los individuos con malaria no complicada⁴⁰. Ambos fenómenos causan obstrucción de la microvasculatura, lo que aumenta la inflamación, el daño tisular y el fallo en órganos como la placenta, los riñones o el cerebro^{37,41}. Además, causan alteraciones en la membrana de los eritrocitos sanos, lo que contribuye a la eliminación de los mismos por fagocitosis y la consecuente anemia⁴². Además de contribuir de forma directa a la patogenia de la malaria, la citoadherencia genera un fenómeno de evasión inmunitaria por parte del parásito, ya que causa una retención de los eritrocitos infectados en el endotelio vascular que evita que pasen por el bazo y sean eliminados³⁹. Además, las rosetas ocultan los eritrocitos infectados cubriéndolos de eritrocitos sanos, lo que impide su reconocimiento por parte del sistema inmunitario y disminuye el acceso de las células inmunitarias y citoquinas al lugar de secuestro^{39,43}.

MALARIA NO COMPLICADA vs. MALARIA GRAVE

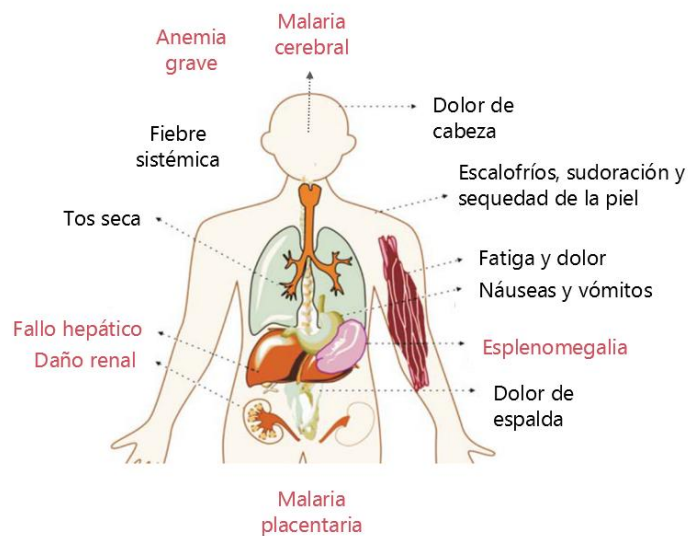


Figura 5 | Manifestaciones clínicas y síntomas de la malaria. Síntomas más comunes de la malaria y principales órganos afectados por la malaria no complicada (negro) y la malaria grave (rojo). Imagen obtenida y adaptada de Balaji *et al.*, 2020³⁵.

La malaria, al ser una infección que cursa en el interior del eritrocito principalmente, causa alteraciones de diversa magnitud en la homeostasis sanguínea. Entre las más habituales en los cuadros de malaria se encuentra la anemia y la trombocitopenia⁴⁴, causadas por la respectiva disminución de los niveles de hemoglobina (Hb) y de plaquetas. La anemia puede ser la principal

complicación de la malaria, especialmente en niños. La destrucción directa del eritrocito por parte del parásito, la eliminación temprana de los eritrocitos no parasitados y la inhibición de la eritropoyesis parecen estar involucrados en el desarrollo de la anemia malárica⁴⁵. Las plaquetas también desempeñan un papel relevante^{46,47} y el nivel de trombocitopenia se correlaciona positivamente con la parasitemia, la gravedad de la infección y los resultados clínicos⁴⁸. Además, entre las manifestaciones de la malaria clínica, diversos estudios han observado alteraciones de monocitos^{49,50} y de otros leucocitos^{51,52}. Los monocitos parecen tener una correlación inversa con la malaria grave^{53,54} y la infección asintomática persistente ha demostrado aumentar significativamente la circulación de monocitos no clásicos y de células proinflamatorias productoras de citoquinas, tanto en modelos de ratones como en humanos⁵⁰. A pesar de que estas alteraciones no son patognomónicas, sí pueden ayudar a orientar el diagnóstico clínico o el pronóstico de la enfermedad, especialmente en regiones de elevado endemismo.

Entre los distintos grupos poblacionales expuestos a la malaria, los niños menores de cinco años y las mujeres embarazadas son los que sufren la enfermedad más grave y registran las mayores tasas de mortalidad^{55,56}. La edad es uno de los principales factores que marcan el cuadro clínico de la malaria. En este sentido, las repetidas exposiciones al parásito conducen a la adquisición gradual de inmunidad en los niños que sobreviven a las primeras infecciones, reduciendo notablemente las tasas de mortalidad y malaria grave a partir de los cinco años⁵⁵ ([Figura 6](#)). En los adultos, al alcanzarse la madurez del sistema inmunitario con una acumulativa exposición al parásito, se presentan las menores tasas de malaria sintomática⁵⁵. Se estima que más de la mitad de las muertes por malaria se producen en niños menores de cinco años infectados por *P. falciparum*⁵⁷. La ausencia de inmunidad previa frente al parásito convierte a los niños en especialmente vulnerables en las primeras exposiciones, mostrando las mayores tasas de malaria grave que suele presentarse clínicamente como coma, anemia grave o dificultad respiratoria⁵⁸. A pesar de que la prevalencia de malaria grave es muy superior en niños, el cuadro clínico difiere entre niños y adultos⁵⁹ y la letalidad de esta puede llegar a ser superior en adultos, especialmente en los casos de malaria cerebral⁶⁰.

La malaria asociada al embarazo se caracteriza por el secuestro de los parásitos en la placenta de las mujeres gestantes⁶¹. Esta afección provoca una importante morbilidad materna y, sobre todo, fetal e infantil, causando entre 75 000 y 200 000 muertes infantiles cada año⁶². Las mujeres gestantes son especialmente susceptibles durante el primer y segundo embarazo y tienen un elevado riesgo de malaria cerebral, que alcanza un 50% de letalidad³⁴, y de muerte materna y fetal debido a la anemia y al retraso del crecimiento intrauterino⁵⁶. El devastador impacto que ha tenido la malaria en las mujeres gestantes ha motivado la realización de grandes

esfuerzos en la ampliación de la cobertura del tratamiento preventivo intermitente (IPTp), una herramienta probadamente eficaz y coste-efectiva para prevenir la malaria durante el embarazo⁶³.

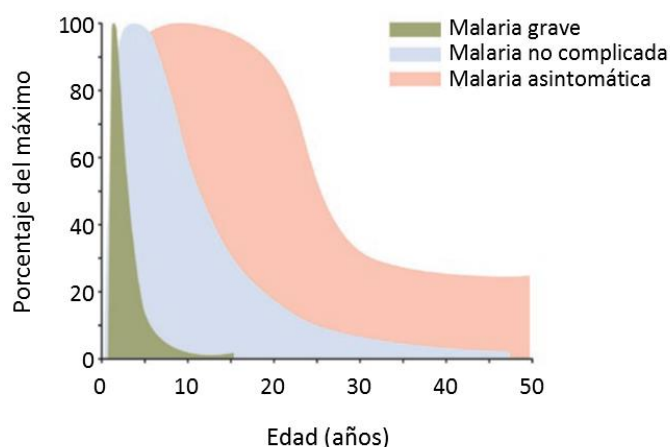


Figura 6 | Gravedad de la malaria según la edad. Imagen obtenida y adaptada de Langhorne *et al.*, 2008⁵⁵.

2.1.4. La malaria subclínica como reservorio del parásito

Uno de los principales retos para el control de la malaria es la detección de los portadores de malaria subclínica o asintomáticos. Este tipo de infección es el tipo de malaria mayoritaria en regiones endémicas⁶⁴ y se caracteriza por desarrollar niveles de parasitemia muy bajos que no desencadenan la patología de la enfermedad⁶⁵. La malaria subclínica es la consecuencia de la adquisición de inmunidad frente a la malaria tras sucesivas exposiciones al parásito⁶⁶. Esta inmunidad es parcial, se adquiere de forma más eficaz en los adultos que en los niños y no suele evitar la infección, pero sí la aparición de los síntomas y el incremento de la parasitemia⁶⁶. Por ello, es mucho más frecuente en adultos que en niños, aunque puede ocurrir a cualquier edad⁶⁶.

Normalmente, la malaria subclínica se acompaña de malaria submicroscópica, es decir, malaria con parasitemia por debajo del límite de detección (LDD) de la microscopía, el método estándar de diagnóstico de malaria en regiones endémicas junto con los test de diagnóstico rápido (TDR)²¹. Esta frecuente situación eleva el riesgo epidemiológico, ya que al no presentar síntomas y no ser detectable por los sistemas habituales, la infección permanece oculta. En las regiones donde la malaria es estacional, los portadores de malaria subclínica se convierten en el reservorio efectivo del parásito entre las épocas de transmisión acelerada por las lluvias estacionales. La época seca se caracteriza por niveles de transmisión muy bajos, con casi ningún

caso clínico y con escasa presencia del mosquito vector⁶⁷. Sin embargo, los portadores de malaria subclínica mantienen la infección crónica de forma asintomática generando gametocitos circulantes, lo que los convierte en el reservorio del parásito a partir del cual se reinicia el siguiente pico de malaria cuando vuelve el mosquito en la estación lluviosa⁶⁸. Por ello, la detección y control de este tipo de casos constituye un punto crítico a la hora de eliminar y controlar la malaria.

Además, la malaria subclínica implica un riesgo de malaria importada en países no endémicos. El desarrollo de la economía global en los últimos 30 años, con el consiguiente aumento del transporte de personas y mercancías, ha facilitado los viajes intercontinentales. Esta facilidad de desplazarse, unido a la elevada prevalencia de malaria subclínica, cuya detección supone un reto, ha dado lugar a un claro incremento de la malaria importada en países europeos^{69,70}. Por tanto, en este entorno mundial, resulta también esencial establecer métodos de detección de este tipo de enfermedad en viajeros procedentes de regiones endémicas.

2.1.5. Diagnóstico de malaria

El diagnóstico temprano de malaria constituye una herramienta primordial en el control de la infección. Para lograr la eliminación y evitar el resurgimiento de la malaria en países donde ha sido eliminada, el sistema de vigilancia ha de ser capaz de detectar a tiempo todas las infecciones por malaria de la región para poder así interrumpir su transmisión⁷¹. Sin embargo, a pesar de que nos encontramos en la era de la eliminación de la malaria, todavía no existe un método de diagnóstico para su vigilancia apropiada⁷².

Los métodos de diagnóstico más utilizados en regiones endémicas son la microscopía óptica y los TDR¹. A pesar de que la microscopía es el método de diagnóstico estándar y ofrece ventajas como la capacidad de determinar la especie de *Plasmodium* y la carga parasitaria, es un método poco sensible, consume mucho tiempo y requiere de personal con una elevada especialización⁷³. Por otra parte, los TDR son dispositivos inmunocromatográficos de flujo lateral que detectan la presencia de un determinado antígeno de *Plasmodium* en la sangre o saliva de un individuo⁷⁴. Su uso ha experimentado un crecimiento exponencial en los últimos años, ya que ofrece claras ventajas frente a la microscopía como son la rapidez en la obtención de resultados y la sencillez de su uso⁷⁵. Además, pueden ser utilizados por personal no experimentado y no requieren equipamiento ni del uso de electricidad, lo que permite utilizarlos en cualquier lugar alejado de un laboratorio⁷⁵. Entre sus desventajas se encuentra una baja sensibilidad, con un LDD de unos 200 parásitos/ μ L similar a la de la microscopía⁷⁶, y que únicamente permiten una detección

cualitativa del parásito. La baja sensibilidad de ambas técnicas, microscopía y TDR, las convierte en inapropiadas a la hora de detectar malaria submicroscópica, el tipo de infección mayoritaria en regiones endémicas⁶⁴. Su uso tiene como consecuencia la subestimación de la prevalencia de malaria en estudios realizados con estas técnicas y la ausencia de tratamiento en aquellos individuos infectados que han recibido un diagnóstico negativo⁷⁷.

Por otra parte, el diagnóstico molecular del material genético del parásito, cuya técnica estrella es la PCR, ha experimentado grandes avances en las últimas dos décadas. Los test basados en PCR son altamente sensibles y alcanzan un LDD por debajo de 0,02 parásitos/ μ L^{72,78}. Esta técnica, además, es potencialmente cuantitativa y permite medir el nivel de parasitemia y estimar la eficacia de los tratamientos. Sin embargo, el elevado coste de sus reactivos, equipamiento e infraestructuras y la necesidad de personal especializado constituyen un importante obstáculo para la aplicación de estos métodos en regiones de bajos recursos, dejando relegada la PCR a los estudios de investigación.

Finalmente, la detección de anticuerpos frente a *P. falciparum* también constituye una diana diagnóstica. Su uso no está muy extendido, ya que los estudios disponibles al respecto no han hallado el anticuerpo específico que permita detectar a todos los portadores de malaria. Sin embargo, dada la escasez de estudios que hay al respecto y el potencial que tienen este tipo de test aprovechando la cascada de amplificación provocada por el sistema inmunitario, parece una vía de investigación necesaria. La detección exitosa de los anticuerpos que se sintetizan tras la infección y desaparecen rápidamente permitiría la creación de TDR altamente sensibles basados en la detección de anticuerpos.

2.2. POLIMORFISMOS GENÉTICOS Y TOLERANCIA A LA MALARIA

Se estima que la malaria humana existe desde hace al menos 10 000 años⁷⁹. Desde entonces, se cree que puede haber sido el agente causal de la muerte de la mitad de las personas que han existido⁸⁰. Por ello, los parásitos del género *Plasmodium* se consideran la fuerza evolutiva más fuerte de la historia reciente⁸¹. En 1949 Haldane descubrió, por primera vez, que los individuos heterocigotos para la β -talasemia eran más resistentes a la malaria que los que no portaban esta mutación⁸². Este hallazgo dio lugar a la denominada “hipótesis de la malaria” basada en la idea de que la infección por *Plasmodium* actúa como un agente selectivo de determinadas alteraciones genéticas, *a priori* perjudiciales, pero que debido a la protección que ejercen frente a la malaria han sido seleccionadas positivamente en regiones endémicas de malaria⁸³. Desde entonces, son numerosas las evidencias de que la distribución de determinados

polimorfismos genéticos eritrocitarios que confieren protección a la malaria se concentra en regiones endémicas debido a este fenómeno de selección evolutiva^{81,84,85}.

Las hemoglobinopatías, trastornos en la producción o la estructura de la Hb, son algunas de las alteraciones genéticas con mayor capacidad protectora frente a la malaria^{86,87}. Su distribución se concentra principalmente en las regiones donde la malaria es endémica debido a la presión selectiva positiva a la que han estado sometidas ([Figura 7](#)). Entre ellas, se encuentran las talasemias, caracterizadas por una disminución de la producción de las cadenas α o β de la Hb que produce un efector protector contra los síntomas clínicos de la malaria y la muerte, a pesar de que no parecen afectar a la carga parasitaria de los individuos^{88,89}.

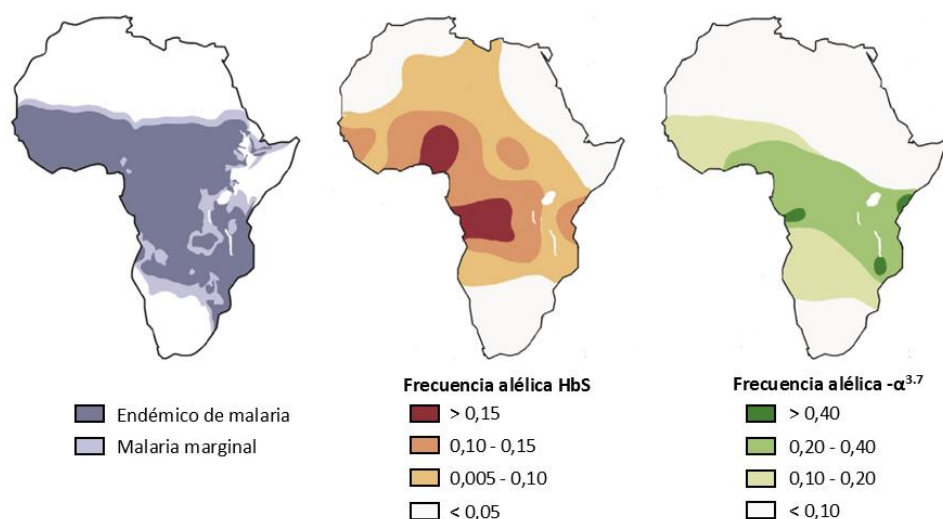


Figura 7 | Distribución de la endemidad de la malaria, la HbS y la α -talasemia en África. Imagen obtenida y adaptada de Williams, T., 2006⁹⁰.

Por otra parte, las Hb S o C son formas estructuralmente distintas de la Hb⁹⁰. La HbS está causada por una mutación en el gen de la cadena β de la Hb (HBB) que produce una sustitución del ácido glutámico de la sexta posición por una valina (Glu6Val)⁹¹. Esta mutación produce un cambio estructural en la molécula que da lugar a la formación de eritrocitos con forma de hoz en su estado desoxigenado que se caracterizan por tener una alta tasa de hemolisis y pérdida de elasticidad que deriva en la oclusión de los capilares⁹². Los individuos con HbS en heterocigosis (HbAS) portan el llamado rasgo falciforme, que es carente de sintomatología y ejerce un efecto protector frente a la malaria grave⁹³⁻⁹⁵. Entre los mecanismos de acción, se encuentra una mejor eliminación de los glóbulos rojos infectados⁹⁶⁻⁹⁸, una reducción de la citoadherencia y formación de rosetas⁹⁹ y la inhibición del crecimiento de *Plasmodium*¹⁰⁰.

Además del efecto directo de la HbAS en el crecimiento y supervivencia del parásito, este trastorno también parece incidir en la respuesta inmunitaria a la malaria. Un estudio demostró que los niños con HbAS adquieren inmunidad adaptativa frente a la malaria de forma más rápida¹⁰¹. También se ha observado un mayor reconocimiento de antígenos de superficie variables (VSA) en los individuos con HbAS^{102,103} o una menor producción de IgG frente a antígenos de merozoíto en niños precedentes de regiones endémicas¹⁰⁴. Además, un estudio llevado a cabo en Burkina Faso demostró que las alteraciones genéticas en el gen HBB también influyen en la transmisión de la malaria¹⁰⁵. Uno de los daños colaterales de la selección positiva de la HbS y de su elevada frecuencia alélica son los portadores de HbS en homocigosis (HbSS), individuos que padecen anemia falciforme cuya clínica se manifiesta con dolor intenso, derrames cerebrales e incluso daño multiorgánico, derivando en una esperanza de vida inferior a los 50 años en la mayoría de los casos¹⁰⁶. Así pues, nos encontramos ante un ejemplo de polimorfismo equilibrado, cuya presencia en heterocigosis genera un gran beneficio por la protección que ejerce frente a la malaria a costa de una mayor prevalencia de anemia falciforme, una enfermedad congénita grave.

A su vez, la HbC está causada por una mutación en el mismo codón de la HbS y genera una sustitución del sexto residuo de ácido glutámico por lisina (Glu6Lys)¹⁰⁷. Esta variante se distribuye principalmente en el Oeste de África¹⁰⁸ y se asocia a cierto grado de protección frente a la malaria grave¹⁰⁹⁻¹¹¹. Este fenómeno de protección podría estar relacionado con una exportación deficiente de la proteína PfEMP1^{112,113}, un factor de virulencia esencial para la patogénesis y evasión inmune del parásito, lo que genera una reducción de la citoadherencia y formación de rosetas.

Una de las enzimopatías más extendidas en el mundo es el déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), que afecta a más de 400 millones de personas a lo largo del globo¹¹⁴. Esta enzima, la primera de la bifurcación de la ruta de las pentosas fosfato, cataliza la producción de NADPH y, por tanto, es fundamental en la defensa antioxidante del eritrocito¹¹⁵. A pesar de que la gran mayoría de individuos con déficit de G6PD son asintomáticos, este trastorno puede causar anemia hemolítica si se exponen a determinadas drogas o al consumo de habas. Actualmente, se conocen más de 200 mutaciones en el gen de la G6PD, de las cuales una elevada proporción genera una deficiencia de la actividad enzimática, ya que comprometen su estabilidad y/o disminuyen su actividad catalítica¹¹⁶. Dado que el gen de la G6PD se localiza en el cromosoma X y que las mutaciones del mismo son de herencia recesiva, el déficit de G6PD es mucho más común en hombres y las mujeres se convierten en las portadoras de estos cambios funcionales¹¹⁶. Son numerosos los estudios que han demostrado que los individuos con déficit

de G6PD y las mujeres heterocigotas portadoras tiene una ventaja selectiva frente a la malaria grave¹¹⁷⁻¹²⁰. Es por ello que las variantes de G6PD causantes de esta deficiencia se concentran en las regiones endémicas de malaria¹²¹. Entre ellas, la variante A- es la más frecuente en poblaciones en africanas^{122,123}. Está causada por dos mutaciones simultáneas en el gen de la G6PD, la mutación Asn126Asp, causante de la variante G6PD A, que no causa déficit de la enzima, más la Val68Met, que actúan de forma sinérgica a la hora de producir el fenotipo deficiente¹²³. El mecanismo principal de acción responsable del efecto protector de esta variante parece ser consecuencia del aumento de la susceptibilidad al estrés oxidativo en los eritrocitos infectados con déficit de G6PD, que resulta en un aumento de la fagocitosis temprana de estos eritrocitos debido a una mayor acumulación de marcadores de eliminación fagocítica^{124,125}.

Recientemente, se ha descubierto que la variante E756del del gen PIEZO1, una variante con elevada frecuencia en poblaciones africanas, provoca una disminución del crecimiento de *P. berghei*, de la disfunción de la barrera hematoencefálica durante la malaria cerebral y de la mortalidad en un modelo de ratón¹²⁶. Además, un estudio realizado con niños de Gabón, demostró que protege frente a la malaria humana grave¹²⁷. A pesar de que desde hace años se conoce que algunas variantes de este gen producen xerocitosis congénita¹²⁸, un trastorno autosómico dominante causante de anemia hemolítica¹²⁹, hasta el año 2018 no se determinó este efecto protector frente a la malaria¹²⁶. PIEZO1 es un canal catiónico mecanosensible no selectivo^{130,131} que traduce los estímulos mecánicos en procesos fisiológicos como el tacto¹³². Juega un papel esencial en la homeostasis del volumen eritrocitario y su disrupción resulta en la lisis de los eritrocitos y su consiguiente anemia¹³³. La variante E756del está producida por la delección de un triplete de nucleótidos del gen PIEZO1 y, por tanto, de uno de sus aminoácidos, manteniendo así el resto de la fase de lectura¹²⁶. Los mecanismos que llevan a la tolerancia frente a la malaria grave aún se desconocen. Una de las hipótesis propuestas es que, dado que E756del es una variante que produce una ganancia de función del canal iónico Piezo1, los eritrocitos con esta variante están deshidratados por un aumento en la entrada de iones a través de este canal y la consecuente expulsión de agua. La deshidratación de los eritrocitos ha demostrado reducir el crecimiento de *Plasmodium*^{126,134,135}, lo que explicaría una reducción en la parasitemia de los individuos E756del. Otras de las explicaciones plausibles son una tolerancia ejercida por el impedimento en la exportación de factores de virulencia, ya que los portadores de E756del en heterocigosis presentan una expresión reducida de la proteína de membrana eritrocitaria PfEMP-1¹²⁷; o bien por la sobrecarga de hierro observada en los individuos portadores de E756del¹³⁶. A pesar de estos indicios sobre su posible mecanismo, resulta

evidente la necesidad de realizar estudios que determinen el mecanismo por el cual esta alteración genética reduce la gravedad de la infección por *P. falciparum*.

Otras de las variantes moleculares descritas como protectoras frente a la malaria son las deficiencias de la enzima piruvato quinasa (PK)¹³⁷⁻¹³⁹. La PK es una enzima que interviene en la glucólisis y cataliza la conversión de fosfoenolpiruvato en piruvato produciendo ATP, una molécula esencial para el mantenimiento de la estructura y función de los eritrocitos¹⁴⁰. El déficit de esta enzima está causado por mutaciones en el gen PKLR¹⁴¹ y es un trastorno común causante de anemia hemolítica congénita cuyo fenotipo clínico es bastante heterogéneo y varía desde una anemia moderada crónica hasta una anemia grave desde el nacimiento que requiere de transfusiones periódicas¹³⁷. Se han encontrado evidencias de que el déficit de PK protege frente a la malaria en modelos animales de infección por *P. chabaudi*¹⁴² o en cultivos de *Plasmodium* con eritrocitos deficientes en PK^{138,139}; sin embargo, su protección frente a la malaria en humanos resulta más compleja de demostrar. A pesar de ello, la búsqueda de esta asociación sigue interesando, ya que la elevada prevalencia de este trastorno en poblaciones africanas¹⁴¹ junto con las evidencias de protección en modelos no humanos hace sospechar que estas variantes ejercen un efecto protector frente a la malaria humana.

2.3. RESPUESTA INMUNITARIA A LA MALARIA EN HUMANOS

La respuesta inmunitaria a la malaria es un proceso complejo y altamente variable entre individuos, atendiendo a factores como la edad, endemidad de la región en la que se encuentran o estado de salud de los mismos^{143,144}. Las primeras exposiciones al parásito resultan en el desarrollo de la enfermedad febril en la práctica totalidad de los casos⁵⁵ debido a la falta de inmunidad adquirida frente al parásito. En regiones endémicas, la inmunidad protectora frente a la malaria se desarrolla únicamente tras años de exposición al parásito⁵⁵, por lo que son más frecuentes los casos de malaria grave o incluso la muerte⁵⁸ en niños menores de cinco años. A partir de dicha edad y hasta el inicio de la adolescencia aproximadamente, la población adquiere inmunidad frente a los síntomas más graves, aunque continúa siendo susceptible a la malaria no complicada, y es finalmente en la edad adulta cuando la mayoría adquiere una inmunidad parcial frente a la infección que evita la aparición de episodios clínicos¹⁴⁵.

Una vez dentro del organismo, *P. falciparum* desencadena los dos mecanismos de respuesta inmunitaria. Una respuesta inmunitaria innata, más rápida, inespecífica y que no mejora tras sucesivas exposiciones al parásito y una respuesta inmunitaria adquirida, más potente tras el contacto reiterado con un antígeno¹⁴⁶. La inmunidad innata constituye la primera línea de

defensa del cuerpo humano frente a los microorganismos¹⁴⁷ y se basa en el reconocimiento de patrones moleculares comunes a muchos patógenos¹⁴⁶. Gracias a ella, se puede emitir una respuesta muy rápida incluso en los primeros contactos con el patógeno. Por otra parte, la inmunidad adaptativa requiere de exposición previa y se basa en el reconocimiento de estructuras específicas de cada patógeno. La especificidad en esta respuesta permite que se genere memoria inmunitaria gracias al uso de un amplio repertorio de receptores para antígenos individualizados¹⁴⁶. La respuesta innata actúa sinérgicamente con la adaptativa e influye en la misma, por ello, las respuestas más efectivas se dan cuando ambos mecanismos actúan conjuntamente^{148,149}.

Ambas respuestas están mediadas por una gran variedad de células originadas en la médula ósea, los leucocitos o glóbulos blancos, y moléculas solubles secretadas por las mismas^{146,147,150,151}. La respuesta innata tiene como principales protagonistas a las células dendríticas, los linfocitos citolíticos naturales (traducido del inglés *Natural killer*, NK), los linfocitos T citotóxicos naturales, los macrófagos, los monocitos y los granulocitos, entre los cuales los neutrófilos son los más relevantes. Por el contrario, la adquirida se clasifica en humoral, mediada por anticuerpos producidos por los linfocitos B, y celular, cuyos principales mediadores son los linfocitos T. Además, el sistema del complemento es un grupo de proteínas séricas que desempeña funciones tanto de inmunidad innata e inflamación como de inmunidad específica. Se activa a través de una reacción en cascada mediante la vía clásica, mediada por anticuerpos, o por la vía alternativa activada por determinadas estructuras comunes de los microorganismos. El complemento tiene como función la opsonización y atracción de fagocitos, el aumento del flujo sanguíneo y de la permeabilidad capilar, la lisis del patógeno y la liberación de mediadores inflamatorios de los mastocitos. Los fagocitos, entre los que se encuentran los monocitos, macrófagos y neutrófilos, son capaces de interiorizar, ingerir y destruir el patógeno tras el reconocimiento de sus estructuras moleculares. Además, junto con los mastocitos, ayudan a inducir inflamación. Los macrófagos también actúan junto con las células dendríticas como células presentadoras de antígenos (APC, por sus siglas en inglés) que muestran en su superficie antígenos de microorganismos patógenos extracelulares, de manera que los linfocitos T puedan reconocerlos y activarse, por lo que son un enlace crucial con la inmunidad adaptativa. Esta presentación de antígenos consiste en la exposición de pequeños fragmentos unidos a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (en los humanos conocido como sistema de antígenos leucocitarios humanos HLA) de tipo II (MHC-II). Las células NK son conocidas como las asesinas naturales y son un elemento fundamental de la respuesta innata. Desencadenan la exocitosis de sus gránulos causando citólisis de las células infectadas al

detectar la ausencia de moléculas del MHC de tipo I (MHC-I), algo muy común en las células infectadas, especialmente por virus, y en células tumorales. Al contrario que estas, todas las células del cuerpo humano expresan MHC-I con antígenos intracelulares unidos (excepto en el caso menos frecuente de la presentación cruzada que permite la presentación de proteínas exógenas por MHC-I).

Los linfocitos T y B son el eje vertebrador de la respuesta adaptativa. Ambos reconocen de forma específica a los antígenos a través de receptores llamados receptor de células T (TCR) y receptor de células B (BCR) respectivamente. Los T maduran en el timo y tienen diversas funciones dependiendo del tipo de linfocito efector en que se diferencie. Existen varios tipos de linfocitos T, cada uno con una función y un mecanismo de acción propio, entre los que describimos los principales y mejor conocidos. Los linfocitos T cooperadores (Th, por sus siglas en inglés) expresan en su superficie la molécula CD4 y se clasifican en tipo 1 (Th1), tipo 2 (Th2), tipo 17 (Th17) y T reguladores (Treg). Los Th1 aumentan la activación de macrófagos que han sido invadidos por un microorganismo capaz de evadir su destrucción. Cuando el linfocito Th1 reconoce antígenos del patógeno expuestos en la superficie del macrófago, le envía una señal estimuladora para que sea capaz de destruir al patógeno fagocitado. Además, tanto las Th1 como las Th2 estimulan la producción de anticuerpos por los linfocitos B contra patógenos extracelulares. Las Th17 desempeñan un papel fundamental en la respuesta contra bacterias extracelulares y hongos activando una respuesta proinflamatoria y reclutando neutrófilos en el lugar de la infección. Por último, los linfocitos Treg son una subpoblación que modula las respuestas inmunitarias regulando o suprimiendo la acción de otras células. Los linfocitos T citotóxicos (Tc) expresan CD8 y son responsables de destruir las células del anfitrión infectadas por patógenos intracelulares. Por otra parte, los linfocitos B maduran en la médula ósea y son los encargados de producir anticuerpos que neutralizan elementos patógenos, entre otras funciones ([ver sección 2.3.1](#)). Por otro lado, los linfocitos B actúan de APC para los linfocitos Th2, quienes activan a su vez al linfocito B haciendo que se divida y diferencie.

Todos estos componentes del sistema inmunitario, tanto de la respuesta innata como adaptativa, están conectados entre sí a través de un sistema de mensajería llevado a cabo por las citocinas o mediante el contacto directo entre moléculas de superficie, con el fin de llevar a cabo una respuesta conjunta y ordenada que acabe con la eliminación efectiva del patógeno. Las citocinas, que son pequeñas proteínas de señalización liberadas por diversas células en el cuerpo, inducen respuestas mediante la unión a receptores específicos celulares.

2.3.1. El linfocito B como parte esencial de la respuesta inmunitaria

Los linfocitos B son un tipo de leucocitos que participan en la respuesta humoral adaptativa frente a patógenos extracelulares. Su función principal es la de producir inmunoglobulinas (Ig), también llamadas anticuerpos, y, en segunda instancia, actuar como APC¹⁴⁶. Las Ig pueden expresarse como receptores de antígeno en la membrana del linfocito B formando el BCR o secretarse como moléculas solubles. En ambos casos son capaces de reconocer un antígeno de tipo proteico, lipopolisacárido o polisacárido de forma muy específica¹⁵⁰. La parte del antígeno que es reconocida específicamente es generalmente una pequeña región de su superficie y se denomina epítipo o determinante antigénico.

Los anticuerpos son proteínas heterodiméricas formadas por cuatro cadenas, dos ligeras que pueden ser de tipo kappa (κ) o lambda (λ), y dos pesadas idénticas entre sí y unidas mediante enlaces disulfuro ([Figura 8](#))¹⁵². Las pesadas determinan el isotipo de anticuerpo y tienen tres dominios constantes (C_H) y uno variable (V_H) y las ligeras están divididas en una región constante (C_L) y otra variable (V_L). Los dos sitios de unión al antígeno están formados por los dominios V_L y V_H en cada brazo del anticuerpo. Por otra parte, la estructura de la Ig también puede dividirse en dos fragmentos de unión al antígeno idénticos que están compuestos por una cadena ligera completa y los dominios V_H y en un fragmento cristalizante que interactúa con distintos receptores de superficie celular y determina la función de cada isotipo ([Figura 8](#)). Existen 5 clases principales de cadena pesada o isotipos: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE.

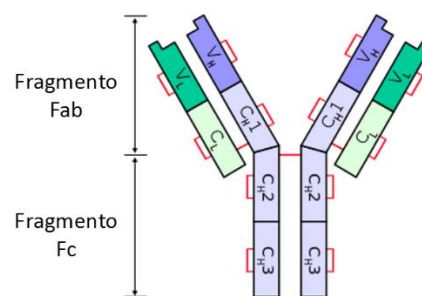


Figura 8 | Diagrama de una inmunoglobulina. Se muestran las cadenas pesadas en azul y las ligeras en verde, así como las regiones variables (V) y constantes (C). Fab, fragmento de unión al antígeno. Fc, fragmento cristalizante.

El repertorio de anticuerpos de cada persona se estima que es del orden de 10^{11} anticuerpos con especificidades diferentes, lo que refleja la enorme diversidad genética de los linfocitos B¹⁵⁰ producto de diferentes mecanismos genéticos que hacen variar la secuencia de aminoácidos del sitio de unión al antígeno (dominios V_H y V_L). Al contrario que las regiones constantes, las

variables no están codificadas por un único segmento génico, sino por dos (V y J) en el caso de las cadenas ligeras o tres (V, D y J) en el caso de las pesadas. En los precursores de linfocitos B, dichos segmentos se encuentran en localizaciones muy separadas^{146,150}, pero durante el proceso de maduración de los linfocitos B en la médula ósea, estos sufren un reordenamiento mediante recombinación somática¹⁵³ en el que un segmento génico V se recombina con uno J dando lugar a una combinación específica VJ. La clave de este proceso es que existen múltiples copias de cada segmento (entre 4 y 40 dependiendo del segmento), pero se selecciona aleatoriamente solo uno de cada tipo. En el caso de la región variable de las cadenas pesadas, el proceso es similar, pero se le añade un grupo de genes extra llamado D, lo que confiere mayor diversidad si cabe al sistema. Este ADN recombinado (VJ o VDJ) resultante se transcribe a ARN y, tras la eliminación de los intrones, se fusiona con un segmento C formando el ARN mensajero maduro que será traducido a la proteína correspondiente. Las células B inicialmente expresan los genes C correspondientes a los isotipos IgM e IgG. Otros de los mecanismos generadores de diversidad es la imprecisión a la hora de unir los exones codificantes de los genes¹⁵⁰. Esta unión no siempre es igual debido a fallos en el proceso de recombinación e implica pequeños cambios en los nucleótidos de cada segmento, lo que produce cambios en los aminoácidos codificados. Mediante este proceso tan complejo se generan millones de linfocitos B distintos, cada uno con un BCR único expresado en su membrana capaz de reconocer un antígeno específico.

Durante el proceso de maduración en la médula ósea^{146,150}, los linfocitos B autorreactivos, es decir, los que reconocen estructuras propias del organismo, son detectados y eliminados. Los linfocitos B vírgenes que finalizan su proceso de maduración salen por la circulación hacia los órganos linfoides secundarios expresando en su membrana IgM e IgD. La activación del linfocito se produce tras el contacto por el BCR con el antígeno y puede ser dependiente o independiente de linfocitos T¹⁵⁴. La mayoría de respuestas son dependientes de señales de linfocitos Th y requieren del reconocimiento del mismo antígeno por parte de las células T. Los antígenos no dependientes, por el contrario, pueden desencadenar una respuesta de linfocitos B sin la participación de los T. En este caso, la unión del antígeno al BCR desencadena una rápida activación del linfocito B mediante una serie de reacciones bioquímicas intracelulares que conducen a la modificación del perfil de expresión de una serie de genes que permitirán al linfocito B desarrollar su función. En ambos casos, la activación dará lugar a la generación de células plasmáticas secretoras de IgM en primera instancia, lo que convierte a este isotipo de anticuerpo en esencial en la respuesta primaria a una infección.

Detallamos a continuación la activación de los linfocitos B por antígenos T-dependientes y las consecuencias en el perfil de anticuerpos que producen, pues esta interacción media la

formación de la mayoría de linfocitos B de memoria y células productoras de anticuerpos¹⁵⁵. El linfocito B debe primero unirse al antígeno por su BCR, internalizarlo y presentar sus péptidos unidos a moléculas MHC-II (papel de APC) a linfocitos Th. Los linfocitos Th entonces emiten citocinas y señales activadoras directas mediante las proteínas de membrana CD40L que se unen a CD40 del linfocito B e inducen que este prolifere en un foco primario de expansión. De esta manera, los linfocitos B son activados por linfocitos Th que reconocen el mismo antígeno (pero no necesariamente mismo epítipo). Esta interacción ocurre en los órganos linfoides secundarios. Tras esta activación, los linfocitos B proliferan durante días y se pueden diferenciar a plasmablastos, células de vida corta secretoras de IgM específicas de baja afinidad¹⁵⁶, a células plasmáticas de larga duración o a linfocitos B de memoria.

Uno de los posibles destinos para las células B activadas es la formación de centros germinales en los órganos linfoides secundarios, que son zonas de división celular en las que los plasmablastos sufren modificaciones importantes a nivel genético a medida que proliferan para mejorar la respuesta primaria a un patógeno. Estas modificaciones son hipermutación somática para llevar cabo una maduración de la afinidad de los anticuerpos por sus antígenos¹⁵⁷ y el cambio de clase de los anticuerpos que expresa. La hipermutación somática consiste en la introducción de mutaciones puntuales en los genes que codifican para las regiones hipervariables, y cuando estas mejoran la afinidad antígeno-anticuerpo, el linfocito es seleccionado y se multiplica, de lo contrario, la célula sería eliminada. Por otro lado, el cambio de isotipo^{146,150,153} ocurre a nivel de las cadenas pesadas gracias a sitios específicos de recombinación en los genes constantes C y da lugar a la producción de IgG, IgA o IgE dejando el linfocito de expresar IgM o IgD. El resultado del cambio de isotipo es un cambio en la función efectora de los anticuerpos manteniendo intacta la especificidad por su antígeno. En este punto, es importante recalcar que la maduración de la afinidad y cambio de isotipo se generan únicamente en los linfocitos B activados por antígenos T-dependientes.

Tras los cambios genéticos de los linfocitos B activados más afines, estos se pueden diferenciar en células plasmáticas productoras de anticuerpos, que migran principalmente a la médula ósea desde donde producen grandes cantidades de anticuerpos, o en linfocitos B de memoria, que recirculan por los órganos linfoides secundarios. Una vez diferenciadas, las células plasmáticas pierden la capacidad de dividirse, cambiar de isotipo, sufrir hipermutación somática y expresar en su membrana Ig o moléculas MHC, centrándose en la producción de anticuerpos. Las células B de memoria expresan anticuerpos de superficie, pero no los secretan. En un adulto, aproximadamente el 40% de los linfocitos B son linfocitos B de memoria, de los cuales la mitad son productores de IgM, con o sin IgD, y la otra mitad de IgG o IgA¹⁵⁸. Ante una segunda

exposición al patógeno, los linfocitos B de memoria generarán una respuesta secundaria mucho más rápida y efectiva y, dado que su afinidad es más alta que la de células B vírgenes y compiten con ellas por el antígeno, serán estas células B de memoria las que reciban las señales activadoras y proliferen rápidamente¹⁴⁶. Tras el reconocimiento secundario, los linfocitos B de memoria se multiplicarán rápidamente y se diferenciarán en células plasmáticas de larga vida productoras de grandes cantidades de anticuerpos de elevada afinidad.

La estimulación de los linfocitos B activados por antígenos T-dependientes también se puede llevar a cabo fuera de los centros germinales en los llamados focos extrafoliculares, lo que proporciona una respuesta de anticuerpos temprana. Las células plasmáticas generadas en los focos extrafoliculares son de vida corta, generan anticuerpos de baja afinidad y carecen de la capacidad de migrar a lugares alejados como la médula ósea. En estos lugares, también se generan células B de memoria independientes del centro germinal que son en su mayoría IgM⁺ dada la capacidad limitada de cambio de isotipo de este tipo de células. Esta respuesta extrafolicular también ayuda a la generación de linfocitos T cooperadores foliculares que migrarán al folículo para la formación del centro germinal. Por otra parte, los linfocitos B activados mediante antígenos T-independientes no producen cambio de isotipo y, por tanto, solo sintetizan IgM. Tampoco generan células de memoria ni maduran en su afinidad.

En el ser humano existen cinco clases de anticuerpos^{146,150,152} denominados IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. La IgG se subdivide a su vez en cuatro subtipos, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 y la IgA en dos, IgA1 e IgA2. La secuencia de la región constante de las cadenas pesadas determina la clase o isotipo de anticuerpo ([Tabla 1](#)) y, por tanto, su función efectora. La IgG es el isotipo más abundante en suero, predomina en la respuesta secundaria y presenta una estructura monomérica cuando se secreta. Sus subclases se nombran por orden de abundancia de los anticuerpos en suero. La subclase IgG1 es la más abundante y está especializada en el reconocimiento de antígenos proteicos y junto con la IgG3 activa eficazmente el complemento y las respuestas proinflamatorias. Por otro lado, la IgG2 reconoce antígenos de tipo polisacárido y la IgG4, la menos abundante, se genera tras infecciones persistentes. La IgM es el primer anticuerpo en producirse en la respuesta primaria y es un gran activador de la vía clásica del complemento. Se secreta con una estructura pentamérica formada por cinco monómeros idénticos unidos a una cadena J o, en raras ocasiones, hexamérica carente de cadena J, y tiene una elevada avidéz por su antígeno gracias a los diez sitios de unión que posee¹⁵⁹. La IgA forma parte esencial de la inmunidad en las mucosas, tracto respiratorio e intestinal, y se secreta en forma de dímero habitualmente. Durante la respuesta secundaria, se encarga de opsonizar los antígenos y activar la fagocitosis. La IgE es la menos abundante y tiene la capacidad de unirse

con elevada avidez a los basófilos y mastocitos tisulares. Su secreción suele asociarse a reacciones alérgicas. Por último, la IgD carece de función efectora y actúa únicamente como receptor de antígenos anclada en la membrana de los linfocitos B.

Tabla 1
Propiedades de los distintos isotipos de Inmunoglobulinas

Tipo de Ig	Cadena pesada	Estructura en suero	Concentración sérica media (mg/mL)
IgG1	γ1	Monómero	9
IgG2	γ2	Monómero	3
IgG3	γ3	Monómero	1
IgG4	γ4	Monómero	0,5
IgA1	α1	Monómero/Dímero	3
IgA2	α2	Monómero/Dímero	0,5
IgM	μ	Pentámero/hexámero	1,5
IgD	δ	Monómero	0,03
IgE	ε	Monómero	0,00005

Obtenido y adaptado de Male, D. *et al.*¹⁴⁶

2.3.2. Respuesta humoral frente a la malaria: producción de anticuerpos específicos de *P. falciparum*

A pesar de que la generación de inmunidad adaptativa frente a *P. falciparum* requiere de la inmunidad tanto celular como humoral, numerosos estudios indican que los anticuerpos frente a la fase sanguínea del parásito son los principales mediadores de la enfermedad y elementos clave de la respuesta inmunitaria protectora^{160,161}. Los mecanismos de acción de los anticuerpos incluyen la inhibición de la invasión de los merozoítos, el bloqueo de la citoadherencia de los eritrocitos infectados a las células endoteliales y una potenciación de la fagocitosis mediada por los monocitos o los macrófagos^{160,161}. Además, la adquisición de anticuerpos específicos frente a *P. falciparum* depende de diversos factores como son la edad del hospedador, la intensidad de transmisión de la región y el tipo de antígeno reconocido^{162,163}. Para que las Ig específicas alcancen un nivel suficiente para generar protección frente a las manifestaciones clínicas de la malaria se necesitan múltiples infecciones^{164,165}, lo que deja a los niños menores de cinco años en una situación de vulnerabilidad frente a la infección. La protección ejercida resulta poco efectiva en comparación con otras enfermedades infecciosas¹⁴⁵ e impide que se alcance una inmunidad esterilizante¹⁶⁶. La elevada variabilidad de los antígenos de *Plasmodium*, la

incapacidad de generar concentraciones de anticuerpos suficientemente altas y la rápida disminución de los niveles de anticuerpos son algunas de las razones por las que resulta compleja la adquisición de inmunidad esterilizante tras la infección natural o la vacunación^{165,167,168}.

Dentro de los distintos isotipos de anticuerpos, la IgG se considera el principal mediador de la protección inmunitaria. En 1961, Cohen *et al.*¹⁶⁹ describieron, por primera vez, que la inmunización pasiva mediante la transferencia de IgG de individuos inmunes a enfermos de malaria reducía de forma drástica la carga parasitaria del enfermo, indicando que las IgG específicas de *P. falciparum* juegan un papel esencial en el control de la fase eritrocítica. También se describió que los bebés tienen cierto grado de tolerancia a los síntomas de la malaria durante los primeros meses de vida debido a la transferencia de IgG de la madre al feto durante el último trimestre de embarazo^{170,171}. Desde que se determinaron estas primeras evidencias, una gran variedad de estudios han ratificado este efecto protector de la IgG¹⁷²⁻¹⁷⁵. Sin embargo, la identificación de la especificidad de las Ig responsables de esta protección continúa siendo un reto.

En ausencia de reinfección, las respuestas inmunoprotectoras frente a *P. falciparum* han demostrado ser de corta duración en comparación con otras enfermedades infecciosas¹⁴⁵. La dificultad en el establecimiento de respuestas protectoras de larga duración frente a la malaria continúa siendo una de las incógnitas que la comunidad científica trata de resolver. La generación de respuestas de larga duración depende tanto de la generación de linfocitos B de memoria como de células plasmáticas de larga duración, un proceso que depende de la colaboración de los linfocitos Th¹⁷⁶. Un estudio realizado por Crompton *et al.*¹⁶⁵ demostró que, en una región con malaria estacional, los niños adquieren una alta concentración de IgG específicas frente a cientos de antígenos de *P. falciparum* durante las épocas en las que hay una elevada transmisión. Sin embargo, estos anticuerpos decaen rápidamente en la época seca cuando, al disminuir la presencia de mosquitos vectores, se reducen también las reinfecciones. A lo largo de los años y las sucesivas reexposiciones a la malaria, los niveles de IgG serológica durante la época seca aumentan hasta que, al alcanzar la edad adulta, se estabilizan durante todo el año. Así pues, se estableció la hipótesis de que la producción de IgG en los niños pequeños estaba mediada principalmente por células plasmáticas de corta duración y que, tras numerosas reinfecciones a lo largo de los años, se aumenta la capacidad de generar células plasmáticas de larga duración. Este tipo de células se inducen tras las respuestas secundarias a la malaria y son el producto de la diferenciación de las células B de memoria¹⁷⁷. De hecho, otros estudios han descrito que algunos de los factores que parecen influenciar la diferenciación a

células plasmáticas de larga duración son las repetidas exposiciones al parásito y el desarrollo de malaria persistente subclínica¹⁷⁸. Un estudio realizado con niños de Gambia demostró que la disminución de las IgG tras la infección era más lenta en los niños mayores de cinco años en comparación con los menores de esa edad y en los niños con malaria subclínica persistente en comparación con los que padecieron malaria clínica¹⁷⁸. Esto indica que la persistencia del parásito en la sangre de los individuos con malaria subclínica genera respuestas humorales más robustas y de mayor duración. Dado que la duración de la respuesta inmunitaria es clave en el control de la malaria, estos datos demuestran que los mecanismos que llevan a la producción de células plasmáticas de larga duración son un elemento decisivo en la adquisición de protección frente a la malaria.

Pese a que la IgG ha sido el centro de la mayoría de los estudios de respuesta humoral frente a *P. falciparum*, investigaciones recientes sugieren que la IgM también juega un papel relevante en la protección frente a la malaria que ha sido subestimado¹⁷⁹⁻¹⁸³. Son crecientes las evidencias que indican que la IgM tiene un papel distinto en la infección por *P. falciparum* en comparación con otras enfermedades infecciosas. Habitualmente, el papel de la IgM queda relegado a la respuesta primaria, ya que se induce rápidamente al inicio de la infección y decae en poco tiempo siendo reemplazada por la IgG tras el cambio de isotipo. Sin embargo, la producción de IgM específica de malaria ha demostrado ser de larga duración, incluso en ausencia de reinfección y tener un papel relevante en la respuesta secundaria a la malaria¹⁸⁴. En cuanto a su mecanismo de acción, la IgM tiene la capacidad de inhibir la invasión de los eritrocitos sanos por los merozoítos y, por tanto, frenar la progresión del ciclo intraeritrocítico gracias a la fijación a la superficie de los merozoítos y a la activación de la vía clásica del complemento¹⁸⁴⁻¹⁸⁶.

En la última década, diversos estudios han demostrado el efecto protector de la IgM en la malaria. En un modelo de ratón con deficiencia de IgM se observó que la infección por *P. chabaudi* incrementaba la susceptibilidad de los ratones frente a la infección, aumentando su parasitemia y mortalidad, y que la transferencia de suero con IgM específica procedente de ratones de tipo silvestre previamente inmunizados reducía de nuevo su carga parasitaria y tasa de mortalidad¹⁸³. Además, estudios realizados con distintas etnias africanas, han demostrado que los niveles de IgM total y específica de *P. falciparum* de la etnia Fulani, caracterizada por tener menor susceptibilidad a la malaria, son superiores a los de otras etnias con misma exposición al parásito^{187,188}.

La capacidad de protección de la IgM específica de malaria es debida a la facultad de *P. falciparum* de generar linfocitos B de memoria productores de IgM de alta afinidad que ha sufrido hipermutación somática¹⁸⁰⁻¹⁸². Estas células han demostrado generar una potente

respuesta ante una infección secundaria de malaria¹⁸² y ser más rápidas en su actuación que los linfocitos B de memoria productores de IgG¹⁸⁰. Además, un estudio reciente ha evidenciado que los linfocitos B de memoria IgM⁺ específicos de la malaria predominan en niños y solo con la edad se produce el cambio de isotipo a IgG¹⁸². Esta observación, además, es específica de la malaria, ya que se realizó el mismo análisis con linfocitos B de memoria específicos de la gripe y se observó que las células IgG⁺ predominan desde la niñez. Así pues, estas células de memoria IgM⁺ son de elevada afinidad y han sufrido el proceso de hipermutación somática al nivel de las IgG⁺ específicas de la gripe y tiene la misma capacidad que la IgG de inhibir el crecimiento de *P. falciparum in vitro* mediante neutralización y fagocitosis de los eritrocitos infectados tras la activación de monocitos.

La IgA juega un papel esencial en la protección de las mucosas¹⁸⁹, sin embargo, su papel en infecciones sanguíneas como la malaria aún se desconoce. Diversos estudios han demostrado que la infección natural por *P. falciparum* desencadena una respuesta IgA gracias a la detección de elevadas concentraciones de esta Ig tanto en suero como leche materna¹⁹⁰⁻¹⁹⁴. El mecanismo por el cual se activa su producción aún se desconoce, sin embargo, se ha descrito que los esporozoítos inducen una respuesta IgA en el sitio de inoculación dérmica¹⁹⁵ y que su producción podría ser inducida tras el contacto de los antígenos del parásito con la mucosa oral¹⁹⁶. A pesar de estas evidencias, todavía no se ha podido demostrar el efecto protector de la IgA específica de *P. falciparum*¹⁹⁷, por lo que probablemente no juegue un papel relevante en el control de la infección.

Además de ser parte esencial de la respuesta inmunitaria, los anticuerpos son herramientas útiles para el control y seguimiento de infecciones. En regiones endémicas de malaria, las repetidas exposiciones al parásito a lo largo de los años generan un incremento en la concentración de las Ig específicas del parásito¹⁹⁸. Este efecto acumulativo convierte a los anticuerpos antimaláricos en marcadores serológicos de la exposición al parásito capaces de definir los niveles de transmisión en una población¹⁹⁹⁻²⁰². Además, el uso de los anticuerpos como marcadores de exposición facilita la identificación de marcadores de protección en regiones con exposición heterogénea a la malaria¹⁹⁸. Entre los distintos isotipos de anticuerpos, el más utilizado como marcador serológico ha sido la IgG²⁰¹, que tiene una correlación positiva con la carga parasitaria²⁰³ y una peor clínica¹⁸⁶ y es un indicador del nivel de transmisión de malaria en una región²⁰⁴. Según se ha descrito, la IgM y la IgA específicas de *P. falciparum* pueden actuar también como marcadores de exposición^{56,60}, sin embargo, escasean los estudios acerca del posible papel de ambas Ig como marcadores serológicos de exposición o protección frente a la infección o las alteraciones clínicas de la misma.

2.3.3. Proteínas antigénicas de *P. falciparum*

La identificación de antígenos inmunogénicos de *P. falciparum* constituye uno de los principales objetivos de la investigación antimalárica, ya que permite ampliar la colección de moléculas candidatas para el diseño de vacunas eficaces y la colección de antígenos de captura para el diagnóstico serológico. Hasta la fecha, entre el gran repertorio de más de 5000 proteínas que tiene *P. falciparum*, únicamente se ha investigado un pequeño set de ellas y todas están asociadas a la IgG. Sin embargo, aunque la IgM tiene ventajas diagnósticas y se ha demostrado su papel protector, los antígenos de malaria reconocidos por la IgM circulante no han sido analizados.

La mayoría de antígenos inmunogénicos de la fase eritrocítica de *P. falciparum* se pueden clasificar en dos grandes grupos: antígenos de superficie altamente variables (VSA, por sus siglas en inglés procedentes de *Variant Surface antigens*), localizados en la membrana del eritrocito infectado, y proteínas de membrana del merozoíto o secretadas por el mismo durante la invasión del eritrocito¹⁶⁶. Algunas de las características intrínsecas de estas proteínas parecen determinar un mayor grado de inmunogenicidad como ser más abundantes, tener mayor grado de polimorfismo y carecer de un ortólogo humano²⁰⁵.

Los VSA son proteínas exportadas a la membrana del eritrocito infectado durante los estadios más maduros de la fase eritrocítica ([Figura 9](#)) y juegan un papel esencial tanto en la patogénesis como en la evasión inmunológica del parásito²⁰⁶. Estos antígenos son altamente variables y suelen ser muy inmunogénicos y, por tanto, buenos candidatos como diana terapéutica o para vacunas²⁰⁷. Se trata de proteínas polimórficas que pertenecen a tres familias multigénicas principales¹⁶⁶; la familia génica *var*, que codifica para las proteínas de membrana eritrocitaria 1 (PfEMP1), la familia *rif* que codifica para las proteínas de repetición intercalada (RIFIN) o la *stevor* que codifica para las proteínas variantes subteloméricas de marco de lectura abierto (STEVOR). Las tres familias de proteínas participan en el proceso de evasión inmune mediante la adhesión de los eritrocitos infectados tanto a las células endoteliales de la microvasculatura como a otros eritrocitos, con la consiguiente formación de rosetas, agregados de eritrocitos que impiden el reconocimiento por parte del sistema inmunitario y su posterior eliminación en el bazo²⁰⁶.

Las PfEMP1 son una familia de proteínas de elevado peso molecular (200-450 KDa) que se expresan en la membrana del eritrocito infectado²⁰⁸. Su principal función es mediar el secuestro de los eritrocitos infectados actuando como ligandos a receptores del hospedador²⁰⁸. Diversos estudios han demostrado que los anticuerpos IgG frente a las proteínas PfEMP1 tienen un efecto

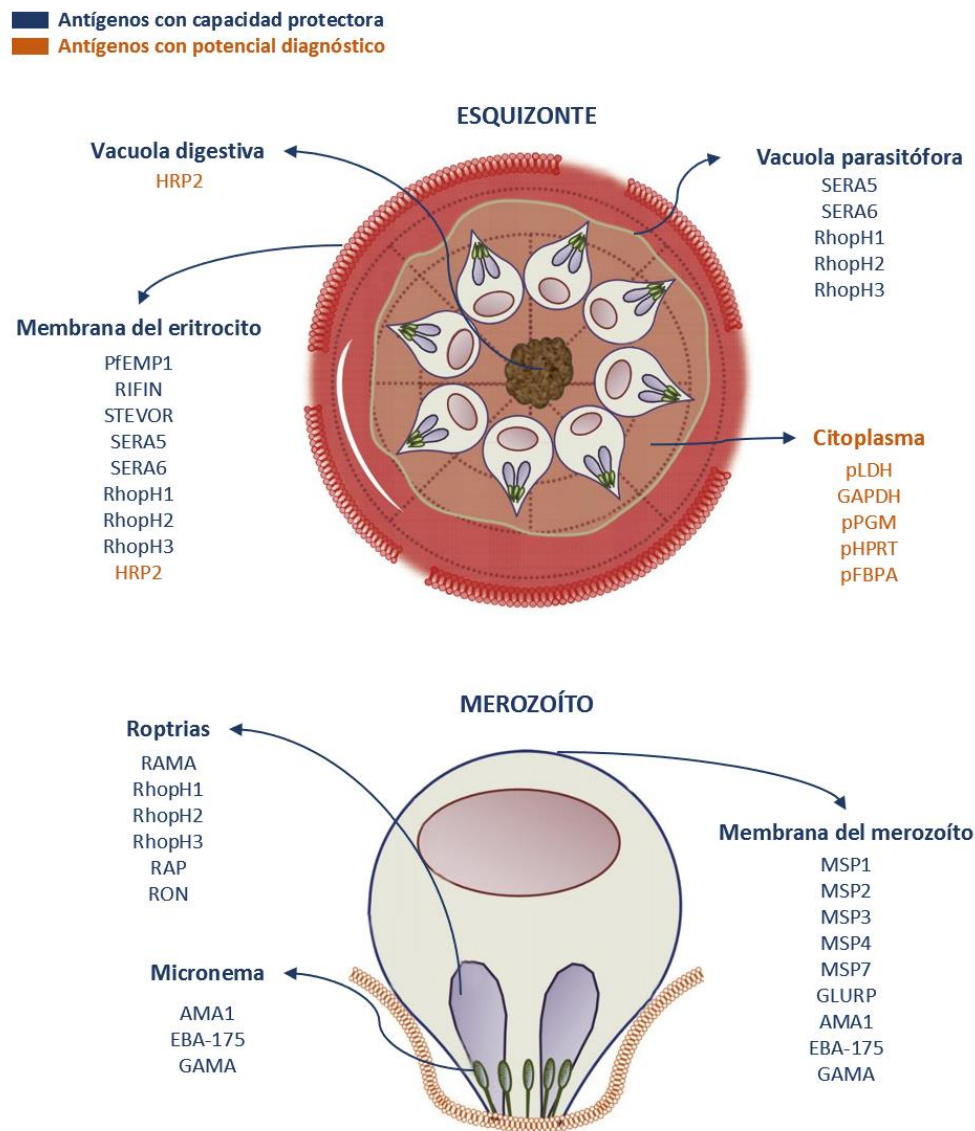


Figura 9 | Localización de los principales antígenos de *P. falciparum* con capacidad protectora o diagnóstica. Se muestran los antígenos localizados en el esquizonte y en el merozoíto con capacidad protectora (azul) o capacidad diagnóstica (naranja). La imagen fue obtenida de Bautista, JM. *et al.*²⁰⁹ y actualizada.

protector frente a la malaria grave²¹⁰⁻²¹³ gracias a, posiblemente, la opsonización y posterior fagocitosis inducida por los anticuerpos o una prevención de la citoaderencia¹⁶⁶ y se consideran las principales dianas de las respuestas protectoras frente a VSA²¹⁴. Por otra parte, las proteínas RIFIN se expresan en la superficie del eritrocito, la parte apical del merozoíto o en el citosol del parásito²¹⁵. Además de participar en los procesos de adhesión, inhiben la activación de ciertos linfocitos B y células NK mediante su unión a receptores asociados a la respuesta inmunitaria²¹⁶. La IgG anti-RIFIN también está asociada a una protección frente a la malaria grave^{213,217} y da lugar a una eliminación más rápida de los parásitos y protección frente a los síntomas²¹⁸. Por

último, las proteínas STEVOR parecen ser las menos estudiadas de los VSA. Su estructura es muy similar a la de las RIFIN y tienen funciones similares en cuanto a evasión inmune y protección inmunitaria²⁰⁷. Por el contrario, esta respuesta inmunitaria puede contribuir también a la rigidez de los eritrocitos infectados y la formación de rosetas^{219,220}, potenciando la evasión inmunitaria.

La invasión de los eritrocitos por parte de los merozoítos constituye una de las etapas más críticas del ciclo parasitario. Por ello, las respuestas inmunitarias frente a los merozoítos, cuya superficie es muy compleja y presenta multitud de antígenos²²¹, han sido el centro de muchos estudios de inmunoprotección²²² ([Figura 10](#)). Los antígenos de merozoíto se clasifican habitualmente según su anclaje a la membrana del mismo en tres grupos. El primero de ellos son los antígenos anclados gracias al glicosilfosfatidilinositol (GPI), que sirve de unión entre la proteína y la superficie del merozoíto²²³. Entre ellas, se encuentran algunas proteínas de superficie del merozoíto, de las roptrias y del micronema²²¹ ([Figura 9](#)). Entre las no asociadas a GPI también hay proteínas de relevancia inmunológica que se pueden clasificar en dos grandes grupos: proteínas transmembrana o asociadas a la periferia del merozoíto²²¹, es decir, presentes en su entorno próximo.

Las proteínas de superficie del merozoíto (MSP) son buenos inmunógenos y, entre ellas, encontramos diversos candidatos a vacuna como MSP1, la más abundante de ellas, MSP2 o MSP3. Estos antígenos han demostrado desencadenar una respuesta inmunoprotectora²²⁴, lo que ha llevado a la realización de ensayos clínicos para evaluar su potencial como inmunógenos²²⁵⁻²²⁸. Sin embargo, el nivel de protección ejercido parece ser más débil que el de las proteínas del micronema o las roptrias^{222,229} ([Figura 10](#)). Las roptrias son parte de los orgánulos secretores de los merozoítos, participan en la formación de la vacuola parasitófora y son elementos clave en la invasión²⁰⁹. Sus proteínas son unos de los antígenos con mayor capacidad de inmunoprotección²²². Entre ellas, el antígeno de membrana asociado a las roptrias (RAMA) es el único anclado a GPI y está asociado a una fuerte protección²²². El complejo RhopH es un complejo de proteínas de elevado peso molecular que comprende las proteínas RhopH1, RhopH2 y RhopH3 y está implicado en la invasión y la citoadherencia a la microvasculatura^{230,231}. Este complejo se distribuye por la vacuola parasitófora²³⁰ y se transfiere a la membrana de eritrocito y al citoplasma del hospedador después de la invasión. Algunos estudios han sugerido que los antígenos RhopH son buenos candidatos a vacunas, ya que inducen inmunidad protectora^{230,232}. Finalmente, las proteínas asociadas a las roptrias (RAP) y las proteínas del cuello de las roptrias (RON), son también altamente inmunogénicas²²². Por otro lado, el micronema es un orgánulo secretor localizado en la parte apical del parásito y especializado en la invasión del eritrocito²³³ y su principal antígeno inmunoprotector es el antígeno del

micronema anclado a GPI (GAMA), esencial en la invasión²³⁴. Las IgG frente a GAMA inhiben la invasión en función de la dosis, lo que lo convierte en un buen candidato a vacuna²³⁵.

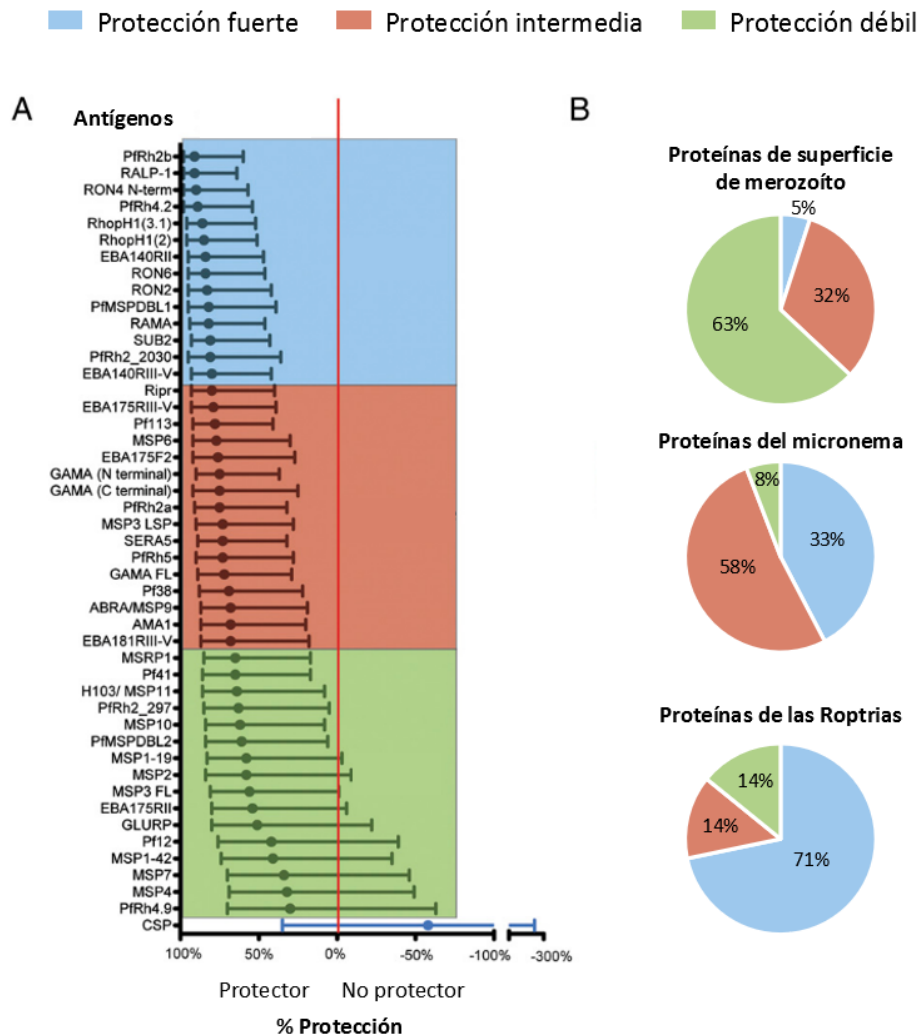


Figura 10 | Antígenos de merozoíto asociados a protección frente a la malaria sintomática. A, Asociación entre las IgG y la protección frente a la malaria sintomática para cada antígeno analizado en una cohorte de 206 niños procedentes de Papúa Nueva Guinea. Los antígenos están clasificados por la fuerza de su asociación con protección en protección fuerte (azul), intermedia (rojo) y débil (verde). El porcentaje de protección se calculó mediante el cociente de riesgos instantáneos (traducido del inglés *Hazard ratio*, HR) calculado mediante una regresión de Cox comparando los niños con niveles altos vs. bajos de IgG específica de cada antígeno. Los círculos indican el porcentaje de protección y las barras de error indican el intervalo de confianza del 95%. La línea vertical roja indica el porcentaje de protección = 0% (HR = 1). B, porcentaje de antígenos asociados a cada nivel de protección según la ubicación del antígeno dentro del merozoíto clasificados en proteínas de superficie del merozoíto (n = 19), proteínas del micronema (n = 12) y proteínas de las roptrias (n = 14). Obtenido y adaptado de Richards, J. *et al.*²²².

Entre las proteínas transmembranales del merozoíto se encuentran AMA1 y EBA-175²³⁶, proteínas secretadas por el micronema que son posteriormente localizadas en la membrana del merozoíto²²¹. Ambos antígenos son esenciales en la invasión del eritrocito y las IgG frente a ellas

han demostrado proteger frente a la infección mediante el bloqueo de la invasión^{224,237,238}. Por ello, el estudio de las respuestas inmunoprotectoras frente a estos antígenos ha alcanzado la fase de ensayo clínico para evaluar su potencial como candidatos a vacuna^{239,240}. Por último, las proteínas asociadas a la periferia del merozoíto son proteínas que carecen de dominios transmembrana y anclajes GPI, por lo que no se encuentran ancladas directamente a la superficie. Entre ellas se encuentra la familia de proteínas ricas en serina (SERA), proteínas expresadas en los estadios maduros del esquizonte y que se localizan en la vacuola parasitófora²²¹. Su función no está del todo clara, pero se cree que son responsables de la escisión proteolítica necesaria para la salida del merozoíto del esquizonte²⁴¹. Los ensayos clínicos realizados con los antígenos SERA5 y SERA6 han demostrado su efecto inmunoprotector^{242,243}. La proteína rica en glutamato (GLURP) se expresa en la superficie del merozoíto y, a pesar de que la IgG frente a ella no parece impedir la invasión, sí median la inhibición del crecimiento del parásito en cooperación con los monocitos²⁴⁴.

Lamentablemente, a pesar de haber este amplio repertorio de antígenos de la fase eritrocítica capaces de desencadenar una respuesta inmunoprotectora, ninguno de ellos ha demostrado ejercer una protección esterilizante frente a la malaria de forma individual. Así pues, resulta evidente la necesidad de explorar en mayor profundidad este campo e incluir el análisis de combinaciones de antígenos a la hora de elaborar nuevas vacunas.

Uno de los principales intereses de la comunidad científica es la mejora de los sistemas diagnósticos de malaria ([Ver sección 2.1.5](#)). Sin embargo, hasta la fecha, solo unos pocos antígenos de *Plasmodium* se han probado como herramientas diagnósticas. En este sentido, la identificación tanto de antígenos como de sus anticuerpos específicos que puedan servir de marcadores de infección juega un papel esencial. Actualmente, la mayoría de TDR de malaria están basados en la detección de la proteína rica en histidina 2 (HRP2), la lactato deshidrogenasa (LDH) de *P. falciparum*²⁴⁵ o, ambas proteínas al mismo tiempo²⁴⁶ ([Figura 9](#)). La HRP2 es una proteína específica de *P. falciparum* muy abundante en la fase eritrocítica y se caracteriza por tener regiones altamente repetitivas contra las que es sencillo generar anticuerpos²⁴⁷. Ha sido la diana diagnóstica principal desde los años 90, cuando se generaron los primeros TDR^{248,249}. Sin embargo, se ha demostrado que en diversas localizaciones de Sudamérica y algunas de África subsahariana y Asia, algunos aislados de *P. falciparum* carecen de los genes *pfhrp2* que codifican para esta proteína y, por tanto, carecen de la misma²⁵⁰, lo que conduce a la aparición de falsos negativos en los diagnósticos. Estos problemas encontrados en los test basados en la detección de HRP2 se suplieron con la elaboración de test de detección de LDH, una enzima clave en el metabolismo anaeróbico de *Plasmodium*²⁵¹ y que está altamente conservada entre sus distintas

especies²⁵². Es por ello que sirve como buen marcador diagnóstico de la malaria independientemente de la especie que la cause. Dada la baja sensibilidad de los TDR basados en estos antígenos²⁵³, la búsqueda de marcadores de infección continúa. Un estudio realizado con niños de Gambia con distintos niveles de gravedad de malaria e individuos no infectados, detectó la presencia de las proteínas pHPRT, pPGM, pLDH y pFBPA como marcadores de malaria grave²⁵⁴. Estos, junto con la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH)²⁵⁵, parecen ser los antígenos citoplasmáticos más prometedores para realizar diagnóstico de la infección.

El diagnóstico mediante la detección de anticuerpos serológicos continúa constituyendo un reto. La mayoría de anticuerpos específicos de *Plasmodium*, especialmente la IgG, continúan siendo detectables en suero más allá de la curación de la infección y pueden dar lugar a la aparición de falsos positivos en individuos que han experimentado malaria previamente^{201,256,257}. Por ello, la IgG suele ser utilizada como marcador de exposición a la malaria en lugar de marcador de diagnóstico. Sin embargo, un estudio realizado en 2008, determinó que el diagnóstico de *P. vivax* mediante la detección de IgM específica de la región C-terminal de la proteína MSP1 era posible y que no se veía afectada por los anticuerpos de memoria generados por exposiciones previas²⁵⁸. Este ensayo demostró una sensibilidad del 97% y su efectividad fue independiente de la parasitemia, manteniendo la sensibilidad en los portadores de baja carga parasitaria. A pesar de este resultado prometedor, hasta la fecha en la literatura no se ha encontrado ningún ensayo de identificación de antígenos que generen respuestas IgM que sirvan como diana diagnóstica de *P. falciparum*, una vía que parece necesario investigar.

Por otra parte, gracias a la capacidad de los anticuerpos de persistir durante meses o años tras la infección, se pueden utilizar como marcadores menos dependientes de la estacionalidad en el momento de la toma de la muestra²⁰¹. Numerosos estudios han determinado conjuntos de antígenos cuyas respuestas inmunitarias sirven como marcadores de exposición a la malaria²⁵⁹⁻²⁶¹. Entre los más novedosos, un estudio realizado con niños de Uganda seleccionó un panel de antígenos asociados a la exposición reciente a la malaria²⁶² que constituían marcadores de exposición a la malaria de mayor precisión.

3. OBJETIVOS



La malaria continúa siendo una de las enfermedades infecciosas que causa mayor morbilidad y mortalidad en el mundo. Según la presentación clínica en el ser humano, la infección por parásitos del género *Plasmodium* se clasifica tradicionalmente en malaria grave y malaria no complicada. Los síntomas de la malaria no complicada son inespecíficos como fiebre, dolor de cabeza, fatiga o náuseas. Sin embargo, en los casos graves, se puede desarrollar anemia grave, inflamación y daño cerebral, fallo hepático o renal, esplenomegalia o, en mujeres gestantes, malaria placentaria. Estas formas graves de la enfermedad ponen en riesgo la vida de muchas de las personas infectadas, pero muy especialmente la de niños menores de 5 años.

Además de estos cuadros clínicos de mayor o menor gravedad, también es común el desarrollo de malaria subclínica, caracterizada por tener bajos niveles de parasitemia y ausencia de sintomatología. Esta forma oculta de malaria es común en la población adulta y constituye un problema epidemiológico de elevadas dimensiones, ya que es un tipo de infección que, al no manifestarse, es difícilmente detectable, lo que además garantiza un reservorio para el ciclo infeccioso entre el vector mosquito y el ser humano, estableciéndose así un endemismo constante de la enfermedad.

Todavía resulta una incógnita la identificación de todos los factores que determinan que un individuo se mantenga semi-protégido y desarrolle malaria subclínica en lugar de malaria clínica grave o no complicada. Los factores principales que parecen influir en la gravedad de la infección son el desarrollo de inmunidad adaptativa, influida por la edad o el estado de embarazo, y la genética individual gracias a la selección positiva de algunos polimorfismos genéticos que confieren tolerancia a la malaria en las poblaciones humanas de regiones históricamente endémicas.

En este contexto multifactorial, la identificación de biomarcadores de tolerancia a la malaria, tanto inmunitarios como genéticos, que permita identificar dianas de protección inmunológica y de diagnóstico del estado infeccioso subclínico, constituye un objetivo científico primordial para contribuir a eliminar esta enfermedad.

Las estrategias actuales de control y erradicación de la enfermedad se enfrentan a la ausencia de vacunas efectivas y de sistemas de diagnóstico suficientemente sensibles y asequibles al mismo tiempo. En el año 2021, la OMS recomendó a los países endémicos de malaria la vacuna antimalárica RTS,S/AS01, que es la única aprobada, pero de la que no hay ningún plan o estrategia nacional o internacional que garantice su aplicación en las poblaciones afectadas. Además, su baja efectividad, en torno al 30%, junto con las cuatro dosis necesarias

en niños menores de un año, hace necesario seguir investigando en el desarrollo de productos vacunales de mayor eficacia.

En cuanto a los sistemas diagnósticos, actualmente contamos con sistemas muy sensibles para detectar la presencia del parásito como la PCR. Sin embargo, debido al coste de reactivos y equipamientos y a que requiere de personal especializado, su uso en regiones endémicas de bajos recursos resulta, por ahora, inviable para su empleo diagnóstico amplio. Es por ello que, en estos lugares, el diagnóstico de malaria se realiza habitualmente mediante microscopía o TDR, cuya implantación es elevada a pesar de poseer una sensibilidad bastante limitada.

Para abordar esta problemática en relación con la inmunoprevención y el diagnóstico de la malaria, sigue habiendo estudios enfocados a la identificación de antígenos de *Plasmodium* que permitan incrementar el número de candidatos tanto para el desarrollo de vacunas con aquellos que favorezcan una respuesta protectora, como para ser usados en el diagnóstico serológico. Todos los estudios realizados con esta perspectiva se han centrado en los antígenos reconocidos por IgG. Sin embargo, aún se desconoce la mayoría del repertorio antigénico reconocido por IgM que, por su capacidad anti-*Plasmodium* demostrada, permitiría aumentar el número de candidatos para vacunación y diagnóstico.

Con estas carencias y necesidades para combatir la malaria en mente, en la presente tesis doctoral nos planteamos cinco objetivos principales:

- ❖ 1. Estimar la prevalencia de la infección por *P. falciparum* en regiones endémicas de malaria y determinar si la edad o el estado de embarazo de los individuos influyen en el grado de parasitemia adquirido.
- ❖ 2. Determinar la potencial asociación entre el estado inmunitario humoral de habitantes de regiones endémicas y su estado infeccioso.
- ❖ 3. Evaluar la prevalencia poblacional en estas regiones endémicas de una serie de polimorfismos que han sido descritos como protectores frente a la malaria y determinar si en los individuos que las portan existe relación con la gravedad de la infección.
- ❖ 4. Descubrir los antígenos de *P. falciparum* reconocidos por IgM y analizar si el repertorio antigénico se modifica por la edad o el estado infeccioso.
- ❖ 5. Identificar los epítomos inmunodominantes de los antígenos descubiertos y analizar su potencial como marcadores de diagnóstico serológico o inmunoprotección.

4. MATERIALES Y MÉTODOS



4.1. MUESTRAS CLÍNICAS

A lo largo de este trabajo de tesis se han utilizado muestras clínicas de sangre y/o plasma de tres conjuntos de sujetos: habitantes de Ghana, de RDC e individuos con malaria importada ([Figura 11](#)), es decir, personas procedentes de regiones endémicas de malaria en África cuya infección ha sido diagnosticada por el sistema de salud español y que se han infectado al viajar a sus países de origen. Cada uno de estos sets de muestras han sido empleados en distintos ensayos que se detallan en la [tabla 2](#).



Figura 11 | Lugar de recogida de los tres sets de muestras utilizados a lo largo de la tesis. Se recogieron muestras de sangre y/o plasma en Ghana, RDC y en España correspondientes a casos de malaria importada.

Tabla 2

Relación de ensayos en los que se ha utilizado cada set de muestras

Ensayo	Ghana	RDC	Malaria importada
Infección por <i>P. falciparum</i>	X	X	
Comparación de métodos de diagnóstico	X		
Estado inmunitario	X		
Alteración de parámetros hematológicos	X		
Tolerancia genética a la malaria	X	X	
Identificación de antígenos IgM	X		
Identificación de epítomos IgM			X

4.1.1. Ghana

Las muestras procedentes de Ghana se recogieron en el hospital *Our Lady of Grace* de Breman-Asikuma, una localidad rural situada en la región central de Ghana catalogada como de alta transmisión de malaria durante todo el año y en donde el 100% de las infecciones por malaria declaradas están causadas por *P. falciparum*²⁶³. Las muestras se tomaron en mayo de 2017 durante la temporada de lluvias, cuando la transmisión del parásito de la malaria alcanza su punto máximo. Se consideró elegible a todo paciente que acudía al hospital sin distinción de edad, sexo o motivo de consulta. Así pues, se reclutaron un total de 200 donantes voluntarios de los que se recogieron 200 muestras de sangre y 195 de plasma debido a la escasez de volumen de muestra en cinco de los participantes. Dado que la conservación de sangre o plasma en formato seco permite realizar el transporte y almacenamiento de muestras a temperatura ambiente y que ha demostrado ser un tipo de muestra adecuado para extraer posteriormente ADN o proteínas²⁶⁴⁻²⁶⁶, las muestras se conservaron en formato de manchas de sangre seca (DBS, *dried blood spot*) o manchas de plasma seco (DSS, *dried serum spot*). De cada individuo se tomaron 2 mL de sangre periférica mediante venopunción y se conservaron 600 µL en forma de sangre seca, que se dispuso en forma de 12 DBS de 50 µL en tarjetas de papel de filtro Whatman FTA *classic* (GE Healthcare) ([Figura 12](#)). El plasma se obtuvo centrifugando la sangre restante y se generaron 12 DSS de forma similar a la sangre. Todas las tarjetas se secaron al aire durante 12 horas y se almacenaron a temperatura ambiente de forma individual en bolsas selladas con desecante.

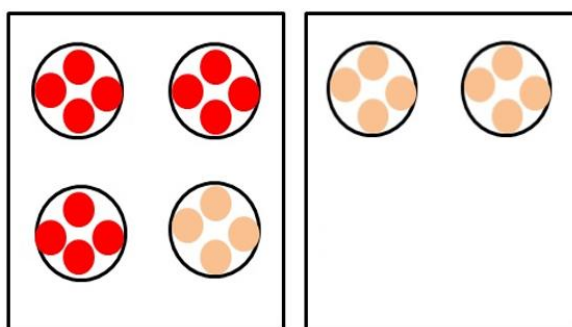


Figura 12 | Disposición de las muestras de sangre y plasma en tarjetas FTA. Para la recogida de muestras se utilizaron dos tarjetas FTA por individuo y se dispusieron en ellas 600 µL de sangre completa distribuidos en 12 DBS de 50 µL y 600 µL de plasma dispuestos de la misma forma.

4.1.2. RDC

En RDC se recogieron un total de 224 muestras de sangre completa en formato seco utilizando el mismo procedimiento que en las muestras de Ghana. Estas muestras se recogieron en marzo del 2019 en cinco hospitales de Mbuji-Mayi (Hospital General de Dipumba, Institut Supérieur De Technique Medical, Hospital General de Kansele, Centre Hospitalier Notre-Dame y Centre Hospitalier Kitenge), una ciudad situada en el centro-sur de RDC cuya transmisión de malaria es elevada y es causada en el 100% de los casos por *P. falciparum*²⁶⁷. Para la selección de donantes se siguieron los mismos criterios de aleatoriedad que en Ghana.

4.1.3. Malaria importada

El último set de muestras consistió en un total de 35 muestras de plasma recogidas en una red de hospitales españoles, entre los que se encontraron el Hospital 12 de Octubre, el Hospital de Fuenlabrada, El Hospital Príncipe de Asturias, el Hospital Universitario Fundación Alcorcón, el Hospital Gregorio Marañón, el Hospital San Pedro y el Hospital Severo Ochoa. En estas localizaciones, el criterio de selección de participantes fue cualquier individuo mayor de 18 años procedente de una región endémica de África, independientemente de su estado de infección por malaria. A todos los individuos se les realizó diagnóstico de malaria mediante microscopía, gota gruesa o extensión fina, en su hospital correspondiente, y se confirmó mediante diagnóstico molecular por PCR. En base a su resultado, se les clasificó en individuos no infectados (NI), individuos con malaria submicroscópica (MS), es decir, positivos por PCR, pero negativos por microscopía, e individuos con malaria microscópica (MM), positivos por ambas técnicas. Las 35 muestras de plasma se emplearon en los ensayos de identificación de epítomos de *P. falciparum* reconocidos por IgM (11 NI, 12 MS y 12 MM). A las 35 muestras se añadieron dos controles de plasma de individuos europeos no expuestos previamente a la malaria (NE), dando lugar a un total de 37 muestras en este set.

4.2. DETERMINACIÓN DEL ESTADO INFECCIOSO E INMUNITARIO DE INDIVIDUOS PROCEDENTES DE REGIONES ENDÉMICAS DE ÁFRICA

Uno de los primeros objetivos del presente trabajo de tesis fue determinar el estado de infección por *P. falciparum* de habitantes de regiones endémicas de malaria de Ghana y RDC y analizar si el nivel de parasitemia o la prevalencia de malaria variaban en función de la edad de

los individuos o el estado de embarazo. Posteriormente, se determinó el estado inmunitario de los individuos procedentes de Ghana a través de la cuantificación de las Ig tanto totales como específicas de *P. falciparum* y se asoció con el estado infeccioso y la edad de los mismos.

4.2.1. Diagnóstico de malaria y estimación de la parasitemia

El diagnóstico de la infección por *P. falciparum* en las muestras de sangre procedentes de Ghana y RDC se realizó mediante PCR cuantitativa. Además, con el fin de comparar esta técnica de diagnóstico con la empleada en el hospital local de Ghana, el TDR, se recopilaron los datos de diagnóstico y estimación de la parasitemia del hospital *Our Lady of Grace* de Ghana.

4.2.1.1. Detección de *P. falciparum* mediante PCR cuantitativa

Para diagnosticar la presencia de *P. falciparum* y estimar la parasitemia en las muestras de sangre procedentes de Ghana y RDC, se extrajo el ADN de una DBS de cada individuo y se realizó una PCR cuantitativa con el fin de amplificar y detectar la presencia de un fragmento de un gen de *P. falciparum*. La extracción de ADN a partir de las DBS se realizó con el kit *InstaGene Whole Blood Kit* (Bio-Rad) siguiendo el método descrito por Chaorattanakawee, *et al.*²⁶⁵. Para ello, se recortó de cada DBS un fragmento de unos 5 mm de diámetro con un sacabocados estéril. Este fragmento se incubó durante toda la noche embebido en 200 µL solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril a 4 °C. Posteriormente, el tubo se centrifugó a 14 000 g durante dos minutos. Tras descartar el sobrenadante, se volvieron a añadir 100 µL de PBS estéril y se retiró de nuevo el sobrenadante. Se añadieron entonces 60 µL de la matriz *InstaGene*, una matriz que contiene un 6% de resina *Chelex* que captura los iones metálicos polivalentes de la solución, evitando que interfieran con la amplificación posterior por PCR. El DBS embebido en *InstaGene* se incubó durante ocho minutos a 70 °C, se agitó con vortex durante 15 segundos, se hirvió a 100 °C durante cuatro minutos y se volvió a agitar durante 15 segundos. Por último, tras centrifugar a 14 000 g durante un minuto, se recogió el sobrenadante que contenía el ADN purificado. Para mejorar la pureza del ADN extraído, esta secuencia de purificación se realizó una segunda vez volviendo a añadir 60 µL de *InstaGene* sobre el sobrenadante recogido y repitiendo el proceso anterior.

El ADN extraído sirvió como molde para la amplificación mediante PCR del gen Pf-18S rRNA y de un fragmento del gen de la GAPDH, cuya expresión es constitutiva y, por tanto, sirve como control positivo de la extracción de ADN y para normalizar la concentración de ADN tras la

extracción. Para la amplificación del gen Pf-18S se siguió el método descrito por Rantala, *et al.*²⁶⁸. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 25 μ L mezclando los siguientes componentes: 250 nM de cebador directo (5' ATTGCTTTTGAGAGGTTTGTACTTT 3'), 250 nM de cebador reverso (5' GCTGTAGTATTCAAACACAATGAACTCAA 3'), 12,5 μ L de Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific), 1,5 μ L de sonda (FAM-CATAACAGACGGGTAGTCAT), 6,5 μ L de agua y 2 μ L de ADN extraído. Para las reacciones de amplificación de GAPDH se mezclaron los siguientes componentes: 12,5 μ L de Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific), 1,25 μ L de una mezcla comercial de cebadores y sonda para GAPDH (Hs02786624_g1, Thermo Fisher Scientific), 9,25 μ L de agua y 2 μ L de ADN. Ambas reacciones de PCR se realizaron por duplicado y, con el fin de comprobar la ausencia de contaminaciones, cada ronda de amplificación se acompañó de un control negativo en el que se sustituyó el ADN molde por 2 μ L de agua. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador y detector de secuencias ABI 7000 (Applied Biosystems) siguiendo las condiciones de ciclado: 95 °C durante 10 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 30 segundos. Para estimar la parasitemia de cada muestra se utilizaron los valores medios del ciclo umbral (CT) de los duplicados de cada muestra y se interpolaron en una recta patrón realizada a distintas parasitemias comprendidas entre 160 000 y 19,53 parásitos/ μ L.

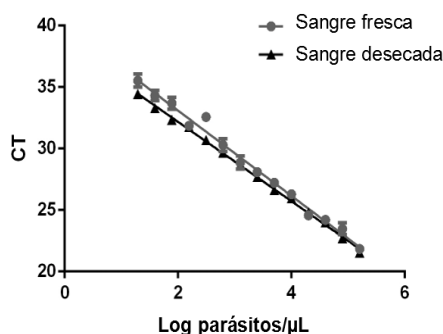


Figura 13 | Comparación de recta patrón de distintas parasitemias de *P. falciparum* obtenida con sangre fresca o tras su desecación.

La recta patrón se elaboró mediante diluciones seriadas de cultivos de la cepa Dd2 de *P. falciparum* realizados siguiendo el protocolo descrito por Radfar, A. *et al.*²⁶⁹ en PBS y manteniendo el hematocrito medio de los pacientes (35%), simulando así la composición de la sangre humana. Estas muestras se desecaron del mismo modo que las muestras de sangre de los individuos procedentes de regiones endémicas ([ver sección 4.1.1](#)) y se extrajo el ADN de la

misma manera. Para descartar la posible pérdida de ADN en la extracción a partir de tarjeta en comparación con la sangre fresca, se elaboró la misma recta patrón extrayendo el ADN directamente de la sangre sin desecar y se pudo observar que los valores de CT eran muy similares ([Figura 13](#)). Por ello, y por la mayor similitud con las muestras problema, se seleccionó la recta patrón con sangre desecada. Una vez obtenida la recta patrón, se interpolaron los valores de CT de las muestras problema para determinar su parasitemia.

4.2.1.2. Detección de *P. falciparum* mediante TDR y microscopía y recuentos sanguíneos en hospital local

El método de diagnóstico de malaria rutinario en el hospital de Ghana donde se recogieron las muestras es el TDR. Por ello, y para poder comparar los resultados que arroja este método de diagnóstico con la PCR, el método estándar utilizado en nuestro laboratorio, se recopilaron los resultados diagnósticos en el hospital local. Allí, las muestras de sangre fresca se analizaron mediante la prueba rápida Paracheck® *Rapid Test for P. falciparum malaria* (Viola Diagnostic Systems). En caso de ser positivas, se confirmó el diagnóstico mediante observación por microscopía de frotis de sangre de gota gruesa. Para ello, se colocó una gota de sangre en un portaobjetos y, tras secarse al aire, se tiñó durante 10 minutos en Giemsa diluido 1:9 en agua destilada. Posteriormente, se realizó un recuento del número de parásitos/leucocito y con el dato de concentración de leucocitos en sangre de cada paciente se estimó el número de parásitos/ μL . En los casos en los que no se disponía del dato individualizado de concentración de leucocitos, se utilizó la media estimada para la población de 8000 leucocitos/ μL . Todos los recuentos hematológicos de los pacientes, entre los que se encuentran la concentración de leucocitos, Hb y plaquetas y los porcentajes de neutrófilos, linfocitos y monocitos, fueron obtenidos mediante el analizador hematológico SYSMEX KX-21.

4.2.2. Cuantificación de inmunoglobulinas

La cuantificación de Ig totales y específicas de *P. falciparum* de las muestras de plasma procedentes de Ghana se realizó mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). En el caso de las Ig específicas, la estrategia consistió en la realización de cultivos de *P. falciparum*, cuyas proteínas fueron extraídas y sirvieron para recubrir los pocillos de placas de ELISA. Tras incubar con el plasma, los anticuerpos específicos de las proteínas de *P. falciparum* quedaron retenidos y, tras la incubación con un anticuerpo secundario específico del isotipo de Ig a determinar conjugado con peroxidasa de rábano (HRP), se reveló su presencia ([Figura 14A](#)).

Por otra parte, la cuantificación de las Ig totales se realizó mediante un ELISA tipo sándwich en el que un anticuerpo primario específico del isotipo de Ig a determinar se fijó en las placas de ELISA. Posteriormente, tras incubarlo con la muestra de plasma, quedaron adheridos los anticuerpos de ese isotipo que fueron revelados con un anticuerpo secundario conjugado con HRP ([Figura 14B](#)).

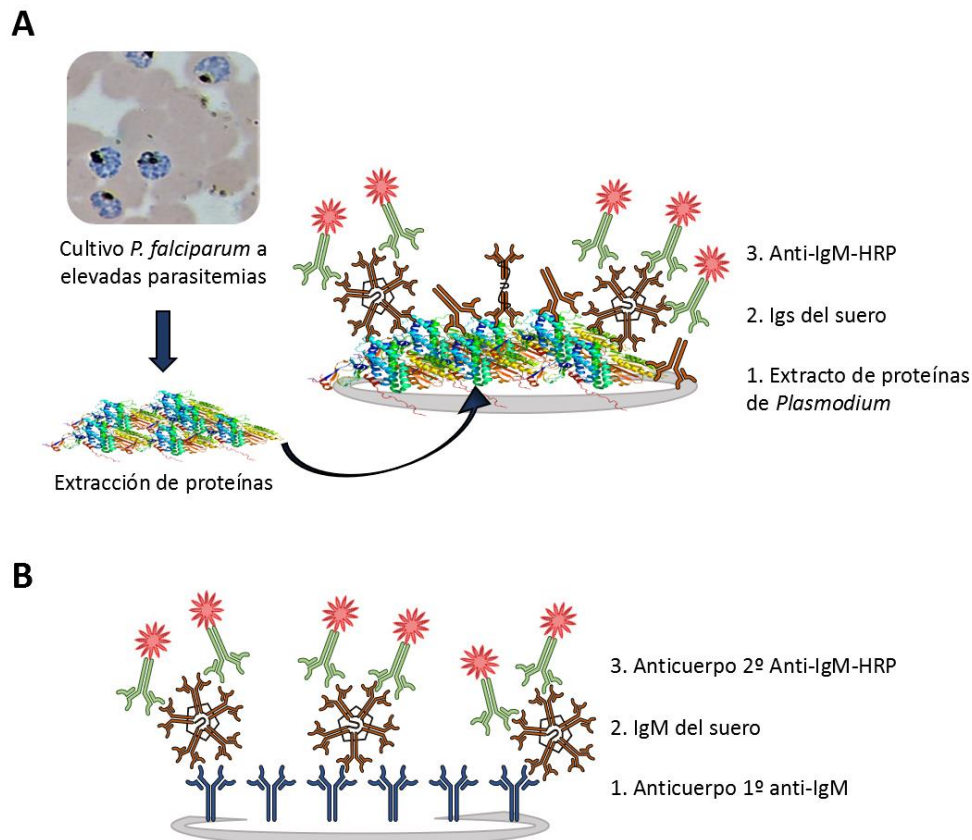


Figura 14| Modelo de ELISA para cuantificación de Ig específica de *P. falciparum* y total. A, modelo de ELISA de Ig específica. El diseño se basó en la capacidad de los anticuerpos específicos de unirse a sus antígenos. Por ello, se realizaron cultivos de *P. falciparum* a elevadas parasitemias y se extrajeron sus proteínas que sirvieron de recubrimiento para las placas de ELISA. Una vez unidas las proteínas a la base de la placa, se incubó con el plasma de los donantes, de forma que sus anticuerpos específicos quedaron adheridos a sus antígenos. Por último, se reveló con un anticuerpo específico del isotipo de Ig, en este caso IgM, conjugado con HRP. **B,** modelo de ELISA de Ig total tipo sándwich. Se adhirió el anticuerpo 1º específico del isotipo de Ig, en este caso IgM, a los pocillos de las placas de ELISA. Posteriormente, tras incubarlo con el plasma de los donantes, quedaron adheridos los anticuerpos serológicos que se revelaron con un anticuerpo 2º conjugado con HRP.

Los extractos de proteínas de *P. falciparum* obtenidos a partir de cultivos se utilizaron en diversos ensayos a lo largo de este trabajo de tesis, entre los que se incluyen la estimación de la concentración de Ig específicas de *P. falciparum* y la identificación de antígenos de *P. falciparum*

reconocidos por IgM. Para obtener el extracto proteico, se cultivó el aislado clínico de *P. falciparum* UCM7²⁷⁰ de África Occidental siguiendo el método descrito anteriormente por nuestro grupo²⁶⁹. Los cultivos se recolectaron cuando alcanzaron el estado de esquizonte maduro y una parasitemia de más del 25% y se mezclaron con saponina/PBS al 0,05% (p/v) durante 5 minutos a temperatura ambiente para lisar los eritrocitos. Los parásitos se recogieron por centrifugación a 20 000 g durante 12 minutos a 4 °C y, después de tres lavados en PBS frío, el pellet de parásitos se resuspendió en tres volúmenes de tampón de extracción (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 50 mM, 0,5% de Mega 10, 3% de CHAPS y una pastilla de cóctel de inhibidores de proteasas por cada 10 mL) durante 30 min en hielo. Esta resuspensión se sometió a cuatro ciclos de congelación-descongelación y se centrifugó de nuevo a 20 000 g durante 10 min a 4 °C para obtener un sobrenadante rico en proteínas de *P. falciparum* que se conservó a -20 °C. Una vez finalizada la extracción, se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford²⁷¹ con el kit Bradford Assay Kit (Thermo Fisher Scientific).

4.2.2.1. Elución de anticuerpos a partir de DSS

Para recuperar los anticuerpos desecados en los DSS y poder emplearlos en los ensayos inmunológicos, se realizó una elución de los mismos siguiendo el protocolo descrito por Corran *et al.*²⁷². Utilizando un sacabocados, se cortaron fragmentos de 5 mm de diámetro de los DSS y, para eluir pasivamente los anticuerpos, se incubaron durante toda la noche embebidos en PBS-Tween 20 al 0,05% a 4 °C. Tras la incubación, se desechó el fragmento y se conservó la solución que contenía las proteínas presentes en el DSS a -20 °C. Dado que cada fragmento de 5 mm corresponde a 4 µL de plasma²⁷² y que el volumen resultante fue de 200 µL por las pérdidas acaecidas durante el proceso, se estimó que las proteínas eluidas se encontraban a una concentración 1:50 del plasma original.

4.2.2.2. Estrategia de ELISA

Dado que uno de los objetivos científicos de esta tesis fue determinar si había diferencias entre los niveles de Ig de individuos procedentes de regiones endémicas según su edad o su estado infeccioso, se evaluó la concentración de Ig serológicas tanto totales como específicas de *P. falciparum* en todos los individuos procedentes de Ghana.

Para esta determinación, se utilizaron los kits *ELISA Human IgG/IgM/IgA Quantitation Set* (Bethyl laboratories). En el caso de la Ig específicas ([Figura 13](#)), se recubrieron placas de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific) con 0,5 µg de extracto de proteínas de *P. falciparum* diluidas

en 100 μ L de tampón de recubrimiento (tampón carbonato-bicarbonato 50 mM, pH 9,6) por pocillo durante toda la noche. Los pocillos de la curva estándar se recubrieron con 1 μ g de anticuerpo primario anti-IgG, IgM o IgA según procediera diluido en 100 μ L de tampón de recubrimiento tal y como indican las instrucciones del fabricante. El recubrimiento de las placas para la determinación de Ig total se realizó de la misma manera que la recta patrón en el total de muestras y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras realizar el recubrimiento de las placas, se hicieron cinco lavados con PBS-Tween 20 al 0,05% y, con el fin de bloquear las posibles uniones inespecíficas de otras proteínas al recubrimiento de la placa, se incubaron durante 30 minutos con albúmina de suero bovino (BSA) al 1% en solución salina tamponada con Tris a temperatura ambiente. A continuación, las placas se lavaron de nuevo y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con 100 μ L del plasma humano diluido (1:10 000 para la IgM total; 1:500 para la IgM específica de *P. falciparum* (Pf-IgM); 1:20 000 para la IgA total; 1:100 para la IgA específica de *P. falciparum* (Pf-IgA); 1:100 000 para la IgG total; y 1:5 000 para la IgG específica de *P. falciparum* (Pf-IgG)). Tras los pasos de lavado, se añadieron 100 μ L de anticuerpo secundario diluido marcado con HRP (1:75 000 para los anticuerpos totales y Pf-IgG y Pf-IgM y 1:10 000 para Pf-IgA) a cada pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último, se lavaron las placas y se incubaron con 100 μ L de solución de tetrametilbencidina (TMB) (Thermo Fisher Scientific) y se registró la absorbancia a 652 nm en un espectrofotómetro Varian Cary 50 Bio (Agilent Technologies). Los datos de absorbancia y concentración de Ig de la curva patrón se ajustaron a un modelo logístico sigmoidal de cuatro parámetros utilizando el software GraphPad Prism 8 para posteriormente interpolar en la curva los valores de absorbancia de las muestras problema.

4.2.3. Análisis estadísticos

Todos los análisis de datos, estadísticas y gráficos, a excepción de la elaboración de las curvas patrón que fueron elaboradas con el software GraphPad Prism 8, se realizaron en el entorno R v3.5.2. Cuando se indica, los datos crudos se transformaron en log2 para la normalización de los datos y se estandarizaron en puntuaciones Z (*z-scores*). Los datos normalizados y estandarizados se utilizaron tanto para los análisis estadísticos como para las representaciones gráficas. Las diferencias estadísticas entre grupos se analizaron mediante la prueba no paramétrica de *Wilcoxon* no pareado. También se aplicó la prueba de *Spearman* para estudiar la correlación entre diferentes variables y el test de *Fisher* para evaluar si la proporción de individuos infectados cambiaba entre los grupos de edad establecidos. Los análisis de oportunidad relativa (traducido del inglés *Odds ratio*, OR) se realizaron con el calculador online

MedCalc (https://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php). En todos los análisis se consideró que había significación estadística en aquellos valores $p \leq 0,05$.

4.3. ANÁLISIS GENÉTICOS

Entre los objetivos de la presente tesis doctoral se encuentra la determinación de la presencia de polimorfismos genéticos que confieren protección frente a la malaria. Para ello, se analizó genéticamente el ADN previamente extraído ([Ver sección 4.2.1.1](#)) de los individuos procedentes de Ghana y RDC ($n = 200$ y $n = 224$, respectivamente) con el fin de detectar potenciales variantes polimórficas frecuentes en regiones endémicas de malaria localizadas en los genes HBB (NCBI Gene ID: 3043), G6PD (NCBI Gene ID: 2539), PIEZO1 (NCBI Gene ID: 9780) y PKLR (NCBI Gene ID: 5313).

4.3.1. Hemoglobina S y C

Para determinar la presencia de las variantes HbS, causada por la mutación Glu6Val A>T (rs334), y la HbC, causada por la mutación Glu6Lys G>A (rs33930165), se realizó una PCR a tiempo final para amplificar un fragmento del gen HBB que contenía las posiciones polimórficas en el centro, seguido de un análisis de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP). La PCR se realizó con el kit *DNA polymerase 1 U/μL* (Biotools). Cada reacción de PCR fue de un volumen total de 60 μL y se preparó mezclando los siguientes componentes: 400 nM de cebador directo (5' AGTCAGGGCAGAGCCATCTA 3'), 400 nM de cebador reverso (5' CAGATCCCCAAAGGACTCAA 3'), 6 μL de tampón de reacción comercial 10X, 200 μM de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), 20 mU/μL de Taq polimerasa, 45,3 μL de agua y 1,5 μL de ADN extraído. Con el fin de comprobar la ausencia de contaminaciones, cada ronda de amplificación se acompañó de un control negativo en el que se sustituyó el ADN molde por 1,5 μL de agua. La amplificación se llevó a cabo en un Termociclador Veriti (Applied Biosystems) siguiendo el siguiente programa de temperaturas: 4 minutos a 94 °C para activar la polimerasa, una segunda etapa de 40 ciclos de 10 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C y 20 segundos a 72 °C para separar las hebras, hibridar los cebadores y elongar las cadenas respectivamente, y una última etapa de 7 minutos a 72 °C con el fin de asegurar la elongación de todas las cadenas. Las muestras se conservaron a 4 °C hasta su uso.

La amplificación por PCR del fragmento del gen HBB dio lugar a una banda de 353 pares de bases (pb) que fue sometida a un análisis de RFLP. Para ello, se realizó una purificación del

producto de PCR con el kit comercial *Speedtools PCR clean-up kit* (Biotools) y se sometió a una digestión con las enzimas Ddel y BseRI por separado. El diseño de este método de RFLP se basó en la premisa de que dichas enzimas de restricción reconocen una secuencia de seis nucleótidos específicos localizados en el sitio polimórfico, de forma que si se produce una mutación en esa región se perderá el sitio de restricción. Así pues, la enzima Ddel presenta dos sitios de restricción en las variantes de HbA normal y HbC, dando lugar a tres fragmentos de restricción resultantes, mientras que la HbS pierde uno de ellos, generando dos fragmentos de restricción únicamente. Por otro lado, la enzima BseRI posee un sitio de restricción en la HbA que se pierde en las variantes HbS y HbC. Gracias a este diseño experimental con dos lugares de corte de restricción, se obtiene un patrón de bandas distinto en cada uno de los genotipos posibles (Figura 15).

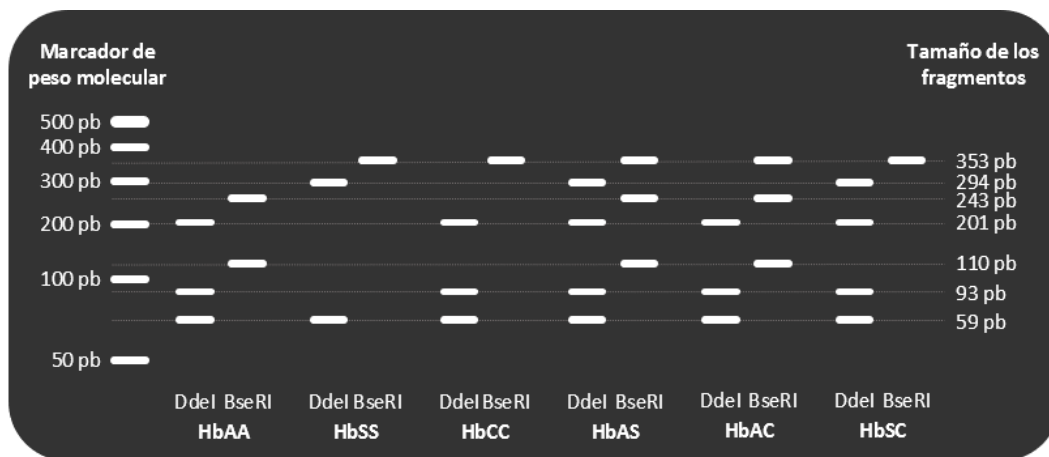


Figura 15 | Patrón de restricción obtenido tras la digestión con Ddel y BseRI según el genotipo de HBB. Se muestra el resultado de la digestión con las enzimas de restricción Ddel y BseRI por separado para cada genotipo de Hb teniendo en cuenta las variantes de Hb normal, HbS y HbC.

Las digestiones se llevaron a cabo en un volumen total de 30 μ L. En el caso de la digestión con Ddel se mezclaron los siguientes componentes: 0,5 μ L de enzima Ddel 10 U/ μ L (Thermo Fisher Scientific), 1,5 μ L de tampón comercial 10X, 15 μ L del producto de PCR previamente purificado y 13 μ L de agua. Las digestiones con BseRI se prepararon de la siguiente manera: 2 μ L de enzima BseRI 5 U/ μ L (New England BioLabs), 1,5 μ L de tampón comercial 10X, 15 μ L del producto de PCR previamente purificado y 11,5 μ L de agua. Finalmente, las reacciones se incubaron a 37 °C durante toda la noche y se conservaron a 4 °C hasta su uso. Para observar la digestión resultante e identificar la presencia de los distintos genotipos de Hb, se corrieron 20 μ L de cada digestión junto con 10 μ L del producto PCR sin digerir en un gel de agarosa al 2% conteniendo SYBR Safe DNA gel strain (Thermo Fisher Scientific). Los gels resultantes se

observaron con el sistema Gel Doc XR+ (Bio-Rad) mediante iluminación ultravioleta y se capturó la imagen con el software Image Lab.

4.3.2. G6PD A-

La presencia de la variante polimórfica A- del gen de la G6PD (rs1050828) se determinó mediante PCR-RFLP de forma similar a las variantes de Hb. Dicha variante está formada por la adición de la mutación Val68Met a la Asn126Asp, característica de la G6PD A. Dado que ambas mutaciones son necesarias para generar la variante A- y que la mutación Val68Met siempre va acompañada de la Asn126Asp, se determinó únicamente la presencia de la mutación Val68Met que llevaba implícita la aparición de la Asn126Asp. Para ello, se amplificó mediante PCR a tiempo final un fragmento del gen de la G6PD localizado en el cromosoma X que contenía la posición polimórfica en el centro y se analizó la presencia de las variantes polimórficas mediante RFLP. La PCR se realizó con el kit *DNA polymerase 1 U/μL* (Biotools). Cada reacción de PCR fue de un volumen total de 40 μL y se preparó mezclando los siguientes componentes: 200 nM de cebador directo (5' CATCTGGTAAGTGTGTCCCACC 3'), 200 nM de cebador reverso (5' GGTCACGGGGGCTGGTAAT 3'), 4 μL de tampón de reacción comercial 10X, 200 μM de dNTPs, 20 mU/μL de Taq polimerasa, 31,8 μL de agua y 1 μL de ADN extraído. Con el fin de comprobar la ausencia de contaminaciones, cada ronda de amplificación se acompañó de un control negativo en el que se sustituyó el ADN molde por 1 μL de agua. La amplificación se llevó a cabo en un Termociclador Veriti (Applied Biosystems) siguiendo el siguiente programa de temperaturas: 4 minutos a 94 °C para activar la polimerasa, una segunda etapa de 40 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C y 20 segundos a 72 °C para separar las hebras, hibridar los cebadores y elongar las cadenas respectivamente, y una última etapa de 7 minutos a 72 °C con el fin de asegurar la elongación de todas las cadenas. Los productos de PCR se mantuvieron a 4 °C hasta su uso.

Una vez amplificado el fragmento de 382 pb, se purificó con el kit comercial *Speedtools PCR clean-up kit* (Biotools) siguiendo las instrucciones del fabricante y se eluyó en un volumen de 20 μL para posteriormente realizar la RFLP. En este caso, la estrategia consistió en la aparición de un nuevo sitio de restricción para la enzima NlaIII en la variante A- con respecto a la normal, que posee un único sitio de restricción para esta enzima. Así pues, la digestión del fragmento con el alelo normal de G6PD dio lugar a dos fragmentos de restricción de 270 y 112 pb y en el caso del alelo mutado A- se generaron tres fragmentos de 147, 123 y 112 pb ([Figura 16](#)).

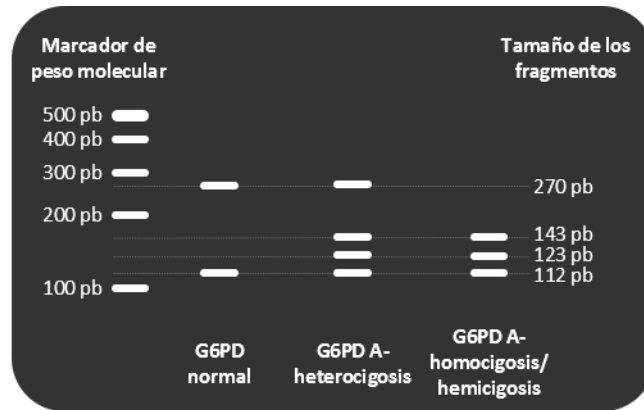


Figura 16 | Patrón de restricción obtenidos tras la digestión de NlaIII según el genotipo de G6PD. Se muestra el resultado de la digestión con la enzima de restricción NlaIII para cada genotipo de G6PD, teniendo en cuenta las variantes de G6PD normal y A-.

Las digestiones se llevaron a cabo en un volumen total de 30 μ L que contenía los siguientes componentes: 0,3 μ L de enzima NlaIII 5 U/ μ L (Thermo Fisher Scientific), 1 μ L de tampón comercial 10X, 20 μ L del producto de PCR previamente purificado y 8,7 μ L de agua y fueron incubadas a 37 °C durante toda la noche. Para observar la digestión resultante e identificar la presencia de los distintos genotipos de G6PD, se corrieron 20 μ L de la digestión junto con 10 μ L del producto PCR sin digerir en un gel de agarosa al 2% conteniendo SYBR Safe DNA gel strain (Thermo Fisher Scientific). Los geles resultantes se observaron mediante el sistema Gel Doc XR+ (Bio-Rad) con iluminación ultravioleta y se capturó la imagen con el software Image Lab.

4.3.3. PIEZO E756del

Dado el reciente descubrimiento de la capacidad protectora frente a la malaria de la variante E756del del gen PIEZO1¹²⁶, se determinó la presencia de la misma en los individuos procedentes de regiones endémicas de África con el fin de asociar su presencia a una menor prevalencia o parasitemia de malaria. La variante E756del (rs59446030) se caracteriza por la deleción del triplete de nucleótidos TCC localizado en una región altamente repetitiva en la que, en el alelo normal, esta secuencia se repite un total de ocho veces y tras la deleción de uno de ellos resulta la variante E756del que consta de siete repeticiones. Dadas las particularidades de este polimorfismo, se optó por una estrategia de amplificación del fragmento mediante PCR seguida del método de secuenciación Sanger²⁷³.

El alto contenido en GC del fragmento a analizar requirió de una estrategia de amplificación específica de este tipo de secuencias, caracterizadas por tener una fuerte estructura secundaria

y una mayor resistencia a la desnaturalización y separación de las dos hebras complementarias debido a la unión mediante tres puentes de hidrógeno entre los nucleótidos GC en comparación con los dos que se generan entre A y T. Por ello, la PCR se realizó con una polimerasa adaptada a este tipo de secuencias, la mezcla maestra para PCR de alta fidelidad *Phusion* con tampón adaptado a las condiciones de alto contenido en GC (Thermo Fisher Scientific). Cada reacción de PCR fue de un volumen total de 30 μL y se preparó mezclando los siguientes componentes: 500 nM de cebador directo (5' ATTTTCGGACCCTCTCCAG 3'), 500 nM de cebador reverso (5' GGGACATGGCACAGCAGAC 3'), 15 μL de la mezcla maestra comercial que contenía el tampón, los dNTPs y la polimerasa, 11 μL de agua y 1 μL de ADN extraído previamente. Con el fin de comprobar la ausencia de contaminaciones, cada ronda de amplificación se acompañó de un control negativo en el que se sustituyó el ADN molde por 1 μL de agua. La amplificación se llevó a cabo en un Termociclador Veriti (Applied Biosystems) siguiendo el siguiente programa de temperaturas: 30 segundos a 98 °C para activar la polimerasa y asegurar la separación completa de las hebras que, una segunda etapa de 40 ciclos de 10 segundos a 98 °C y 6 segundos a 72 °C para separar las hebras, hibridar los cebadores y elongar las cadenas respectivamente, y una última etapa de 7 minutos a 72 °C con el fin de asegurar la elongación de todas las cadenas. Los productos de PCR se mantuvieron a 4 °C hasta su uso.

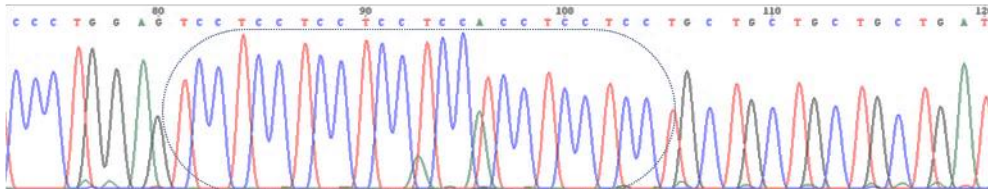
Tras analizar el resultado de la PCR mediante electroforesis unidimensional en gel de agarosa al 2%, se observó que la amplificación por PCR dio lugar a la aparición de dos bandas, una banda de 222 pb que contenía el fragmento de PIEZO1 deseado y una banda inespecífica de unos 700 pb. Por ello, se cortó la banda específica de PIEZO1 y se purificó con el kit *Speedtools PCR clean-up kit* (Biotools). El producto de PCR purificado fue secuenciado mediante el método Sanger en la Unidad de genómica de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) y el resultado de la secuenciación fue analizado visualmente mediante el programa Chromas, que permite determinar la secuencia de nucleótidos presente en la muestra ([Figura 17](#)).

4.3.4. PKLR

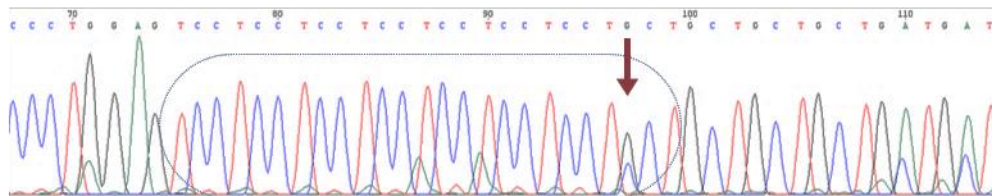
Del gen PKLR se analizó la presencia de dos variantes polimórficas, Glu277Lys (rs147689373) y Leu241Val (rs147659527), ambas causados por la sustitución de un único nucleótido de la secuencia, G>A y C>G respectivamente. Para ello, se amplificó mediante PCR a tiempo final un fragmento del gen que contenía los dos sitios polimórficos en su interior y se secuenció mediante el método Sanger. La PCR se realizó con el kit *DNA polymerase 1 U/ μL* (Biotools). Cada reacción de PCR fue de un volumen total de 50 μL y se preparó mezclando los siguientes

componentes: 400 nM de cebador directo (5' CTCTTTCCATGTCCGCAGGC 3'), 400 nM de cebador reverso (5' CTTGATGCCGTGCTCTCCG 3'), 5 µL de tampón de reacción comercial 10X, 200 µM de dNTPs, 20 mU/µL de Taq polimerasa, 40,1 µL de agua y 2,5 µL de ADN extraído.

PIEZO normal



PIEZO E756del heterocigosis



PIEZO E756del homocigosis

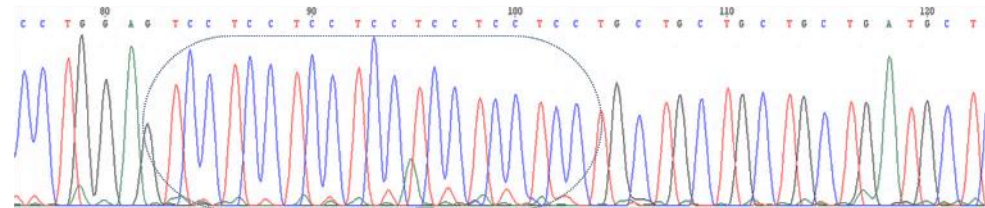


Figura 17 | Posibles resultados de la secuenciación del fragmento amplificado según el genotipo de PIEZO1. Se muestra el resultado de la secuenciación Sanger del fragmento de PIEZO1 amplificado por PCR según el genotipo del individuo normal, E756del en heterocigosis y E756del en homocigosis. La secuencia normal consta de ocho repeticiones del triplete TCC marcadas con una línea punteada. En el genotipo heterocigoto se observan algunos dobles picos de nucleótidos a partir del lugar de mutación de uno de los alelos, marcado con una flecha. A partir de ese punto, se puede observar que los picos de secuenciación no coinciden entre las hebras, indicando que el individuo es heterocigoto. El genotipo homocigoto muestra siete repeticiones del triplete TCC y ausencia de dobles picos, ya que ambas hebras son idénticas.

Con el fin de comprobar la ausencia de contaminaciones, cada ronda de amplificación se acompañó de un control negativo en el que se sustituyó el ADN molde por 2,5 µL de agua. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Veriti (Applied Biosystems) siguiendo el siguiente programa de temperaturas: 4 minutos a 94 °C para activar la polimerasa, una segunda etapa de 40 ciclos de 10 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C y 20 segundos a 72 °C para separar las hebras, hibridar los cebadores y elongar las cadenas respectivamente, y una última etapa de 7 minutos a 72°C con el fin de asegurar la elongación de todas las cadenas. Los

productos de PCR se mantuvieron a 4 °C hasta su uso. Los productos de PCR de 251 pb se purificaron con el kit *Speedtools PCR clean-up kit* (Biotools) y se secuenciaron en la Unidad de Genómica de la UCM. Los resultados de la secuenciación se analizaron con el visor de secuencias genéticas Chromas ([Figura 18](#)).

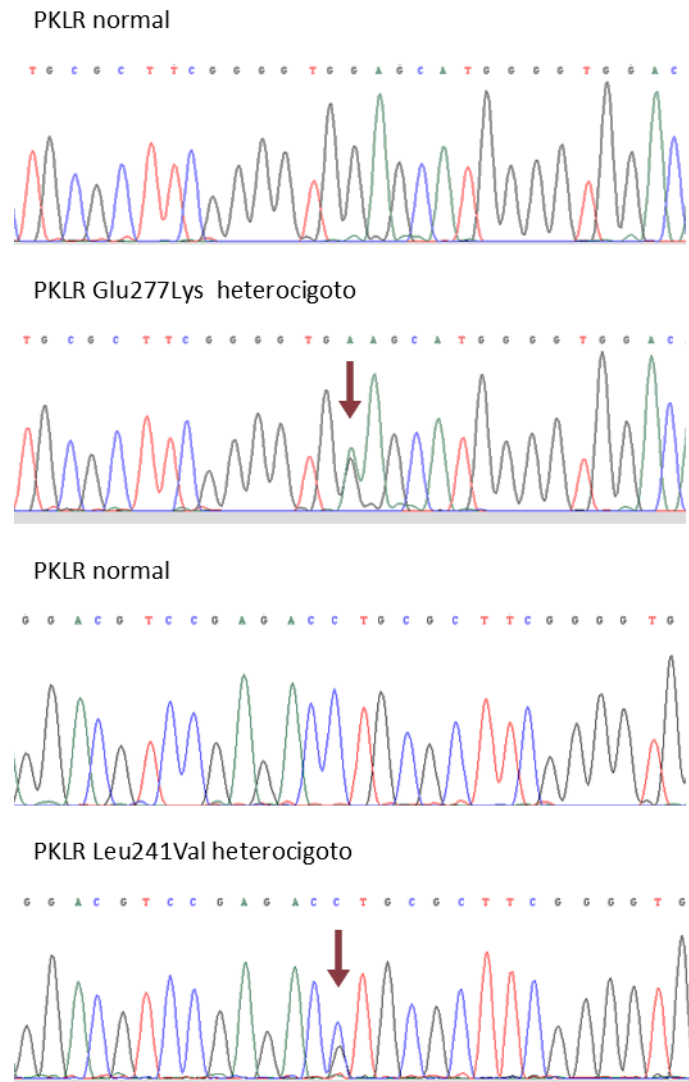


Figura 18 | Posibles resultados de la secuenciación del fragmento amplificado según el genotipo de PKLR. Se muestra el resultado de la secuenciación Sanger del fragmento de PKLR amplificado por PCR según el genotipo del individuo normal, Glu277Lys en heterocigosis y Leu241Val en heterocigosis. Las flechas indican el doble pico observado por el cambio en el nucleótido en el genotipo heterocigoto.

4.4. IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS DE *P. falciparum* RECONOCIDOS POR IgM Y DE SUS EPÍTOPOS INMUNODOMINANTES

La identificación de antígenos de *P. falciparum* reconocidos por IgM constituyó uno de los objetivos centrales de la presente tesis doctoral. Para alcanzar este propósito, se diseñó un nuevo método de inmunoprecipitación (IP) basado en la captura de antígenos por parte de la IgM de individuos procedentes de regiones endémicas de malaria utilizando un soporte de microesferas magnéticas. Una vez desarrollado el método, se empleó para aislar los antígenos de *P. falciparum* reconocidos por la IgM serológica de 54 individuos procedentes de Ghana que fueron clasificados, en primer lugar, en función de su edad o estado de embarazo en niños menores de 5 años, adultos en edad reproductiva de 14 a 49 años, mujeres gestantes y adultos mayores de 50 años. Cada uno de estos cuatro grupos fue clasificado a su vez en los tres grupos de infección: NI, MS y MM. Dado que del grupo de mayores de 50 años no disponíamos de muestras de MM, se generaron un total de 11 grupos de edad e infección. Cada uno de estos grupos constó de 5 individuos ($n = 5$) a excepción de los niños menores de 5 años no infectados, de los que únicamente pudimos disponer de 4 muestras, lo que dio lugar a un total de 54 individuos analizados. Los antígenos aislados de cada muestra fueron identificados y semicuantificados mediante espectrometría de masas y un flujo de trabajo computacional desarrollado por nosotros. Estos datos se emplearon para conocer el repertorio antigénico de *P. falciparum* reconocido por habitantes de regiones endémicas de malaria y analizar las diferencias en el reconocimiento según su edad, estado de infección por malaria o embarazo de los individuos.

4.4.1. Inmunoprecipitación de antígenos IgM

4.4.1.1. Elución de anticuerpos a partir de DSS

Con el fin de recuperar las proteínas presentes en los DSS, entre las que se encuentran las IgM, se cortaron cinco DSS de cada individuo en círculos de 5 mm de diámetro utilizando un sacabocados y se sumergieron en 400 μ l de tampón de unión/lavado (TL) (Tris-HCl 25 mM, NaCl 0,15 M, Tween 20 al 0,05%, pH 7,5) en un tubo de plástico de 0,5 mL ([Figura 19](#)). Este tubo se incubó durante toda la noche a 4 °C con el fin de permitir que las proteínas presentes en los DSS eluyeran hacia el tampón. Posteriormente, para recuperar el tampón conteniendo la mezcla de proteínas de los DSS, se agujereó el fondo del tubo con un punzón, se colocó en un tubo de plástico de 2 mL y se centrifugó a 14 000 g durante 1 minuto para recoger la solución y evitar los

restos de papel de filtro. Teniendo en cuenta que cada fragmento de 5 mm de DSS contiene 4 μ L de plasma²⁷² y que se eluyeron cinco de ellos en un volumen total de 400 μ L de TL, de cada individuo se obtuvo una cantidad total de 20 μ L de plasma diluido 1:20 con respecto al plasma original.

4.4.1.2. Inmunocaptura y elución de antígenos de *P. falciparum* reconocidos por IgM

Para el aislamiento de los antígenos de *P. falciparum* se utilizó un procedimiento de inmunocaptura basado en la retención de los mismos por parte de las IgM serológicas que se anclaron a esferas magnéticas recubiertas de estreptavidina a través de un anticuerpo anti-IgM biotinilado. Como se muestra en la [Figura 19](#), las proteínas extraídas de los DSS se incubaron con 100 μ g de [extracto de proteínas de *P. falciparum*](#) (20 μ L de extracto a 5 μ g/ μ L) y, tras agitar vigorosamente, se incubaron durante toda la noche a 4 °C para permitir que los antígenos se unieran a sus anticuerpos específicos. Con el fin aislar estos complejos IgM-antígeno, se añadió a la mezcla 30 μ g de un anticuerpo IgG anti-IgM biotinilado (Abcam) y se incubó durante 3 h a 4 °C con agitación. Posteriormente, la mezcla se añadió a 50 μ L de esferas magnéticas conjugadas con estreptavidina (Pierce) prelavadas con 1 mL de TL y se incubó todo el conjunto durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. A continuación, se capturaron las esferas que llevaban unidas el anticuerpo anti-IgM, la IgM serológica y los antígenos con un soporte magnético y se retiró el sobrenadante, que se conservó para su posterior análisis. Tras tres pasos de lavado con 300 μ L de TL, las esferas se lavaron finalmente con 300 μ L de agua destilada con Tween-20 al 0,1% para eliminar los restos de tampón y favorecer el proceso posterior de elución a pH ácido. Para liberar los antígenos inmunocapturados por el sistema, se eligió una estrategia no desnaturizante de elución suave a pH ácido basada en la capacidad de disociar las interacciones antígeno-anticuerpo sin romper la unión biotina-estreptavidina. Así pues, se añadieron 100 μ L de tampón de elución (ácido acético 0,5 M, NaCl 0,15 M, pH 2,4) al sistema y se incubó durante 10 minutos con agitación a temperatura ambiente. Para recuperar los antígenos eluidos, finalmente se colocaron los tubos en una gradilla magnética para capturar las esferas magnéticas y se recogió el eluido que contenía los antígenos de *P. falciparum*.

Para llegar a este diseño final del método, inicialmente se optimizaron dos pasos del protocolo: la eficacia de unión de la IgM serológica a las esferas y el método de elución con el fin de minimizar la concentración de anticuerpos en el eluido que podrían causar una disminución de la sensibilidad en la identificación de proteínas mediante espectrometría de masas. Para optimizar la eficacia de unión de la IgM, se fijó el volumen de esferas en 50 μ L y la

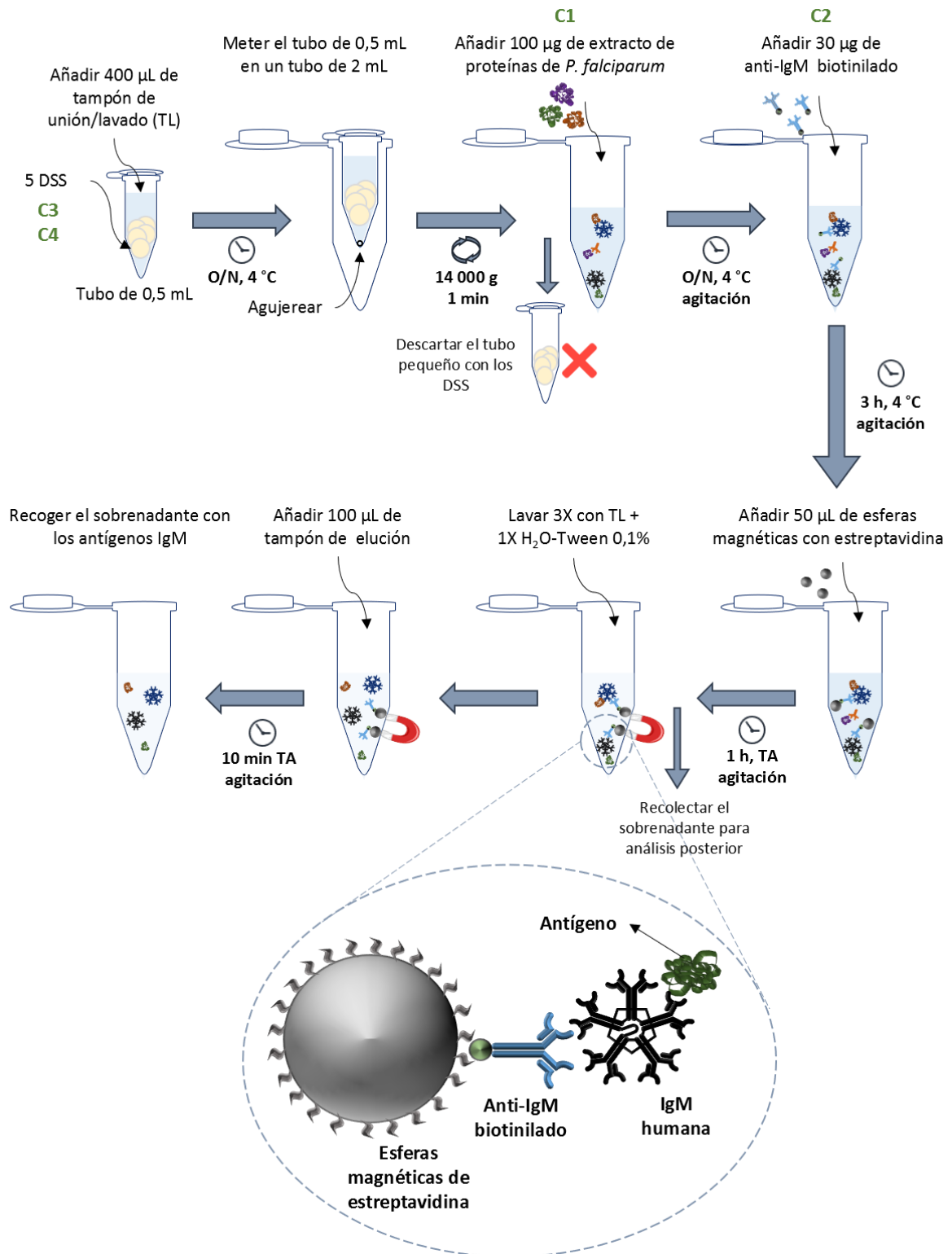


Figura 19 | Representación esquemática del método de inmunoprecipitación y elución de antígenos de *P. falciparum*. Se indica cada uno de los pasos a seguir en el protocolo diseñado y descrito anteriormente. El punto en el que hay algún cambio o eliminación de los componentes de la IP en los controles negativos C1-C4 se indica en verde. TA = temperatura ambiente, O/N = periodo de una noche (del inglés *overnight*).

cantidad de IgG anti-IgM en 30 µg y se probaron dos volúmenes diferentes de plasma fresco control, 20 y 100 µL, lo que dio lugar a ratios de plasma/esfera (µL/µL) de 0,4 y 2 respectivamente. En este ensayo no se utilizó extracto de proteínas de *P. falciparum*, ya que no se consideró necesario para evaluar la capacidad de unión de la IgM, y los 20 µL del extracto proteico fueron sustituidos por el mismo volumen de TL. En cuanto a la optimización de la elución, se probaron dos métodos de elución: elución a pH ácido, caracterizada por ser una elución suave que evita la ruptura de las interacciones más fuertes como la unión biotina-estreptavidina y elución por ebullición, que produce la desnaturalización de todos los componentes de la IP haciendo que se separen de las esferas magnéticas y se recojan en el eluido. Para la elución a pH ácido, se añadieron 100 µL de tampón de elución a los antígenos inmunoprecipitados y se incubaron 10 minutos con agitación a temperatura ambiente. Por el contrario, la elución mediante ebullición se realizó añadiendo 100 µL de tampón de elución por ebullición (Tris-HCl 62,4 mM, dodecilsulfato sódico (SDS) 2%, 2-mercaptoetanol 5%) y se hirvió durante 5 min a 100 °C. Los tubos con ambos métodos de elución se colocaron finalmente en un soporte magnético para capturar las esferas magnéticas y recoger el sobrenadante que contenía los antígenos *P. falciparum*.

4.4.1.3. Controles negativos

Para comprobar la especificidad del método de IP, se incluyeron cuatro controles negativos en el análisis ([Figura 19](#), C1-C4). El diseño de los controles se basó en la eliminación de cada uno de los componentes del sistema de IP y la sustitución del plasma procedente de región endémica por uno no expuesto previamente a la malaria, con fin de comprobar que los antígenos recuperados son específicos y reconocidos por IgM y no constituyen restos no lavados del extracto proteico. Así pues, se incluyó un control de especie que no poseía extracto de proteínas de *P. falciparum* (C1) y, por tanto, no debería dar lugar a la identificación de antígenos de *P. falciparum*; un control de posibles uniones no específicas de la IgM a las esferas en el que se eliminó el anticuerpo anti-IgM (C2); un control sin IgM específica de *P. falciparum* en el que se sustituyó el plasma de región endémica por un plasma europeo no expuesto previamente a la malaria (C3); y un control de unión inespecífica de proteínas de *P. falciparum* al sistema de IP en el que se eliminó el plasma y, por tanto, la IgM (C4). Cada elemento eliminado de la IP fue sustituido por el mismo volumen de TL en el paso correspondiente.

4.4.2. Optimización del método de inmunoprecipitación

4.4.2.1. Detección de IgM mediante electroforesis unidimensional e inmunotransferencia

En el proceso de optimización del método de IP de antígenos IgM, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y una inmunotransferencia de IgM con el fin de comparar la composición de proteínas y la presencia de IgM en el plasma control empleado, el sobrenadante recogido tras la retención de las esferas magnéticas por el imán y los eluidos por pH ácido y ebullición de las IP realizadas con el ratio plasma/esfera de 0,4 y 2. Para ello, se polimerizaron dos geles de poliacrilamida al 12% que contenían 10 mL de solución separadora (3,3 mL de agua, 4 mL de acrilamida al 30%, 2,5 mL de solución Tris 1,5 M pH 8,8, 100 µl de SDS al 10%, 100 µl de persulfato de amonio al 10% y 4 µl de tetrametiletilendiamina (TEMED)) y 2 mL de solución concentradora (1,4 mL de agua, 330 µl de acrilamida al 30%, 250 µl de solución Tris 1 M pH 6,8, 20 µl de SDS al 10%, 20 µl de persulfato de amonio al 10% y 2 µl de TEMED). Los geles se emplearon para realizar dos electroforesis idénticas en condiciones desnaturalizantes. Para ello, se cargaron en cada gel 15 µg del plasma y los sobrenadantes, 28 µL de los eluidos y 4 µg de IgM humana control (Calbiochem) en tampón de carga (Tris 50 mM, DTT 250 mM, SDS 2% (p/v), azul de bromofenol 0,25% (p/v) y glicerina 10% (v/v)) y se realizó la separación electroforética de las proteínas presentes en tampón de electroforesis (Tris 25 mM, glicina 250 mM y SDS al 0,1% (p/v)) durante 20 minutos a 90 V más 1 h a 120 V en la cubeta Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad).

Tras la electroforesis, uno de los geles se empleó para observar las proteínas presentes en cada muestra mediante una tinción Coomassie y el otro para realizar una inmunotransferencia de detección de IgM. Para la tinción Coomassie, se embebió el gel en solución de teñido (Coomassie Blue G-250 2,5% (p/v), metanol 45% y ácido acético glacial 10%) durante 30 minutos en agitación y se destiñó con solución de desteñido (metanol 30%, ácido acético glacial 10%) durante 4 h y con agua destilada durante toda la noche.

Para realizar la inmunotransferencia, en primer lugar, se equilibró el gel y una membrana de nitrocelulosa en tampón de transferencia (glicina 39 mM, Tris 49 mM, SDS 0,037 % (p/v) y metanol 20% (p/v)) durante 20 minutos a 4 °C. Se transfirieron entonces las proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa embebidos en tampón de transferencia durante 80 minutos a 75 mA a 4 °C empleando una cubeta Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (BioRad). Al finalizar la transferencia y con el fin de bloquear las uniones inespecíficas, la membrana de nitrocelulosa se incubó en solución de bloqueo (leche desnatada en polvo 5% (p/v), PBS,

Tween-20 0,05%) durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación. Posteriormente, se incubó con un anticuerpo primario anti-IgM humana biotinilado (Abcam) diluido 1:50 000 (v/v) en solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C en agitación. Al día siguiente, tras cinco lavados con solución de lavado (PBS, Tween-20 0,05% (v/v)), la membrana se incubó con estreptavidina conjugada con HRP (Merck) diluida 1:5000 (v/v) durante 1 h a temperatura ambiente en agitación. Tras cinco nuevas rondas de lavado, la estreptavidina-HRP unida de forma indirecta a la IgM se detectó mediante quimioluminiscencia embebiendo la membrana en 5 mL de sustrato Western Lightning ECL Pro (Perkin Elmer) durante 5 minutos en oscuridad. La señal luminiscente emitida por la oxidación del luminol del sustrato causada por la HRP se captó mediante películas radiográficas utilizando el equipo AGFA CP 1000 (AGFA).

4.4.2.2. Cuantificación de IgM mediante ELISA

Durante la optimización de la eficacia de unión de la IgM a las esferas, también se cuantificó la cantidad de IgM total del plasma fresco original, del sobrenadante obtenido tras la captura de del complejo esfera-anti-IgM-IgM con el imán y de los eluidos mediante pH ácido a los ratios de plasma/esfera de 0,4 y 2 con el fin de estimar la proporción de IgM que había quedado retenida por las esferas y la que había eluido en cada uno de los casos. Las concentraciones de IgM total se cuantificaron mediante el kit *ELISA Human IgM Quantitation Set* (Bethyl laboratories) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se recubrieron placas de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific) con 1 µg de anticuerpo anti-IgM humana por pocillo y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Después de lavar las placas cinco veces, se bloquearon las uniones no específicas durante 30 minutos con BSA al 1% en solución salina tamponada con Tris a temperatura ambiente. Todos los pasos de lavado se realizaron 5 veces con 100 µl de PBS-Tween al 0,05%. A continuación, las placas se lavaron de nuevo y se incubaron con 100 µl de plasma humano diluido 1:10 000 durante 1 h a temperatura ambiente. Después de los pasos de lavado, se añadieron 100 µl de anticuerpo secundario anti-IgM conjugado con HRP a cada pocillo durante 1 h a temperatura ambiente. Por último, se lavaron las placas y se incubaron con 100 µl de solución TMB (Thermo Fisher Scientific) y se registraron las densidades ópticas a 652 nm en un espectrofotómetro Varian Cary 50 Bio (Agilent Technologies). El valor de absorbancia se interpoló en una recta patrón realizada con un suero de referencia a concentraciones conocidas de IgM y adaptada a un modelo de cuatro parámetros sigmoidal con el fin de obtener el valor de concentración de IgM de cada muestra.

4.4.3. Identificación de antígenos

4.4.3.1. Análisis de antígenos IgM mediante espectrometría de masas

Los antígenos aislados mediante el [método previamente descrito](#) fueron analizados por cromatografía líquida (LC) acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) en la Unidad de Proteómica de la UCM. Esta técnica se basa en la digestión con tripsina de las proteínas presentes en la mezcla a analizar dando lugar a diferentes péptidos que se separan entre sí mediante LC. El cromatógrafo se encuentra acoplado a un espectrómetro de masas cuya función es estimar la relación masa/carga de los iones presentes en los péptidos obtenidos mediante calentamiento y ionización de los distintos átomos que componen cada molécula²⁷⁴. La espectrometría de masas en tándem consta de dos fases, la primera se denomina MS1 y en ella se adquieren las masas e intensidades de señal de los péptidos, también llamados precursores. Dado que los datos de masa/carga de un péptido completo no son identificativos de su secuencia, los péptidos más abundantes se someten a una fragmentación aleatoria y a una segunda fase denominada MS2 en la que se adquieren los datos de masa/carga de cada uno de los fragmentos obtenidos a partir de los péptidos MS1. El espectro MS1 obtenido tendrá un pico por cada péptido y el área de este pico permitirá estimar la concentración de ese péptido en la muestra de forma indirecta. Además, gracias a los espectros MS2 asociados a cada espectro MS1, se podrá deducir la secuencia exacta del péptido, dado que cada átomo ionizado posee una relación masa/carga única que permite identificar el residuo al que pertenece.

En primer lugar, los péptidos fueron digeridos con tripsina. Para ello, se cargaron 5 µg de cada uno de los 54 eluidos obtenidos en un gel concentrador de acrilamida al 4% con el fin de agrupar todas las proteínas de la muestra en una misma banda y poder así eliminar el tampón de elución antes de la digestión. Tras la tinción del gel con Coomassie coloidal, se escindió la banda que contenía el total de las proteínas y se digirieron con tripsina siguiendo el método de Sechi, S. y Chait, BT.²⁷⁵. Para ello, las proteínas fueron reducidas con ditiotretitol 10 mM a 56 °C durante 30 minutos y se alquilaron posteriormente con iodacetamida 55 mM durante 20 minutos en oscuridad. Finalmente, se añadió tripsina recombinante de grado de secuenciación (Roche Molecular Biochemicals) diluida 1:25 (p/v) en bicarbonato amónico 25 mM a pH 8,5 en cada muestra y se incubó durante toda la noche a 37 °C. Los péptidos previamente digeridos, se desalaron y concentraron mediante cromatografía de fase reversa C18 (OMIX C18, Agilent technologies) y se eluyeron con acetonitrilo (ACN) al 80% con ácido trifluoroacético al 0,1% durante 15 minutos. Finalmente, las muestras se liofilizaron en un equipo *Speed-Vac* y se resuspendieron en 15 µL de ACN al 2% con ácido fórmico al 0,1% y se conservaron a -20 °C hasta su análisis.

Una vez preparados los péptidos, fueron analizados mediante LC-MS/MS. Para ello, se empleó el cromatógrafo nano Easy-nLC 1000 (Thermo Fisher Scientific) acoplado al espectrómetro de masas de alta resolución Q-Exactive HF (Thermo Fisher Scientific). Los péptidos fueron concentrados por cromatografía de fase reversa usando una precolumna Acclaim PepMap 100 (Thermo Scientific, 20 mm x 75 μ m ID, C18 de 3 μ m diámetro de partícula y 100 Å de tamaño de poro) en tampón A (ACN 2% y ácido fórmico 0,1% en agua) y separados en una columna analítica de fase reversa C18 (Nikkys Technos Co., Ltd; NTCC-360/75-3-125 de 150 mm x 75 μ m ID, 3 μ m de diámetro de partícula, 100 Å de tamaño de poro) con punta integrada para electrospray. Los péptidos fueron eluidos usando un gradiente desde el 5% hasta el 35% de tampón B (ácido fórmico 0,1% en ACN) durante 90 minutos, del 35% al 45% durante 10 minutos y 10 minutos más al 95% con tampón A operando a un flujo constante de 250 nL/minuto.

Este sistema se acopló a la fuente de nanoelectrospray del espectrómetro de masas y la entrada de los péptidos se realizó por ionización con electrospray utilizando la punta integrada en la columna analítica. La adquisición de datos se realizó con un voltaje de 1,8 kV para el electrospray y a una temperatura de 250 °C en el tubo de transferencia de iones que guía los iones desde el spray hasta el interior del espectrómetro de masas. Los péptidos fueron entonces detectados con una resolución de 45 000 en modo *Full scan* MS en un rango de masas m/z de 350-1800 Da. Los datos MS/MS fueron adquiridos en modo de adquisición dependiente de la información y en modo positivo utilizando el software *Xcalibur* 4.0. Así pues, en cada microscan se seleccionaron hasta 12 precursores con carga de 2+ a 4+, en función de su intensidad (punto de corte: 1×10^4), con exclusión dinámica de 20 segundos, seguidos de su aislamiento con un ancho de ventana de ± 2 unidades de m/z , en un tiempo máximo de 100 ms para su fragmentación por disociación de alta colisión con una energía de colisión normalizada del 20%.

4.4.3.2. Desarrollo de un flujo de trabajo computacional para la identificación de antígenos

Para identificar las proteínas sometidas a LC-MS/MS, se desarrolló un flujo de trabajo computacional que permitió procesar los datos crudos arrojados por el espectrómetro de masas y convertirlos en una lista de proteínas identificadas en cada muestra de antígenos junto con su abundancia relativa ([Figura 20](#)). Los datos de masa/carga obtenidos fueron analizados con el motor de búsqueda MS-GF+²⁷⁶ mediante comparación con una base de datos que comprendía el proteoma humano (UP000005640, 74 811 proteínas), el proteoma de *P. falciparum* 3D7

(UP000001450, 5445 proteínas) y una base de datos de contaminantes descargada del Instituto Max Plank de Bioquímica (245 proteínas). Para ello, se convirtieron los datos del espectrómetro de masas a formato MZML utilizando el software *MSConvert* de *ProteoWizard* 3.0.20162. Además, con el comando *BuiSA* se estimaron los péptidos que se obtendrían tras la digestión con tripsina de cada una de las proteínas de la base de datos y sus datos de masa/carga. Posteriormente, se contrastaron los datos obtenidos con los arrojados por el espectrómetro de masas con MSGF+. Los parámetros de búsqueda fueron: tolerancia de masa del precursor, 10 ppm; tipo de instrumento, Q-Exactive; solo péptidos totalmente tripticos; carga del precursor entre 2 y 5; longitud del péptido entre 5 y 64 aminoácidos; máximo de escisiones por tripsina perdidas, 2; modificaciones fijas, carbamidometilación de la cisteína; modificaciones dinámicas, oxidación de la metionina y N-acetilación.

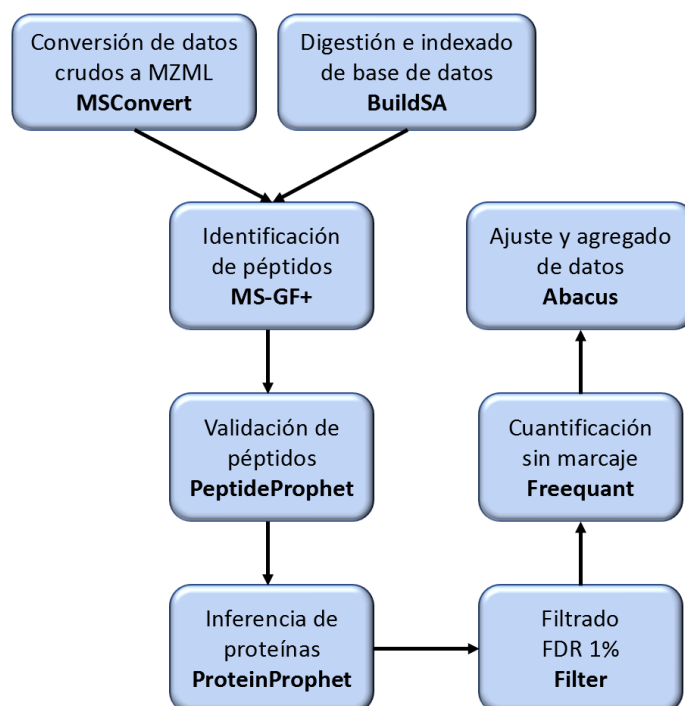


Figura 20 | Flujo de trabajo computacional para la identificación de antígenos a partir de los datos crudos del espectrómetro de masas. Las herramientas y comandos computacionales empleados se indican en **negrita**.

Con el fin de estimar el porcentaje de identificaciones incorrectas de péptidos y proteínas, se utilizó una estrategia conocida como *target-decoy* que consiste en introducir en la base de datos de proteínas las secuencias al derecho y al revés. De esta forma, se introducen en la base de datos numerosas secuencias que no existen en la naturaleza. Los péptidos que se asignen a las secuencias reversas corresponderán con resultados de búsqueda incorrectos y serán

representativos de otras posibles identificaciones incorrectas y, por tanto, permitirán estimar tasa de descubrimientos falsos (FDR) de la búsqueda con el fin de ajustar el porcentaje de acierto de la misma²⁷⁷. Los péptidos identificados por MS-GF+ se filtraron y validaron utilizando el kit de herramientas *Philosopher* versión 3.4.13²⁷⁸. La probabilidad de que cada péptido estuviera realmente en la muestra analizada fue estimada y modelada por *PeptideProphet* y las proteínas fueron inferidas por *ProteinProphet*. Los péptidos y las proteínas se filtraron utilizando una FDR del 1% con el comando *filter* y se cuantificaron sin marcaje mediante las intensidades MS1 con *freequant*. Finalmente, los datos de cuantificación de los múltiples experimentos fueron agregados y ajustados con *Abacus*²⁷⁹.

4.4.4. Microarray de péptidos para la identificación de epítomos inmunodominantes

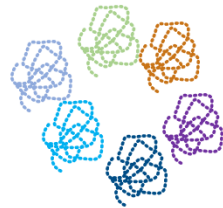
Tras la identificación de antígenos de *P. falciparum* reconocidos por IgM, se seleccionaron los que presentaban un amplio reconocimiento por parte de la población infectada por malaria con el fin de identificar sus epítomos inmunodominantes y asociar su reconocimiento por parte de las IgM con el estado infeccioso individual. Para ello, se realizó un filtrado de los antígenos identificados y se seleccionaron aquellos reconocidos por al menos el 80% de los individuos con MM y MS en, al menos, uno de los grupos de edad o en embarazo (0-5, 14-49, mujeres gestantes y >50 años). Como se muestra en la [figura 21](#), una vez seleccionados los antígenos a analizar, se detectaron y eliminaron las regiones de baja complejidad (BC) y las hélices transmembrana de las secuencias, dado que son poco específicas y poco accesibles al sistema inmunitario respectivamente y se generó una librería de péptidos de 15 aminoácidos con un solapamiento de 14 residuos entre sí. Con ellos, se realizó un análisis de inmunorreactividad por IgM mediante un microarray de péptidos diseñado con las secuencias resultantes, utilizando para ello muestras de plasma diferentes de las utilizadas para el descubrimiento de antígenos. Las muestras utilizadas para el descubrimiento de epítomos lineales fueron de [malaria importada](#) y clasificadas según su nivel de infección en MM, MS, NI y NE.

4.4.4.1. Sustracción de regiones de baja complejidad y de hélices transmembrana

Con el fin de sustraer del análisis regiones antigénicas poco específicas o difícilmente accesibles por el sistema inmunitario, se eliminaron las secuencias de las regiones BC y de las hélices transmembrana en aquellas proteínas de membrana. La identificación de regiones BC se realizó mediante el algoritmo SEG²⁸⁰ de exigencia intermedia utilizando la plataforma online de herramientas de baja complejidad *PlaToLoCo* (<http://platoloco.aei.polsl.pl/>). Por otra parte,

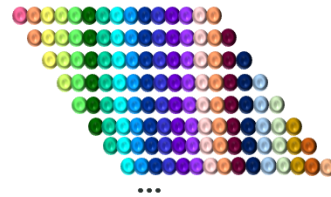
para la detección de las hélices transmembrana, se empleó el servidor automático HMMTOP versión 2.0 (<http://www.enzim.hu/hmmtop/index.php>), cuya función es predecir las hélices transmembrana a partir de una secuencia determinada mediante un método desarrollado por Tusnády, G.E. y Simon, I.²⁸¹

1. SELECCIÓN DE ANTÍGENOS IgM MÁS RECONOCIDOS



Eliminación de regiones BC y
hélices transmembrana

2. GENERACIÓN DE LIBRERÍA DE PÉPTIDOS



3. MICROARRAY DE PÉPTIDOS DE ALTA DENSIDAD

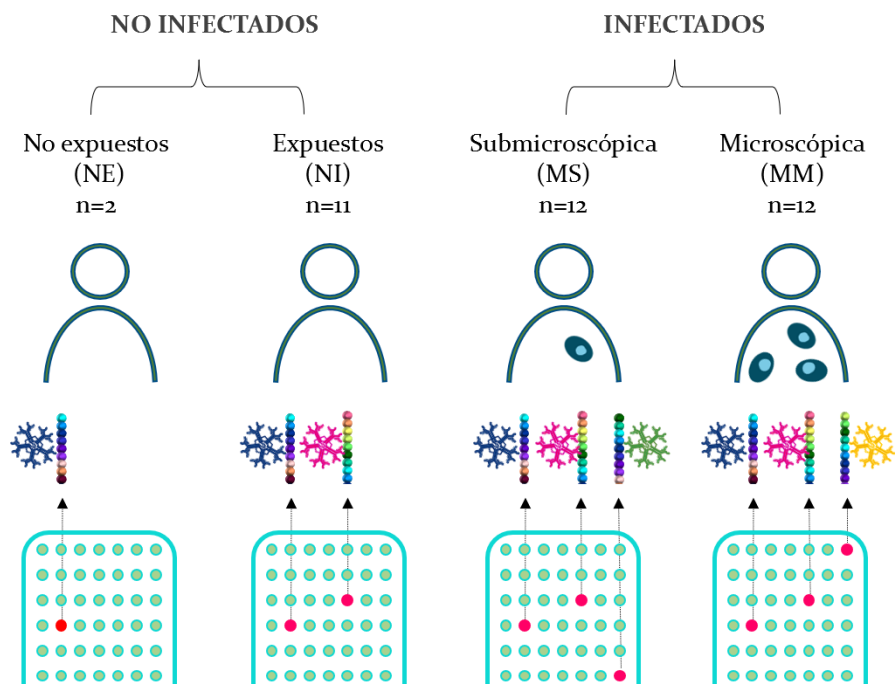


Figura 21 | Diseño del microarray de péptidos para la identificación de epítomos inmunogénicos. El diseño se basó en la selección de los 25 antígenos con mayor reconocimiento por IgM en los individuos infectados por malaria. Tras la eliminación de las regiones BC y las hélices transmembrana de las secuencias de estos antígenos, se creó una librería de 13 099 péptidos lineares con solapamiento de 14 residuos. Estos péptidos fueron distribuidos en un microarray para determinar el reconocimiento de los mismos por parte de la IgM de 37 individuos clasificados según su nivel de infección.

4.4.4.2. Microarray de péptidos

El microarray de péptidos, sintetizado en la compañía Schafer-N, contenía 13 099 péptidos lineales y solapantes en 14 residuos que cubrían la secuencia completa de los antígenos a excepción de las regiones BC y las hélices transmembrana previamente sustraídas de las secuencias. La matriz de péptidos de alta densidad se generó mediante síntesis fotolitográfica sin máscara adaptada a la síntesis de péptidos en fase sólida con el extremo C-terminal anclado a la superficie²⁸². Cada péptido se sintetizó por triplicado y se fijó en 14 arrays de alta densidad, siete de ellos idénticos entre sí, de seis sectores iguales con barreras y con campos de 20x20 μm separados por espacios de 10 μm . Cada sector contenía 20 160 campos de péptido, por lo que se emplearon dos sectores por cada muestra de plasma con el fin de cubrir los 39 297 péptidos procedentes de la síntesis por triplicado de los 13 099 péptidos. En cada sector se incluyó el péptido SHRANETIYNTTLKY procedente de una glicoproteína del β -herpesvirus 5 como control negativo y se consideraron blancos aquellos campos carentes de péptido. El recubrimiento de los arrays se llevó a cabo mediante la incubación de los portaobjetos Nexterion E (Schott AG) con copolímero lineal de N,N'-dimetilacrilamida al 2% (p/v) y metacrilato de aminometilo (Sigma Aldrich) mezclado en una proporción 20:1 p/p antes de la polimerización durante 2 h a temperatura ambiente tampón de borato de sodio 0,1 M recién desgasificado a pH 8 (TEMED 0,025% (v/v) y persulfato de amonio 0,1% (p/v)) como está descrito²⁸². Posteriormente, se incubó cada muestra de plasma en dos sectores conteniendo péptidos diferentes a una concentración 1:20 con respecto al plasma original diluido en tampón (Tris/acetato 0,05 M, pH 8, NaCl 0,13 M, Tween20 0,1% (v/v) y BSA a 1 g/L) durante 2 h a temperatura ambiente. Tras lavar con el mismo tampón, se incubó con un anticuerpo anti-IgM humana conjugado con Alexa Fluor® 647 a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 2 h a temperatura ambiente y se lavaron de nuevo. Finalmente, los portaobjetos se centrifugaron y se escanearon con una resolución de 1 μm en un escáner laser InnopSys 900 utilizando una longitud de onda de excitación de 647 nm. Las imágenes se analizaron con el software PepArray (Schafer-N) y la señal fluorescente en cada campo se calculó como la media ponderada de las intensidades de los píxeles en ese campo.

4.4.5. Análisis estadísticos

El procesamiento de datos, los análisis estadísticos y las gráficas se elaboraron en el entorno R v3.6.3. Las diferencias entre el número de antígenos reconocidos por los grupos de infección y los controles negativos se evaluaron mediante un test de análisis de la varianza. En caso de un resultado significativo, se realizó una prueba t de *Student* no pareada por parejas para identificar

los contrastes que dieron lugar a la significación. Para establecer si había diferencias estadísticamente significativas en el resto de variables entre los individuos clasificados por grupos de edad e infección o los antígenos expresados en distintos estadios o según la presencia de regiones BC, se realizaron test de *Wilcoxon* no pareados. Con el fin de visualizar los solapamientos entre los antígenos identificados en cada grupo se utilizó la librería *VennDiagram*²⁸³ y las correlaciones entre distintas variables se estimaron mediante la prueba de *Pearson*. La caracterización biológica de los antígenos identificados se realizó mediante un análisis de enriquecimiento de términos de ontología genética (GO, por sus siglas en inglés) empleando la librería *ClusterProfiler* de Bioconductor²⁸⁴ y la anotación del genoma de la malaria (org.Pf.plasmo.db).

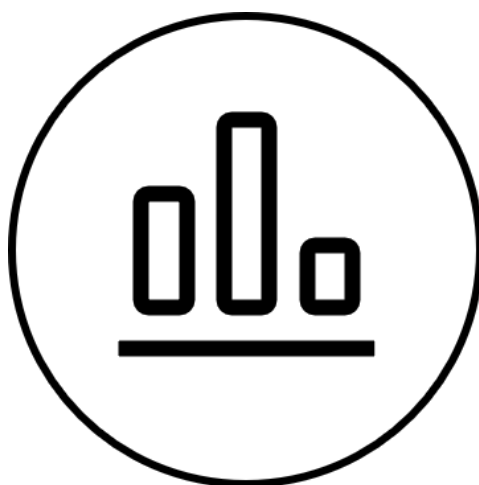
Para determinar el o los estadios en los que se expresa cada antígeno, se utilizó la herramienta *MCA app* del *Malaria Cell Atlas*²⁸⁵ (<https://www.sanger.ac.uk/tool/mca/mca>), un proyecto que proporciona datos transcriptómicos de célula única a lo largo del ciclo de vida de *P. falciparum*. Se anotó en qué fase intraeritrocítica de anillo, trofozoíto y/o esquizonte se expresaba cada uno de los antígenos identificados y, en base a su perfil de expresión, fueron clasificados para cada estadio en dos grupos, expresados o no expresados. Por otra parte, la detección de regiones BC se realizó mediante el algoritmo SEG²⁸⁰ de exigencia intermedia utilizando la plataforma online de herramientas de baja complejidad *PlaToLoCo* (<http://platoloco.aei.polsl.pl/>).

Los datos de abundancia de los antígenos se obtuvieron a partir de las intensidades de MS1. Tras transformarlos con log2 y normalizarlos mediante el método de estabilización de la varianza²⁸⁶, se sometieron a una prueba de enriquecimiento diferencial basada en modelos lineales y estadísticas empíricas de Bayes utilizando la librería *DEP* de Bioconductor²⁸⁷, una librería desarrollada para identificar proteínas diferencialmente enriquecidas o expresadas en datos proteómicos cuantitativos basados en la espectrometría de masas. Los datos transformados y normalizados se utilizaron también para la representación de mapas de calor diseñados con la librería *pheatmap*²⁸⁸ y el análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) con la librería *factoextra*²⁸⁹.

Con respecto a los análisis estadísticos de los resultados arrojados por el microarray de péptidos, en primer lugar, los datos de intensidad de señal se transformaron con puntuaciones *z*, es decir, en el número de desviaciones estándar (DE) de los blancos sin péptido que tiene la intensidad de señal de un péptido sobre la media de los blancos. Una vez transformados los datos, se llevó a cabo un análisis exploratorio de los mismos mediante PCA y la visualización de mapas de calor de la intensidad de los péptidos en cada individuo por grupos de infección,

empleando para ello las librerías *Pheatmap*²⁸⁸ y *Factoextra*²⁸⁹. Se consideraron señales positivas aquellas en las que al menos dos de las tres réplicas del péptido tuvieran una señal con $p\text{-valor} \leq 0,05$ y la señal media fuera superior a la media de las señales superiores a 0 de los individuos NE. Este punto de corte se estimó en 5,6 puntuaciones z. Se verificó que este punto de corte era adecuado mediante la visualización de gráficos de densidad de la intensidad de señal de los distintos grupos de infección. Las diferencias entre grupos se determinaron mediante la prueba t de *Student* en el caso de los datos con distribuciones normales o con el test no paramétrico de *Wilcoxon* no pareado en el caso de distribuciones no normales. Las correlaciones entre distintas variables se estimaron mediante el test de *Pearson*. En todos los casos, se estableció la significación estadística en aquellos $p\text{-valores} \leq 0,05$.

5. RESULTADOS



5.1. ESTADO DE INFECCIÓN E INMUNITARIO EN POBLACIONES HIPERENDÉMICAS DE MALARIA

En este estudio, se realizó un análisis poblacional de la prevalencia y grado de infección en sangre por *P. falciparum* y de la sensibilidad diagnóstica local en dos regiones hiperendémicas de malaria localizadas en Ghana y RDC. Además, se realizó un examen, en cada individuo, de los niveles de inmunidad humoral frente a la infección con el fin de establecer marcadores de progresión o tolerancia frente a la infección. Para ello, se midieron los niveles de tres clases de Ig serológicas (IgG, IgM e IgA), tanto totales como específicas de *P. falciparum*, y se evaluó su potencial como marcadores de exposición o protección frente a la infección.

5.1.1. Características demográficas y clasificación de la población

Para realizar el estudio, se recogieron un total de 424 muestras de sangre y plasma de individuos procedentes de Ghana (n = 200) y RDC (n = 224). Los sujetos fueron clasificados atendiendo a cuatro factores: sexo, edad, estado de embarazo y país de procedencia. De los 424 individuos que se incluyeron en el estudio, el 36,79% fueron hombres y el 62,5% mujeres ([Tabla 3](#)). La edad media de los participantes fue de 28,65 años y se establecieron cuatro grupos de edad atendiendo al distinto grado de susceptibilidad frente a la malaria descrita en la bibliografía^{145,290,291}: niños menores de 5 años, niños entre 6 y 13 años, adultos en edad reproductiva (14-49 años) e individuos mayores de 50. Las mujeres pertenecientes al grupo de edad 14-49, se clasificaron a su vez en gestantes y no gestantes. El grupo de edad mayoritario fue el de adultos entre 14 y 49 años con un 37,2% de la población, seguido de las mujeres gestantes (23,6%), personas mayores de 50 años (16,27%), niños menores de 5 (12,97%) y, por último, jóvenes de 6 a 13 años (9,91%) ([Tabla 3](#)).

5.1.2. Prevalencia de malaria y su distribución en la población

Para determinar la prevalencia de malaria y la intensidad de la infección en la población, se estimó la parasitemia de *P. falciparum* en todos los individuos mediante PCR cuantitativa. El LDD del parásito mediante el examen microscópico de extensiones sanguíneas se definió en 150 parásitos/ μ L de sangre por ser el valor medio descrito en la bibliografía (100-200 parásitos/ μ L)^{292,293}. De acuerdo con él, las muestras se clasificaron en tres grupos de infección: NI, MS (0,5-150 parásitos/ μ L) o MM (>150 parásitos/ μ L).

Tabla 3

Distribución de la población por parámetros demográficos

Edad/embarazo	GHANA			RDC			TOTAL		
	Mujeres	Hombres	Total	Mujeres	Hombres	Total	Mujeres	Hombres	Total
0-5	9 (32,14%)	19 (67,86%)	28 (14%)	13 (48,15%)	14 (51,85%)	27 (12,05%)	22 (40%)	33 (60%)	55 (12,97%)
6-13	6 (46,15%)	7 (53,85%)	13 (6,5%)	11 (37,93%)	18 (62,07%)	29 (12,95%)	17 (40,48%)	25 (59,52%)	42 (9,91%)
14-49	35 (77,78%)	10 (22,22%)	45 (22,5%)	56 (49,56%)	56 (49,56%)	113* (50,45%)	91 (57,59%)	66 (41,77%)	158 (37,26%)
Gestantes	88 (100%)	0	88 (44%)	12 (100%)	0	12 (5,36%)	100 (100%)	0	100 (23,58%)
>50	19 (73,08%)	7 (26,92%)	26 (13%)	16 (37,21%)	25 (58,14%)	43** (19,2%)	35 (50,72%)	32 (46,38%)	69 (16,27%)
Total	157 (78,5%)	43 (21,5%)	200	108 (48,21%)	113 (50,45%)	224	265 (62,5%)	156 (36,79%)	424

Los porcentajes de mujeres y hombres han sido calculados con respecto al total de cada grupo de edad. Los de los totales expresan el porcentaje de cada grupo de edad con respecto al total del país

* Incluye 1 individuo (0,88%) con sexo no registrado

** Incluye 2 individuos (4,65%) con sexo no registrado

La prevalencia de malaria en la población total fue del 59,07% y mostró gran similitud entre los dos países (60,59% en Ghana y 57,71% en RDC). De todas las infecciones, encontramos que las de tipo submicroscópico eran mayoritarias en ambas poblaciones: 75,61% en Ghana y 54,96% en RDC con una media total del 64,96% ([Figura 22](#)).

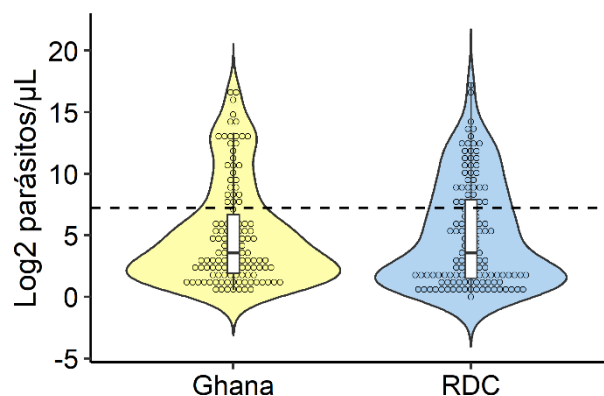


Figura 22 | Niveles de parasitemia en la población infectada de Ghana y RDC. Las infecciones detectables (arriba) o no detectables (abajo) por microscopía están separadas por la línea de puntos. Los valores de parasitemia medidos en parásitos/μL fueron transformados con log2.

Posteriormente, tras analizar la relación entre la parasitemia y la edad de los individuos, se pudo observar que la edad es un factor determinante en la densidad de parásitos que se desarrolla tras la infección. Los individuos con MM eran significativamente más jóvenes que aquellos con MS o NI (23,94 años frente a 29,84 y 29,87 años respectivamente) ([Figura 23A](#)). Este resultado fue también demostrado mediante un análisis de correlación que reveló una correlación inversa y significativa de la edad con la parasitemia, que disminuía a medida que aumentaba la edad de los donantes en ambas poblaciones ([Figura 23B](#)).

A pesar de que esta disminución de la parasitemia con la edad se observó en ambas poblaciones, el descenso fue mucho más notable en Ghana, cuya prevalencia de MM fue notablemente superior en los niños menores de 5 años y entre 6 y 13 años (25% y 23% respectivamente) con respecto a los adultos jóvenes y mayores de 50 (11% y 4% respectivamente) ([Figura 24A](#)). Este descenso de la prevalencia de MM con la edad se vio compensado con un aumento de la MS, cuya prevalencia aumentó con bastante evidencia a partir de los 6 años de edad (29%, 54%, 40% y 56% en niños menores de 5, 6-13, 14-49 y mayores de 50 años respectivamente). Sin embargo, en RDC estas diferencias en la parasitemia entre grupos de edad fueron menos notables, siendo ligeramente inferior la prevalencia de MM en adultos con respecto a los niños (26%, 38%, 22% y 23% en niños menores de 5, 6-13, 14-49 y

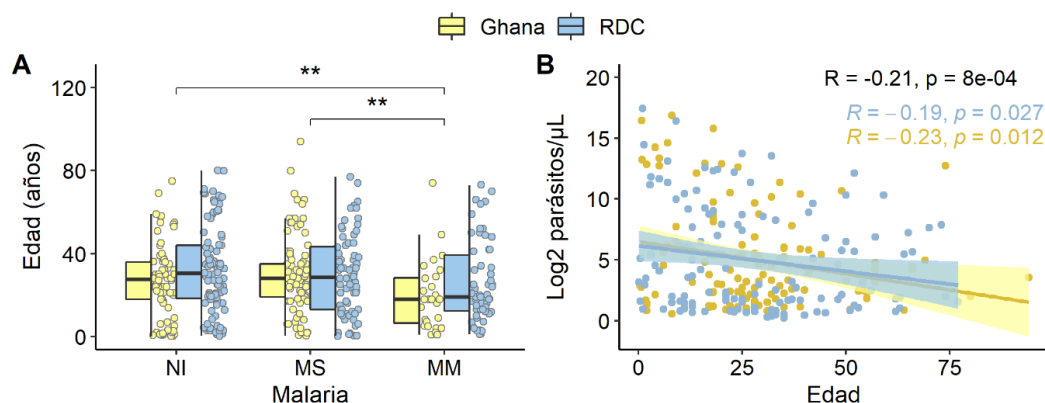


Figura 23 | Disminución de la parasitemia con la edad de los individuos en Ghana y RDC. **A**, edad de los individuos por grupo de infección. Cada gráfico de cajas muestra la distribución de la edad de los individuos que forman cada grupo de infección: MM, MS y NI por país (La barra central indica la mediana, los bordes de las cajas los cuartiles (Q) 1 y 3 y los bigotes se extienden hasta los valores mínimo y máximo no superiores a $Q1/Q3 \pm 1,5 \times$ Rango intercuartílico (RIC)). Las diferencias significativas obtenidas mediante el test de *Wilcoxon* indican p-valor $\leq 0,01$ (**). **B**, correlación de *Pearson* entre la edad y el logaritmo en base 2 de la parasitemia. Se muestra el coeficiente de correlación de *Pearson* (R) y el p-valor de Ghana (amarillo), RDC (azul) y del conjunto de las dos poblaciones (negro).

mayores de 50 años respectivamente) (Figura 24B). La prevalencia de malaria total sin tener en cuenta la carga parasitaria fue similar en los niños menores de 5 años y los adultos, jóvenes y mayores de 50 años, en ambas poblaciones, mientras que los niños de 6 a 13 años mostraron prevalencias de malaria algo superiores. Las mujeres gestantes mostraron una prevalencia de malaria del 66% y 75% en Ghana y RDC respectivamente, superior en ambos casos a la observada en las mujeres no gestantes que fue del 51% y 46% en ambas localizaciones (Figura 24C y D). En RDC, además, se observó un notable aumento en la proporción de gestantes con MM, viéndose incrementada la parasitemia una vez que se infectaban en comparación con las mujeres no gestantes de su mismo rango de edad (Figura 24D).

5.1.3. Comparación de métodos de diagnóstico locales y moleculares

El objetivo de este estudio fue comparar la sensibilidad de los TDR utilizados como rutina diagnóstica de malaria en los hospitales locales. Para ello, se recopilieron los resultados del diagnóstico obtenido mediante TDR en 171 pacientes que acudieron a *Our Lady of Grace Hospital* (Ghana) y se compararon con aquellos obtenidos mediante PCR cuantitativa, el método molecular más sensible para diagnosticar malaria conocido hasta la fecha. Las comparaciones se realizaron en la población total y en cada grupo de edad (≤ 5 , 6-13, 14-49, ≥ 50) y de parasitemia (>150 parásitos/μL, <150 parásitos/μL) establecidos por separado.

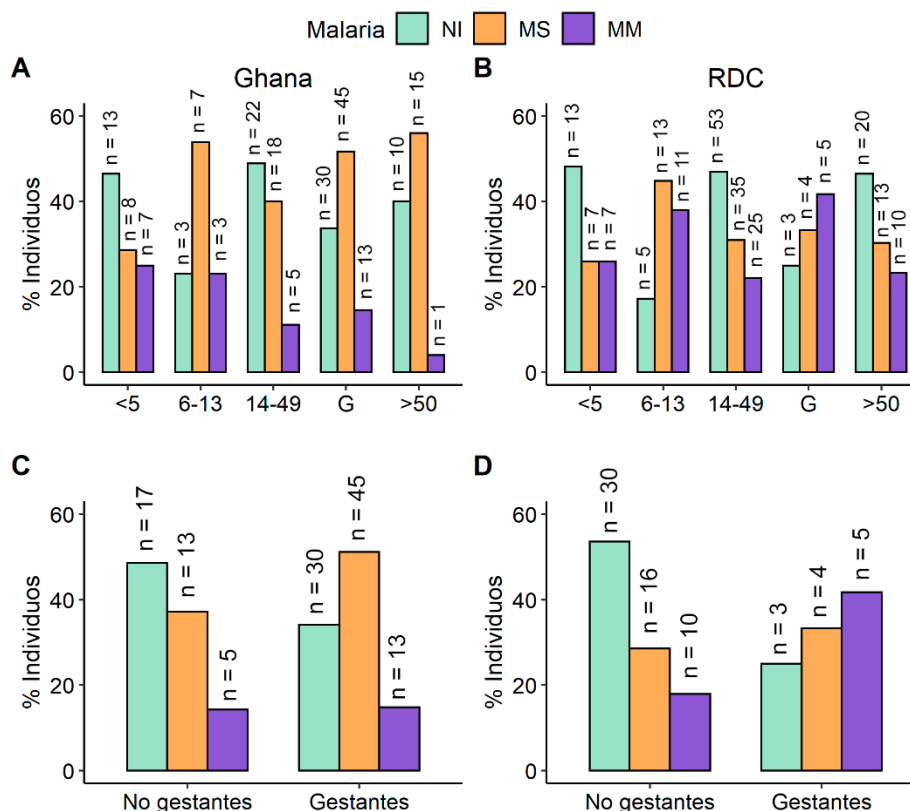


Figura 24 | Prevalencia de cada tipo de infección por malaria por grupo de edad o embarazo en Ghana y RDC. Frecuencia MM, MS y NI por grupo de edad y embarazo (G) en A, Ghana y B, RDC y en mujeres gestantes y no gestantes en las mismas poblaciones C y D.

La prevalencia global de la malaria aumentó drásticamente desde el 9,36% mediante diagnóstico con TDR hasta el 61,57% mediante PCR (Tabla 4). La tasa media de falsos negativos del TDR fue del 85,05% y se observaron algunas diferencias según la edad. El porcentaje de falsos negativos fue menos pronunciado en el grupo de menores de 5 años, donde el valor disminuyó al 57,14%. La sensibilidad del TDR fue gravemente baja en el grupo de edad de 14 a 49 años y en las infecciones de tipo submicroscópico (Figura 25). Este resultado parece ser coherente con la elevada prevalencia de malaria a bajas parasitemias detectada en los individuos de ese rango de edad. De las 73 infecciones de MS diagnosticadas por PCR, el 98,63% no fueron detectadas por el TDR (Figura 25), mientras que en las infecciones de MM (n = 24) este valor descendió al 50%. Solo uno de los 16 individuos en los que se detectó la presencia de *P. falciparum* mediante TDR resultó negativo mediante PCR. Calculamos que el límite de detección de los TDR utilizados localmente en Ghana era de 131 parásitos/μL, muy superior a los 0,5 parásitos/μL detectados por la qPCR.

Tabla 4

Comparación de resultados diagnósticos de malaria mediante los métodos TDR y PCR

Edad	n	TDR+ (%)	qPCR + (%)	Falsos negativos TDR (%)	Sensibilidad TDR (%)	Especificidad TDR (%)
0-5	26	6 (23,08%)	14 (53,85%)	8 (57,14%)	42,86%	100%
6-13	13	2 (15,38%)	10 (76,92%)	8 (80,00%)	20,00%	100%
14-49	113	6 (5,31%)	71 (62,83%)	65 (91,55%)	8,45%	97,62%
>50	19	2 (10,53%)	12 (63,16%)	10 (83,33%)	16,67%	100%
Total	171	16 (9,36%)	107 (61,57%)	91 (85,05%)	14,95%	98,44%

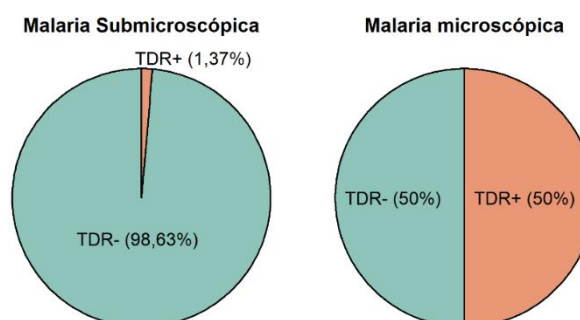


Figura 25 | Porcentaje de individuos diagnosticados de malaria mediante TDR con respecto al método de referencia (PCR). Se muestra por separado el diagnóstico por TDR de los 73 casos con MS (<150 parásitos/ μ L) y los 24 casos de MM (>150 parásitos/ μ L) detectados por PCR en el total de la población.

Dado que en el hospital *Our Lady of Grace* de Ghana se calcula rutinariamente el nivel de parasitemia por microscopía en los casos positivos de TDR, tuvimos la oportunidad de comparar la precisión de la estimación de la parasitemia por los exámenes microscópicos realizados por los técnicos locales con la de la PCR cuantitativa. Como se muestra en la [Figura 26](#), los resultados emitidos por ambas técnicas fueron similares, observándose una fuerte correlación entre las densidades de parásitos detectadas por microscopía y PCR cuantitativa (coeficiente de correlación de *Spearman* = 0,67, p-valor = 0,006). De los 16 individuos examinados, dos (12,5%) mostraron diferencias notables en las densidades de parásitos por ambos métodos atribuibles a errores en el recuento microscópico.

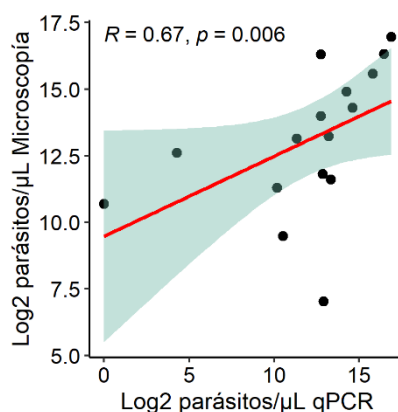


Figura 26 | Comparación de la estimación de la parasitemia mediante microscopía y PCR. Se indica la correlación de *Spearman* obtenida entre los datos de parasitemia estimada mediante las dos técnicas de los 16 individuos positivos por TDR.

5.1.4. Niveles de anticuerpos serológicos frente a *P. falciparum*

Nos propusimos evaluar la influencia de la edad como factor determinante en el desarrollo de la respuesta humoral específica contra *P. falciparum* y la relación de dicha respuesta con el estado de infección. Para ello, se realizaron mediciones mediante ELISA de las IgG, IgM e IgA serológicas tanto totales como específicas de *P. falciparum* en todos los individuos procedentes de Ghana de los que se disponía de muestra de plasma ($n = 195$). Los individuos con edades comprendidas entre los 6 y los 13 años fueron descartados de este análisis debido al bajo tamaño muestral de este grupo al separarlo por grupos de infección. De los individuos analizados, el 97,9% mostraron niveles detectables de las seis Ig en contraste con la ausencia total en donantes sanos no expuestos previamente a la malaria.

En general, las tres clases de anticuerpos específicos de *P. falciparum* mostraron patrones similares en todos los grupos de edad e infección, salvo algunas excepciones ([Figura 27 A-C](#)). En la población NI, los adultos (grupos 14-49 no gestantes y >50 años) mostraron concentraciones de Pf-IgG, Pf-IgM y especialmente de Pf-IgA significativamente mayores que los niños menores de 5 años. Esta dinámica se repitió en el grupo de MS únicamente en la Pf-IgG, mientras que la Pf-IgM y la Pf-IgA aumentaron únicamente en los individuos mayores de 50 años con respecto a los niños menores de 5. Por el contrario, no se observaron diferencias entre grupos de edad en los individuos infectados por MM. Los niveles de Ig totales de los individuos NI también se vieron incrementados con la edad en los tres isotipos de Ig, siendo especialmente fuerte este incremento en el caso de la IgA total ([Figura 27 D-F](#)) de forma similar a lo observado en la Pf-IgA. Este aumento en los niveles de Ig total en los adultos con respecto a los niños no se observó en

los individuos con MM ni MS en el caso de la IgG e IgM total, pero permaneció en el caso de la IgA total de los individuos portadores de MS ([Figura 27F](#)).

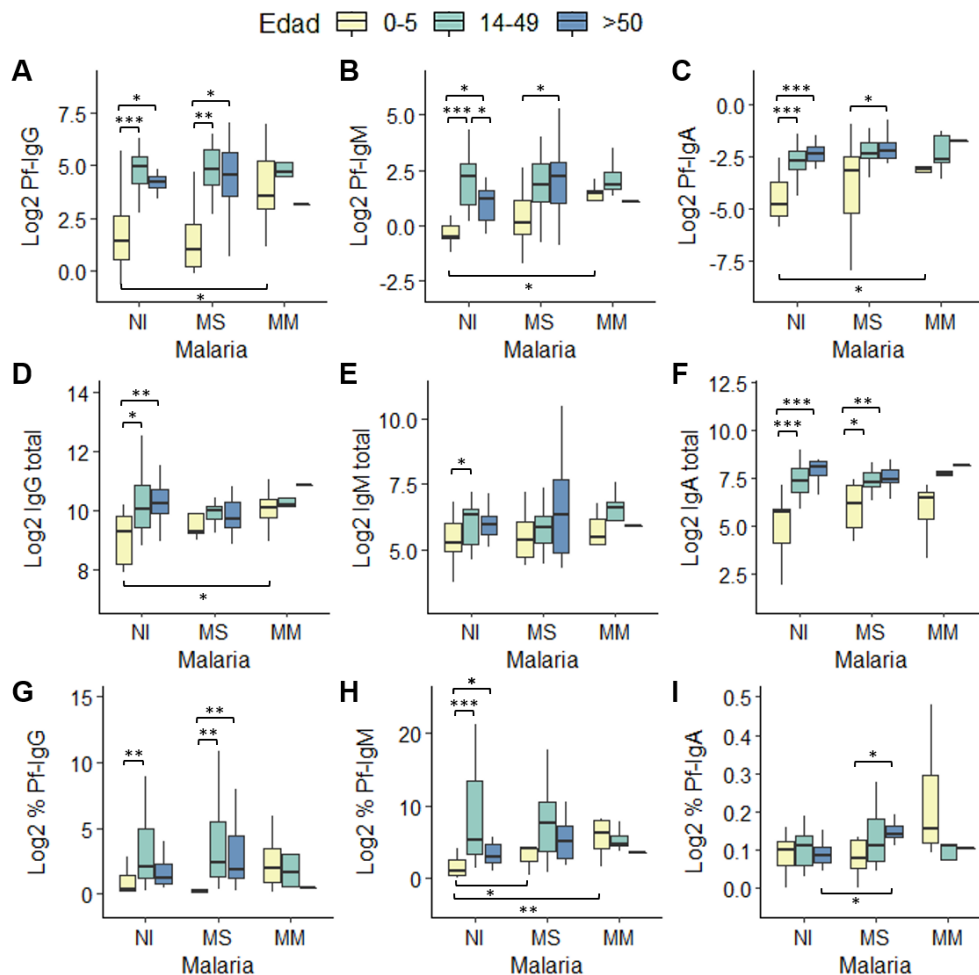


Figura 27 | Variaciones de los niveles de IgG, IgM e IgA específicas de *P. falciparum*, totales y su porcentaje según la edad y el estado de infección. Los datos de concentración fueron calculados en mg/dL y transformados en log2. Los porcentajes expresan como el porcentaje de concentración de cada Ig específica de *P. falciparum* con respecto su total. NI, no infectado; MS, malaria submicroscópica; MM, malaria microscópica. Cada gráfico de cajas muestra la distribución de los niveles de anticuerpos de cada grupo (la barra central indica la mediana, los bordes de las cajas, los Q1 y Q3 y los bigotes se extienden hasta los valores mínimo y máximo no superiores a Q1/Q3 $\pm$ 1,5 x RIC). Las diferencias significativas obtenidas mediante el test de Wilcoxon se indican con asteriscos (*). La significación entre grupos de edad se encuentra marcada en la parte superior del gráfico y la significación entre grupos de infección se marca en la parte inferior. *, p-valor $\leq$ 0,05; **, p-valor $\leq$ 0,01; ***, p-valor $\leq$ 0,001.

Los niños, a pesar de ser el grupo con menor concentración de anticuerpos, fueron los que mostraron mayores alteraciones en los niveles de Ig tras la infección a altas parasitemias. Así, todas las Ig específicas se vieron incrementadas significativamente en los niños que padecían MM con respecto a los NI, alcanzando niveles similares a los adultos con MM ([Figura 27 A-C](#)).

Las infecciones de MM y MS no influyeron en los títulos de IgM e IgA total en ningún grupo de edad, aunque en los niños con MM la IgG total aumentó ligeramente con respecto a los NI ([Figura 27 D-F](#)). En los niños con MS, el porcentaje de IgM específica fue el único valor que se vio incrementado significativamente respecto a los niños NI ([Figura 27H](#)). En los adultos, se observó un aumento significativo del porcentaje de IgA específica ([Figura 27I](#)), mientras que los niveles de Pf-IgG permanecieron en sus niveles basales tras padecer este tipo de infección ([Figura 27G](#)).

Posteriormente, se analizó si el embarazo producía alteraciones en la producción de Ig serológicas tras la infección por malaria. Así, se compararon los niveles de Ig de las mujeres gestantes y de sus homólogas no gestantes en los grupos de infección establecidos sin encontrar apenas diferencias ([Figura 28](#)). Analizando estos datos según el estado de infección de las mujeres gestantes y no gestantes por separado, encontramos que solo las primeras sufrieron alteraciones en los niveles de Ig al infectarse de malaria. Resulta interesante que la IgM fue la única Ig que varió su concentración en mujeres embarazadas que se infectan con *P. falciparum*, en especial si padecen MM ([Figura 28B, E, H](#)). En cuanto a las comparaciones entre gestantes y no gestantes, únicamente los niveles de IgG total se vieron disminuidos en las mujeres gestantes con MS con respecto a las no gestantes con el mismo tipo de infección ([Figura 28D](#)).

5.1.5. Alteración de parámetros hematológicos tras la infección por *P. falciparum*

Para analizar los cambios hematológicos desencadenados por la infección por *P. falciparum*, se midieron las siguientes variables hematológicas: concentraciones de Hb, plaquetas y leucocitos y porcentajes de neutrófilos, linfocitos y monocitos en cada individuo procedente de Ghana (n = 195) y se compararon por grupos de parasitemia, edad y embarazo ([Tabla 5](#)). En general, tras analizar el conjunto de la población independientemente de la edad, se observó una disminución significativa del nivel de Hb, del recuento de plaquetas y de leucocitos en los individuos con MM en comparación con aquellos con MS o NI.

En comparación con los individuos sanos, el total de pacientes infectados por malaria mostraron, como era de esperar, una disminución significativa de los niveles de Hb. Las diferencias fueron estadísticamente significativas en los adultos no gestantes con MS y en las mujeres gestantes con MM y, aunque no fue estadísticamente significativo, se observó una tendencia similar en niños.

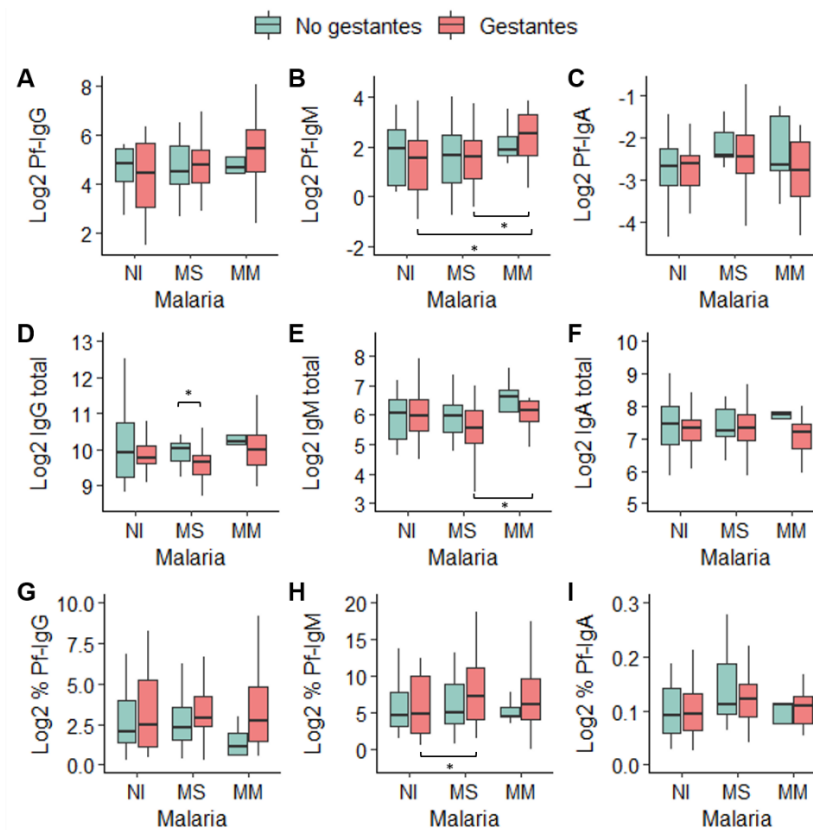


Figura 28 | Variaciones de los niveles de IgG, IgM e IgA totales, específicas de *P. falciparum* y su porcentaje en mujeres en edad fértil dependiendo del estado de embarazo. Los datos de concentración fueron calculados en mg/dL y se transformaron con log2. Los porcentajes se expresan como el porcentaje de concentración de Ig específica de *P. falciparum* con respecto a la concentración de Ig total. NI, no infectado; MS, malaria submicroscópica; MM, malaria microscópica. Cada gráfico de cajas muestra la distribución de los niveles de anticuerpos de cada grupo (la barra central indica la mediana, los bordes de las cajas, los Q 1 y 3 y los bigotes se extienden hasta los valores mínimo y máximo no superiores a $Q1/Q3 \pm 1,5 \times RIC$). Las diferencias significativas obtenidas mediante el test de Wilcoxon se indican con asteriscos (*). La significación entre grupos de gestantes y no gestantes se encuentra marcada en la parte superior del gráfico y la significación entre grupos de infección se marca en la parte inferior. *, p-valor $\leq 0,05$.

Los recuentos de plaquetas mostraron valores reducidos en los grupos infectados, especialmente en los niños más pequeños, cuyas plaquetas disminuyeron significativamente en las infecciones MS y MM en comparación con los niños NI. Sin embargo, no se encontraron alteraciones significativas en los valores de plaquetas en las mujeres gestantes y en los adultos mayores de 50 años. En cuanto a las células inmunitarias, la concentración de leucocitos en sangre disminuyó significativamente en los niños y adultos no gestantes con MM en comparación con sus homólogos NI. Entre las subpoblaciones leucocitarias de linfocitos, neutrófilos y monocitos, solamente estos últimos se vieron ligeramente alterados. La infección con MS en el grupo de 0 a 5 años aumentó la proporción de monocitos, no solo con respecto a los individuos NI, sino también a los infectados con MM.

Tabla 5

Efecto de la infección por malaria en los parámetros hematológicos por grupo de edad y embarazo

		0-5			14-49						>50			Población completa		
					No gestantes			Gestantes								
		n	Mediana (RIC)	P-valor	n	Mediana (RIC)	P-valor	n	Mediana (RIC)	P-valor	n	Mediana (RIC)	P-valor	n	Mediana (RIC)	P-valor
Hb (g/dL)	MM	7	7,0 (6,8-11)		5	10,9 (10,5-11,4)		12	10,3 (9,3-10,5)	0,0114 (vs NI) 0,0046 (vs MS)	1	13,2		28	10,50 (9,3-11,2)	0,0077 (vs NI) 0,0087 (vs MS)
	MS	8	10,7 (9,1-11,3)		16	11,1 (10-11,6)	0,022 (vs NI)	43	11,1 (10,15-11,9)		14	12,4 (10-13,3)		88	11,15 (10,1-12,3)	
	NI	13	10,2 (9,9-10,8)		22	12,3 (11,2-13,3)		27	10,8 (10,2-11,5)		10	12,6 (11,8-12,8)		69	10,90 (10,2-12,4)	
Plaquetas (x10 ⁹ /L)	MM	7	112 (88-202)	0,014 (vs MS) 0,0004 (vs NI)	5	139 (88-150)	0,0073 (vs NI) 0,0147 (vs MS)	12	150 (95-224)		1	195		28	155 (89-198)	< 0,0001 (vs NI) 0,0003 (vs MS)
	MS	8	305 (216-333)	0,0326 (vs NI)	16	237 (166-263)		43	197 (174-245)		14	205 (100-254)		88	209 (169-263)	
	NI	13	391 (367-441)		22	196 (170-256)		27	207 (167-243)		10	202 (176-244)		69	239 (182-301)	
Leucocitos (x10 ⁹ /L)	MM	7	6,0 (4,2-7,7)	0,0062 (vs NI)	5	4,6 (3,6-5,3)	0,043 (vs NI)	12	6,8 (4,1-7,9)		1	7,5		28	6 (4,1-7,5)	0,047 (vs NI)
	MS	8	8,5 (6,8-14,7)		16	5,7 (4-7,2)		43	7,1 (5,9-8,1)		14	5,1 (3,9-7,4)		88	6,8 (5,3-7,9)	
	NI	13	10,1 (8,4-10,4)		22	6,3 (4,5-7,1)		27	6,6 (6,3-7,6)		10	4,4 (3,9-5,6)		69	6,7 (5,6-8,9)	
Neutrófilos (%)	MM	7	44 (37,5-51)		5	47 (45-50)		12	60,5 (57,7-66)		1	87		28	58,5 (44,7-69,7)	
	MS	8	36,5 (25-47,2)		16	54,5 (40,7-66,2)		43	61 (54,5-66,5)		14	44 (36-59)		88	56,5 (42-64)	
	NI	13	38 (24-48)		22	54,5 (43,7-71,5)		27	62 (53-68)		10	49 (40-57,7)		69	54 (43-68)	
Linfocitos (%)	MM	7	45 (39,5-56,5)		5	41 (40-43)		12	31,5 (26,2-33,2)		1	10		28	32,5 (20,5-41,5)	
	MS	8	53 (46,2-53,2)		16	35,5 (25,7-48)		43	30 (24,5-37,5)		14	49 (41-53)		88	35 (26-48,2)	
	NI	13	60 (42-63)		22	38 (19,7-45)		27	29 (25-36)		10	42,5 (37,5-49,2)		69	36 (26-46)	
Monocitos (%)	MM	7	8 (6-10)	0,031 (vs MS)	5	14 (10-14)		12	9 (7-11)		1	3		28	9 (7-11)	
	MS	8	14,5 (11-2,2)	0,034 (vs NI)	16	10,5 (6,7-12,7)		43	9 (6,5-11)		14	5 (4-12)		88	10 (6-12)	
	NI	13	4 (0-10)		22	9 (3-12,5)		27	8 (6-11,5)		10	10 (5,2-13)		69	8,5 (3,7-12)	

Solo se indican los P-valores significativos. Los individuos entre 6 y 13 años se han incluido en los análisis de población completa.

Tras comparar mujeres gestantes y no gestantes, únicamente se observaron ligeras alteraciones. Las mujeres gestantes con MS mostraron unos recuentos de leucocitos significativamente superiores a la de sus homólogas no gestantes ([Tabla 6](#)).

Tabla 6

Efectos del embarazo en los parámetros hematológicos de mujeres en edad fértil por grupo de infección

		NI			MS			MM		
		n	Mediana (RIC)	P- Valor	n	Mediana (RIC)	P- Valor	n	Mediana (RIC)	P- Valor
Hb (g/dL)	Gestantes	27	10,8 (10,2-11,5)		43	11,1 (10,1-11,9)		12	10,3 (9,35-10,5)	
	No Gestantes	17	11,5 (10,7-13,1)		13	11 (10,1-11,4)		5	10,9 (10,5-11,4)	
Plaquetas (x10⁹/L)	Gestantes	27	207 (167- 243)		43	197 (174-245)		12	150 (95-225)	
	No Gestantes	17	243 (187-257)		13	252 (210-263)		5	139 (88-150)	
Leucocitos (x10⁹/L)	Gestantes	27	6,6 (6,3-7,6)		43	7,1 (5,9-8,1)	0,029	12	6,8 (4,1-7,9)	
	No Gestantes	17	6,1 (4,4-7)		13	5,7 (4-7,1)		5	4,6 (3,6-5,3)	
Neutrófilos (%)	Gestantes	27	62 (53-68)		43	61 (54,5-66,5)		12	60,5 (57,7-66)	
	No Gestantes	17	54 (44-69)		13	51 (40-66)		5	47 (45-50)	
Linfocitos (%)	Gestantes	27	29 (25-36)		43	30 (24,5-37,5)		12	31,5 (26,2-33,25)	
	No Gestantes	17	39 (20-45)		13	38 (28-48)		5	41 (40-43)	
Monocitos (%)	Gestantes	27	8 (6-11,5)		43	9 (6,5-11)		12	9 (7-11)	
	No Gestantes	17	10 (4-14)		13	10 (6-12)		5	14 (10-14)	

La anemia se diagnosticó mediante la concentración de Hb y se clasificó su gravedad siguiendo las directrices de la Organización Mundial de la Salud²⁹⁴ en anemia leve, moderada o grave. Del total de participantes, el 61,62% tenía alguna forma de anemia. Como se muestra en la [Figura 29](#), la tasa más alta de anemia grave se encontró en los niños que sufrían MM (57,14%), seguidos por los adultos mayores de 50 años y los niños que sufrían MS (21,43% y 12,5% respectivamente) ([Figura 29A](#)). La mayor prevalencia de anemia total se detectó en las mujeres gestantes con MM (91,67%) ([Figura 29B](#)) y la menor en los adultos mayores de 50 años NI (40%) ([Figura 29A](#)). Los individuos no infectados por malaria también mostraron distintos grados de anemia, que fueron desde el 76,92% en los niños hasta el 40% en el grupo de mayor edad ([Figura 29A](#)).

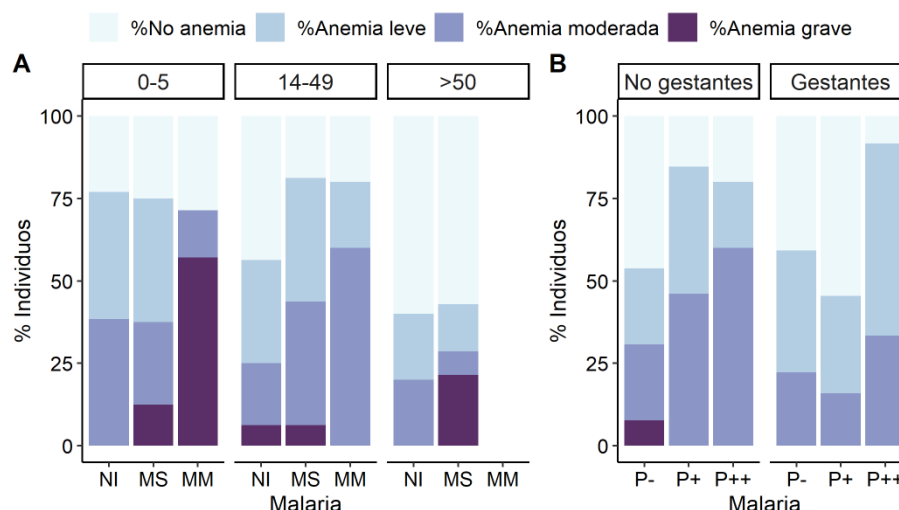


Figura 29 | Prevalencia de anemia por grupo de edad, embarazo e infección. Los porcentajes de cada nivel de anemia se indican por separado. NI, no infectado; MS, malaria submicroscópica; MM, malaria microscópica; G, mujeres gestantes. **A**, niveles de anemia por grupos de edad y parasitemia. **B**, niveles de anemia por grupos de parasitemia y embarazo en mujeres en edad fértil.

5.1.6. Correlación entre inmunoglobulinas, infección y parámetros hematológicos

Dado que las mayores concentraciones de anticuerpos frente a *P. falciparum* parecían estar asociadas a la MM en los niños, se exploró si la probabilidad de detectar MM o anemia grave en los niños era mayor en aquellos con niveles elevados de anticuerpos específicos de *P. falciparum* mediante un análisis de OR. Los puntos de corte para establecer el grupo de sujetos con concentraciones elevadas de cada Ig específica de *P. falciparum* se fijaron en el Q1 del grupo infectado con MM (2,23 mg/dL para Pf-IgM, 0,11 mg/dL para Pf-IgA y 7,88 mg/dL para Pf-IgG). Los OR mostraron que los niveles de Pf-IgA tenían el mayor potencial para predecir si un niño tiene MM o anemia grave (OR 13,24 e infinito respectivamente), seguidos por los niveles de Pf-IgM ([Tabla 7](#)).

Para analizar las posibles correlaciones entre los parámetros hematológicos y los niveles de Ig, se calcularon las correlaciones parciales de *Spearman* entre todas las variables medidas ajustando en base a la edad de los individuos ([Figura 30](#)). De esta forma, se pudo analizar la población completa eliminando la edad como factor de confusión. El análisis reveló una fuerte correlación positiva entre las IgG, IgM e IgA totales en las personas infectadas, mientras que esta asociación no se observó en los individuos no infectados. Las Ig específicas de *P. falciparum* estaban significativamente correlacionadas entre sí en ambos grupos, infectados y no infectados, y la mayor correlación positiva se encontró entre la IgG y la IgM específica de *P. falciparum* ($p = 0,652$ y $0,671$ para las personas infectadas y no infectadas, respectivamente).

Tabla 7

Probabilidad de detectar malaria microscópica y anemia grave en niños con alta vs. baja concentración de anticuerpos específicos

	OR	95% IC	P-valor
Malaria microscópica			
Pf-IgG $\geq 7,88$ vs $< 7,88$	7,22	0,74-107,88	0,051
Pf-IgM $\geq 2,23$ vs $< 2,23$	9,92	0,96-159,68	0,028
Pf-IgA $\geq 0,11$ vs $< 0,11$	13,24	1,12-751,02	0,018
Anemia grave			
Pf-IgG $\geq 7,88$ vs $< 7,88$	4,47	0,39-68,4	0,280
Pf-IgM $\geq 2,23$ vs $< 2,23$	19,82	1,41-1231,42	0,010
Pf-IgA $\geq 0,11$ vs $< 0,11$	∞	1,99- ∞	0,004

OR = Oportunidad Relativa (*Odds ratio*); IC = Intervalo de Confianza

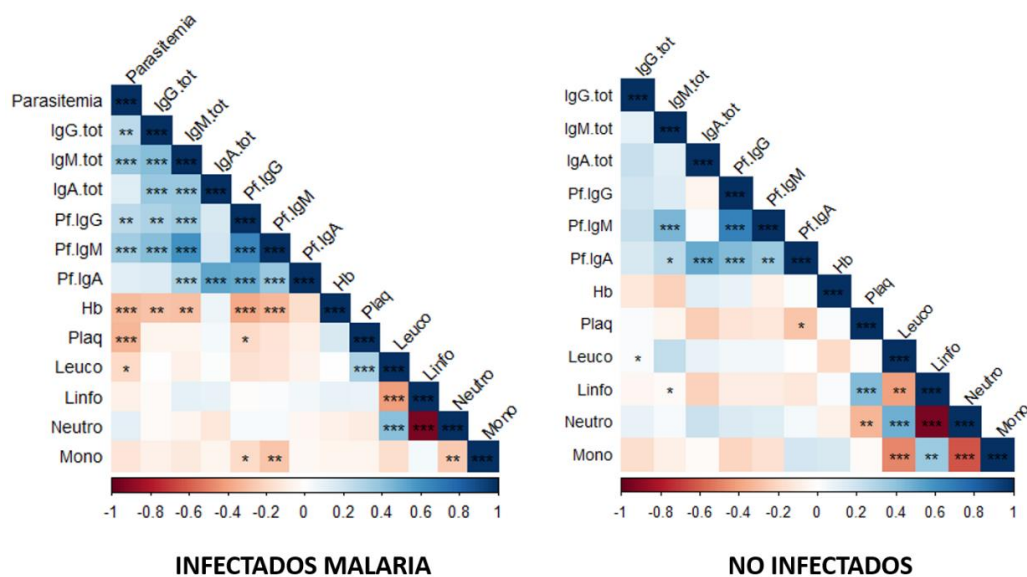


Figura 30 | Correlación entre la parasitemia, los niveles de inmunoglobulinas y los parámetros hematológicos en individuos infectados de malaria y no infectados. Las correlaciones fueron calculadas mediante correlación parcial de *Spearman* controlando la edad de los individuos en la población completa (n = 176). Los asteriscos indican una correlación significativa entre las variables de los ejes. *, p-valor $\leq 0,05$; **, p-valor $\leq 0,01$; ***, p-valor $\leq 0,001$. Las correlaciones positivas se marcan en azul y las negativas en rojo.

Todas las Ig específicas estaban fuertemente asociadas a sus totales en individuos infectados, sin embargo, la correlación entre la Pf-IgG y la IgG total se perdió en los individuos no infectados. Se pudo comprobar que la IgM era la Ig con mayor correlación positiva con la

densidad de parásitos en los individuos infectados por malaria ($p = 0,372$ y $0,348$ para la IgM total y la Pf-IgM respectivamente) y no se encontró ninguna asociación entre la IgA y la parasitemia. Tras el análisis de las correlaciones entre la parasitemia y las variables hematológicas, se encontraron correlaciones negativas entre la densidad del parásito y la Hb, las plaquetas y los leucocitos, siendo especialmente contundente el descenso de la concentración de Hb y plaquetas cuando aumenta la densidad del parásito. También se encontraron correlaciones entre los niveles de anticuerpos y las variables hematológicas. La Hb se correlacionó negativamente con las IgG e IgM totales y especialmente con las específicas únicamente en los individuos infectados de malaria. Además, se observó una disminución progresiva del porcentaje de monocitos al aumentar la Pf-IgG y la Pf-IgM en los individuos infectados. Por el contrario, las personas no infectadas no revelaron estas asociaciones.

5.2. TOLERANCIA GENÉTICA A LA MALARIA EN REGIONES HIPERENDÉMICAS

Tras evaluar el estado infeccioso e inmunológico en regiones endémicas de malaria, se determinó la presencia de polimorfismos genéticos descritos por proporcionar cierto nivel de tolerancia a la malaria grave. Para ello, se evaluó la frecuencia de estas variantes polimórficas en dos regiones altamente endémicas de malaria y se asoció su presencia con el nivel de parasitemia de los individuos.

5.2.1. Frecuencias alélicas y genotípicas de variantes polimórficas que confieren tolerancia a la malaria en Ghana y RDC

El presente estudio se llevó a cabo para determinar la frecuencia de variantes polimórficas que han sido previamente asociadas a una posible protección frente a la malaria y con el fin de analizar el nivel de tolerancia que ofrecen frente a la malaria grave en poblaciones hiperendémicas. Inicialmente, se genotiparon 424 individuos procedentes de Ghana y RDC para las siguientes seis posiciones polimórficas localizadas en los genes PIEZO1, G6PD, HBB, y PKLR: rs59446030, rs1050828, rs334, rs33930165, rs147659527 y rs141393570. En todas las posiciones se detectaron al menos dos variantes poblacionales, a excepción de rs141393570 en el gen PKLR de la que todos los individuos presentaron la misma variante, por lo que fue descartado del estudio. De las restantes cinco posiciones polimórficas que se incluyeron en el diseño inicial, se identificaron posteriormente la presencia de variantes adicionales en dos

polimorfismos de PIEZO1 (rs144777557 y rs202139830) y en uno de PKLR (rs147689373). Por ello, finalmente se realizó el estudio con un total de ocho variantes polimórficas ([Tabla 8](#)).

De las ocho variantes analizadas, cuatro correspondientes a la variante E756del de PIEZO1, la A- de G6PD y las variantes HbS y HbC del gen HBB, habían sido descritos previamente como protectores frente a la malaria severa. Sin embargo, de los otros cuatro identificados, rs144777557 y rs202139830 en el gen PIEZO1 y rs147689373 y rs147659527 en el gen PKLR, se desconocía su asociación con la malaria humana. De las 424 muestras, se pudo genotipar con éxito un total de 423 muestras para los polimorfismos de los genes PIEZO1 y HBB, 421 para el polimorfismo A- de la G6PD y 418 para el PKLR. En primer lugar, se estimaron las frecuencias alélicas y genotípicas de los alelos minoritarios de los polimorfismos en las poblaciones de estudio y se compararon con las frecuencias descritas previamente para cada polimorfismo tabuladas en la base de datos *Ensembl* en la población total, África, América, este asiático, Europa y el sur asiático. De los polimorfismos analizados, la variante minoritaria más frecuente fue la E756del del gen PIEZO1, con una frecuencia alélica de casi 0,2; seguido de la G6PD A- y la HbS (0,17 y 0,11 respectivamente) ([Tabla 8](#)). Todas las frecuencias alélicas determinadas en nuestra población fueron superiores o similares a las descritas en *1000 Genomes/gnomAD* en la población africana a excepción del polimorfismo rs202139830 del gen PIEZO1 (Pz_E750Q) cuya frecuencia fue muy inferior a la descrita previamente en poblaciones endémicas de malaria (0,016 frente a 0,142). Como era de esperar, dado que las variantes estudiadas han sido asociadas a una tolerancia frente a la malaria, todas las frecuencias alélicas encontradas en Ghana y RDC fueron superiores a las descritas en poblaciones no africanas ([Tabla 8](#)). En cuanto a las frecuencias genotípicas, se hallaron elevadas frecuencias del genotipo heterocigoto para las mutaciones E756del, HbS y G6PD A- (0,32, 0,20 y 0,17 respectivamente) y se detectaron genotipos homocigotos para las mutaciones E756del, HbS y G6PD A- y PK_L241V con baja frecuencia (0,035, 0,012, 0,097 y 0,002 respectivamente) ([Tabla 8](#)).

Tras analizar todas las variantes polimórficas de forma conjunta, se pudo comprobar que la mayoría de individuos portaban algún tipo de variante protectora y que muchos de ellos portaban dos o más variantes minoritarias en su genoma. De los 415 individuos que se pudieron genotipar completamente para los 8 polimorfismos, únicamente 129 (30,79%) no presentaban ninguna de las variantes analizadas, 174 portaban una única variante (41,53%), 86 (20,52%) dos variantes, 27 (6,44%) tres variantes y 3 individuos (0,72%) portaban 4 de las variantes simultáneamente. La variante Pz_E750Q se encontró únicamente en los individuos portadores de la variante más común del gen PIEZO 1 en África, la Pz_E756del. Así, de los 8 individuos portadores de la variante Pz_E750Q hallados, todos presentaban la variante Pz_E756del de

Tabla 8

Frecuencias alélicas y genotípicas de polimorfismos potencialmente asociados a tolerancia frente a la malaria

ID polimorfismo (variante)	Gen	Mutación	Nombre variante	FRECUENCIA GENOTÍPICA			FRECUENCIA ALÉLICA Ghana + RDC	FRECUENCIA ALÉLICA 1000 GENOMES/gnomAD					
				Homocigoto N	Heterocigoto	Homocigoto M		ALL	AFR	AMR	EAS	EUR	SAS
rs59446030 (delCCT)	PIEZO1	E756del	Pz_E756del	0,64	0,32	0,035	0,196	0,051	0,179	0,019	0	0,001	0,005
rs59446030 (dupCCT)	PIEZO1	E756ins	Pz_E756ins	0,984	0,016	0	0,0082	0,004	0,01	0,001	0,001	0,004	0,004
rs59446030 (del(CCT) ₂)	PIEZO1	E755_E756del	Pz_E755_E756del	0,9953	0,0047	0	0,0023	0	0	0	0	0	0
rs144777557 (delCTG)	PIEZO1	Q749del	Pz_Q749del	0,9555	0,0445	0	0,0222	0	0	0	0	0	0
rs202139830	PIEZO1	E750Q	Pz_E750Q	0,9696	0,0281	0,0023	0,0164	0,043	0,142	0,014	0,002	0,005	0,01
rs1050828	G6PD	V68M	G6PD A-	0,737	0,1659	0,0972*	0,1727	0,038	0,135	0,013	0	0	0
rs334	HBB	E7V	HbS	0,7822	0,2037	0,0117	0,1136	0,027	0,1	0,007	0	0	0
rs33930165	HBB	E7K	HbC	0,9668	0,0332	0	0,0304	0,003	0,013	0	0	0	0
rs147689373	PKLR	E277K	PK_E277K	0,9668	0,0332	0	0,0166	0,003	0,009	0,001	0	0	0
rs147659527	PKLR	L241V	PK_L241V	0,9810	0,0165	0,0024	0,0106	0,0002	0,001	0	0	0	0

* Incluye a mujeres homocigotas y hombres hemocigotos

N = normal (alelo mayoritario), M = mutado (alelo minoritario). ALL = población mundial, AFR = África, AMR = América, EAS = este asiático, EUR = Europa, SAS = sur asiático

forma simultánea y cinco la portaban en homocigosis, indicando un posible desequilibrio de ligamiento entre estos dos loci.

5.2.2. ¿Se puede relacionar polimorfismos tolerantes y nivel de parasitemia?

Para tratar de contestar a la relevante cuestión de si la presencia de los polimorfismos estudiados interfería en el desarrollo de la infección por *P. falciparum*, se comparó la prevalencia de MM y MS entre individuos sin ninguna de las variantes tolerantes y los portadores de alguna de ellas (Figura 31). La prevalencia de MM o de alta densidad más elevada se observó en los individuos que no portaban ninguna variante polimórfica protectora (19,23%), mientras que la prevalencia de MM de los individuos que portaban cada una de las variantes estudiadas se estimó entre el 0% y el 15,38%. Cabe destacar que, a pesar de que los individuos que no portaban ninguna variante protectora tenían la mayor prevalencia de MM, la prevalencia de malaria total de este grupo fue una de las más bajas (55,38%) dado que, adicionalmente, este grupo mostró una proporción menor de individuos con MS. De entre los individuos portadores de variantes tolerantes, el grupo que mostró menor proporción de individuos con MM fue el de los portadores de la variante Pz_E750Q, entre los cuales no se encontró ningún individuo con MM, seguido por los portadores de las variantes PK_E277K, Pz_Q749del y HbS (7,14%, 10,53% y 10,87% respectivamente).

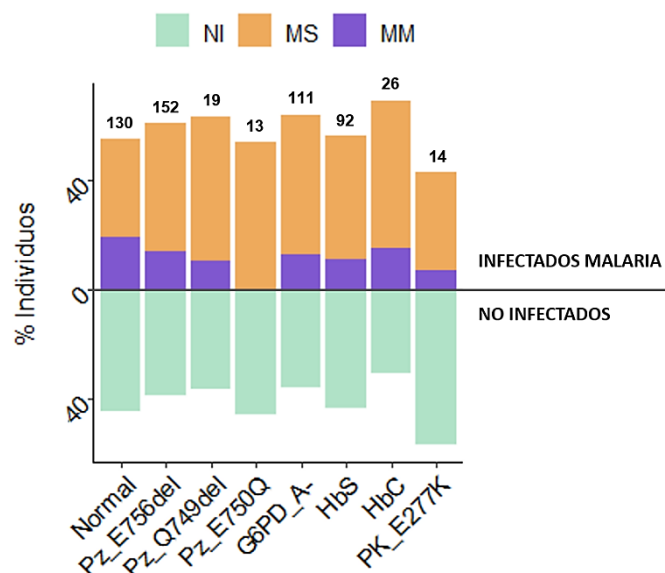


Figura 31 | Proporción de individuos con malaria microscópica, submicroscópica y no infectados en individuos portadores de variantes polimórficas protectoras. NI, no infectado; MS, malaria submicroscópica; MM, malaria microscópica. Encima de cada barra se indica el número de individuos (n) total de cada grupo. Se han incluido las variantes que poseían una n superior a 10.

Posteriormente, se estimó la probabilidad de padecer MM en los individuos infectados que portaban cada variante y se comparó con los individuos que no tenían ninguna de las variantes consideradas tolerantes. Se realizó un análisis de OR para cada variante que tuviera un mínimo de 10 individuos infectados portadores de esa variante. Dicho análisis mostró que la presencia de las mutaciones E756del en el gen PIEZO 1, G6PD A- y HbS disminuían significativamente la probabilidad de padecer MM o a altas parasitemias (RP 0,481; 0,452 y 0,414 respectivamente) (Tabla 9). También se analizó la probabilidad de padecer este tipo de infección en aquellos individuos que tenían dos mutaciones simultáneas y, a pesar de que las diferencias no fueron significativas, se pudo observar que la probabilidad de padecer MM en estos individuos era menor que en los no mutados y que en los portadores de una única mutación indicando un posible efecto sinérgico en la acumulación de variantes.

Tabla 9

Probabilidad de padecer malaria microscópica al infectarse en los portadores de mutaciones tolerantes vs. ausencia de mutaciones

	n	Frecuencia MM	OR	95 % IC	P-valor
Normal	71	0,35			
Pz_E756del	82	0,21	0,481	0,234 - 0,991	0,0473
Pz_Q749del	12	0,17	0,368	0,075 - 1,813	0,2191
G6PD A-	85	0,2	0,452	0,211 - 0,967	0,0408
HbS	49	0,18	0,414	0,173 - 0,990	0,0474
HbC	18	0,22	0,526	0,156 - 1,769	0,2989
Pz_E756del + G6PD A-	22	0,14	0,291	0,0783-1,0783	0,0647
Pz_E756del + HbS	18	0,11	0,230	0,049 - 1,082	0,0629
HbS + G6PD A-	14	0,07	0,142	0,0175-1,1460	0,0669

OR = Oportunidad relativa (*Odds ratio*); MM = Malaria Microscópica

Las OR fueron calculadas comparando los individuos portadores de la mutación con los individuos que no portaban ninguna de las mutaciones estudiadas. Se incluyeron los individuos heterocigotos para cada mutación a excepción de la G6PD A- en la que se incluyeron los individuos homocigotos y heterocigotos.

Por último, se analizó si los portadores de estas variantes polimórficas tenían menor probabilidad de padecer malaria. Este análisis mostró que la prevalencia de malaria era similar en los individuos con mutaciones tolerantes y sin ellas (datos no mostrados), sugiriendo que estas variantes polimórficas inciden en la protección frente a la gravedad de la infección en lugar de prevenirla.

Dado que la edad es un factor determinante en el desarrollo de la parasitemia cuando un individuo se infecta con *P. falciparum*, se analizó si había diferencias en los niveles de

parasitemia de individuos portadores de variantes polimórficas potencialmente protectoras y los que no las portaban por grupos de edad ([Figura 32A-D](#)). Además, dada la especial condición biológica de las mujeres gestantes, estas se separaron de los individuos de su mismo grupo de edad.

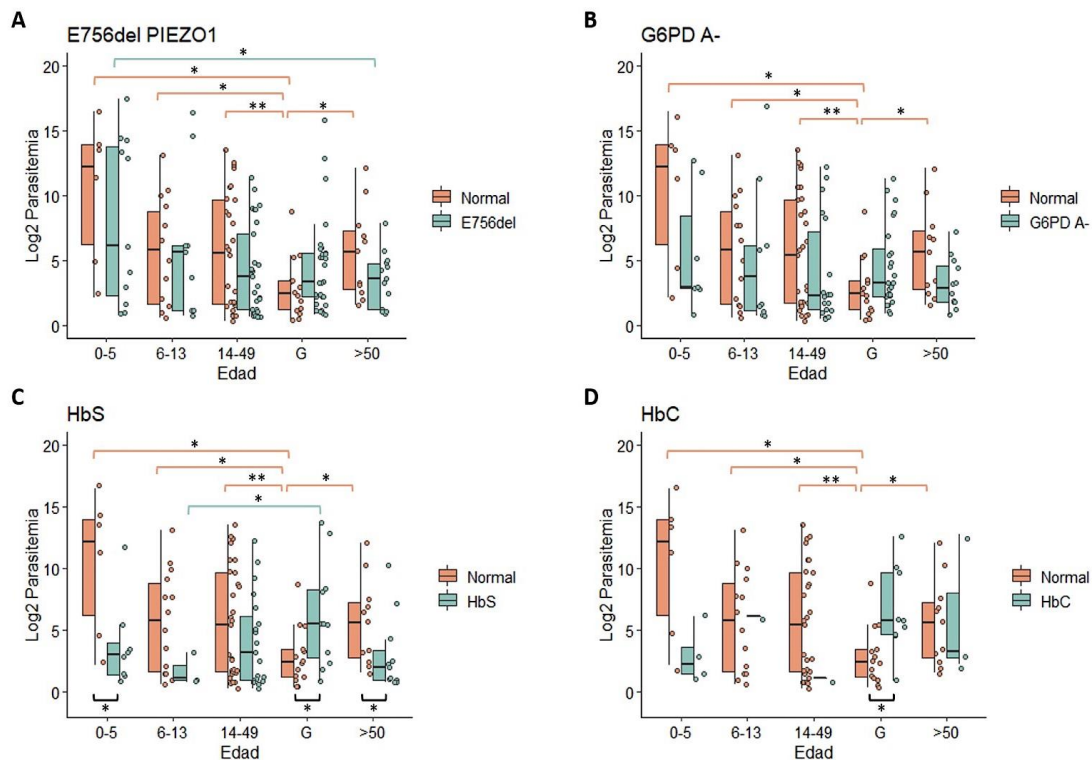


Figura 32 | Nivel de parasitemia según la presencia o ausencia de variantes polimórficas que confieren tolerancia a la malaria por grupos de edad y embarazo. Se comparó el nivel de parasitemia entre los individuos portadores de alguna de las variantes que confieren tolerancia a la malaria y los que no portaban ninguna de estas variantes. Parasitemia según la variante **A**, E756del; **B**, G6PD A-; **C**, HbS; **D**, HbC. Las diferencias significativas obtenidas mediante el test de *Wilcoxon* se indican con asteriscos (*). *, p-valor $\leq 0,05$; **, p-valor $\leq 0,01$. Las diferencias por grupos de edad o embarazo (G) se indican en la parte superior y las diferencias entre mutados y no mutados se indican en la parte inferior del gráfico. Cada gráfico de cajas muestra la distribución del nivel de parasitemia de cada grupo (la barra central indica la mediana, los bordes de las cajas los Q 1 y 3 y los bigotes se extienden hasta los valores mínimo y máximo no superiores a $Q1/Q3 \pm 1,5 \times RIC$).

Los individuos portadores de HbS mostraron parasitemias significativamente inferiores que los individuos de su mismo grupo de edad que no portaban esta variante. Dicho descenso fue estadísticamente significativo en los grupos más vulnerables: menores de 5 y mayores de 50 años ([Figura 32C](#)), mientras que en los individuos de 6 a 13 años y los adultos de 14 a 49 únicamente se pudo observar una tendencia a la disminución de la parasitemia. Sorprendentemente, tras analizar los resultados de las mujeres gestantes, se observó que la

parasitemia de las que portaban los polimorfismos E756del, G6PD A-, HbS y HbC era superior a la de las gestantes que no portaban ninguna mutación, siendo este incremento significativo en las portadoras de HbS y HbC ([Figura 32C-D](#)). Estas diferencias parecen ser debidas a una disminución de la parasitemia observada en las mujeres gestantes sin ninguna mutación con respecto al resto de grupos de edad de la misma condición ([Figura 32 A-D](#)), mientras que en las mujeres gestantes portadoras de mutaciones no se observó dicha disminución.

A continuación, se analizó si la presencia de distintas mutaciones en un mismo individuo tenía un efecto acumulativo en cuanto a protección frente a la infección. Para ello, se sumaron las mutaciones que portaba cada individuo de la población ($n = 428$) y se analizó si el número de mutaciones era significativamente distinto en los grupos de infectados con MM y MS mediante la prueba *T de Student*. Este análisis mostró que los individuos con MS tenían un número significativamente mayor de mutaciones que los que padecían MM (media 1,17 vs. 0,81, respectivamente, p -valor 0,0064). Al realizar este mismo análisis comparando el número de mutaciones en infectados por *P. falciparum* y no infectados no se observaron diferencias significativas (media 0,98 vs 1,07 mutaciones en no infectados e infectados respectivamente, p -valor 0,3596), lo que sugiere que los portadores de mutaciones tolerantes no impiden la infección, pero si reducen la parasitemia una vez infectados.

Para corroborar este resultado, se analizó mediante la prueba exacta de *Fisher* si la proporción de individuos con MM y MS era significativamente diferente entre los individuos que portaban dos o más mutaciones con respecto a los que tenían una variante únicamente. Se observó que en los individuos portadores de dos o más mutaciones la proporción de individuos infectados con MM era significativamente inferior con respecto a los que tenían una mutación (29,2% vs. 14,9% de MM respecto al total de infectados en individuos con 1 mutación y >1 mutación respectivamente) ([Figura 33A](#)).

Por el contrario, y como se había observado en el análisis anterior, la prevalencia de malaria total fue similar independientemente del número de mutaciones (63,8% vs. 57,26% en individuos con 1 mutación y >1 mutación respectivamente) ([Figura 33B](#)). Además, se observó una correlación inversa significativa entre el número de mutaciones y la parasitemia ($R = -0,13$; p -valor = 0,036). Estos resultados sugieren que la acumulación de distintas variantes polimórficas protectoras en poblaciones endémicas de malaria ejerce un efecto acumulativo de la tolerancia a la infección dando lugar a infecciones más leves.

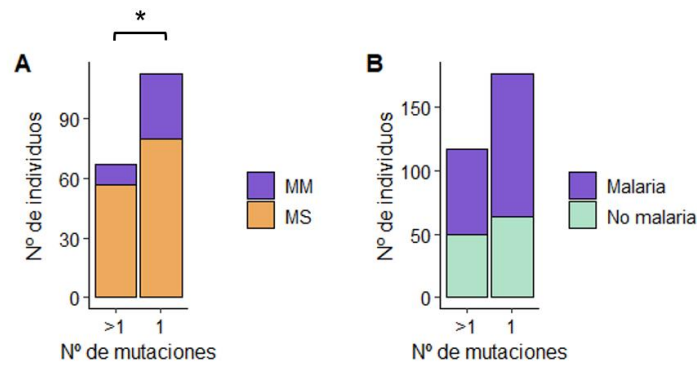


Figura 33 | Variaciones en el tipo de infección y la prevalencia de malaria según el número de variantes potencialmente protectoras. A, proporción de individuos con MM y MS en los portadores de una mutación o dos o más de ellas. B, proporción de individuos con malaria en los portadores de una mutación o dos o más de ellas. MS, malaria submicroscópica; MM, malaria microscópica. Se indica la significación obtenida mediante test de Fisher. *, p-valor $\leq 0,05$.

5.3. IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS IgM DE *P. falciparum* Y DE SUS EPÍTOPOS INMUNODOMINANTES

El objetivo de este estudio fue identificar los antígenos de *P. falciparum*, así como sus epítopos inmunodominantes, reconocidos por las IgM serológicas de individuos residentes en una región hiperendémica de malaria y establecer si hay diferencias en la intensidad o el patrón de dicho reconocimiento dependiendo de datos demográficos o de infección. Para ello, se desarrolló, en primer lugar, un método nuevo de IP que permitió aislar a gran escala los antígenos de las IgM y un flujo de trabajo computacional para su identificación y semicuantificación. Seguidamente, se aplicó dicha metodología para el estudio de los antígenos reconocidos por la IgM de 54 habitantes de Ghana y se analizó si había diferencias en el reconocimiento antigénico según la edad (grupos 0-5, 14-49 y >50 años), estado de embarazo (mujeres gestantes vs. no gestantes) y estado infeccioso (NI, MS y MM) de cada individuo. También se realizó una caracterización biológica de los antígenos identificados con el fin de conocer si el estadio del parásito en el que se expresan o la presencia de regiones BC, zonas cuya secuencia de aminoácidos es altamente repetitiva, influyen en su reconocimiento por parte de las IgM específicas. Una vez identificados los antígenos reconocidos por IgM, se identificaron los epítopos de los antígenos inmunodominantes mediante un microarray de péptidos en el que se midió la reactividad de la IgM del plasma de 37 individuos no infectados (clasificado en no expuestos previamente a la malaria, NE o sí expuestos, NI) o infectados con malaria importada (MS y MM) frente a múltiples epítopos con el fin de establecer asociaciones entre el reconocimiento peptídico por parte de la IgM y el estado infeccioso de los individuos.

5.3.1. Nuevo método de identificación y cuantificación de antígenos IgM de *P. falciparum* a gran escala

El método de IP de antígenos que empleamos se resume muy simplificado en tres pasos de unión e incubación. En el primero, las IgM serológicas se unen a antígenos de *P. falciparum*, posteriormente este complejo se une a anticuerpos biotinilados anti-IgM y, por último, la adición de microesferas magnéticas conjugadas con estreptavidina permite que el complejo completo sea recogido mediante un imán dejando un sobrenadante que contiene las proteínas no unidas. Finalmente, conseguimos la recuperación de los antígenos de *P. falciparum* mediante un proceso de elución.

El desarrollo de dicho método de IP para aislar antígenos de *P. falciparum* reconocidos por las IgM se centró en la optimización de dos puntos clave del proceso: aumentar la eficacia de unión de la IgM a las esferas magnéticas a diferentes ratios de plasma/esfera y minimizar la concentración de anticuerpos presentes en el eluido final para evitar que disminuyan la sensibilidad en la identificación de proteínas mediante LC-MS/MS. Dado que esta fase de optimización recaía únicamente en analizar la unión indirecta de los anticuerpos serológicos a las esferas y su separación durante el método de elución, se realizaron IP sin extracto de proteínas de *P. falciparum*. Se evaluaron un total de cuatro condiciones de IP distintas: ratios plasma/esfera de 0,4 y 2 (v/v) manteniendo un volumen fijo de 50 µL de esferas y 30 µg de IgG anti-IgM y dos métodos de elución distintos para cada una de ellas, elución a pH ácido y mediante ebullición, ambos con el mismo volumen.

En primer lugar, se evaluó y cuantificó la presencia de proteínas totales en el plasma original, los sobrenadantes que contenían todos los componentes de la IP no retenidos por las esferas tras la retención por imán y los eluidos finales mediante tinción Coomassie de gel SDS-PAGE, y la presencia de IgM mediante inmunotransferencia y ELISA. Dado que la elución mediante ebullición da lugar a la separación completa de la IgM de las esferas, en contraposición con la elución a pH ácido que conserva parcialmente la unión IgM-esfera²⁹⁵, se optó por este tipo de elución para comparar la cantidad de IgM retenida en las esferas tras incubaciones con ratios plasma/esfera de 0,4 y 2. El gel teñido de Coomassie ([Figura 34A](#), carriles 5 y 7) mostró que la cantidad de IgM retenida por las esferas fue mayor cuando se inmunoprecipitó a un ratio de plasma/esfera de 2 ([Figura 34A](#), carril 7). Este resultado fue el esperado dado que se había utilizado una cantidad 5 veces mayor de plasma y, por tanto, de IgM. Sin embargo, la eficacia de unión fue superior tras la incubación a ratio 0,4, puesto que en su sobrenadante la intensidad de señal de la IgM fue muy baja ([Figura 34B](#), carril 2), indicando que prácticamente toda la IgM serológica se había unido a las esferas dando lugar a un desperdicio de IgM mínimo.

Resultados

Para cuantificar la eficacia de unión exacta, se midió mediante ELISA la concentración de IgM del plasma antes y después de inmunoprecipitar. Así, al sustraer la cantidad de IgM presente en el sobrenadante de la cantidad de IgM del plasma original se pudo estimar la cantidad de IgM retenida en las esferas. A pesar de que se había administrado cinco veces más IgM en el ratio plasma/esfera de 2, comparado con el ratio de 0,4, la cantidad de IgM unida fue solo dos veces superior, dando lugar a una pérdida de IgM mayor que alcanzó el 77% de la IgM administrada (Figura 34C). Por el contrario, el ratio plasma/esfera de 0,4 fue más ventajoso, ya que el 89,64% de la IgM administrada fue capturada.

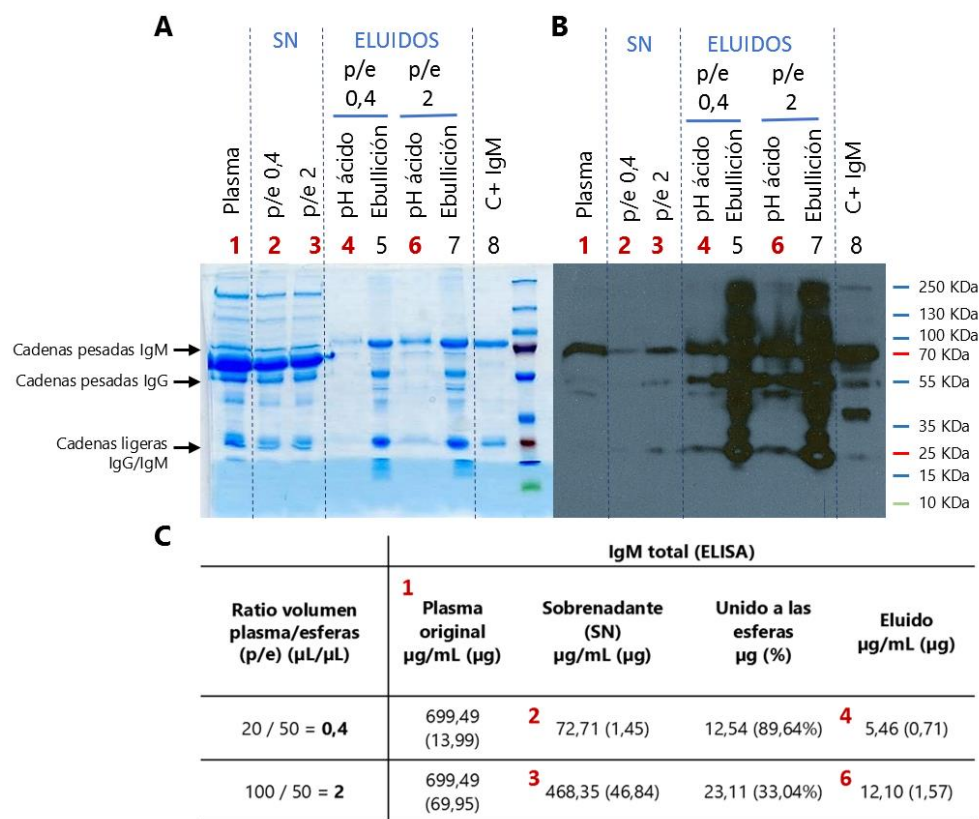


Figura 34 | Optimización de la eficacia de unión IgM-esfera según el ratio plasma/esfera y el tipo de elución. A, gel SDS-PAGE teñido con Coomassie. B, detección de IgM mediante inmunotransferencia y C, cuantificación de IgM mediante ELISA siguiendo el orden de carriles: 1, plasma original; 2, sobrenadante de la IP realizada a ratio plasma/esfera de 0,4; 3, sobrenadante de la IP realizada a ratio plasma/esfera de 2; 4, eluido a pH ácido de la IP realizada a ratio plasma/esfera de 0,4; 5, eluido mediante ebullición de la IP realizada a ratio plasma/esfera de 0,4; 6, eluido a pH ácido de la IP realizada a ratio plasma/esfera de 2; 7, eluido mediante ebullición de la IP realizada a ratio plasma/esfera de 2; 8, IgM control +. Las muestras a las que se realizó cuantificación de IgM mediante ELISA se marcan en rojo. p/e, ratio de volúmenes plasma/esfera (μL/μL).

Con el fin de seleccionar el método de elución y el ratio de plasma/esfera más adecuado, se evaluó la composición de proteínas de los eluidos según el método de elución y el ratio

plasma/esfera empleado. La cantidad final de IgM en los eluidos obtenidos en condiciones de acidez fue 2,22 veces menor con el ratio plasma/esfera de 0,4 que con el ratio de 2 ([Figura 34C](#)), lo que es coherente con la presencia de una cantidad menor de IgM desde el principio del protocolo. La capacidad que tiene la ebullición de romper las fuerzas de enlace no covalentes entre anticuerpo-antígeno y biotina-estreptavidina eluyó una variedad de proteínas que se pudieron observar claramente en los geles teñidos con *Coomassie* como un patrón de bandas complejo que incluían proteínas del tamaño de las cadenas pesadas de la IgG anti-IgM y una gran cantidad de IgM ([Figura 34A](#), carriles 5 y 7). Al contrario, en la elución a pH ácido se observó la presencia casi exclusiva de IgM y a menor concentración ([Figura 34A y 34B](#), carriles 4 y 6) sin apenas aparición de bandas correspondientes al tamaño de las IgG anti-IgM, debido a que la afinidad entre la biotina y la estreptavidina es extremadamente alta y resistente a condiciones ácidas²⁹⁶.

Sorprendentemente, como se puede observar en los carriles 4 y 6 de [la Figura 34B](#), en la inmunotransferencia de IgM de los eluidos a pH ácido se detectó una banda de peso molecular correspondiente a las cadenas pesadas de las IgG (53 kDa), menor que el de las cadenas pesadas de la IgM (70 kDa). Tras analizar las posibles causas de la aparición de dicha banda se concluyó que la estreptavidina-HRP, que se empleó para revelar la inmunotransferencia, podría haberse unido al anticuerpo IgG anti-IgM biotinilado lixiviado de la IP dando lugar a la aparición de dicha banda. La detección por inmunotransferencia de IgM en los eluidos mediante ebullición mostró una señal extendida y con un elevado fondo ([Figura 34B](#), carriles 5 y 7) que podría estar causada por la elevada concentración de anticuerpos presentes en los eluidos y, probablemente, debido a una agregación de los anticuerpos inducida por calor²⁹⁷.

Teniendo en cuenta los resultados observados y, ya que uno de los objetivos de nuestra estrategia de IP de antígenos era minimizar la cantidad de plasma necesaria, se seleccionó el ratio plasma/esfera de 0,4 debido a que la unión de la IgM a las esferas era más eficiente. En cuanto al tipo de elución idónea, se preseleccionó la elución a pH ácido por generar un eluido con baja concentración de anticuerpos que debería conllevar un aumento en la sensibilidad de la identificación de proteínas de *P. falciparum*. No obstante, para comprobar esta hipótesis, se realizó un ensayo final para evaluar el número de antígenos de *P. falciparum* detectados por ambos métodos de elución. Se realizaron dos IP completas incluyendo el extracto de proteínas de *P. falciparum* y bajo las mismas condiciones (ratio plasma/esfera de 0,4) y se comparó el número de proteínas de *P. falciparum* y humanas identificadas realizando la elución a pH ácido y mediante ebullición. Tras la identificación de proteínas mediante LC-MS/MS de los eluidos generados, se detectaron únicamente 2 proteínas de *P. falciparum* en la elución mediante

ebullición frente al total de 102 proteínas en la elución a pH ácido ([Figura 35A](#)). Este dato demostró que la elución a pH ácido aumentaba considerablemente la sensibilidad de la identificación de proteínas minoritarias mediante LC-MS/MS gracias a que retenía los anticuerpos de la IP unidos a las esferas, evitando que su presencia en el eluido impidiera la detección de proteínas minoritarias. Además, la mayoría de proteínas tanto humanas como de *P. falciparum* detectadas mediante elución por ebullición (83%) se detectaron también en la elución a pH ácido ([Figura 35B](#)).

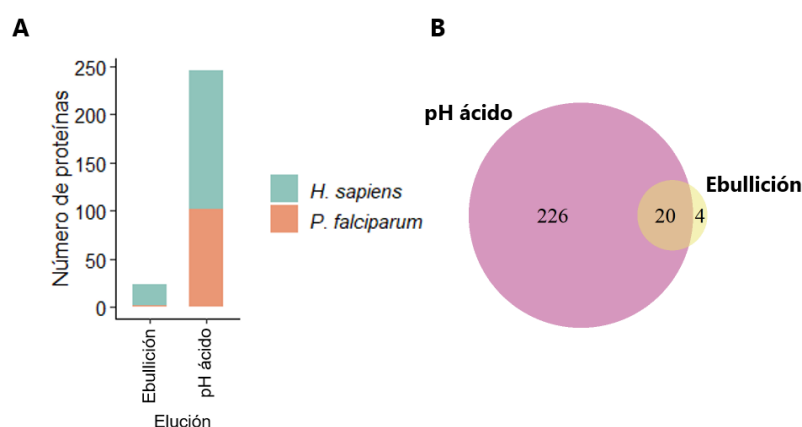


Figura 35 | Comparación del número de proteínas identificadas tras la elución a pH ácido y mediante ebullición. A, número de proteínas de *P. falciparum* y *Homo sapiens* identificadas mediante LC-MS/MS según el método de elución de la IP. B, solapamiento entre las proteínas de identificadas en la elución a pH ácido y mediante ebullición.

5.3.2. Reconocimiento antigénico de la IgM en una región endémica de malaria según la edad, el embarazo y el estado infeccioso de los individuos

Tras haber finalizado el proceso de optimización previamente descrito y haber seleccionado las condiciones idóneas para la IP: ratio plasma/esfera 0,4 y elución mediante pH ácido, se empleó este método de IP para identificar los antígenos de *P. falciparum* reconocidos por la IgM en un total de 54 muestras de plasma de personas residentes en una región hiperendémica de malaria en Ghana y clasificadas por grupos de edad, embarazo e infección (un total de 11 grupos de edad/embarazo e infección de $n = 5$ a excepción de los niños no infectados cuyo tamaño muestral fue $n = 4$, [ver sección 4.4](#)). La identificación de antígenos IgM se llevó a cabo mediante análisis proteómico (LC-MS/MS) de péptidos digeridos con tripsina procedentes del eluido de 54 IP realizadas por separado. Para este ensayo se emplearon muestras de plasma seco de cada individuo adsorbido sobre papel de filtro, uno de los métodos de conservación de muestras fluidas más empleado en la actualidad²⁷². Los resultados de este análisis se compararon finalmente entre grupos de edad, infección y embarazo. Teniendo en cuenta que la

espectrometría de masas puede alcanzar una sensibilidad en el rango amolar²⁹⁸, se esperaba que entre las proteínas identificadas se incluyeran proteínas minoritarias no específicas que no se hubieran lavado completamente. Para identificarlas, se incluyeron en el ensayo dos réplicas técnicas de cuatro controles negativos distintos con el fin de ayudarnos a testar la especificidad y reproducibilidad del sistema de IP. Se incluyó un control de la identificación de la especie a la que pertenecen las proteínas identificadas eliminando el extracto de proteínas de *P. falciparum* (C1), un control de la unión inespecífica de IgM a las esferas eliminando el anticuerpo anti-IgM (C2), un control sin IgM específica de *P. falciparum* sustituyendo el plasma de región endémica por un plasma europeo no expuesto (C3) y un control de la posible unión inespecífica de las proteínas de *P. falciparum* eliminando el plasma y, por tanto, la IgM (C4).

Tras procesar los datos del análisis proteómico por el espectrómetro de masas de las 54 muestras y 8 controles con un flujo de trabajo computacional desarrollado específicamente para este tipo de análisis ([Ver sección 4.4.3.2](#)), se identificaron un total de 245 proteínas (237 eliminando los controles) de *P. falciparum*, 683 humanas, de las cuales 134 correspondían a anticuerpos y 90 a proteínas contaminantes. Como se observa en la [Figura 36A](#), se identificó una media de 43 proteínas de *P. falciparum* (rango 16-90) en cada IP realizada con plasma procedente de región endémica (incluyendo los NI, MS y MM) frente a una media de 8 proteínas de *P. falciparum* en cada control negativo (rango 0-13). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas entre todos los grupos control y los grupos problema, mientras que no se observaron diferencias significativas entre los distintos niveles de infección.

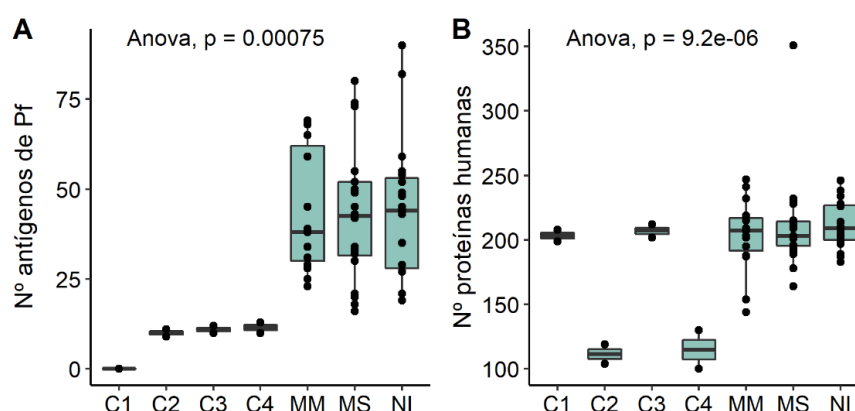


Figura 36 | Número de proteínas de *P. falciparum* y humanas identificadas tras las IP clasificadas por grupos de infección. Se identificaron mediante LC-MS/MS las proteínas eluidas en cada IP realizada con plasma de personas con MS (n = 20), MM (n = 15) y NI (n = 19). Controles: C1 sin extracto de *P. falciparum*, C2 sin anti-IgM, C3 con plasma no expuesto a la malaria y C4 sin plasma. **A**, número de antígenos de *P. falciparum* identificados. **B**, número de proteínas humanas identificadas. Cada gráfico de cajas muestra la distribución de cada grupo (la barra central indica la mediana, los bordes de las cajas los Q1 y Q3 y los bigotes se extienden hasta los valores mínimo y máximo no superiores a $Q1/Q3 \pm 1,5 \times \text{RIC}$).

Resultados

En cuanto a la presencia de proteínas residuales humanas no específicas en los eluidos, se hallaron una media de 209 proteínas en cada IP de las muestras problema ([Figura 36B](#)). Los controles C1 (sin extracto de *P. falciparum*) y C3 (con plasma no expuesto a la malaria) mostraron valores similares a las muestras problema (media de 203 y 207 proteínas respectivamente), mientras que en los controles C2 (sin anti-IgM) y C4 (sin plasma) la cantidad de proteínas humanas identificadas fue sustancialmente inferior (111 y 115 respectivamente) ([Figura 36B](#)). Las diferencias entre la cantidad de proteínas humanas de los distintos controles indican que aproximadamente el 50% de las proteínas humanas identificadas se corresponden con las cadenas pesadas y ligeras de las IgM o a uniones inespecíficas de estas, dado que tanto al eliminar el plasma y, por tanto, la IgM, como al eliminar el anticuerpo anti-IgM, impidiendo la captura de las IgM, la cantidad de proteínas identificadas disminuye de manera similar.

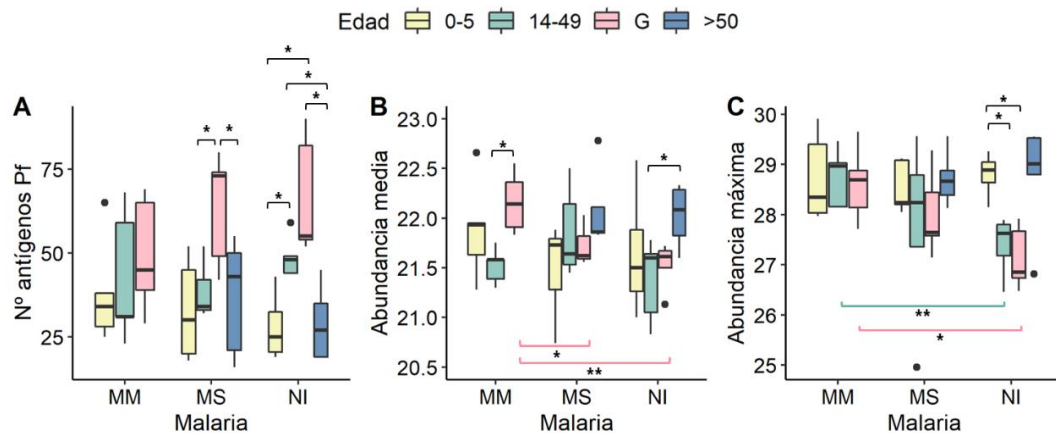


Figura 37 | Número de antígenos de *P. falciparum*, abundancia media y máxima por grupo de edad, embarazo e infección. A, número de antígenos distintos de *P. falciparum* reconocidos por IgM en las IP e identificados por LC-MS/MS. B, abundancia media de los antígenos identificados. Se realizó la media de la abundancia de los antígenos reconocidos en cada individuo. C, abundancia máxima de los antígenos identificados, dato de abundancia del antígeno más abundante de cada individuo. Todos los datos de abundancia fueron transformados con log2 y normalizados. NI, no infectado; MS, malaria submicroscópica; MM, malaria microscópica. Cada gráfico de cajas muestra la distribución de cada grupo (la barra central indica la mediana, los bordes de las cajas los Q1 y Q3 y los bigotes se extienden hasta los valores mínimo y máximo no superiores a $Q1/Q3 \pm 1,5 \times RIC$ y los puntos negros se corresponden a los valores atípicos). Las diferencias significativas obtenidas mediante el test de Wilcoxon se indican con asteriscos (*). La significación entre grupos de edad se encuentra marcada en la parte superior del gráfico y la significación entre grupos de infección se marca en la parte inferior. *, p-valor $\leq 0,05$; **, p-valor $\leq 0,01$. G = gestantes

Para continuar con el análisis se realizó un recuento del número de antígenos distintos reconocidos por cada individuo y se calculó su dato de abundancia media, la media de las abundancias de cada antígeno reconocido por ese individuo, y de abundancia máxima, el dato de abundancia más alto de ese individuo. El análisis reveló, al añadir las variables de edad y

condición de embarazo, que el repertorio de antígenos diferentes reconocidos por las mujeres gestantes NI o MS fue mayor que el de los niños y adultos en equivalente estado de infección ([Figura 37A](#)). A pesar de que las mujeres gestantes con MM reconocieron menor número de antígenos que las NI o con MM ([Figura 37A](#)), los niveles de abundancia media ([Figura 37B](#)) y máxima ([Figura 37C](#)) de estos antígenos fueron más elevados. Es decir, en las gestantes la diversidad antigénica reconocida por sus IgM es mayor en los estados más sanos de infección, pero la cantidad total de estos antígenos unidos a las IgM (independientemente de cuan diferentes sean los antígenos) es menor. Y de la misma manera, tras la infección a altas parasitemias se produce un aumento en la producción de ciertos anticuerpos en lugar de aumentar el repertorio de especificidades de estos. La abundancia máxima de los antígenos identificados incrementó significativamente en los adultos y gestantes tras infectarse a elevadas parasitemias ([Figura 37C](#)), mientras que en los niños este valor no se vio alterado por la infección. No obstante, los niños y mayores de 50 sin infección mostraron una abundancia máxima superior a la de los adultos y mujeres gestantes.

De los 237 antígenos identificados en las muestras de estudio, 55 se identificaron en todos los grupos de edad y embarazo ([Figura 38A](#)) y únicamente 13 (5,49%) fueron reconocidos por más del 75% de la población, indicando que un bajo porcentaje de los antígenos son dominantes y comunes a la mayoría de individuos. Las mujeres gestantes fueron las que reconocieron mayor cantidad de antígenos exclusivos de su grupo (40 antígenos exclusivos en gestantes frente a 19 antígenos exclusivos del resto de grupos) ([Figura 38A](#)). Respecto a las diferencias en el reconocimiento entre grupos de infección, el número de antígenos exclusivos de grupo aumentó progresivamente con la infección en todos los grupos de edad, a excepción de las mujeres gestantes, que al padecer MM mostraron un reconocimiento antigénico menos diverso ([Figura 38B](#)) en línea con lo observado anteriormente ([Figura 37](#)).

Estudios previos sugieren que elevadas respuestas de anticuerpos IgG frente a determinados antígenos dominantes pueden suprimir la respuesta frente a otros antígenos menos reactivos²⁹⁹. Para estudiar este posible efecto en nuestro estudio con IgM, se analizaron las correlaciones entre el número de antígenos reconocidos y la abundancia media y máxima de las IgM frente a dichos antígenos en el total de la población ([Figura 39A-C](#)). Se observó una fuerte correlación inversa entre el número de antígenos reconocidos por las IgM de cada individuo y la abundancia máxima de estos en las IP ($R -0,51$, $p\text{-valor } 8,9 \times 10^{-5}$) ([Figura 39B](#)), sugiriendo que una elevada producción de IgM frente a ciertos antígenos dominantes suprime la producción de IgM frente a otros antígenos menos reactivos. Esta hipótesis también se confirmó por el hecho

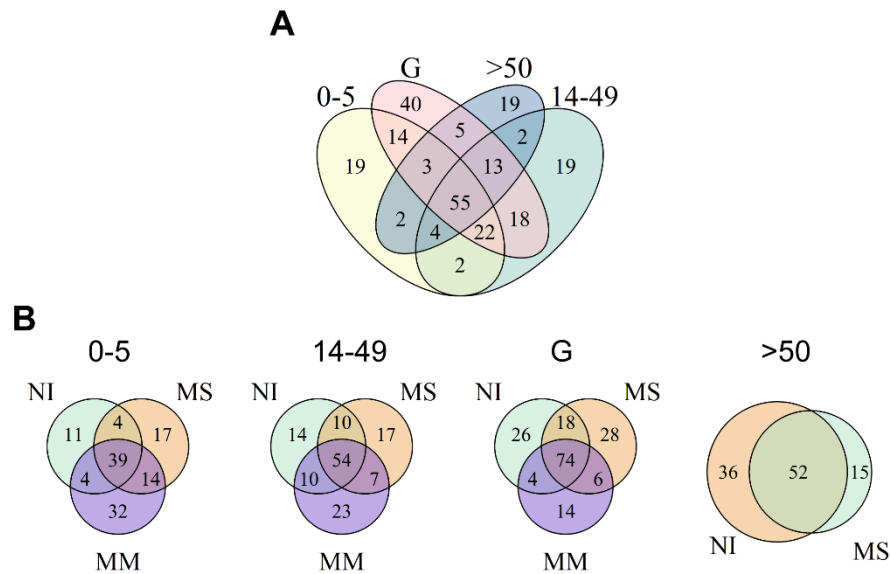


Figura 38 | Solapamientos entre los antígenos identificados por grupos de edad, embarazo e infección. **A**, solapamiento de antígenos identificados por grupos de edad y embarazo. **B**, solapamiento de antígenos identificados por grupos de infección en cada grupo de edad por separado. G= mujeres gestantes.

de que el número de antígenos reconocidos no se correlacionó significativamente con la abundancia media ([Figura 39A](#)), indicando que, en efecto, en los individuos que reconocen menor cantidad de antígenos se produce un aumento en la abundancia de un determinado set de ellos, pero no del repertorio completo. Como se esperaba, los valores de abundancia media y máxima estuvieron correlacionados de forma directa ([Figura 39C](#)), ya que la abundancia máxima influye directamente sobre la abundancia media.

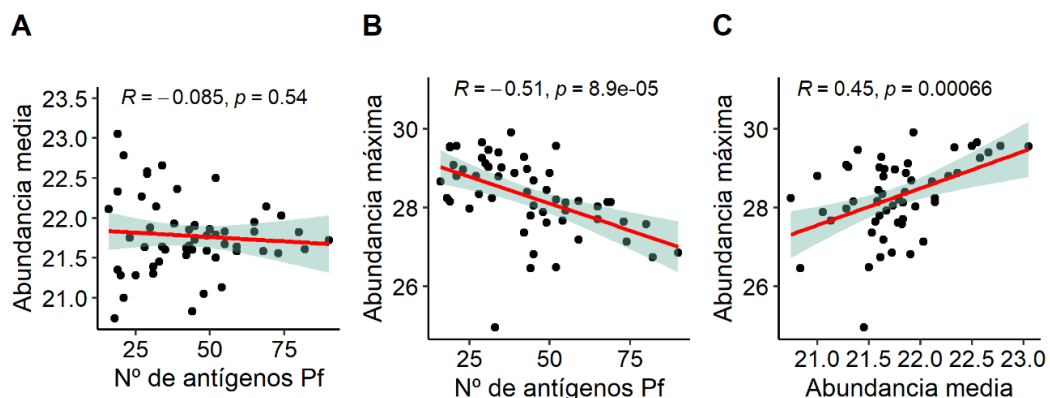


Figura 39 | Correlación entre el número de antígenos reconocidos, su abundancia media y máxima. **A**, correlación de *Pearson* entre el número de antígenos identificados por las IgM de cada individuo y su abundancia media. Para la obtención de la abundancia media se tuvo en cuenta únicamente los antígenos reconocidos en cada individuo **B**, correlación de *Pearson* entre el número de antígenos identificados y su abundancia máxima. **C**, correlación de *Pearson* entre la abundancia máxima y la abundancia media de los antígenos reconocidos en cada individuo.

5.3.3. Caracterización biológica de los antígenos de *P. falciparum* reconocidos por IgM

A fin de evaluar la localización y el proceso biológico en el que estaban implicados los antígenos identificados por IgM en la población completa, se realizó un análisis de enriquecimiento de términos GO. Dicho análisis, permite estimar si entre todos los antígenos identificados existe una mayor proporción de antígenos pertenecientes a un determinado componente celular o proceso biológico respecto a lo que cabría esperar considerando el proteoma completo de *P. falciparum*.

Respecto al componente celular, se observó un gran enriquecimiento de proteínas pertenecientes a la parte apical de la célula, entre las que se encuentran las roptrias y las proteínas de micronema (Figura 40A y B).

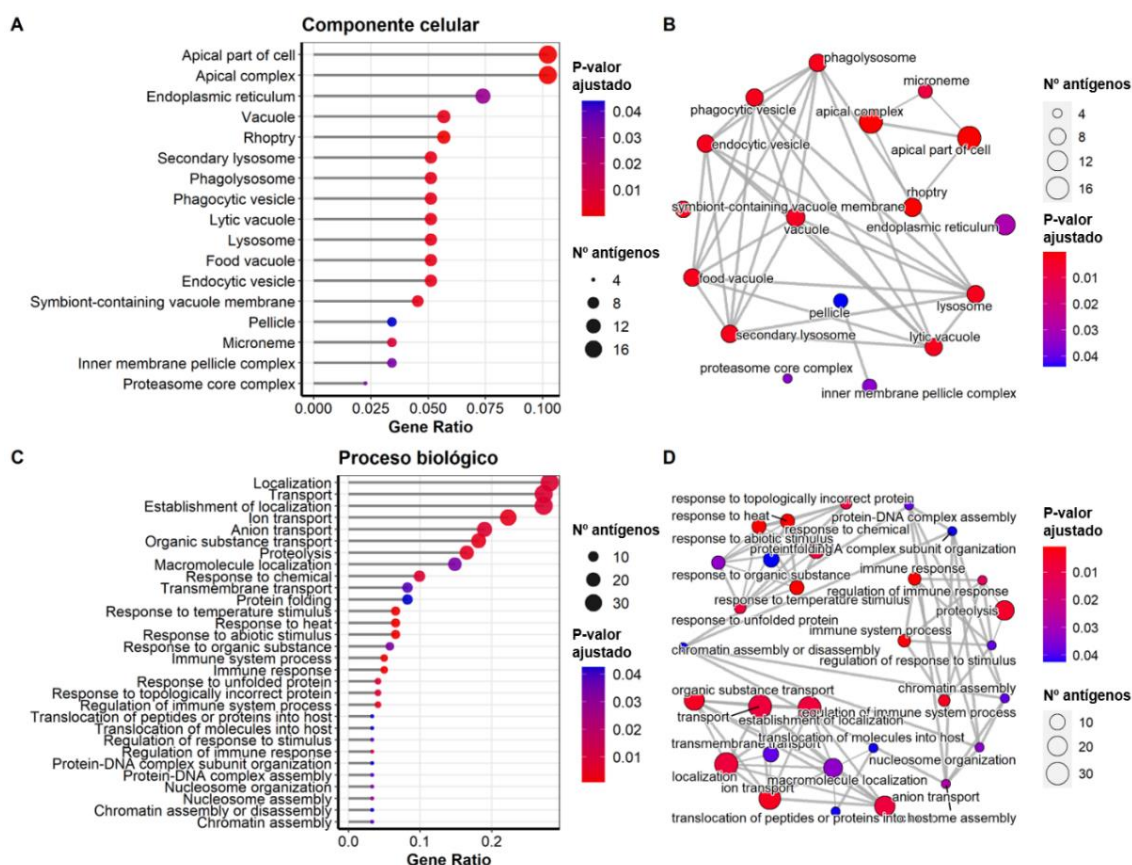


Figura 40 | Análisis de enriquecimiento de términos de ontología genética del total de antígenos identificados. A y B, términos asociados al componente celular enriquecidos significativamente. C y D, términos asociados al proceso biológico enriquecidos significativamente. A y C muestran la significación y el número de antígenos implicados en cada término enriquecido significativamente. B y D muestran una red de los términos enriquecidos significativamente en la que los términos se encuentran unidos mediante una línea gris cuando comparten al menos una proteína. Los términos se indican en inglés, ya que han sido obtenidos directamente de la base de datos *Gene Ontology* <http://geneontology.org/>

Dichas proteínas son esenciales en la invasión del eritrocito dado que son las que entran en contacto directo con la célula hospedadora²⁰⁹. También se pudo observar un fuerte enriquecimiento de proteínas pertenecientes a la vacuola parasitófora, los lisosomas o las vesículas, proteínas implicadas directamente en la interacción parásito-huésped, la adquisición de nutrientes y la exportación de factores de virulencia³⁰⁰ y, por tanto, esenciales en el desarrollo de la patogenia por parte del parásito. El análisis de enriquecimiento en cuanto a la función biológica mostró, en línea con los resultados observados en cuanto al componente celular, un fuerte enriquecimiento de proteínas implicadas en el transporte y localización de proteínas, es decir, de proteínas cuya función biológica consiste en transportar o mantener en un lugar específico a otra proteína, célula o sustancia. También se vieron enriquecidas las proteínas implicadas en la regulación de la respuesta inmunitaria indicando que, en efecto, las proteínas son antigénicas ([Figura 40C y D](#)).

Para determinar el perfil de expresión de los antígenos reconocidos IgM se utilizó la herramienta *MCA app* del *Malaria Cell Atlas*²⁸⁵, un proyecto que proporciona datos transcriptómicos de célula única a lo largo del ciclo de vida de *P. falciparum*. En primer lugar, se anotó en qué fase asexual intraeritrocítica de anillo, trofozoíto y/o esquizonte se expresaba cada uno de los 237 antígenos identificados. Así, todos los antígenos fueron clasificados para cada estadio en dos grupos, expresados o no expresados. Entonces, se comparó el porcentaje de individuos de la población total que reconocían los antígenos de cada grupo en cada una de las fases ([Figura 41A-C](#)). El porcentaje de individuos que reconocieron los antígenos que se expresaban en la fase de esquizonte fue significativamente superior que los que no se expresan en este estadio ([Figura 41C](#)). Por el contrario, no se observaron diferencias en el reconocimiento antigénico que dependieran de su expresión en los estadios de anillo y trofozoíto, es decir, el desarrollo del parásito a través de estas fases no marca el nivel de inmunogenicidad de los antígenos expresados.

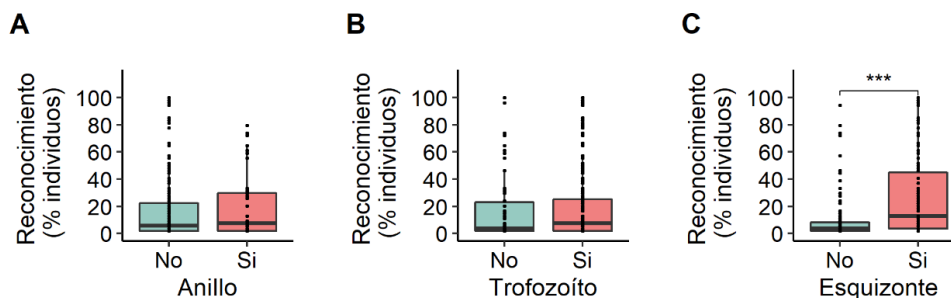


Figura 41 | Reconocimiento antigénico por IgM de acuerdo al estadio parasitario de expresión. Se muestra el porcentaje de individuos que reconocen los antígenos que se expresan (Sí) o no se expresan (No) en la fase de **A**, anillo; **B**, trofozoíto y **C**, esquizonte. Las diferencias significativas obtenidas mediante el test de Wilcoxon se indican con asteriscos ***, p-valor $\leq 0,001$.

5.3.4. Reconocimiento IgM-antígeno según la presencia de regiones de baja complejidad

Dado que en el proteoma de *Plasmodium* existe una elevada presencia de regiones BC, caracterizadas por ser altamente repetitivas en su secuencia de aminoácidos, y que estas tienen una posible vinculación con su actividad antigénica^{301,302}, se analizó si la presencia de estas regiones influía en el reconocimiento de los antígenos de *P. falciparum* por parte de las IgM. Para ello, se determinó el número de regiones BC, su longitud y su proporción con respecto a la longitud de la proteína en cada uno de los 237 antígenos identificados inicialmente utilizando el algoritmo SEG²⁸⁰. En primer lugar, se analizó si había diferencias en el porcentaje de individuos que reconocían los antígenos que no tenían ninguna región BC frente a los que tenían una o más de ellas. A pesar de que se observó una elevada variabilidad en los dos grupos establecidos, los antígenos sin regiones BC fueron reconocidos por un porcentaje significativamente superior de individuos que aquellos con dichas regiones ([Figura 42A](#)). Además, la correlación entre el porcentaje de individuos que reconocieron cada antígeno y el número de regiones BC, su longitud y el porcentaje de longitud respecto al total de la proteína fue significativamente inversa ([Figura 42B-D](#)). Todo ello indica que las proteínas que tienen más regiones BC tienen un menor reconocimiento por parte de las IgM que las que tienen menor cantidad de ellas.

5.3.5. Antígenos IgM reconocidos diferencialmente entre grupos de infección

Para analizar si había diferencias en la abundancia de los antígenos capturados por las IgM según el grupo de edad, embarazo o nivel de infección de los individuos, se realizó, en primer lugar, un análisis exploratorio de los datos de abundancia de los antígenos identificados previamente en el que se incluyó a la población completa y que nos permitió hacer una primera aproximación al comportamiento de los datos sin necesidad de hacer ninguna hipótesis previa. Posteriormente, se realizó un análisis de abundancia diferencial de acuerdo a dos criterios; en el primero de ellos se comparó los individuos infectados por *P. falciparum* frente a los no infectados y en el segundo de ellos se comparó los individuos infectados con MS o MM en cada grupo de edad o embarazo por separado.

Para el análisis exploratorio, se filtró la lista de antígenos con el fin de conservar los más inmunodominantes. Se conservaron únicamente aquellos que fueron detectados por la IgM de un mínimo 3 de los 5 individuos de al menos uno de los grupos de edad e infección establecidos, dando lugar a un total de 82 antígenos. La cantidad de antígenos distintos reconocidos y su

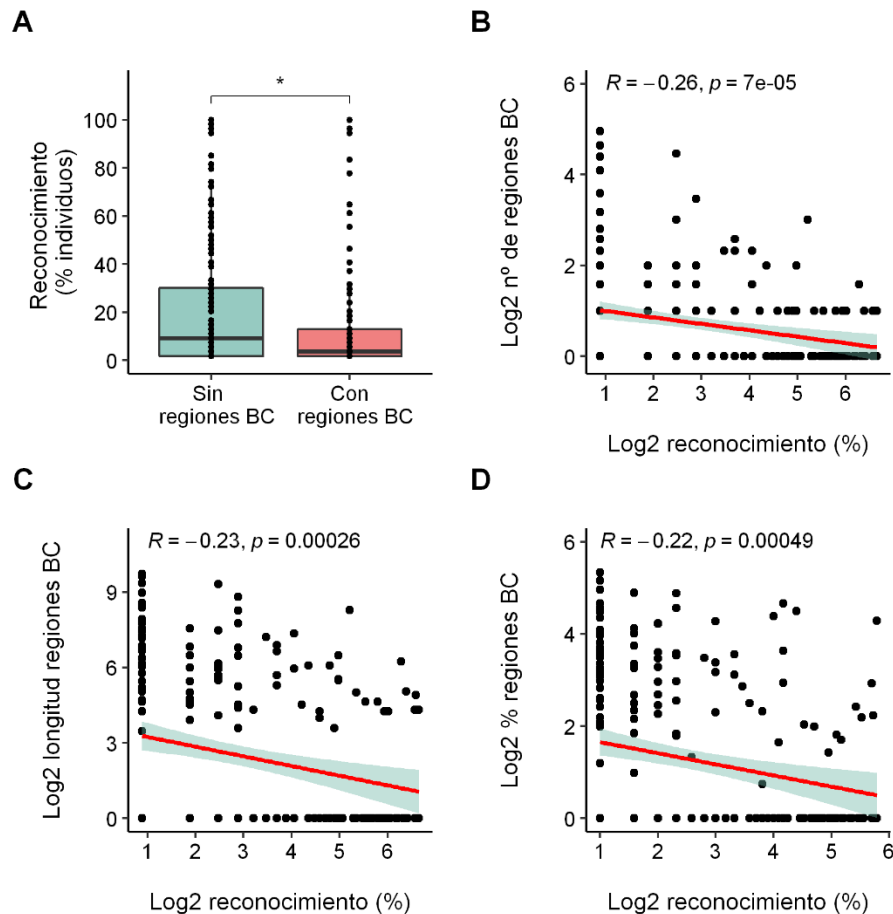


Figura 42 | Reconocimiento de antígenos con regiones de baja complejidad por IgM. A, porcentaje de individuos sobre el total ($n = 54$) que reconocen los antígenos con regiones BC y sin regiones BC. Las diferencias significativas obtenidas mediante el test de *Wilcoxon* se indican con asteriscos *, p -valor $\leq 0,05$. Correlación de *Pearson* entre el porcentaje de individuos que reconocieron cada antígeno y B, el número de regiones BC de los antígenos; C, la longitud total de las regiones BC; y D, el porcentaje de la longitud de las regiones BC respecto a la longitud total de la secuencia de los antígenos. Para las correlaciones (B, C y D) se transformaron los datos con log2.

abundancia mostraron una elevada variabilidad entre individuos, incluso entre los pertenecientes al mismo grupo de edad e infección ([Figura 43A](#))

A pesar de ello, el PCA ([Figuras 43B y C](#)) y la matriz de correlaciones ([Figura 43D](#)) entre individuos mostró un agrupamiento de los individuos de la misma edad. Por el contrario, no se observaron agrupamientos de los individuos con el mismo estado infeccioso ([Figura 43B y D](#)), presumiblemente debido a que la edad fue la principal fuente de variación de los datos y no permitió ver los efectos de otras variables en la población completa. La proporción de individuos de la población total que reconocen cada uno de los antígenos se correlacionó positivamente con la abundancia media de estos ($R = 0,54$, p -valor = $2,1 \times 10^{-7}$) ([Figura 43E](#)), lo que nos sugiere que los antígenos más dominantes y reconocidos por mayor porcentaje de la población, también se reconocen en mayor abundancia que los antígenos menos inmunodominantes.

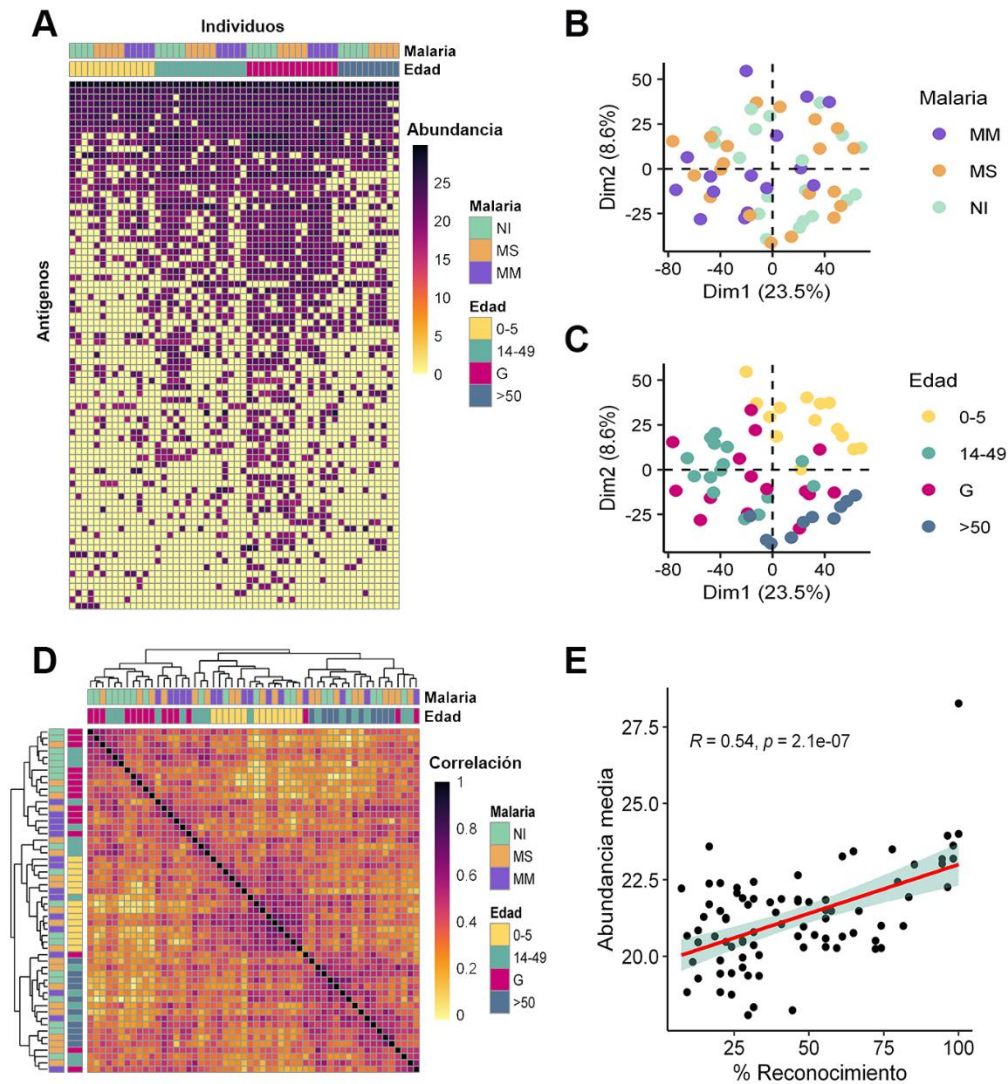


Figura 43 | Abundancia de los antígenos más inmunodominantes ($n = 82$) en la población. A, valores de abundancia relativa de cada antígeno transformados en log2 y normalizados. Cada fila corresponde a cada uno de los antígenos ordenados por abundancia media de mayor a menor y cada columna a cada individuo ($n = 54$) ordenados en grupos de edad h embarazo e infección. **B**, PCA de los 54 individuos elaborado con los datos de abundancia de los 82 antígenos y coloreado por grupo de edad. **C**, PCA de los 54 individuos elaborado con los datos de abundancia de los 82 antígenos y coloreado por grupo de infección. **D**, matriz de correlaciones de *Pearson* entre distintos individuos. Se realizó un agrupamiento jerárquico según las correlaciones entre ellos. **E**, correlación de *Pearson* entre el porcentaje de individuos que reconocen cada uno de los antígenos (% reconocimiento) y su la abundancia media de cada antígeno, teniendo en cuenta solamente los datos de las personas cuyas IgM lo detectaban.

El análisis de abundancia diferencial se llevó a cabo con el fin de conocer si la abundancia de las IgM que reconocen cada antígeno varía de acuerdo al estado infeccioso de los individuos. Para ello, se utilizó el paquete de análisis proteómico “DEP” de *Bioconductor*. Dadas las grandes diferencias observadas anteriormente entre grupos de edad, el análisis se llevó a cabo por grupos de edad por separado. Los individuos de cada grupo de edad fueron clasificados en

infectados por *P. falciparum* y no infectados y se filtraron los antígenos, conservando aquellos que estaban reconocidos por al menos el 50% de los individuos de al menos uno de los grupos de infección establecidos. Dicho filtrado permitió descartar los antígenos poco representativos sin eliminar aquellos representativos de únicamente algunos de los grupos de estudio.

De los 71 antígenos filtrados, 30 (42,25%) mostraron una abundancia significativamente diferente entre infectados y no infectados en algún grupo de edad ([Figura 44A](#)). El grupo de adultos de 14 a 49 años fue el que mostró mayor cantidad de antígenos con abundancia diferencial entre los grupos de infección, seguido por las mujeres gestantes, los niños menores de 5 años y, por último, los adultos mayores de 50 ([Figuras 44A y C](#)). Cabe destacar que en los adultos jóvenes y las mujeres gestantes el número de antígenos que disminuyeron significativamente su abundancia con la aparición de la infección superaron a los que la aumentaron (11 disminuidos frente a 3 incrementados en adultos y 10 disminuidos frente a 2 aumentados en mujeres gestantes). En contraste con lo observado en adultos jóvenes, los niños y los adultos mayores de 50 años mostraron un mayor número de antígenos distintos significativamente aumentados con la infección que disminuidos (3 aumentados vs. 2 disminuidos en niños y 4 aumentados vs. 2 disminuidos en mayores de 50) ([Figuras 44A y C](#)).

Tras observar los resultados obtenidos, destacó la gran variabilidad en el comportamiento de los distintos grupos de edad, apreciándose cambios distintos tras la infección entre niños y adultos especialmente. Los individuos adultos estimularon potentemente la producción de anticuerpos específicos frente a un reducido número de antígenos, mientras que la mayoría del repertorio de IgM específicas de *P. falciparum* se vio reducido con la infección. Por el contrario, los niños, al encontrarse en los primeros contactos con el parásito de su vida, tienen una respuesta menos específica y aumentan la producción de mayor cantidad de IgMs específicas distintas tras la infección.

A continuación, se realizó un análisis de abundancia diferencial entre los grupos de individuos infectados con MM y MS para determinar si el nivel de parasitemia influye en la producción de IgM específica de *P. falciparum* frente a antígenos específicos. De los 54 individuos iniciales, este análisis se realizó con los 30 infectados por *P. falciparum* y fueron clasificados según su edad, estado de embarazo (menores de 5 años, adultos jóvenes de 14 a 49 años y mujeres gestantes) y nivel de parasitemia (MM y MS). El grupo de mayores de 50 años fue descartado por no haber individuos infectados con MM. Tras filtrar y normalizar los datos de abundancia del mismo modo que en el análisis previo, se obtuvieron un total de 68 antígenos. De ellos, 10 (14,71%) mostraron diferencias significativas en la abundancia de individuos infectados con MM y MS en alguno de los grupos de edad ([Figura 44B](#)). El grupo de niños

menores de 5 años fue el que mostró mayor cantidad de antígenos con diferencias significativas entre grupos de parasitemia con un total de 5 antígenos, de los cuales 3 aumentaron su abundancia en los individuos con MM respecto a MS y 2 disminuyeron su abundancia al aumentar la parasitemia. Los individuos adultos, gestantes y no gestantes, mostraron pocas diferencias entre grupos de parasitemia, con únicamente 3 antígenos con abundancia diferencial entre grupos de parasitemia en cada grupo ([Figuras 44B y C](#)).

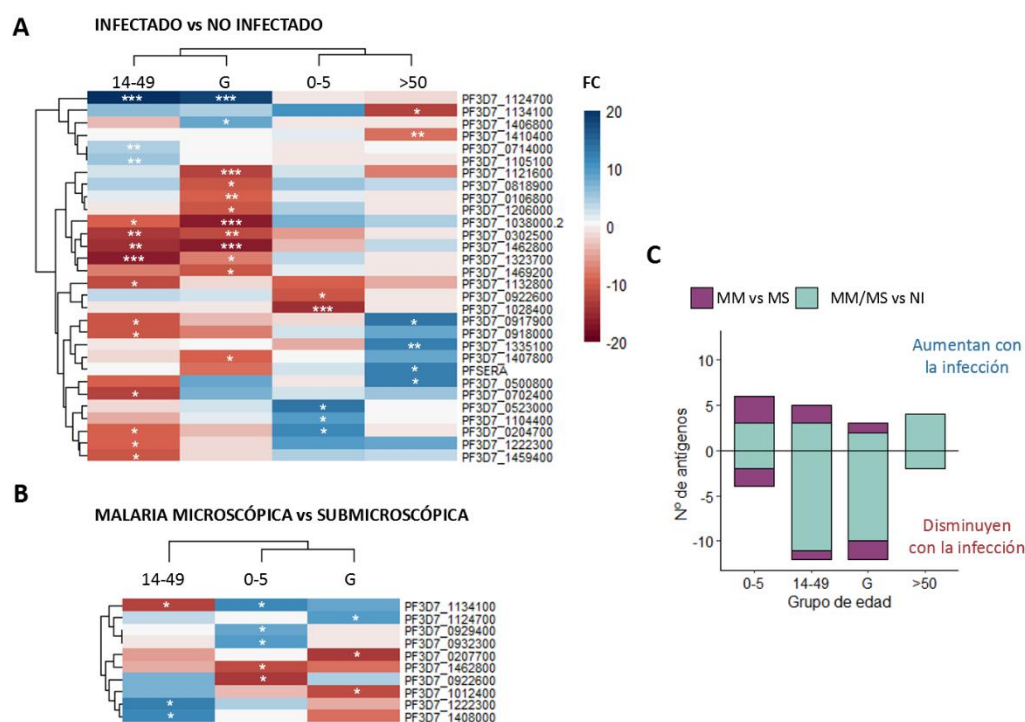


Figura 44 | Análisis de abundancia diferencial de antígenos entre grupos de infección. Se muestra el número de veces que el valor de abundancia de los antígenos se multiplica o divide (FC, *fold change*) significativamente en cada grupo de edad o embarazo en **A**, individuos infectados por *P. falciparum* respecto a no infectados en alguno de los grupos de edad y embarazo establecidos (0-5, 14-49, mujeres gestantes y mayores de 50 años) y **B**, individuos con MM vs. MS. En azul se indican los antígenos con abundancia significativamente superior en infectados vs. no infectados (A) o en MM vs. MS (B). En rojo se marcan los antígenos con abundancia significativamente inferior en infectados vs. no infectados (A) o en MM vs. MS (B). Se realizó un agrupamiento jerárquico de los grupos de edad y embarazo en base a su distancia euclidiana. **C**, número de antígenos con abundancia diferencial entre infectados por *P. falciparum* y no infectados (verde) y MM y MS (morado).

Se analizó también la correlación existente entre las abundancias de todo el set de antígenos identificados con el fin de establecer posibles grupos de antígenos de *P. falciparum* con comportamiento similar en cuanto a su reconocimiento por parte de las IgM. Se realizó para ello una matriz de correlaciones de *Pearson* entre todos los antígenos y se ordenó en función de la similitud entre las correlaciones de cada antígeno ([Figura 45A](#)). Una vez agrupada la matriz, se observó la aparición de dos grandes grupos de antígenos ([Figura 45A](#), grupos 1+2 y grupos

3+4) divididos a su vez en otros dos grupos cada uno. El grupo 1 de antígenos mostró un enriquecimiento de términos de ontología genética relacionados con la pertenencia a la célula hospedadora, es decir, al eritrocito humano infectado ([Figura 45B](#)). En general, este grupo se correlacionó positivamente con el grupo 2 que mostró un enriquecimiento de términos relacionados con la parte apical del parásito y la membrana plasmática de este ([Figura 45B](#)). El grupo 3 no mostró ningún enriquecimiento significativo en cuanto al componente celular y en el grupo 4, correlacionado inversamente con los grupos 1 y 2, se observó un fuerte enriquecimiento de proteínas relacionadas con la unión a DNA y la cromatina debido a la presencia de diversas histonas en el grupo ([Figura 45B](#)).

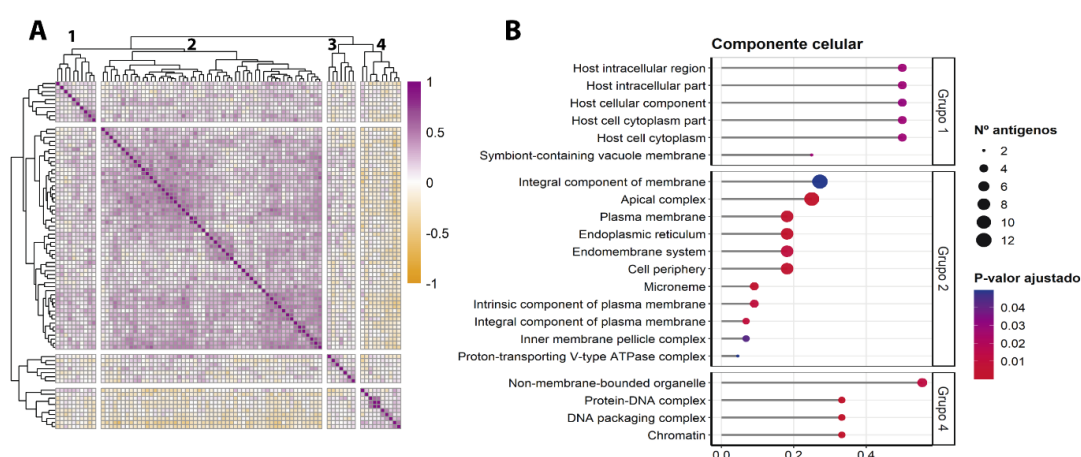


Figura 45 | Agrupamiento de antígenos IgM según su correlación. **A**, matriz de correlaciones de Pearson entre la abundancia de todos los antígenos identificados. Las correlaciones positivas se indican en color morado y las negativas en naranja. Los antígenos se agruparon jerárquicamente en 4 grupos en base a la similitud de las correlaciones. **B**, términos GO relativos al componente celular enriquecidos significativamente en cada uno de los grupos de antígenos. En el grupo 3 de antígenos no se halló ningún término enriquecido.

5.3.6. Epítomos inmunodominantes de *P. falciparum* reconocidos por IgM

Con este estudio se pretendían identificar los epítomos de *P. falciparum* con potencial de inducir una respuesta de IgM y, asimismo, asociar su nivel de reconocimiento con el estado infeccioso individual. Para ello, tras haber identificado un grupo de antígenos de *P. falciparum* reconocidos por IgM, se seleccionaron aquellos que presentaban un amplio reconocimiento por parte de la población infectada. El criterio para su selección consistió en que los antígenos debían ser reconocidos por al menos el 80% de los individuos con MM y MS en al menos uno de los grupos de edad o en embarazo (0-5, 14-49, mujeres embarazadas y >50 años). Tras filtrar por este criterio, se seleccionaron un total de 25 antígenos ([Tabla 10](#)), con los que se realizó un

análisis de su inmunoreactividad por IgM en formato de epítomos lineales. Para ello, se realizó un microarray de péptidos de 15 aminoácidos de longitud con un solapamiento de 14 aminoácidos entre sí que cubrían la secuencia completa de las 25 proteínas, a excepción de las regiones BC y las hélices transmembrana (en aquellas proteínas de membrana) ([ver sección 4.4.4](#)).

Las regiones BC son regiones poco específicas por ser altamente repetitivas, y las hélices transmembrana son escasamente accesibles al sistema inmunitario, razones por las que sus secuencias se identificaron y se eliminaron del análisis, no solo por una menor probabilidad de que su inaccesibilidad dificultase su reconocimiento inmunogénico, sino también por el efecto contrario de acumular reactividad inmunológica por la elevada frecuencia de las secuencias de BC en muchas otras proteínas codificadas en el genoma de *P. falciparum*. Tras eliminar estas regiones de las secuencias, se obtuvieron un total de 13 099 péptidos de 15 aminoácidos (contiguos y solapantes en 14 residuos) y se evaluó su reactividad por parte de las IgM serológicas de individuos procedentes de regiones endémicas de malaria. Para ello, se utilizaron 37 muestras de suero, diferentes de las usadas para el descubrimiento de antígenos, clasificadas en 4 grupos: individuos europeos no expuestos a la malaria, NE (controles negativos); individuos no infectados procedentes de regiones endémicas, NI; individuos con MS e individuos con MM ([ver Figura 21](#)). Las muestras de individuos infectados por malaria fueron de casos de malaria importada, es decir, de individuos cuya infección fue detectada en el sistema de salud español y que volvieron infectados de sus países de origen en África subsahariana y que, de esta forma, permitían una diversidad amplia de procedencias del parásito.

Un primer análisis exploratorio de los datos de señal de la unión de IgM en el microarray mostró que el plasma de los individuos infectados con malaria arrojaba una mayor intensidad frente a los péptidos que el de los individuos no infectados, tanto de aquellos potencialmente expuestos previamente al parásito como los controles negativos de procedencia europea ([Figura 46A](#)). Globalmente, los sueros de individuos infectados con MS reconocían un mayor número de péptidos y con mayor intensidad que los que padecían MM ([Figura 46A](#)). A pesar de ello, la variabilidad dentro de cada uno de estos grupos fue elevada, pues el plasma de algunos individuos infectados mostró una escasa señal de reconocimiento de los péptidos, similar a los de los no infectados. Esta menor señal fue especialmente manifiesta en el grupo de MM. El PCA validó estos resultados, mostrando el agrupamiento de todos los individuos no infectados ([Figura 46B](#), colores verde y gris) junto con algunas de las muestras de MM. Los individuos con

Tabla 10
Antígenos seleccionados para la identificación de epítomos inmunodominantes

Código antígeno	ID Uniprot	Gen	Nombre	Abreviatura	Reconocimiento (%)							
					0-5		14-49		G		>50	Total
					MS	MM	MS	MM	MS	MM	MS	MS+MM
1	Q8I6Z1	PF3D7_0731600	Acyl-CoA synthetase	ACS	20	20	40	40	80	80	60	48,57
2	Q7KQK5	PF3D7_1133400	Apical membrane antigen 1	AMA1	20	0	60	60	100	100	40	54,29
3	Q8I136	PF3D7_1132800	Aquaglyceroporin	AQP	60	40	60	40	100	80	20	57,14
4	Q8I0P6	PF3D7_1357000	Elongation factor 1-alpha	EF1a	60	60	80	80	100	60	80	74,29
5	Q8IBE8	PF3D7_0731500	Erythrocyte binding antigen-175	EBA-175	0	20	60	20	100	80	20	42,86
6	Q8IKC8	PF3D7_1471100	Exported protein 2	EXP2	100	100	80	100	100	80	100	94,29
7	O77389	PF3D7_0316600	Formate-nitrite transporter	FNT	80	80	60	60	100	80	0	65,71
8	Q8IIB6	PF3D7_1124700	GrpE protein homolog	GRPEL1	0	0	80	100	60	100	80	60,00
9	Q7KWJ5	PF3D7_0204700	Hexose transporter	HT	60	100	60	40	80	80	0	60,00
10	C0H571	PF3D7_0929400	High molecular weight rhoptry protein 2	RhopH2	40	80	100	100	100	100	100	88,57
11	Q8I395	PF3D7_0905400	High molecular weight rhoptry protein 3	RhopH3	80	100	40	100	100	100	100	88,57
12	Q8I492	PF3D7_0500800	Mature parasite-infected erythrocyte surface antigen	MESA	0	0	60	20	80	40	80	40,00
13	Q8I0U8	PF3D7_0930300	Merozoite surface protein 1	MSP1	40	40	60	100	100	100	100	77,14
14	Q8ID66	PF92	Merozoite surface protein P92	MSP92	40	60	100	80	100	80	0	65,71
15	Q7K6A5	PF3D7_0523000	Multidrug resistance protein 1	MDRP1	80	60	20	80	80	100	20	62,86
16	Q8ILZ1	PF3D7_1410400	Rhoptry-associated protein 1	RAP1	100	100	100	100	100	100	60	94,29
17	Q8I484	PF3D7_0501600	Rhoptry-associated protein 2	RAP2	100	100	100	100	100	100	100	100,00
18	Q8I485	PF3D7_0501500	Rhoptry-associated protein 3	RAP3	100	80	100	100	100	100	80	94,29
19	Q8I2G1	PF3D7_0935900	Ring-exported protein 1	REX1	40	20	100	60	80	80	60	62,86
20	Q9TY96	PF3D7_0207500	Serine repeat antigen 6	SERA6	0	20	60	20	100	80	40	45,71
21	Q9TY95	SERA5	Serine-repeat antigen protein 5	SERA5	0	20	20	20	60	60	100	40,00
22	Q8IIV8	PF3D7_1104400	Thioredoxin-like mero protein	TrxLM	100	100	80	100	100	80	60	88,57
23	Q8IDH5	PF3D7_1352500	Thioredoxin-related protein, putative	TrxRP	60	40	80	80	80	80	60	68,57
24	Q8ILY8	PF3D7_1410700	Uncharacterized protein	Unch	80	80	100	80	100	60	20	74,29
25	Q8IKR1	PF3D7_1456800	H(+)-exporting diphosphatase	HEDP	20	40	40	60	80	100	40	54,29

MS se separaron del grupo de no infectados y formaron un grupo con mayor variabilidad junto con aquellas muestras de MM de mayor reactividad a péptidos del microarray ([Figura 46B](#)).

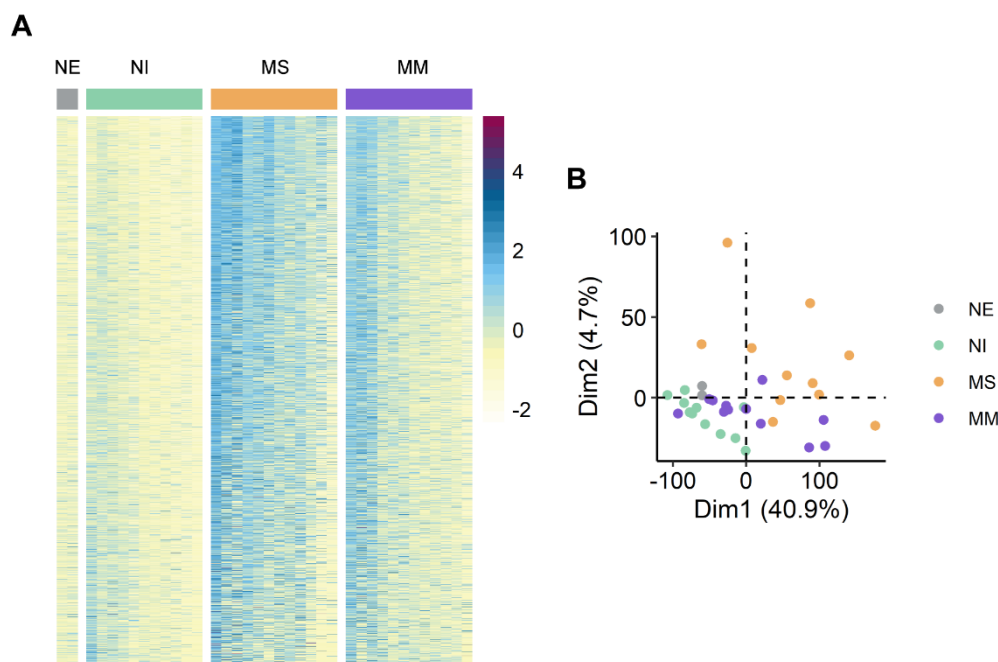


Figura 46 | Análisis exploratorio de la señal de IgM a los péptidos del microarray. **A**, intensidad de señal de todos los péptidos ($n = 13\,099$) ordenados según su intensidad media en todos los individuos ($n = 37$) por grupos de infección. Cada columna corresponde a un individuo y cada fila a un péptido. **B**, PCA realizado con la intensidad de señal a todos los péptidos en todos los individuos, coloreados según su grupo de infección. NE, no expuestos a la malaria; NI, expuestos no infectados; MS, infectados con malaria submicroscópica; MM, infectados con malaria microscópica. En ambas gráficas se utilizó la media de los triplicados de las puntuaciones z como medida de intensidad de señal (ver texto).

Posteriormente, se estableció un criterio de positividad para determinar el punto de corte a partir del cual la señal de la IgM a un péptido del microarray era considerada positiva. Dado que la señal del plasma de individuos NE debe ser necesariamente inespecífica, se tomó su valor medio de las puntuaciones z , es decir, el número de DE sobre la señal de los blancos, de los péptidos que daban señal superior a 0 como tal punto de corte. El valor de este punto se fijó en 5,6 puntuaciones z . Para verificar que tal criterio y el cálculo del valor del punto de corte de positividad era el adecuado, se representó gráficamente la densidad respecto a la intensidad de la señal en los 4 grupos establecidos (NE, NI, MS y MM), marcando la posición del punto de corte ([Figura 47](#)).

Como se puede observar, la mayoría de las señales de individuos no infectados, NE y NI, se acumularon debajo del valor de punto de corte, indicando que estas señales eran mayoritariamente inespecíficas. Por el contrario, en los grupos de infectados, MS y MM, se

observó que las señales específicas, cuya curva presenta la forma de una distribución normal, tenían valores de señal superior al punto de corte, mientras que las señales inespecíficas con áreas sin forma definida permanecían en valores menores a este punto. Por tanto, se pudo concluir que el criterio de positividad a partir del punto de corte calculado era el adecuado, ya que eliminaba las señales inespecíficas de fondo, conservando las señales específicas de reconocimiento de los péptidos.

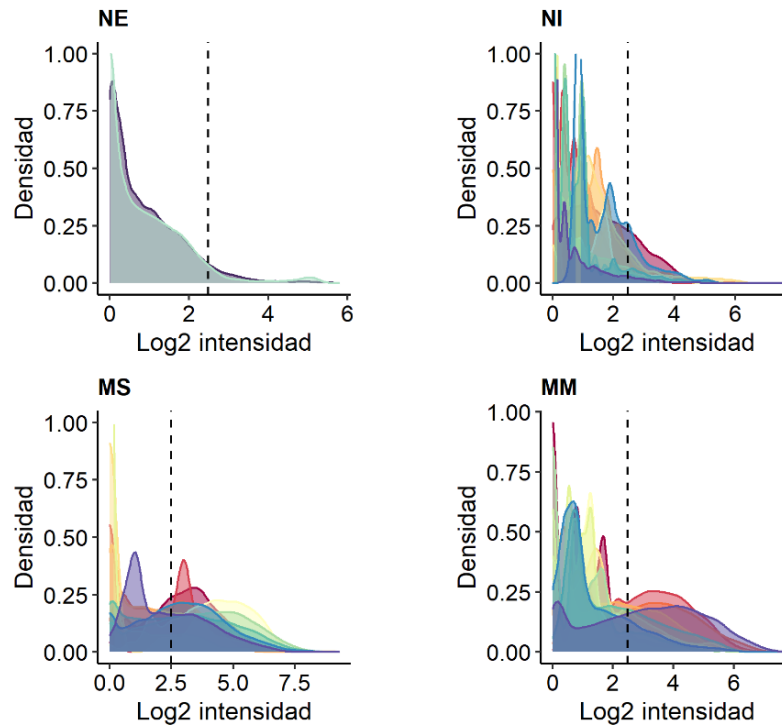


Figura 47 | Criterio de positividad establecido para la intensidad de señal del microarray. Representación, en cada grupo de infección, de los valores de la señal obtenida en densidad respecto a intensidad de señal (en log2), frente a todos los péptidos. Los valores de intensidad de señal se expresan en puntuaciones z. Cada área de un color representa un individuo. El punto de corte a partir del cual se considera una señal positiva se indica con una línea de puntos. NE, no expuestos a la malaria; NI, expuestos a la malaria no infectados; MS, infectados con malaria submicroscópica; MM, infectados con malaria microscópica.

Tras establecer el criterio de positividad, se realizó un recuento del número de péptidos reconocidos por cada individuo y se estimó la intensidad de señal media de los mismos. Los individuos infectados por *P. falciparum* no solo reconocieron un número de péptidos significativamente superior a los no infectados ([Figura 48A](#)) sino que los reconocieron con mayor intensidad ([Figura 48B](#)). Entre los infectados, los individuos con MS fueron los que reconocieron mayor cantidad de péptidos y con mayor intensidad, siendo estos valores significativamente superiores a los de los individuos con MM. Este resultado puede sugerir que, tras una infección,

se generan IgMs específicas circulantes y que tanto el aumento en la diversidad de estas como en su abundancia podría ser esencial en el control de la infección, ya que los individuos que reconocen un mayor repertorio de péptidos y con mayor abundancia son los que presentan infecciones más leves con menor carga parasitaria.

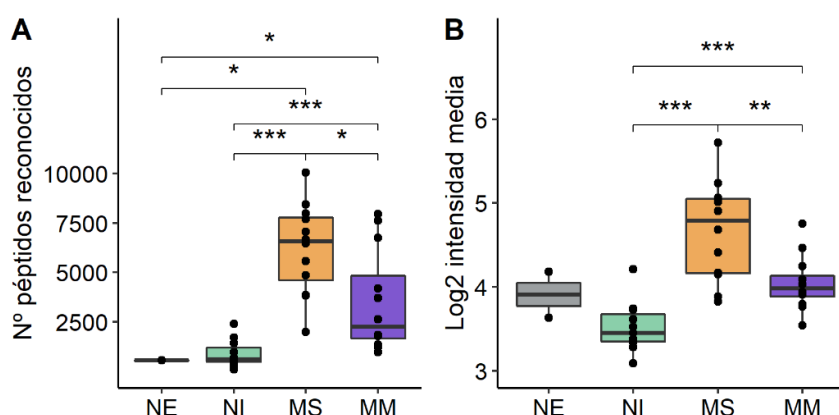


Figura 48 | Número de péptidos reconocidos por IgM e intensidad de señal media por grupos de infección. A, distribución del número de péptidos reconocidos. B, intensidad de señal media de todos los péptidos de cada individuo. Para el cálculo de la intensidad de señal media se tomaron los valores de puntuaciones z con señal positiva únicamente. NE, no expuestos a la malaria; NI, expuestos a la malaria no infectados; MS, infectados con malaria submicroscópica; MM, infectados con malaria microscópica. Las diferencias significativas obtenidas mediante el test de Wilcoxon se indican con asteriscos (*). *, p-valor $\leq 0,05$; **, p-valor $\leq 0,01$; ***, p-valor $\leq 0,001$.

Para analizar potenciales diferencias en el reconocimiento de los péptidos según el antígeno al que pertenecían, se estimó la frecuencia de reconocimiento de los péptidos de cada antígeno en cada grupo de infección por separado (Figura 49). Todos los antígenos mostraron un patrón de reconocimiento similar. La mayor frecuencia de reconocimiento se encontró en los individuos con MS, seguidos de los MM y, por último, los NI, cuyas frecuencias de reconocimiento fueron notablemente inferiores (Figura 49). Entre los 25 antígenos analizados, destacaron las proteínas REX1, MESA, MSP1, GRPEL1 y EBA-175 (Figura 49, antígenos 19, 12, 13, 8 y 5, respectivamente) cuyas frecuencias de reconocimiento en la población infectada fueron las más elevadas. Por el contrario, los antígenos FNT y RAP3 fueron los que mostraron menores frecuencias de reconocimiento (antígenos 7 y 18, respectivamente).

Se analizó también el número de péptidos cuya intensidad de señal de reconocimiento fue significativamente distinta en los sueros de los individuos de cada uno de los tres grupos de infección NI, MS y MM (Figura 50). Para ello, se realizó una prueba t de Student a la señal de todos los péptidos ($n = 13\,099$), comparando los tres grupos de infección por pares. El contraste que dio lugar a la mayor cantidad de péptidos significativos fue el de individuos con MS frente a

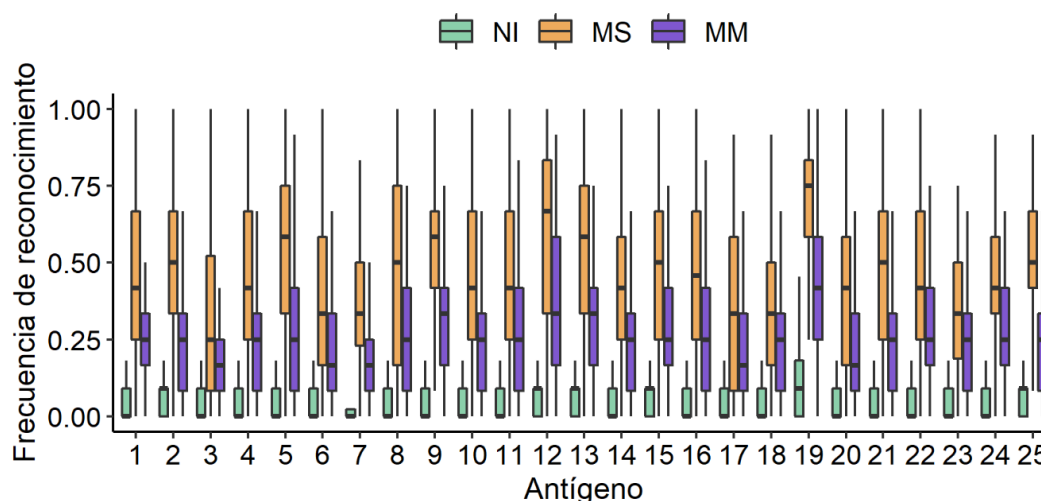


Figura 49 | Frecuencia de reconocimiento de los péptidos de cada antígeno según el estado infeccioso de los individuos. NI, no infectados; MS, infectados con malaria submicroscópica; MM, infectados con malaria microscópica.

NI, con un total de 7328 péptidos con intensidad de señal significativamente distinta entre los dos grupos, de los cuales prácticamente todos tuvieron intensidad de señal superior en el grupo MS y únicamente 7 fueron más abundantes en el grupo NI. En este contraste, las proteínas que alcanzaron mayor porcentaje de péptidos significativos fueron la REX1, HT, MESA, HEDP y EBA-175 con un 85%, 80%, 70%, 66% y 65%, respectivamente, de los péptidos con diferencias significativas entre estos dos grupos ([Figura 50A](#)).

El contraste entre individuos con MM y NI arrojó una cantidad de péptidos significativos notablemente menor, con un total de 913 péptidos cuya abundancia fue significativamente superior en los individuos con MM frente a los NI y ninguno con abundancia superior en el grupo NI. Las proteínas con mayores diferencias entre los grupos MM y NI fueron MESA, REX1, TrxLM, GRPEL1 y HT con un 22%, 17%, 10%, 10% y 9% de péptidos significativos respectivamente ([Figura 50A](#)). Las diferencias entre los dos niveles de parasitemia, MM y MS, fueron mucho menores que las observadas entre individuos infectados y no infectados. El contraste MS vs. MM dio lugar a 174 péptidos con abundancia significativamente superior en el grupo de MS respecto a MM, siendo las proteínas AQP, AMA1, HEDP, GRPEL1 y REX1 las que mostraron mayores diferencias entre niveles de infección ([Figura 50B](#)).

Los análisis de intensidad de señal diferencial realizados hasta el momento se llevaron a cabo teniendo en cuenta todos los individuos de los grupos de infección. Sin embargo, con el fin de investigar si los individuos que reconocen cada péptido lo hacen con distinta intensidad, se realizó también una prueba t de *Student* a todos los péptidos para comparar la intensidad de

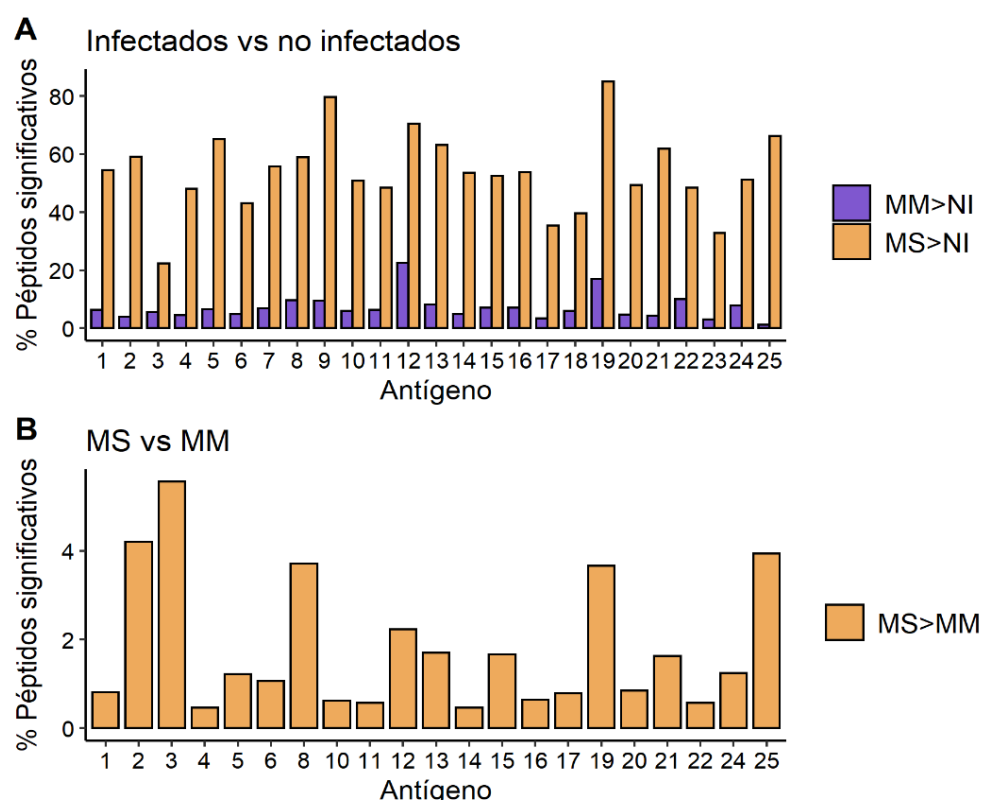


Figura 50 | Número de péptidos con intensidad de señal significativamente diferente entre grupos de infección clasificados por antígeno. Se muestra el porcentaje de péptidos significativos tras comparar **A**, infectados vs. no infectados y **B**, MS vs. MM. Se consideraron significativos aquellos péptidos que tras realizar una prueba t de *Student* entre los grupos indicados y ajustar el p-valor mediante el control del FDR, arrojaron un p-valor ajustado <0,05. NI, no infectados; MS, malaria submicroscópica; MM, malaria microscópica.

señal de los individuos con MM y MS eliminando del análisis aquellos individuos que no reconocían el péptido. Con este análisis se podrían detectar los péptidos reconocidos con intensidad diferencial, sin tener en cuenta aquellos péptidos reconocidos mayoritariamente en uno de los grupos. Para ello, se realizó un filtrado de los péptidos conservando únicamente aquellos reconocidos por al menos el 50% de los individuos con MM y MS y, para cada péptido, se eliminaron los individuos que no lo reconocían. Tras el filtrado se obtuvieron un total de 1962 péptidos, de los cuales 270 mostraron diferencias significativas. De ellos, tres mostraron intensidad de señal significativamente superior en el grupo de MM y 267 en el de MS ([Figura 51](#)). Con este resultado podemos confirmar que el plasma de individuos con MS, además de reconocer con mayor frecuencia los péptidos analizados, los reconocen con mayor abundancia que el de los infectados con MM. Dos de los antígenos analizados, MESA y REX1 ([Figura 51](#), antígenos 12 y 19), destacaron sobre el resto mostrado los mayores porcentajes de péptidos reconocidos con intensidad significativamente superior por los sueros de individuos con MS en contraste con los MM.

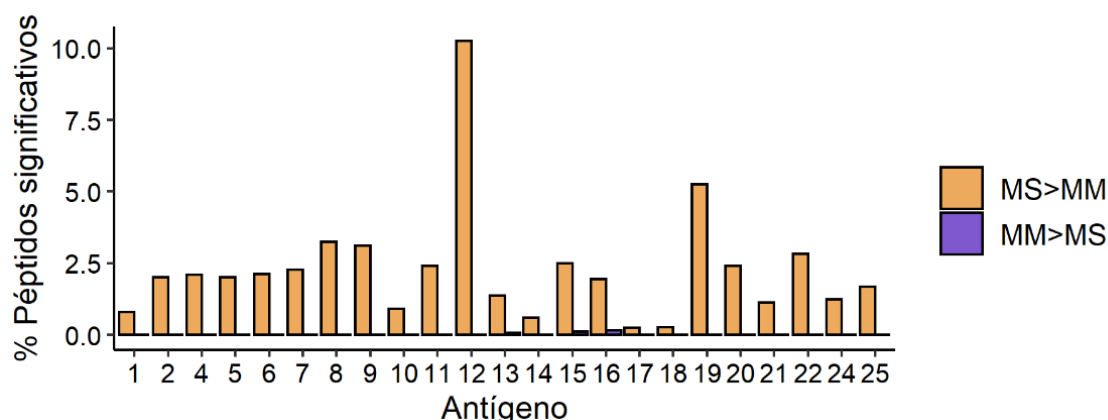


Figura 51 | Número de péptidos de cada antígeno con intensidad de señal significativamente diferente entre grupos de parasitemia. Se consideraron significativos aquellos péptidos que tras realizar una prueba t de *Student* entre los grupos indicados arrojaron un p-valor <0,05. Previamente, se filtró la señal de reconocimiento a los péptidos para conservar únicamente aquellos reconocidos por al menos el 50% de los sueros de individuos con MS y MM. Se introdujeron únicamente los datos de individuos con señal positiva en cada péptido. NI, no infectados; MS, infectados con malaria submicroscópica; MM, infectados con malaria microscópica.

Para tratar de identificar péptidos con potencial utilidad en diagnóstico serológico por señal de unión a IgM, se seleccionaron aquellos que habían sido reconocidos por más del 75% de los individuos con MS y con MM y que no habían sido reconocidos por ningún individuo NI. Este filtro seleccionó un total de 22 péptidos con elevada señal inmunogénica ([Tabla 11](#)), pero cuyos niveles presumiblemente disminuyen rápidamente tras la infección, ya que ningún individuo no infectado mostró niveles detectables de IgM específica frente a los mismos. De los 22 péptidos seleccionados, 9 pertenecieron a las proteínas MESA, SERA6 o REX1 y el más inmunogénico se localizó en el antígeno MESA.

También se identificaron péptidos cuyo reconocimiento por IgM específica indicaba una potencial capacidad protectora, dado que su intensidad de señal fue significativamente superior en el plasma de los infectados con MS, considerados tolerantes a la infección por su capacidad de controlar el crecimiento del parásito. Aquellos del grupo de MM serían, por el contrario, considerados de mayor susceptibilidad a la infección sintomática. En este análisis, tras realizar la prueba t de *Student* de los valores de intensidad de señal entre los grupos MS y MM, se seleccionaron los 10 péptidos con menor p-valor y que tuvieran intensidad de señal superior en el grupo MS con respecto a MM ([Figura 52](#)). Los antígenos con mayor potencial de protección frente a la infección a elevadas parasitemias fueron SERA5 y MSP1, con tres y dos péptidos respectivamente potencialmente protectores. También se encontraron candidatos en los antígenos GRPEL1, RhopH3, EBA-175, MDRP1 y TrxLM.

Tabla 11
Péptidos inmunogénicos candidatos para diagnóstico serológico mediante IgM

Antígeno	Secuencia	Prevalencia (%)			
		NI	MS	MM	MS + MM
MESA	NVIVQEIMNEDVNEK	0	100	83	92
GRPEL1	KNINEESLKTNEEIN	0	100	75	88
MESA	VNVMGESKETDESKE	0	92	75	83
MSP1	SPSENNKKVNEALKS	0	92	75	83
MESA	KETDESKETDESKET	0	92	75	83
SERA6	IYIKTQDVIGYDFN	0	92	75	83
REX1	PQAEKDALAKTENQN	0	92	75	83
RhopH3	GEDKTTDNTYKEMEE	0	92	75	83
EXP2	IESGKYEFDVDSSET	0	83	83	83
SERA6	LDVNKNGVISQENVF	0	83	75	79
RhopH2	NTEGESEVPSDDEIN	0	83	75	79
SERA6	NGVISQENVFDTSES	0	83	75	79
REX1	QYLYEELQIVYDENQ	0	83	75	79
REX1	MQYLYEELQIVYDEN	0	83	75	79
MDRP1	MGKEQKEKKDGNLSI	0	83	75	79
HT	GGEIGTSPYITMEER	0	83	75	79
SERA5	PELNYDLEYFNEHLY	0	83	75	79
EXP2	ESGKYEFDVDSSETD	0	75	83	79
RhopH3	HFLDAIAEKDILEEK	0	75	75	75
EBA-175	GGSRSEDEVTQEFQV	0	75	75	75
RhopH2	QNTGESEVPSDDEI	0	75	75	75
TrxLM	PKFVFKDEITESNIK	0	75	75	75

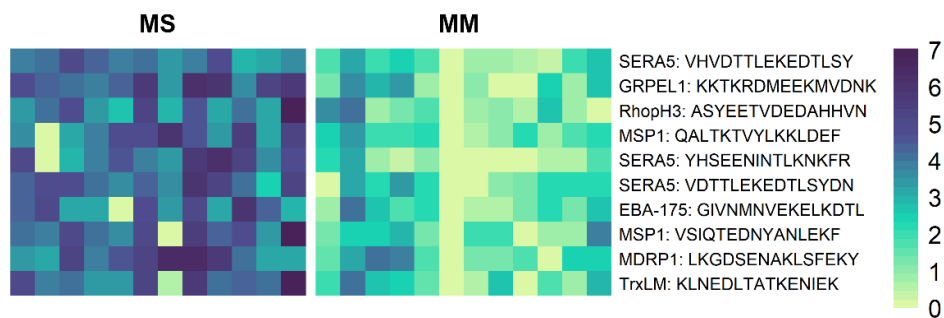


Figura 52 | Intensidad de señal de la IgM específica de los péptidos con potencial protección inmunitaria. Se seleccionaron los diez péptidos con menor p-valor tras realizar la prueba t de *Student* de la intensidad de señal a todos los péptidos entre el plasma de los grupos MS y MM. El gráfico muestra el valor de intensidad de señal de cada individuo (columnas) agrupado por nivel de parasitemia y cada péptido (filas). MS, infectados con malaria submicroscópica; MM, infectados con malaria microscópica.

Con el objeto de identificar las regiones más inmunogénicas de los antígenos, se realizó un mapeo lineal de la intensidad de señal de cada proteína a lo largo de su secuencia ([Anexo I](#)). El perfil antigénico de las 25 proteínas mostró una amplia distribución de regiones de reconocimiento de las IgM a lo largo de la secuencia ([Figura 53, Anexo I](#)). En general, los tres grupos de infección analizados mostraron el mismo patrón de reconocimiento, pero con distinta intensidad. Las regiones con mayor reconocimiento coincidieron en los tres grupos, siendo superior la intensidad de señal de los individuos con MS, seguida de la MM y, por último, los individuos NI, salvo excepciones. Las regiones antigénicas con intensidad de señal similar entre infectados y no infectados fueron consideradas inmunodominantes, mientras que las que presentaban mayor intensidad de señal en infectados se consideraron de capacidad inmunogénica inmediata en respuesta a la infección y, posiblemente, más evanescentes.

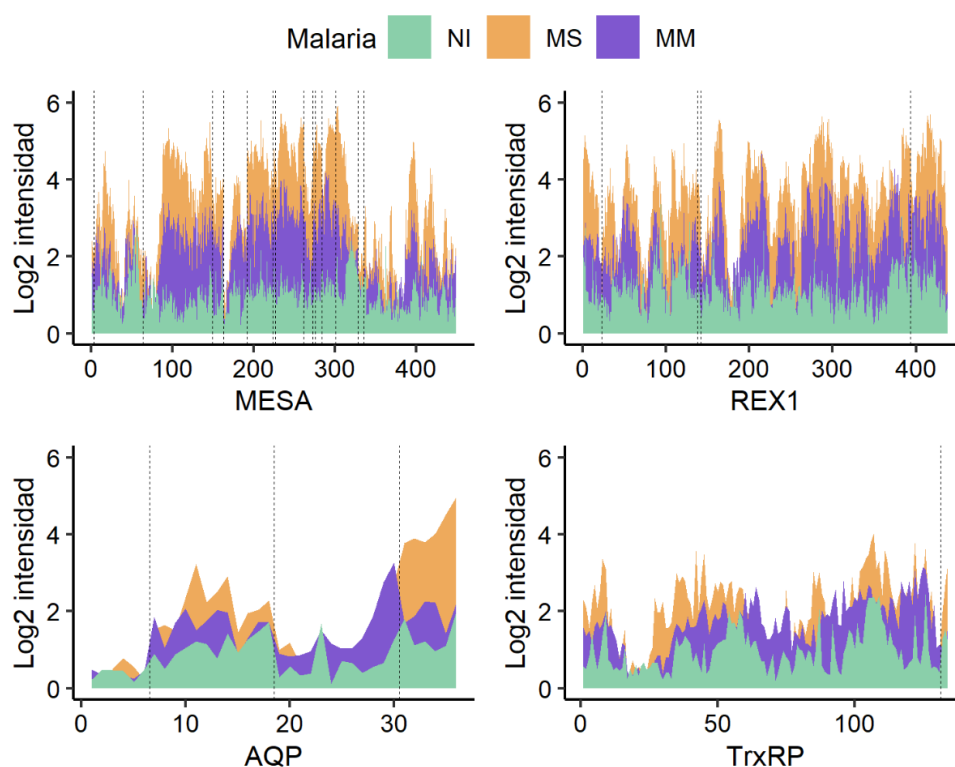


Figura 53 | Intensidad de señal de la IgM a lo largo de la secuencia de los antígenos más representativos. Se muestran los dos antígenos con mayor proporción de péptidos con diferencias significativas entre grupos de infección (MESA y REX1) y los dos antígenos con menor proporción de péptidos significativos (AQP y TrxRP). Las líneas verticales punteadas muestran los puntos donde hay un corte en la secuencia debido a la eliminación de regiones BC y hélices transmembrana. NI, no infectados; MS, malaria submicroscópica; MM, malaria microscópica.

Como ejemplo de la diversidad en el reconocimiento de los distintos antígenos, en la [Figura 53](#) se muestran los dos antígenos con mayor proporción de péptidos con diferencias

significativas en su reconocimiento por IgM entre grupos de infección (REX1 y MESA) y aquellos con menor proporción de péptidos diferenciales (AQP y TrxRP). Los antígenos REX1 y MESA alcanzaron intensidades de señal muy superiores en los individuos infectados con respecto a AQP y TrxRP, mientras que las intensidades de señal con plasma de no infectados fueron similares en los cuatro antígenos mostrados en la [Figura 53](#). Esto sugiere que los antígenos AQP y TrxRP presentan un reconocimiento bajo e inespecífico, mientras que los antígenos REX1 y MESA son reconocidos específicamente por parte de los individuos infectados en la mayoría de su secuencia analizada.

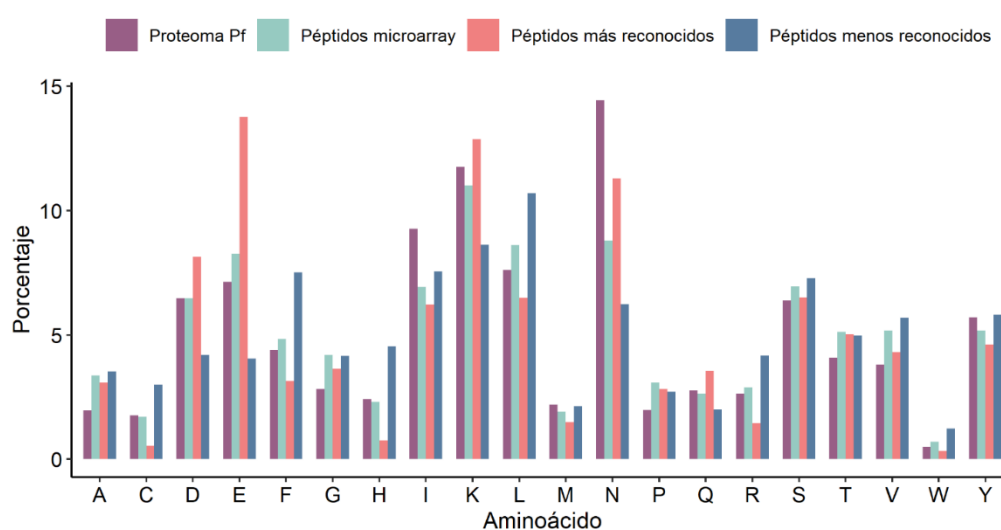


Figura 54 | Composición de aminoácidos de los péptidos con mayor y menor reconocimiento por IgM en el microarray en comparación con el proteoma de *P. falciparum* y el total de péptidos analizados. Se indica el porcentaje de aparición de cada aminoácido sobre el total de aminoácidos. Proteoma Pf, proteoma completo de referencia de *P. falciparum* en la base de datos UniProt (aislado 3D7, UP000001450). Péptidos microarray, total de péptidos incluidos en el microarray IgM (n = 13 099). Péptidos más reconocidos, 20% de los péptidos con mayor porcentaje de individuos que lo reconocen (n = 2619). Péptidos menos reconocidos, 20% de los péptidos con menor porcentaje de individuos que lo reconocen (n = 2619).

Para investigar si la composición de aminoácidos de los péptidos influía en su reconocimiento por parte de las IgM, se calculó el porcentaje de aparición de cada residuo en el 20% de los péptidos con mayor porcentaje de reconocimiento (proporción de los 37 individuos con señal positiva frente a ese péptido) y en el 20% de los péptidos menos reconocidos. Para poner en contexto estos datos, la composición de aminoácidos de estos dos grupos se comparó con la del total de péptidos analizados en el microarray y con la del proteoma completo de *P. falciparum*. Los aminoácidos que tuvieron mayor porcentaje de aparición en los péptidos más reconocidos con respecto a los menos reconocidos fueron el glutamato (E), la arginina (N), el

aspartato (D) y la lisina (K) ([Figura 54](#)). Para analizar la posible causa por la que estos aminoácidos estaban sobrerrepresentados en los péptidos con mayor reconocimiento, se analizó la correlación entre la intensidad de señal de los péptidos en infectados, no infectados y no expuestos, el porcentaje de individuos que lo reconocían (% de reconocimiento) y la repetitividad (número de aminoácidos repetidos en el péptido) de los 13 099 péptidos ([Figura 55](#)). Todos los parámetros medidos mostraron correlaciones directas y significativas, siendo especialmente fuerte la correlación entre la repetitividad de los péptidos y la intensidad de señal de los individuos infectados ($R = 0,87$). La correlación entre la repetitividad y la intensidad de señal de individuos no infectados y no expuestos disminuyó con respecto a la de los infectados alcanzando valores de $R = 0,52$ y $R = 0,33$ respectivamente.

Estas correlaciones sugieren que el reconocimiento de los péptidos por parte de las IgM no depende tanto de su contenido en aminoácidos sino de su repetitividad, siendo más reconocidos aquellos péptidos con una composición altamente repetitiva. De hecho, la repetitividad de los péptidos se correlacionó también con el porcentaje de individuos que lo reconocían (reconocimiento) ([Figura 55](#)). También se analizó la correlación entre la presencia de los distintos aminoácidos y estos parámetros y se pudo observar que los residuos codificados por codones con alto contenido en A+T se correlacionaban directamente con la repetitividad del péptido y con la intensidad de señal de los individuos infectados ([Figura 55](#)).

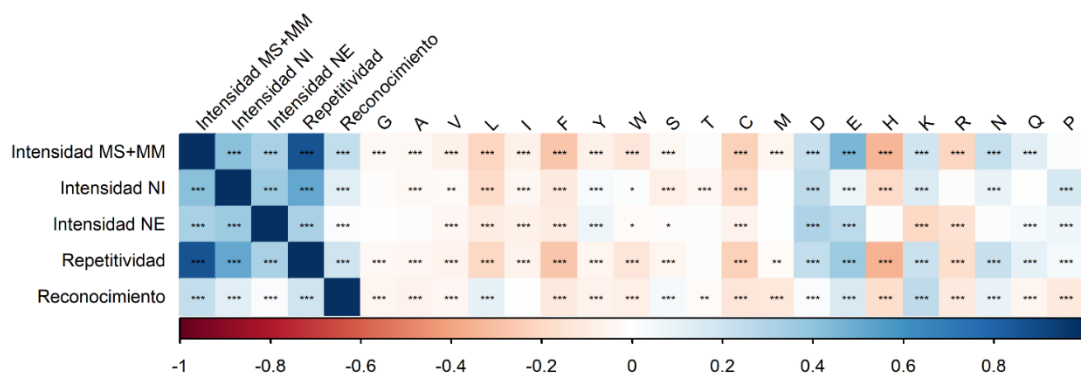
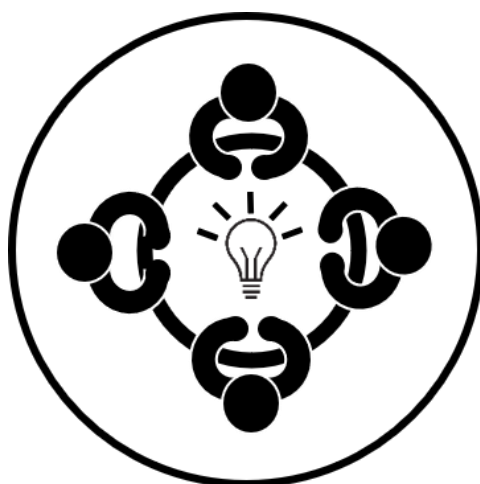


Figura 55 | Correlación entre la intensidad de señal, la repetitividad, el reconocimiento y la presencia de aminoácidos en el total de péptidos. El color indica el valor R de la correlación de Pearson entre las distintas variables de los 13 099 péptidos. En azul se muestran las correlaciones positivas y en rojo las negativas. Los asteriscos (*) indican el nivel de significación. *, p-valor $\leq 0,05$; **, p-valor $\leq 0,01$; ***, p-valor $\leq 0,001$. Intensidad, intensidad de señal media del grupo indicado medida en puntuaciones z. Repetitividad, número de aminoácidos que se repiten en un péptido. Reconocimiento, porcentaje de individuos de los 37 analizados que reconocen ese péptido según el criterio de positividad establecido. Los aminoácidos en código de una letra (de G a P) indican el número de veces que aparece cada residuo en cada péptido. NE, no expuestos; NI, no infectados; MS, malaria submicroscópica; MM, malaria microscópica.

6. DISCUSIÓN



6.1. DINÁMICA POBLACIONAL DE LA MALARIA Y LA RESPUESTA HUMORAL FRENTE A *P. falciparum*

La malaria es una enfermedad que, en las regiones endémicas, reviste especial gravedad en sectores vulnerables de la población como los niños menores de 5 años y las mujeres embarazadas¹. Por el contrario, los niños mayores y los adultos, a pesar de ser susceptibles a la infección, presentan una menor proporción de casos de malaria grave y muerte³⁰³. La malaria grave se considera aquella que amenaza la vida de los infectados y requiere de hospitalización debido a, principalmente, el desarrollo de una parasitemia elevada, causante de anemia grave, o de malaria cerebral, provocada por la retención de los parásitos en el cerebro¹. Las causas que subyacen esta distinta afectación de la infección según la edad o el estado de embarazo son principalmente inmunitarias⁵⁵. Por ello, el análisis de la respuesta humoral frente a la malaria en los distintos sectores poblacionales resulta esencial para comprender los mecanismos que llevan a la tolerancia a o a una mayor vulnerabilidad a la infección.

6.1.1. Estado de infección y respuesta humoral frente a *P. falciparum* en poblaciones endémicas de malaria

Nuestros resultados señalan, al igual que estudios previos^{145,304}, que con la edad se produce un aumento de la inmunidad frente a la malaria que conlleva una reducción de las formas graves de malaria en los adultos con respecto a los niños. A pesar de que las primeras infecciones en niños son decisivas en la adquisición de inmunidad frente al parásito y de que sucesivas exposiciones al parásito mejoran la respuesta protectora³⁰⁴, algunos estudios han demostrado que los individuos adultos tienen mayor nivel de protección frente a elevadas parasitemias gracias a una mayor producción de anticuerpos específicos independientemente de las exposiciones previas a la malaria^{290,291}. En nuestro análisis realizado en Ghana y RDC, se ha observado también que la prevalencia de malaria, sin tener en cuenta la gravedad o la carga parasitaria, es similar en los distintos grupos de edad. Estos resultados corroboran que la inmunidad en la edad adulta frente a la malaria producida tras la infección natural es parcial^{55,66,305} y proporciona un control sobre la parasitemia, más que una eliminación progresiva de los casos de malaria con la edad. A pesar de que nuestro hallazgo es coherente con los conocimientos acumulados sobre la inmunidad adquirida naturalmente contra la malaria³⁰⁶, aparentemente contradice algunos estudios que indican que se produce una disminución de la prevalencia de malaria en los adultos con respecto a los niños en Ghana y otros lugares^{307,308}. En

esos estudios, el diagnóstico de malaria se realizó mediante microscopía o TDR, cuya baja sensibilidad³⁰⁹⁻³¹³ no permite detectar las infecciones submicroscópicas y, por tanto, da lugar a una prevalencia de malaria menor basándose únicamente en los portadores de alta carga parasitaria. Este hecho es especialmente problemático en el caso de los adultos, en los que, según nuestro estudio en el que utilizamos un diagnóstico altamente sensible por PCR, predomina la malaria submicroscópica.

Por otra parte, las mujeres embarazadas son otro grupo de especial atención, ya que tienen mayor riesgo de sufrir malaria independientemente de la adquisición de inmunidad previa¹⁹⁹. Esta mayor susceptibilidad a la infección disminuye en embarazos posteriores³¹⁴, lo que sugiere que se adquiere una inmunidad específica frente a la malaria placentaria a lo largo de los sucesivos embarazos. Nuestros resultados son consistentes con esta mayor susceptibilidad observada previamente, ya que en ambas regiones se observó una mayor prevalencia de malaria en las mujeres gestantes que en las no gestantes.

Cabe destacar que la distribución poblacional de la infección por *P. falciparum* en las dos poblaciones estudiadas (Asikuma, Ghana y Mbuji-Mayi, RDC) fue distinta. En Asikuma se observó una clara disminución de las formas graves de malaria con altas parasitemias con la edad. Por el contrario, en RDC, a pesar de que también se observó este efecto, las diferencias entre grupos de edad fueron notablemente menores y los individuos adultos mostraron mayores tasas de malaria con alta carga parasitaria que en Asikuma. Estas diferencias sacan a relucir la necesidad de analizar la dinámica poblacional de la malaria en cada población de estudio, pues las distintas medidas de prevención, condiciones climáticas, higiénicas e incluso culturales de cada región dan lugar a un distinto comportamiento de la infección. En el caso concreto de Ghana y RDC, el impacto de la malaria en ambos países es radicalmente distinto. Mientras que Ghana es uno de los países que más han reducido su carga de malaria en los últimos años junto con Kenia y Malawi, RDC es el segundo país del mundo con mayor número de casos de malaria y fallecimientos¹ en coherencia con la mayor proporción de formas graves de la infección que vemos en nuestros resultados. A pesar de ello, demostramos que la prevalencia de malaria en ambas localizaciones es similar. En el caso de las mujeres gestantes, la distinta política en ambos países en cuanto a la prevención de la malaria durante el embarazo también puede observarse en nuestros resultados, si bien hay que tener en cuenta que el tamaño muestral de este grupo en RDC fue considerablemente menor que en Ghana. En RDC, la cobertura del IPTp en embarazadas es inferior a la proporcionada en Ghana^{315,316}, lo que podría explicar que ellas muestren un mayor número de casos de infección y de mayor gravedad que en Ghana.

Dadas estas grandes diferencias en la dinámica de la infección entre distintos grupos poblacionales y localizaciones, la vigilancia serológica constituye una herramienta esencial para rastrear la infección y conocer la inmunidad adquirida por los habitantes de regiones endémicas. Para estos estudios, la IgG se ha utilizado de forma clásica como el principal indicador, pues ha sido descrita como un buen marcador de exposición^{201,317}, está asociada a peores resultados clínicos¹⁸⁶ y presenta una correlación positiva con la parasitemia en niños procedentes de regiones endémicas³¹⁸. Sin embargo, otros marcadores serológicos como la IgM y la IgA parecen estar menos estudiados. Por ello, en este estudio se evaluó el papel de los isotipos de IgM e IgA como posibles biomarcadores serológicos complementarios a la IgG y su asociación con el estado de la infección de los individuos. La semiinmunidad parcialmente protectora frente a la malaria existente en edad adulta³⁰³ se refleja en nuestro estudio en dos parámetros relacionados y observados en los adultos, pero no en los niños: la disminución de las tasas de malaria microscópica y el aumento de las Ig específicas frente a *P. falciparum*. A pesar de que en estudios previos se ha demostrado este aumento de los niveles de anticuerpos frente a *P. falciparum* con la edad, estos se basaban principalmente en estudios con IgG^{318,319}. Sin embargo, hasta ahora no se había descrito la adquisición de una co-inmunidad humoral por parte de anticuerpos IgM, IgA e IgG específicos de *P. falciparum* contra el proteoma completo del estadio sanguíneo de *P. falciparum* en una población endémica.

Recientemente, los estudios inmunológicos sobre malaria están poniendo en el centro de atención a la IgM, una Ig que ha demostrado tener un patrón de comportamiento distinto en la malaria con respecto a otras infecciones. La visión general de la IgM es que se induce de forma temprana tras una infección y que su producción decae rápidamente y es reemplazada por la IgG. Sin embargo, en el caso de la malaria, los niveles de IgM específica de *P. falciparum* permanecen elevados a lo largo del tiempo, incluso en ausencia de reinfección¹⁸⁴. Nuestros resultados permiten corroborar esta hipótesis por el hecho de que se detectó IgM específica de *P. falciparum* en los individuos no infectados de todos los grupos de edad, siguiendo un comportamiento similar a la IgG, especialmente en los adultos. Además, estudios recientes han demostrado que, en niños, los linfocitos B de memoria específicos de *P. falciparum* productores de IgM son los que predominan y que solo con la edad se produce el cambio de isotipo a IgG¹⁸². Este hallazgo explicaría el hecho de que, únicamente en niños, el porcentaje de IgM específica de *P. falciparum* aumentó significativamente en los infectados, incluidos los portadores de malaria submicroscópica, respecto a los no infectados, mientras que no se observaron tales diferencias en los porcentajes de IgG. Cabe destacar, que la IgM específica de *P. falciparum* fue el único isotipo de Ig que aumentó tras la infección a alta parasitemia en las mujeres gestantes

y que este efecto no se observó en las mujeres no gestantes del mismo rango de edad. Esto podría indicar que la IgM actúa como marcador de exposición a la malaria en mujeres gestantes, al igual que han indicado estudios previos en los que se ha observado la misma asociación¹⁹⁹.

Aunque la IgA circulante apenas se ha investigado durante la infección por malaria, existen pruebas previas de que la IgA específica de la malaria se produce en respuesta a la infección por *P. falciparum*^{193,194} y a la vacuna RTS,S/AS01³²⁰. Algunas de las hipótesis establecen que posiblemente se induce por el contacto de las proteínas del parásito presentes en la saliva de los individuos infectados¹⁹⁶ con la mucosa oral o que los esporozoítos inducen la respuesta de IgA en el sitio de inoculación dérmica¹⁹⁵. El marcado aumento de los valores de IgA específica de *P. falciparum* con la edad observado en nuestro estudio sugiere que es probable que este isotipo de Ig sea inducido por la exposición repetida al parásito. Este aumento con la edad también se observó en los valores de IgA total, de modo que cuando se calculó el porcentaje de IgA anti-*P. falciparum* sobre la IgA total, los valores se mantuvieron relativamente estables entre los grupos de edad. El potencial de este isotipo para mostrar la exposición al parásito de la malaria incita a seguir investigando las posibles correlaciones entre los niveles de IgA no solo con los antígenos específicos de los estadios sanguíneos, sino también de los antígenos de gametocitos dada su presencia en la saliva de niños con malaria subclínica³²¹ y esporozoítos³²⁰ por su producción tras la vacunación con la proteína de circumsporozoíto.

En lo que respecta a nuestra evaluación de los distintos isotipos de Ig en la población hiperendémica de malaria estudiada, los cinco indicios siguientes sugieren que la IgM y la IgA específicas de la *P. falciparum* podrían ser biomarcadores sólidos y complementarios a la IgG para determinar la exposición individual a la malaria: i) paralelamente a la IgG, la IgM y la IgA específicas del *P. falciparum* aumentan a lo largo de los años y están fuertemente correlacionadas entre sí; ii) los niveles basales más bajos de IgM e IgA específicas de *P. falciparum* (así como de IgG) se observaron en los niños menores de 5 años, lo que refleja su débil protección inmunitaria; iii) los tres isotipos de Ig aumentaron significativamente a edades tempranas en respuesta a las infecciones; iv) en los adultos, los niveles de los tres isotipos de Ig específicas del *P. falciparum* fueron elevados permanentemente y no mostraron aumentos en el caso de una infección presente en el momento de la recogida de muestra, lo que sugiere que, una vez alcanzados los niveles máximos, es posible que no aumenten ni siquiera después de sucesivas exposiciones al parásito; y v) la IgM específica del *P. falciparum* tuvo la mayor correlación con la parasitemia en comparación con otros isotipos de anticuerpos, y su

concentración elevada estuvo altamente asociada a la malaria microscópica y la anemia grave en los niños.

Teniendo en cuenta todas estas observaciones, uno de los puntos más relevantes de nuestro estudio es la elevada prevalencia de infecciones submicroscópicas en áreas endémicas que consideramos que es consecuencia del mantenimiento de la inmunidad parcial adquirida en la edad adulta mediada no solo por IgG, sino también por la IgM y la IgA específicas de *P. falciparum*. Estudios anteriores también han informado de una mayor prevalencia de malaria submicroscópica en adultos que en niños^{64,322}. La malaria submicroscópica no debe considerarse solo un estímulo antigénico continuo para un conjunto de Ig, sino también el principal reservorio infeccioso de la malaria²⁹². Por ello, nuestros resultados, junto con otros estudios similares⁶⁵, subrayan la necesidad de vigilar y diagnosticar adecuadamente las infecciones submicroscópicas, ya que suelen ser asintomáticas^{292,323} y constituyen la infección por *Plasmodium* más común en zonas endémicas³²⁴. Evidentemente, esta característica idiosincrásica de ser a la vez estímulo antigénico y reservorio del parásito plantea la cuestión pertinente de que la eliminación de la malaria submicroscópica en una población no solo disminuiría significativamente la carga global de malaria en esa población, lo cual es muy deseable, sino que también podría disminuir la protección inmunitaria adquirida en caso de que la infección regrese, lo cual podría acabar provocando una enfermedad más grave.

Por último, nos gustaría abordar las limitaciones que consideramos que tiene nuestro estudio. Todos los individuos analizados, incluidos los niños más pequeños, pueden haber estado expuestos a infecciones previas de malaria, por lo que no es posible establecer un nivel de referencia de la respuesta humoral antes de la infección. Los controles ELISA negativos fueron individuos españoles nunca expuestos a la malaria, pero esto no es necesariamente comparable al estado de una región hiperendémica. En segundo lugar, los casos de infección submicroscópica, aunque son estadísticamente consistentes, podrían incluir algún caso aislado de inicio de la infección con baja densidad de parásitos, pero que posteriormente alcance una densidad microscópica, aunque resulta improbable dado que la malaria submicroscópica está claramente asociada al desarrollo de inmunidad frente al parásito³²². Por último, este estudio tiene un número limitado de muestras que, si bien ofrece en una potencia estadística suficiente, sugiere que el estudio podría ampliarse a poblaciones hiperendémicas más grandes y en diferentes localizaciones. Esto proporcionaría un cribado de la población más general y una mayor potencia estadística para identificar otros marcadores de protección.

6.1.2. Afectación de los parámetros hematológicos tras la infección por *P. falciparum* y su asociación con los niveles de inmunoglobulinas

Como es bien sabido, la malaria causa alteraciones en variables hematológicas como la Hb, las plaquetas o los monocitos^{44,49}. La anemia grave constituye una de las principales complicaciones de la malaria, especialmente en niños³²⁵, y está causada por la destrucción directa de los eritrocitos por el parásito, la eliminación temprana de los eritrocitos no parasitados y la inhibición de la eritropoyesis⁴⁵. Además, la anemia causada por la infección por *Plasmodium* parece persistir en el tiempo tras la curación y eliminación de la parasitemia en niños³²⁶, subrayando la importancia del seguimiento de la clínica de los pacientes incluso después de la eliminación de la parasitemia. Por otro lado, las plaquetas también juegan un papel importante en la malaria^{46,47} y la trombocitopenia se correlaciona con la parasitemia, la gravedad de la infección y la clínica⁴⁸. Además, numerosos estudios han reportado alteraciones en los monocitos^{49,50} y los leucocitos^{51,52} durante la infección por *P. falciparum*.

Las pruebas hematológicas realizadas de forma rutinaria en los hospitales de las regiones donde la malaria es endémica nos permiten evaluar el riesgo clínico de la infección por *P. falciparum* y orientar en el tratamiento. Por ello, en nuestro estudio recopilamos los datos hematológicos de un grupo de individuos residentes en Ghana y los evaluamos por grupos de edad e infección y exploramos sus posibles asociaciones con los cambios en los niveles de Ig. Los resultados de nuestro estudio nos permiten destacar tres asociaciones con potencial valor pronóstico: i) Los niveles de Hb no solo fueron significativamente más bajos en los pacientes infectados por malaria, sino que también se correlacionaron negativamente con la densidad del parásito. Dado que la IgM e IgG específicas del *P. falciparum* mostraron una fuerte correlación indirecta con la concentración de Hb, estos isotipos de Ig podrían utilizarse como indicadores de la anemia asociada a la malaria que es considerada una de las principales causas de muerte durante la infección^{327,328}. ii) Los recuentos de plaquetas circulantes se asociaron directamente con los niveles de Hb y, por tanto, disminuyeron conjuntamente en los pacientes infectados. Esto puede estar relacionado con el papel de las plaquetas en la eliminación del parásito directamente a través de los complejos plaqueta-eritrocito infectado, que implica a un alto porcentaje del total de plaquetas y, en consecuencia, sería un factor causante de la trombocitopenia⁴⁸. iii) Los niños con malaria submicroscópica mostraron un mayor porcentaje de monocitos en comparación con los infectados a nivel microscópico. Esto concuerda con la capacidad manifiesta de los monocitos de disminuir la carga parasitaria a través de la fagocitosis⁵³ y la asociación entre bajos recuentos de monocitos y una mayor mortalidad en niños junto con la disminución en las poblaciones de monocitos observadas en niños con

hiperparasitemia⁵⁴. Además, los niveles de IgM específica de *P. falciparum*, y en menor medida de IgG, mostraron una relación inversa con el porcentaje de monocitos, lo que indicaría, junto con su relación con la anemia (véase más arriba), que podría ser un marcador de la gravedad de la malaria.

6.1.3. Comparación de métodos de diagnóstico de malaria

Los resultados obtenidos en la comparación de los métodos de diagnóstico por TDR y PCR ponen de manifiesto la necesidad de explorar nuevos sistemas asequibles y eficaces capaces de detectar a los portadores de malaria submicroscópica. Como ya se ha observado previamente³⁰⁹⁻³¹³, los dos métodos de diagnóstico mostraron una marcada diferencia en cuanto a su sensibilidad y especificidad. Llama especialmente la atención que, a pesar de que todos los pacientes que acuden al hospital *Our Lady of Grace* de Ghana son diagnosticados de malaria mediante TDR, más del 85% de los infectados por *Plasmodium* reciben un diagnóstico negativo y, por tanto, no reciben el tratamiento adecuado. El principal punto débil de los TDR es que no detectan las infecciones submicroscópicas, la mayoría de las infecciones causadas por *P. falciparum*, como se ha demostrado en este trabajo de tesis y en otros estudios realizados en zonas endémicas^{64,66,329}. Estos resultados, junto con la falta de marcadores serológicos que diferencien a los individuos con malaria submicroscópica de los no infectados, conllevan que la detección de los portadores de *P. falciparum* sea especialmente difícil en las zonas de bajos recursos en los que la implantación de un sistema de PCR para diagnóstico es inviable, lo que contribuye a la propagación de la infección.

6.2. TOLERANCIA GENÉTICA A LA MALARIA

La malaria lleva siglos moldeando el genoma humano y es considerada la fuente de presión selectiva más fuerte de la historia reciente⁸¹. Durante las últimas décadas, numerosos estudios han descubierto diversos polimorfismos en genes con función eritrocítica esencial que confieren tolerancia innata a la malaria evitando, aparentemente, la letalidad antes de la edad reproductiva y que, por ello, han sido seleccionados positivamente en poblaciones donde la malaria es endémica^{81,330}. Para analizar la prevalencia y la eventual relación de estas variantes polimórficas con la gravedad de la infección por *P. falciparum*, en esta tesis doctoral se han analizado ocho polimorfismos cuyas variantes minoritarias habían sido previamente descritas

como potencialmente protectoras frente a la infección por *P. falciparum*. Así pues, se seleccionaron variantes polimórficas relevantes cuya tolerancia frente a la malaria se conoce desde hace décadas como son la G6PD A-³³¹ o las Hb S³³² y C¹¹⁰. Además, en este estudio realizado en dos regiones hiperendémicas de malaria, se incluyeron variantes del gen PIEZO1, ya que el polimorfismo E756del se ha asociado recientemente con la tolerancia frente a la malaria grave¹²⁶, y también las variantes E277K y L241V del gen PKLR cuya asociación con la malaria aún no está clara a pesar de ser frecuentes en poblaciones africanas^{141,333}.

Este estudio se ha llevado a cabo con muestras de habitantes de las poblaciones de Asikuma (Ghana) y Mbuji-Mayi (RDC), posiblemente dos de las regiones del mundo con mayor transmisión de malaria. La elevada presión selectiva de *P. falciparum* a la que han estado sometidas estas dos poblaciones podría explicar la elevada frecuencia hallada de algunas de las variantes polimórficas mencionadas, donde un 69% de los participantes es portador de alguna variante e incluso un 27% porta dos o más de ellas. Individualmente, todas las variantes detectadas mostraron una prevalencia muy superior en las poblaciones de estudio que en regiones libres de malaria, lo que apuntaría a que han sido seleccionadas positivamente en estos lugares, como también se ha demostrado previamente en diversas localidades donde la enfermedad es endémica^{81,84,330}.

De las variantes analizadas, E756del del gen PIEZO1 fue la más prevalente, con un 19% de frecuencia alélica, muy similar a las observadas de 18% y 20% en estudios previos en regiones endémicas de malaria^{126,127,334}. En 2018 Ma *et al.*¹²⁶ demostraron, por primera vez, que esta variante aminora el crecimiento de *P. berghei*, la malaria cerebral y la mortalidad asociada en un modelo de malaria en ratón. Además, recientemente, en niños gaboneses se ha demostrado su efecto protector frente a la malaria grave¹²⁷. Nuestros resultados confirman que el polimorfismo E756del proporciona protección frente a parasitemia elevada, ya que los portadores de esta variante en heterocigosis tienen menor probabilidad de padecer malaria microscópica en comparación con los que no la portan. Dado que la prevalencia de malaria total en los portadores de esta variante no es diferente de los que no la portan, el efecto de protección parece incidir en el control de la parasitemia, que se relaciona con la gravedad de la infección y, por tanto, la frecuencia de infección inoculada por el mosquito es independiente de la protección conferida por este polimorfismo una vez instaurada. El mecanismo de esta tolerancia aún se desconoce en detalle, aunque se ha apuntado a la deshidratación del eritrocito^{126,135}, a una menor exportación de factores de virulencia¹²⁷ y/o a una posible sobrecarga de hierro¹³⁶ de los individuos portadores de E756del. Resultaría de particular relevancia una investigación enfocada a determinar el mecanismo por el cual este polimorfismo

reduce la gravedad de la infección por *P. falciparum*, pues contribuiría a la búsqueda de elementos terapéuticos para combatir la malaria.

Nuestros hallazgos también indican, por primera vez, que la variante E750Q de PIEZO1, situada en la región proximal de E756del, podría estar en desequilibrio de ligamiento con esta variante. Todos los individuos portadores de E750Q en su genoma portaban de forma simultánea E756del y, una elevada proporción de ellos, el 62,5%, lo hacían en homocigosis. La única evidencia previa hallada sobre este posible ligamiento entre las dos variantes fue un estudio reciente que determinó una fuerte correlación entre ambas variantes¹²⁷. Dada la escasez de información al respecto, resultaría de interés investigar si esta aparente asociación entre E756del y E750Q tiene alguna relación con la protección observada frente a la malaria, ya que, en nuestro estudio, la escasez de participantes portadores de ambas variantes no permitió asociar este genotipo con la gravedad de la infección por *P. falciparum*.

Otros polimorfismos bien caracterizados a lo largo de los últimos años en cuanto su tolerancia frente a la malaria han sido las hemoglobinopatías S y C¹⁰⁵ y el déficit de G6PD¹¹⁵. Numerosas evidencias indican que el rasgo falciforme, o Hb AS, facilita la eliminación de eritrocitos infectados⁹⁶⁻⁹⁸, reduce la citoadherencia malárica y la formación de rosetas⁹⁹ al tiempo que inhibe el crecimiento de *Plasmodium*¹⁰⁰. Los eritrocitos portadores de Hb C (AC o CC) también reducen su capacidad de citoadherencia y de formación de rosetas debido a una disposición anormal de la proteína del parásito PfEMP1 encargada de la remodelación de la membrana del hospedador y de su secuestro en la microvasculatura¹¹³. En cuanto a la variante G6PD A-, causante de déficit de G6PD en África^{115,116,335}, se ha demostrado que aumenta el estrés oxidativo de los eritrocitos, lo que desencadena una mayor fagocitosis de los eritrocitos parasitados^{124,125}. Los resultados obtenidos en esta tesis muestran una elevada frecuencia de estas tres variantes en regiones endémicas de malaria, con un 11%, 3% y 17% de frecuencia alélica de HbS, HbC y G6PD A- respectivamente. En línea con la protección observada en estudios previos^{93,95,119,336}, nuestro estudio muestra que los portadores de HbS y G6PD A- tienen una menor probabilidad de padecer malaria a elevadas parasitemias, lo que confirmaría la protección ofrecida por estas variantes frente a la infección grave. Aunque en nuestro estudio no se ha podido demostrar este efecto protector en los individuos con Hb AC, como sí se ha observado en numerosos estudios previos^{110,337}, se puede considerar que, al haber solamente 18 individuos infectados con este genotipo, podría estar seriamente limitada la potencia estadística del estudio. Aun así, la prevalencia de malaria microscópica entre los infectados con Hb AC fue inferior a la de los que no portaban ninguna variante tolerante.

En cuanto a los polimorfismos localizados en el gen PKLR, la única evidencia que podemos mostrar es que presentan una prevalencia superior en las dos poblaciones africanas estudiadas que la descrita en regiones no endémicas de malaria^{141,338}. Por otra parte, debido al escaso tamaño muestral de individuos infectados por *P. falciparum* con estos genotipos de PKLR, no se pudo determinar si ejercen tolerancia o protección frente a la malaria grave.

Dada la especial condición biológica de las mujeres gestantes y su mayor susceptibilidad a la malaria⁶¹, este grupo se analizó de forma independiente. Uno de los resultados más singulares fue que los niveles de parasitemia de las mujeres gestantes portadoras de HbS o HbC fueron superiores a los de las gestantes sin ninguna variante protectora. Este resultado sugiere que estas variantes no solo no ejercen un efecto tolerante o protector frente a la malaria en mujeres gestantes, sino que potencian el nivel de parasitemia adquirido. A pesar de que la relación entre la presencia de hemoglobinopatías y la gravedad de la malaria en mujeres embarazadas ha sido escasamente estudiada, algunas investigaciones han mostrado resultados similares a los nuestros³³⁹⁻³⁴¹. Estudios previos han determinado que las mujeres gestantes con Hb AS tienen una prevalencia superior de malaria en sangre periférica que aquellas que tienen Hb AA³³⁹ y que el rasgo falciforme no protege frente a la malaria placentaria^{339,340}. La principal hipótesis es una disminución de la unión de los anticuerpos a la superficie de los eritrocitos infectados en las mujeres gestantes con HbAS en comparación con las gestantes con HbAA, probablemente debido a una menor expresión de la variante específica del embarazo VAR2CSA, de la familia de la proteína de membrana eritrocitaria de *P. falciparum* (PfEMP1), en la superficie en los eritrocitos HbAS parasitados³⁴¹. Estos hallazgos recientes señalan la necesidad de profundizar en los mecanismos de evasión inmunitaria del parásito y de tolerancia genética propios de las mujeres gestantes mediante estudios que aúnen análisis de la respuesta humoral, caracterización de polimorfismos genéticos y fenotipificación de la infección por malaria. También es importante reseñar que nuestro estudio no determinó malaria placentaria, cuya prevalencia suele ser superior a la malaria sanguínea en mujeres embarazadas^{339,342}, por lo que con los datos disponibles no podemos concluir que la potenciación de la parasitemia observada en las mujeres gestantes con rasgo falciforme esté directamente asociada con malaria placentaria.

A pesar de la elevada prevalencia de estas variantes polimórficas en regiones africanas, pocos estudios han abordado la compleja cuestión del fenotipo manifestado cuando dos o más de ellas se heredan conjuntamente en un mismo individuo. El efecto sinérgico de distintos polimorfismos ha sido demostrado en otras enfermedades^{343,344} o en el caso de la variante A- de la G6PD, que requiere de dos mutaciones simultáneas y sinérgicas para generar el fenotipo

deficiente¹²³. Sin embargo, hasta el momento ningún estudio había podido demostrar el efecto aditivo de polimorfismos localizados en distintos genes^{127,345,346} que proporcionan tolerancia a la malaria grave. Nuestro estudio, en el que se han analizado ocho variantes polimórficas de forma simultánea, ha revelado que la adición de variantes que confieren tolerancia a la malaria en un mismo individuo puede tener un efecto potenciador o sinérgico. Nuestros datos indican que los infectados con malaria submicroscópica acumulan en su genoma un mayor número de variantes conocidas como protectoras o tolerantes a la malaria, en comparación con los que padecen malaria a elevadas parasitemias. Observamos, además, que la prevalencia de malaria con alta carga parasitaria es menor en los individuos que portan dos o más variantes en comparación con los que portan solo una. Estos resultados, junto con la correlación inversa observada entre el número de variantes que porta un individuo y la parasitemia alcanzada, nos llevan a concluir, por primera vez, que la adición genética de variantes que confieren tolerancia a la malaria en el genoma de un mismo individuo ejerce un efecto potenciador o sinérgico en cuanto a su efecto protector.

Estos datos ponen de manifiesto la relevancia de analizar conjuntamente los polimorfismos asociados a la tolerancia a la malaria que coexisten en una misma población, ya que una elevada proporción de individuos de poblaciones endémicas portan dos o más variantes polimórficas. Además, si se analizan estos polimorfismos de forma independiente, podemos incurrir en el error de considerar individuos normales o no mutados a aquellos que portan otras variantes, lo que podría enmascarar un resultado significativo en cuanto a la tolerancia a la malaria ejercida por esa variante polimórfica. Este efecto desapercibido de la adición mutacional protectora puede dar resultados inesperados o inadvertidos como los observados en algunas publicaciones donde, no se aprecia asociación entre la protección a la malaria (grave o no complicada) con una determinada variante o bien con la herencia de tal variante en homo-, hetero- o hemicigosis; como podría ser el caso de estudios de protección a la malaria por G6PD^{119,347}.

En resumen, nuestros resultados indican que las variantes polimórficas E756del del gen PIEZO1, el rasgo falciforme o Hb AS y la variante A- de la G6PD generan protección frente la malaria con alta parasitemia. Esta protección se manifiesta como tolerancia que ejerce su efecto reduciendo los niveles de parasitemia sin llegar a proporcionar una protección esterilizante que impida la infección. Nuestros resultados también demuestran que es frecuente la adición de más de una de estas variantes en un mismo individuo en zonas endémicas de malaria y que los portadores de dos o más de ellas desarrollan malaria con menor nivel de parasitemia que los que tienen una o ninguna variante. Además, nuestros hallazgos indican un posible desequilibrio

de ligamiento entre las variantes E750Q y E756del del gen PIEZO1 e inciden en la necesidad de estudiar en profundidad el comportamiento de estas variantes simultáneamente.

6.3. DESCUBRIMIENTO DE PROTEÍNAS ANTIGÉNICAS RECONOCIDAS POR IgM Y SUS EPÍTOPOS

El estudio del repertorio antigénico o inmunoproteoma de *P. falciparum* se ha convertido en un importante objetivo científico en los últimos años. El análisis de estas interacciones entre el sistema inmunitario del hospedador y el patógeno conduce al descubrimiento de nuevos antígenos y, por tanto, a la identificación de posibles candidatos para el diagnóstico serológico temprano y el diseño de vacunas^{259,348}. Hasta la fecha, todos los estudios de identificación de antígenos de *P. falciparum* se han centrado en las proteínas antigénicas reconocidas por la IgG^{299,349,350}. Sin embargo, aunque numerosos estudios han puesto de manifiesto la necesidad de explorar en profundidad el papel de la IgM en la inmunidad humana frente a la malaria^{181,351,352}, hasta el momento no se ha descrito ningún método para identificar antígenos IgM a gran escala mediante proteómica y, por tanto, no se conoce gran parte del repertorio antigénico de la IgM en la malaria. Para llenar este vacío de información, en este estudio desarrollamos un nuevo método de IP que nos permitió aislar e identificar los antígenos reconocidos por la IgM serológica de individuos habitantes de una región hiperendémica de malaria en Ghana con el fin de analizar las diferencias en el reconocimiento antigénico de distintos grupos poblacionales según su edad, estado de embarazo e infección por malaria. Además, hemos identificado los epítomos inmunorreactivos de la IgM de 25 antígenos altamente reconocidos mediante la realización de un microarray de péptidos de alta densidad, lo que nos ha permitido detectar las regiones más inmunogénicas de estos antígenos, así como identificar los péptidos cuya IgM específica es potencialmente protectora o puede tener utilidad para realizar diagnóstico serológico.

6.3.1. Nuevo método de inmunoprecipitación para el aislamiento de antígenos reconocidos por IgM

Las complejas propiedades físico-químicas de la IgM, en particular su gran tamaño debido a su estructura pentamérica de 900 KDa^{353,354} y su naturaleza lábil, dificultan en gran medida su aislamiento³⁵³. La escasez de métodos disponibles para el aislamiento de antígenos IgM parece ser debida a estas dificultades observadas a la hora de purificar la IgM, paso indispensable para

el posterior aislamiento de sus antígenos. En este trabajo de tesis se desarrolló una estrategia innovadora de IP para identificar y cuantificar los antígenos reconocidos por las IgM serológicas, sorteando estas dificultades inherentes al manejo de la IgM. Múltiples estudios previos de nuestro grupo³⁵⁰ y otros³⁵⁵⁻³⁵⁸ han demostrado que otras técnicas consolidadas, como el análisis del proteoma serológico (SERPA) que se basa en electroforesis bidimensional seguida de inmunotransferencia y espectrometría de masas, permiten la identificación de proteínas antigénicas, aunque únicamente analizan proteínas a nivel individual sin cuantificarlas³⁵⁹. Sin embargo, gracias al avance de las técnicas ómicas, hemos podido desarrollar este nuevo método de identificación antigénica a gran escala que ha demostrado tener claras ventajas, ya que permite identificar un número mucho mayor de antígenos de forma más rápida y sencilla y cuantificar la abundancia de su reconocimiento.

El éxito de nuestro sistema radica en cuatro puntos esenciales: el uso de microesferas magnéticas como soporte de la IP, el aprovechamiento del sistema biotina-estreptavidina para retener los anticuerpos de captura, la optimización del método de elución y el uso de DSS como la fuente de IgM. El empleo de microesferas magnéticas como soporte sólido ya ha demostrado ser efectivo³⁶⁰ y tiene claras ventajas con respecto a otros como la agarosa por generar menos uniones inespecíficas y dar lugar a una mejor orientación de los anticuerpos acoplados³⁶¹. Dado que la unión biotina-estreptavidina tiene una afinidad extremadamente alta y que es muy resistente a la elución ácida²⁹⁶, la utilización de este sistema para la unión del anticuerpo anti-IgM a las microesferas nos ha permitido anclar este anticuerpo al sistema de IP, evitando que se eluya en el paso final. Esto, junto con la selección de un método de elución suave a pH ácido, ha permitido minimizar la concentración de anticuerpos en el eluido^{296,361} dando lugar a una mayor sensibilidad en la identificación de proteínas mediante espectrometría de masas²⁹⁵. Además, este método ha demostrado que se pueden identificar antígenos reconocidos por IgM a partir de cantidades mínimas de suero almacenado como DSS, un método de conservación a largo plazo de las proteínas a temperatura ambiente²⁶⁶. Gracias a esta sencilla técnica, podemos reducir los costes y facilitar en gran medida el envío y el almacenamiento de las muestras.

Por último, cabe destacar que, a pesar de que para el desarrollo de este nuevo método se utilizó un modelo de malaria, su uso podría extrapolarse al análisis de antígenos IgM humanos o de otros patógenos. Esto ampliaría el conocimiento actual sobre inmunoproteómica de IgM y permitiría tener en cuenta no solo la respuesta IgG, sino también la respuesta IgM a la hora de diseñar nuevas vacunas o métodos de diagnóstico serológico.

6.3.2. Proteínas antigénicas de *P. falciparum* reconocidas por IgM

El análisis del inmunoproteoma de *P. falciparum* se ha convertido en un desafío en los últimos años. La elevada complejidad de la especie *Plasmodium*, que expresa más de 5000 proteínas, ha puesto en jaque los avances en la identificación de las respuestas inmunoprotectoras. Además, la adquisición de anticuerpos efectivos suele resultar ineficiente debido a que las proteínas antigénicas de *Plasmodium* son excepcionalmente diversas y presentan muchas variantes clonales³⁰⁴. Como se ha comentado con anterioridad, todos los estudios de inmunoproteómica de *Plasmodium* a gran escala se han limitado a identificar las respuestas IgG y, únicamente, se ha analizado la respuesta IgM de antígenos que habían sido identificados por su reconocimiento por parte de las IgG^{186,188,194}. Así pues, en el presente estudio se realizó un cribado inmunómico de la IgM de 54 individuos procedentes de una región hiperendémica de malaria frente al proteoma completo de *P. falciparum*, lo que ha contribuido a desentrañar algunas incógnitas sobre la respuesta IgM frente a *P. falciparum*.

Dado que la tasa de producción de anticuerpos contra antígenos de *P. falciparum* está influida por varios factores como la edad del hospedador, en nuestro estudio se analizó el reconocimiento antigénico de la IgM por grupos de edad¹⁶⁶. Se pudo observar que, en ausencia de infección, las IgM de los niños menores de 5 y los mayores de 50 años reconocen un repertorio menos diverso de antígenos que los adultos jóvenes y las mujeres embarazadas. Sin embargo, al infectarse, especialmente a elevadas parasitemias, la amplitud del repertorio antigénico reconocido es similar entre grupos de edad y embarazo. Estudios previos han establecido que en niños las respuestas humores frente a *P. falciparum* son de corta duración y que sus niveles de IgG específica decaen rápidamente tras la infección³⁰⁴. En línea con estos resultados, nuestras observaciones indican que este proceso podría ser similar con la IgM, dado que se observó que en individuos no infectados el número de antígenos IgM reconocidos por los niños fue inferior al de los adultos jóvenes. Esto podría ser debido a que, como han demostrado estudios previos con IgG¹⁶⁵, tras la infección por malaria los niños generan células plasmáticas de corta duración en contraposición a los adultos que serían capaces de generar células plasmáticas de larga duración productoras de IgM.

Nuestros resultados también han puesto de manifiesto que existe una fuerte correlación inversa entre el número de antígenos reconocidos por la IgM serológica y la cantidad máxima que pueden detectar del antígeno más abundante de todos (abundancia máxima). Esto podría sugerir, tal como describieron Proietti *et al.* en un estudio en el que se analizó la respuesta IgG frente a antígenos de *P. falciparum*²⁹⁹, que la elevada respuesta de anticuerpos frente a un determinado set de antígenos muy inmunogénicos suprime la respuesta frente a otros antígenos

menos reactivos. De hecho, nuestros datos muestran una disminución en la intensidad de reconocimiento de algunos de los antígenos tras la infección en todos los grupos de edad. Este proceso conllevaría la existencia de dos clases de respuestas IgM en una población: individuos que reconocen gran cantidad de antígenos, pero con poca abundancia, y aquellos que reconocen pocos antígenos con gran intensidad. Se considera relevante esta observación a la hora del diseño de vacunas, ya que los antígenos seleccionados para el desarrollo de vacunas podrían suprimir la respuesta de otros también efectivos. Otra de las posibles hipótesis planteadas es que este proceso se trate de una especialización de la respuesta inmunitaria en la que, con las sucesivas exposiciones al parásito, la respuesta se especialice en un determinado set de antígenos en detrimento de otros menos efectivos, como se ha descrito para IgG²⁹⁹. También se pudo observar que, en el caso de los adultos, al alcanzar infecciones con elevada parasitemia aumentó la abundancia máxima de los antígenos reconocidos con respecto a los adultos no infectados, a pesar de que la abundancia media no varió. Esto indicaría que, tras la infección, se produce una potenciación en la producción de un determinado set de anticuerpos en lugar del repertorio completo.

Uno de los hallazgos relevantes de nuestro estudio es el aumento en la amplitud del repertorio antigénico reconocido por las mujeres gestantes en comparación con el resto de grupos poblacionales. La malaria placentaria o gestacional se caracteriza por la acumulación de parásitos en la placenta de las mujeres embarazadas. Este tipo de infección constituye un elevado riesgo tanto para la madre como para el feto y da lugar a anemia maternal, peso bajo al nacer y restricción del crecimiento fetal^{362,363}, incluso cuando padecen malaria submicroscópica³⁶⁴. El sulfato de condroitina A actúa como principal receptor de la adhesión de los eritrocitos infectados a la placenta³⁶⁵ y se ha demostrado que los antígenos de *Plasmodium* que sirven de ligando para la adhesión de los eritrocitos infectados al sulfato de condroitina A son diferentes a los expresados en la superficie de los eritrocitos infectados en la malaria no placentaria⁶². Este hecho explicaría el elevado número de antígenos reconocidos por las IgM de las mujeres gestantes en nuestro estudio, ya que habrían acumulado linfocitos B de memoria y células plasmáticas productoras de IgM específica frente a la infección de la fase sanguínea y la placentaria aumentando así el repertorio antigénico. Además, las mujeres gestantes fueron las únicas que aumentaron ambas abundancias, media y máxima, de los antígenos de *Plasmodium* unidos a las IgM al padecer malaria a elevada parasitemia con respecto a las gestantes no infectadas, lo que parece indicar que se produce una activación de la respuesta IgM tras la infección, y que esto solo ocurre cuando se alcanzan valores de parasitemia elevados.

La fase parasitaria invasora del eritrocito constituye una de las principales dianas de la respuesta humoral protectora mediada por IgG³⁶⁶⁻³⁶⁸. En nuestro estudio, se ha podido confirmar que las proteínas implicadas en la invasión del eritrocito por parte de los merozoítos también son los principales antígenos contra los que se dirige la respuesta IgM. Entre los antígenos IgM identificados, se detectó un fuerte enriquecimiento de proteínas localizadas en la parte apical del merozoíto, entre las que se encuentran proteínas como las roptrias o las pertenecientes al micronema, orgánulos esenciales en la invasión de *Plasmodium*^{234,369,370}. Relacionado íntimamente con esto, en nuestro análisis del reconocimiento antigénico según el estadio de expresión, se observó que los antígenos expresados en el estadio de esquizonte presentan un reconocimiento significativamente superior por parte de las IgM que los que no se expresan en esta fase. Los esquizontes constituyen el estadio más maduro de la fase eritrocítica de *Plasmodium* y contienen en su interior los merozoítos³⁰⁶ que, al liberarse al torrente sanguíneo, entran en contacto estrecho con el sistema inmunitario del hospedador facilitando el reconocimiento de sus proteínas. También se pudo observar un fuerte enriquecimiento de proteínas pertenecientes a la vacuola parasitófora, los lisosomas o las vesículas de transporte, proteínas implicadas directamente en la interacción parásito-hospedador, la adquisición de nutrientes, la exportación de factores de virulencia y la modulación de la respuesta inmunitaria del hospedador^{300,371} y, por tanto, esenciales en el desarrollo de la patogenia por parte del parásito. Estos resultados indican que las IgM predominantes en el suero de habitantes de regiones endémicas de malaria no han sido producidas al azar, sino que han sufrido un proceso de selección y especialización de la respuesta frente a las fases más virulentas del parásito, lo que podría indicar que son protectoras, dado que se unen a los principales antígenos implicados en la patogenia de la malaria.

Las regiones BC son inusualmente abundantes en el proteoma de *Plasmodium* y su presencia aún despierta numerosas incógnitas acerca de su función biológica y el proceso evolutivo que ha llevado a su aparición. La presencia de estas regiones está íntimamente correlacionada con el alto contenido de A+T en el genoma de *P. falciparum*³⁷², que alcanza el 81% del genoma completo y que da lugar a una mayor aparición de aminoácidos codificados por estos nucleótidos en las regiones altamente repetitivas como la asparagina, la lisina, el glutamato y el aspartato³⁷³. Sin embargo, algunos aminoácidos se encuentran sobrerrepresentados con respecto a lo que cabría esperar por la composición de los codones que codifican para ellos. Este es el caso de la asparagina, cuyo predominio sobre la lisina sugiere que se ha producido una selección fenotípica de algunos de estos aminoácidos en lugar de una deriva neutra³⁷⁴. Además, las proteínas antigénicas de *P. falciparum* reconocidas por IgG tienen

una distinta composición de estas regiones, ya que están sometidas a una fuerte presión selectiva por parte del sistema inmunitario del hospedador, en comparación con otras proteínas no antigénicas³⁷⁵.

Dada esta especial vinculación de las regiones BC con las proteínas de *Plasmodium*, en este estudio se procedió a analizar si su presencia en los antígenos IgM identificados influía en su reconocimiento por parte de los individuos de la población analizada. A pesar de que diversos estudios han puesto de manifiesto que las regiones BC tienen una mayor respuesta de IgG que las regiones con mayor complejidad^{301,375}, nuestros datos demuestran que los antígenos IgM sin regiones BC son reconocidos por una mayor proporción de individuos de poblaciones hiperendémicas de malaria que los que sí las presentan. Además, el aumento en el número o la longitud de estas regiones disminuye progresivamente su reconocimiento. Una de las hipótesis que podría explicar este hecho, aparentemente contradictorio con el proceso observado con las IgG, es que las regiones BC han sido descritas como puntos calientes de recombinación que dan lugar a proteínas altamente variables^{302,373}. La presencia de estas regiones conllevaría a una elevada diversificación de los antígenos³⁷⁵⁻³⁷⁷, aumentando su variabilidad e impidiendo su reconocimiento por parte de una elevada proporción de los individuos de una población. Además, algunos estudios indican las IgG específicas de estas regiones no son efectivas y, por tanto, se trataría de una estrategia evolutiva de *Plasmodium* para desviar la atención al sistema inmunitario³⁰¹. Dado que en nuestro estudio los antígenos con elevada presencia de estas regiones son escasamente reconocidos por la IgM, podríamos encontrarnos ante una población cuya respuesta inmunitaria está más especializada en la producción de IgM efectivas en el bloqueo del parásito debida a la alta transmisión de malaria en la región.

Este estudio también ha revelado la elevada variabilidad y complejidad de las respuestas humorales mediadas por IgM. A pesar de que se encontraron patrones comunes entre grupos de edad y que los antígenos mostraron una correlación positiva entre sí, la variabilidad intragrupo fue elevada, siendo distinto el repertorio antigénico reconocido por cada individuo. Los antígenos pertenecientes a la parte apical del merozoíto, a la membrana del eritrocito infectado o al núcleo celular fueron reconocidos de forma diferente por la IgM de individuos de regiones endémicas y las abundancias de la IgM frente a estos grupos de antígenos no estaban correlacionadas entre sí, por lo que los clasificamos como grupos antigénicos diferentes, lo que nos indica que la localización de los antígenos define su reconocimiento por parte de las IgM.

6.3.3. Epítomos de *P. falciparum* reconocidos por IgM

El análisis de las respuestas humores frente a la malaria, en especial las mediadas por IgM, continúa despertando numerosas incógnitas. A pesar de ello, en la última década los grandes avances en técnicas proteómicas han permitido progresar en este ámbito. En concreto, el desarrollo de técnicas de alto rendimiento como el microarray de péptidos de alta densidad han demostrado ser una herramienta potente para detectar los epítomos lineales inmunorreactivos de diversas enfermedades infecciosas^{350,378-381}. La identificación de estos epítomos permite profundizar en el conocimiento biológico de las respuestas humores frente a una infección, mostrando un mapa de reactividad de cada antígeno a lo largo de su secuencia^{165,382} y facilitando el diseño de nuevas vacunas^{383,384} y la detección de potenciales marcadores de diagnóstico serológico³⁸⁵. Gracias a esta técnica, en nuestro estudio hemos localizado las regiones más inmunogénicas de los antígenos inmunodominantes identificados y se han podido seleccionar los epítomos reconocidos por IgM específicas que podrían ser potencialmente protectoras, así como candidatos para diagnóstico serológico mediante IgM.

Para ello, en primer lugar, seleccionamos los antígenos con mayor inmunoreactividad de IgM. Entre ellos, encontramos algunas proteínas descritas de forma clásica como antigénicas y candidatos a vacuna como son AMA1³⁸⁶⁻³⁸⁸, EBA-175^{240,366}, diversas roptrias^{231,389,390}, MSP1²²⁵⁻²²⁷, SERA5²⁴³, SERA6²⁴², MESA³⁹¹ o EXP2³⁹²; así como antígenos cuyas IgG han sido recientemente descritas como potencialmente protectoras como EF1a³⁹³ o TrxLM³⁹⁴. Otras, sin embargo, no habían sido descritas previamente como antigénicas, pero sí habían sido propuestas como diana terapéutica dado su papel esencial en el metabolismo de *Plasmodium*, el transporte de sustancias, la exportación de factores de virulencia o la regulación del equilibrio redox: ACS^{395,396}, AQP³⁹⁷⁻³⁹⁹, FNT⁴⁰⁰⁻⁴⁰², GRPEL1⁴⁰³, HT⁴⁰⁴⁻⁴⁰⁶, MSP92⁴⁰⁷, MDRP1⁴⁰⁸, REX1^{409,410}, TrxRP⁴¹¹ o HEDP⁴¹². Además, pudimos identificar como antígeno inmunodominante reconocido por IgM a una proteína que no había sido caracterizada previamente (PF3D7_1410700).

Tras seleccionar los antígenos inmunodominantes, se realizó un mapeo de sus epítomos reconocidos por IgM. En línea con lo observado en estudios previos realizados con antígenos IgG^{350,382}, las IgM mostraron un elevado reconocimiento de la mayor parte de su secuencia. En todos los antígenos, los individuos con malaria importada reconocieron un elevado repertorio de epítomos muy superior al de los no infectados, sugiriendo que estas respuestas humores mediadas por IgM podrían servir como marcadores de diagnóstico de la malaria importada. Los antígenos REX1, HT y MESA tuvieron la mayor proporción de epítomos altamente reactivos en personas infectadas que, sin embargo, no eran reconocidos por los que no lo estaban. REX1 y MESA son proteínas localizadas en la membrana del eritrocito infectado, en concreto en los

gránulos de Maurer⁴¹⁰ y unas estructuras conocidas como *Knobs*⁴¹³, respectivamente. Esta localización con exposición extracelular las hace accesibles al sistema inmunitario, lo que estaría generando reconocimiento inmunológico. Por otra parte, HT se trata de un transportador de glucosa localizado en la membrana del parásito⁴⁰⁶ y que, por tanto, actúa como inmunógeno al liberarse los merozoítos al torrente sanguíneo tras romper el eritrocito infectado.

En nuestra búsqueda de epítomos concretos con potencial para diagnóstico serológico mediante IgM, localizamos un total de 22 candidatos. Todos ellos presentaban una seroprevalencia superior al 75% en individuos con malaria tanto submicroscópica como microscópica y no fueron reconocidos por el plasma de ninguna persona no infectada. El péptido candidato con mayor potencial diagnóstico fue NVIVQEIMNEDVNEK del antígeno MESA, cuya IgM específica alcanzó una seroprevalencia del 92% en individuos infectados y no se detectó en los sanos. Lamentablemente, no se encontró ningún péptido que generara inmunorreactividad en el 100% de los individuos infectados, lo que podría indicar que, para conseguir un diagnóstico altamente sensible, sería necesaria la combinación de varios de estos péptidos en un mismo sistema diagnóstico. Otras de las proteínas en las que se localizaron buenos candidatos fueron REX1 o SERA6, una proteasa localizada en la vacuola parasitófora y esencial para la salida de los merozoítos del eritrocito⁴¹⁴.

El papel inmunoprotector de la IgM específica de *Plasmodium* ha sido evidenciado en numerosos estudios^{183,184,188,415}. Los epítomos ampliamente reconocidos por los individuos con malaria submicroscópica pueden considerarse asociados a la inmunidad adquirida parcialmente protectora, ya que representaron la respuesta inmunológica de los individuos tolerantes a la infección a elevadas parasitemias. El hecho de que los sueros de personas infectadas a baja parasitemia mostraran mayor concentración de anticuerpos específicos de *P. falciparum*, en nuestro caso de IgM, que los infectados a elevadas parasitemias se ha observado previamente en estudios realizados con IgG³⁸². Las causas que subyacen esta asociación entre una mayor seropositividad de anticuerpos frente a *P. falciparum* y la malaria submicroscópica aún no están claras. Una de las hipótesis posibles es que los individuos capaces de desencadenar una mayor respuesta humoral de anticuerpos específicos estarían parcialmente protegidos frente a la infección a elevada parasitemia, siendo el aumento en los niveles de anticuerpos la causa de la detención del desarrollo de la parasitemia. Por otra parte, los anticuerpos de individuos con malaria persistente subclínica han demostrado tener una mayor duración que los de los individuos con malaria aguda¹⁷⁸. Esto podría ser debido a una mayor tendencia a la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas de larga duración en aquellos individuos con alta estimulación antigénica¹⁷⁷ en contraposición con infecciones agudas que suelen recibir

tratamiento antiparasitario que se resuelve en pocos días. No se debe descartar tampoco que los infectados a elevadas parasitemias sean diagnosticados de forma temprana dado que presentan síntomas, en contraposición con la malaria submicroscópica, cuya detección continúa siendo un reto y se presenta con frecuencia sin sintomatología⁴¹⁶. Dado que la toma de nuestras muestras se realizaba en el momento de la consulta para diagnóstico, los individuos diagnosticados con malaria de forma más temprana no tendrían tiempo suficiente de desarrollar una respuesta inmunitaria robusta, dando lugar a la menor inmunorreactividad observada en estos sueros.

Algunos estudios previos de inmunoprotección frente a la malaria han evidenciado que únicamente una serie de epítomos específicos se asocian a una relativa inmunidad eficiente³⁸² y que estos no son necesariamente los más inmunorreactivos³⁰¹. Con esta premisa, investigamos entre el amplio repertorio de epítomos, cuáles mostraban mayor reactividad en sueros de malaria submicroscópica con respecto a microscópica con el fin de identificar potenciales candidatos inmunoprotectores. Este análisis identificó un total de 10 epítomos con elevado potencial de protección frente a la malaria grave. De ellos, siete pertenecieron a las proteínas SERA5, MSP1, RhopH3 o EBA-175, principales candidatos a vacuna de los últimos años²²¹ y cuyas IgG específicas protegen frente a la malaria grave, indicando que algunas IgM frente a estos antígenos también tienen efecto protector. También se encontraron epítomos cuyas IgM podrían ser protectoras en las proteínas TrxLM, recientemente descrita como protectora frente a la infección³⁹⁴ y en GRPEL1 y MDRP1, cuyo efecto protector es desconocido hasta el momento.

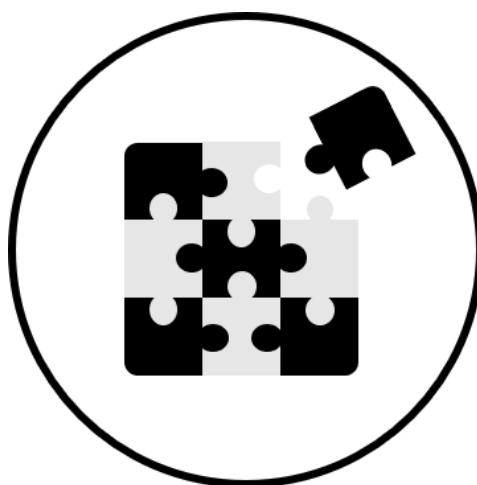
Resulta relevante incidir en el hecho de que este estudio se realizó con infecciones de malaria importada y, por tanto, sus resultados no deben extrapolarse a individuos habitantes de regiones endémicas de malaria. En estas regiones, la frecuente exposición al parásito impide la disminución de los niveles de anticuerpos entre infecciones. Por tanto, es habitual que los individuos no infectados presenten niveles altos de anticuerpos específicos como ha sido demostrado en nuestro estudio previo en región endémica y otros^{299,417}, lo que dificulta en gran medida el diagnóstico serológico. Por otra parte, también ha sido descrito que las exposiciones repetidas al parásito generan un fenómeno de inmunosupresión⁴¹⁸. Estudios previos han evidenciado que los individuos cuya exposición al parásito se ve muy reducida por el traslado a una zona geográfica de endemidad nula o muy baja, como es el caso de los participantes de nuestro estudio con sueros de malaria importada, desencadenan una respuesta inmunitaria, tanto celular como humoral, más potente frente a antígenos específicos de *Plasmodium* que los sometidos a una exposición constante al parásito^{418,419}.

Uno de los puntos más novedosos de este estudio ha sido el análisis de la composición de aminoácidos de los epítomos y su asociación con el reconocimiento por parte de las IgM. Nuestros resultados muestran que los epítomos más inmunogénicos tenían un mayor porcentaje de residuos codificados por codones con alto contenido en A+T, como son glutámico (E), lisina (K) o asparagina (N), en comparación con los menos reactivos. Dada la excepcional proporción de nucleótidos A+T en el genoma de *P. falciparum*⁴²⁰, es esperable que muchos péptidos tengan un alto contenido de estos residuos, aunque distribuidos heterogéneamente. Dado que estos aminoácidos aparentemente relacionados con la inmunogenicidad de *P. falciparum* también están asociados a las regiones BC³⁷³, se analizó la presencia de los mismos en función de la repetitividad de los péptidos, es decir, del número de residuos repetidos en cada péptido. Nuestros resultados indicaron que hay una fuerte correlación entre la presencia de los residuos E, K y N, la repetitividad del péptido y la intensidad de señal del mismo. Por ello, concluimos que el reconocimiento de los péptidos por parte de las IgM no depende tanto de su contenido de aminoácidos sino de su repetitividad, cualidad que potencia la prevalencia de la IgM específica de ese péptido y la intensidad del reconocimiento. Recientemente, un estudio realizado por Hou *et al.*³⁰¹ concluyó que los epítomos localizados en las regiones BC eran más inmunogénicos pero que, sin embargo, no inhibían la invasión de los eritrocitos *in vitro*. Gracias a este resultado, concluyeron que las regiones BC han aparecido evolutivamente para desorientar al sistema inmunitario e impedir que genere anticuerpos neutralizantes. Es importante subrayar que las regiones BC fueron eliminadas de las secuencias de los microarray de nuestro estudio para evitar este sesgo y, por tanto, los resultados corresponden a regiones relativamente complejas. Por ello podemos concluir que, incluso en las regiones más complejas de los antígenos de *P. falciparum*, la repetitividad de la secuencia tiene un peso importante en su reconocimiento por parte de la IgM. En concreto, el aumento en la repetitividad se traduce en un aumento de la prevalencia de la IgM específica del epítomo y de su intensidad de reconocimiento. Dado que en nuestro estudio no se realizaron ensayos de inhibición de la invasión, resultaría de interés analizar de esta forma si las IgM frente a los epítomos altamente repetitivos carecen de efecto protector, como ocurre con las IgG frente a los epítomos de las regiones BC.

En resumen, gracias a este trabajo de inmunorreactividad de IgM hemos podido identificar epítomos con potencial utilidad para realizar diagnóstico serológico mediante esta Ig, lo que aumentaría la sensibilidad de un hipotético sistema que aprovechara la cascada de amplificación producida por el sistema inmunitario. También hemos seleccionado epítomos cuya IgM específica está presente en aquellas muestras procedentes de individuos con bajas parasitemias, lo que sugiere su capacidad de proteger potencialmente frente a la malaria que cursa con

parasitemia elevada. El descubrimiento de estos epítomos aumenta el repertorio de biomarcadores candidatos para diagnóstico e inmunoprotección y, por tanto, requiere de estudios que analicen su potencial de forma individual. Además, hemos demostrado, por primera vez, que la microcomplejidad o repetitividad de un epítomo influye en su inmunogenicidad y que los epítomos más repetitivos son los que desencadenan una mayor respuesta IgM.

7. EPÍLOGO



Los resultados de la presente tesis doctoral abren perspectivas para mejorar el control de la malaria gracias a la identificación de una batería de biomarcadores de tolerancia a la infección tanto inmunitarios como genéticos y de potenciales marcadores de diagnóstico.

Esta tesis trataba de desentrañar e identificar algunos de los factores que conducen a que los individuos habitantes de regiones endémicas de malaria toleren las infecciones más graves. Entre ellos, se encuentran los inmunitarios, que protegen principalmente en la edad adulta por el acúmulo de exposición; y los genéticos, que actúan desde el nacimiento. Cabe destacar, que los mecanismos de protección natural identificados influyen en el nivel de parasitemia adquirido tras la infección en lugar de prevenirla, algo que genera claros beneficios a nivel individual, pero que perpetúa el ciclo de la malaria y la elevada transmisión en regiones endémicas. Es por ello que resulta primordial el desarrollo de vacunas que confieran protección esterilizante frente a la malaria, ya que permitirían cortar las cadenas de transmisión del parásito y proteger a los individuos más vulnerables a la infección, entre los que se encuentran los niños menores de cinco años y las mujeres embarazadas.

Nuestro estudio muestra que la protección natural frente a la infección conlleva una elevada prevalencia de malaria submicroscópica en poblaciones endémicas. Este tipo de infección constituye un reto para el control de la malaria pues, como muestran nuestros datos, es indetectable por los sistemas de diagnóstico utilizados en regiones endémicas como es la microscopía, por definición, o los TDR. Es decir, nos encontramos ante un grave escenario en el que la malaria submicroscópica es el tipo de infección mayoritaria de las regiones endémicas, pero precisamente este tipo de infección es desapercibida con los sistemas diagnósticos locales. La identificación de casos de malaria submicroscópica mediante PCR es indispensable a la hora de realizar estudios de prevalencia de la enfermedad y para aplicar programas de control efectivos, ya que, si se diagnostica mediante otras técnicas menos sensibles disponibles en la actualidad, gran parte de la carga de malaria podría ser desatendida. Así, la identificación de nuevos marcadores de infección que permitan detectar a todos los individuos infectados, incluidos aquellos con malaria submicroscópica, debe ser uno de los principales objetivos de la investigación malarica, puesto que el deficiente diagnóstico en estas regiones limita el tratamiento y mantiene el reservorio de parásito.

Nuestros resultados han puesto de manifiesto, por primera vez, que la IgM e IgA específicas de *P. falciparum* pueden ser marcadores de exposición a la malaria, complementarios a la IgG. Con la IgM e IgA se amplían las herramientas de vigilancia serológica disponibles con el fin de estimar, con mayor precisión, los cambios en la transmisión de la malaria en regiones endémicas según la estación y evaluar la eficacia de las medidas de prevención y control de la malaria.

Además, estas inmunoglobulinas actúan como predictores de la intensidad de la infección en niños, dada la elevación de su concentración en los infectados con elevada parasitemia; y también representan marcadores de pronóstico de la enfermedad por su asociación con la anemia grave.

Nuestro estudio sobre la potencial protección genética a la malaria ha desvelado una elevada prevalencia de las variantes polimórficas descritas que confieren tolerancia a la enfermedad en regiones endémicas. Pero lo que es más relevante y novedoso de nuestro estudio es la necesidad de analizar conjuntamente los polimorfismos que coexisten en una misma población, ya que una elevada proporción de individuos de poblaciones endémicas son portadores de dos o más variantes polimórficas cuyo efecto protector parece ser acumulativo. Esto puede tener implicaciones notables en el impacto de la malaria, pues, como han demostrado estudios previos, la presencia de algunos polimorfismos como el rasgo falciforme disminuyen la morbilidad de la malaria y retrasan la aparición del primer episodio de infección, pero a la vez aumentan la transmisibilidad. El impacto que puede tener la heredabilidad de dos o más variantes polimórficas protectoras en un mismo individuo en la transmisión de la malaria se desconoce. Sin embargo, su capacidad de reducir la carga parasitaria con respecto a los que portan una o ninguna variante podría conllevar una menor detección y, por tanto, permanecer sin tratamiento y, en consecuencia, favorecería una mayor transmisibilidad de la enfermedad al mantenerse el reservorio.

Este trabajo de tesis doctoral amplía la información biológica disponible sobre el reconocimiento de *P. falciparum* por IgM. Los resultados obtenidos han podido demostrar que, en regiones endémicas de malaria, la IgM serológica reconoce un amplio repertorio de antígenos de *P. falciparum* incluso en individuos no infectados y que sus principales dianas son proteínas localizadas en la parte apical del parásito y las vesículas de transporte, algunas de las partes más esenciales para la invasión y patogenia del parásito. El desarrollo de nuestro método de aislamiento e identificación de antígenos reconocidos por IgM puede tener importantes aplicaciones en la comprensión de la respuesta humoral por IgM, no solo en el contexto de la malaria, sino en otras enfermedades en las que el análisis del reconocimiento antigénico de la IgM se ha visto mermado por las dificultades inherentes al manejo de este isotipo de inmunoglobulina tan voluminoso. Como ejemplo del potencial de la técnica se han identificado diez IgM específicas de epítomos de *P. falciparum* con aparente capacidad protectora. Estos péptidos antigénicos podrían ser útiles en el diseño de nuevas vacunas que no se centren exclusivamente en la producción de IgG, sino también en estimular respuestas de IgM, dadas las numerosas evidencias de su capacidad de protección frente a la malaria. Adicionalmente, la

identificación de nuevos candidatos para diagnóstico serológico mediante IgM puede suponer un avance en el desarrollo de métodos de diagnóstico de malaria más sensibles y asequibles. Así, consideramos que, técnicamente, la amplificación de la señal de la respuesta inmunitaria a la malaria mediante IgM específica de antígeno podría ser usada como medio para aumentar la sensibilidad en el diagnóstico sérico rápido. Dado que la utilidad de la IgM como diana diagnóstica ha sido escasamente estudiada, nuestro trabajo abriría también una nueva vía de investigación para mejorar el diagnóstico de malaria.

Finalmente, consideramos trascendente en cuanto a la inmunidad de las gestantes a la malaria nuestra observación de que el embarazo, además de aumentar la susceptibilidad a la infección, altera el patrón de reconocimiento antigénico de la IgM frente a *P. falciparum*. Esta perturbación del tropismo del sistema inmunitario gestante había sido demostrada para IgG, pero hasta el momento se desconocía que sucediese también por parte de la IgM. Este cambio en el repertorio antigénico reconocido puede explicar la mayor susceptibilidad a la infección de las mujeres gestantes con semi-inmunidad adquirida a la malaria y puede ser relevante a la hora de diseñar vacunas específicas para mujeres y durante el embarazo.

8. CONCLUSIONES



Las conclusiones que se derivan de los trabajos de investigación sobre inmunología y tolerancia genética a la malaria en áreas endémicas son:

1. La adquisición de anticuerpos IgM, IgA e IgG específicos de *P. falciparum* aumenta con la edad y conlleva una reducción de casos con alta parasitemia en los adultos con respecto a los niños. Esta adquisición de inmunidad frente a la malaria es, por tanto, parcial y proporciona un control sobre la carga parasitaria en lugar de prevenir la infección.
2. La IgM y la IgA específicas de *P. falciparum* sirven como marcadores de exposición en la población adulta y como marcadores de intensidad de la infección y anemia grave en los niños.
3. Las infecciones por *P. falciparum* a elevadas parasitemias están asociadas a una disminución de la concentración de hemoglobina, plaquetas y leucocitos, cuya detección puede servir como marcador de infecciones graves.
4. Los sistemas de diagnóstico rápido utilizados en regiones endémicas de malaria son ineficientes en la detección de malaria submicroscópica, que es el tipo de infección mayoritaria en estos lugares.
5. Las variantes polimórficas E756del del gen PIEZO1, el rasgo falciforme o hemoglobina AS y la variante A- de la G6PD proporcionan protección frente a la malaria, reduciendo los niveles de parasitemia sin llegar a proporcionar una protección esterilizante que impida la infección. Además, es común la coexistencia de dos o más variantes polimórficas en un mismo individuo y su efecto ejercido de tolerancia es acumulativo, dando lugar a infecciones con menor parasitemia que los portadores de una única variante.
6. Hemos diseñado una nueva metodología para el aislamiento, identificación y cuantificación de antígenos reconocidos por IgM a gran escala a partir de cantidades mínimas de suero almacenado en formato seco. Su uso es capaz de ampliar el conocimiento sobre inmunoproteómica de IgM y abre perspectivas para la identificación de marcadores asociados a protección o diagnóstico mediados por IgM.
7. Las mujeres gestantes tienen mayor proporción de casos de malaria que las mujeres no gestantes y su repertorio de antígenos IgM es superior al de los individuos no gestantes.
8. El repertorio antigénico de *P. falciparum* reconocido por la IgM es superior en los individuos adultos que en los niños y aumenta progresivamente con la carga parasitaria.
9. La elevada producción de IgM frente a un determinado set de antígenos muy inmunogénicos se acompaña de una escasa respuesta frente a otros antígenos, lo que

conlleva la existencia de dos clases de respuestas IgM en una población: individuos que reconocen gran cantidad de antígenos, pero con poca abundancia, y aquellos que reconocen pocos antígenos con gran intensidad.

10. Los antígenos de *P. falciparum* implicados en la invasión del eritrocito o en la interacción con el hospedador son las principales dianas de la respuesta humoral mediada por IgM. Entre ellos, los expresados en el estadio de esquizonte y los que carecen de regiones de baja complejidad son reconocidos por un mayor porcentaje de individuos procedentes de regiones endémicas de malaria.
11. Los antígenos de *P. falciparum* más inmunogénicos presentan un elevado reconocimiento en la mayoría de sus epítomos a lo largo de la secuencia por parte de las IgM de individuos procedentes de regiones endémicas de malaria. Sin embargo, aquellos epítomos con menor variedad de aminoácidos en su secuencia, es decir, los más repetitivos, son reconocidos con mayor intensidad y por parte de mayor porcentaje de individuos.
12. Hemos identificado un total de 22 péptidos con potencial para realizar diagnóstico serológico de malaria y 10 péptidos cuya respuesta IgM es potencialmente inmunoprotectora frente a la infección a elevada parasitemia.

9. BIBLIOGRAFÍA



- 1 World Health Organization. **World malaria report 2021**. (Geneva, 2021).
- 2 Hoffman, S. L., Subramanian, G. M., Collins, F. H. y Venter, J. C. **Plasmodium, human and Anopheles genomics and malaria**. *Nature* 415, 702-709, doi:10.1038/415702a (2002).
- 3 Fürnkranz, U. y Walochnik, J. **Nosocomial Infections: Do Not Forget the Parasites!** *Pathogens* 10, 238, doi:10.3390/pathogens10020238 (2021).
- 4 Rosso, F., Agudelo Rojas, O. L., Suarez Gil, C. C., Lopez Vargas, J. A., Gómez-Mesa, J. E., Carrillo Gomez, D. C., . . . Caicedo Rusca, L. A. **Transmission of malaria from donors to solid organ transplant recipients: A case report and literature review**. *Transpl Infect Dis* 23, e13660, doi:10.1111/tid.13660 (2021).
- 5 Douamba, Z., Dao, N. G., Zohoncon, T. M., Bisseye, C., Compaoré, T. R., Kafando, J. G., . . . Simporé, J. **Mother-to-Children Plasmodium falciparum Asymptomatic Malaria Transmission at Saint Camille Medical Centre in Ouagadougou, Burkina Faso**. *Malar Res Treat* 2014, 390513, doi:10.1155/2014/390513 (2014).
- 6 Laveran, A. **A new parasite found in the blood of malarial patients. Parasitic origin of malarial attacks**. *Bull. mem. soc. med. hosp. Paris* 17, 158-164 (1880).
- 7 Ross, R. **Mosquitos and Malaria**. *Br Med J* 2, 806-807 (1899).
- 8 Grassi, B., Bignami, A. y Bastianelli, G. **Ulteriore ricerche sul ciclo dei parassiti malarici umani sul corpo del zanzarone**. *Accad Lincei* 8, 21-28 (1899).
- 9 Shaw, W. R., Marcenac, P. y Catteruccia, F. **Plasmodium development in Anopheles: a tale of shared resources**. *Trends Parasitol* 38, 124-135, doi:10.1016/j.pt.2021.08.009 (2022).
- 10 Organización Mundial de la Salud. **Estrategia técnica mundial contra la malaria 2016-2030**. (2015).
- 11 Martínez-Salazar, E., Tobón-Castaño, A. y Blair, S. **Malaria en humanos por infección natural con Plasmodium knowlesi**. *Biomédica* 32, 121-130 (2012).
- 12 Ocan, M., Akena, D., Nsobya, S., Kamya, M. R., Senono, R., Kinengyere, A. A. y Obuku, E. A. **Persistence of chloroquine resistance alleles in malaria endemic countries: a systematic review of burden and risk factors**. *Malar J* 18, 76, doi:10.1186/s12936-019-2716-z (2019).
- 13 Sadanand, S. **Malaria: an evaluation of the current state of research on pathogenesis and antimalarial drugs**. *Yale J Biol Med* 83, 185-191 (2010).
- 14 van der Pluijm, R. W., Imwong, M., Chau, N. H., Hoa, N. T., Thuy-Nhien, N. T., Thanh, N. V., . . . Dondorp, A. M. **Determinants of dihydroartemisinin-piperaquine treatment failure in Plasmodium falciparum malaria in Cambodia, Thailand, and Vietnam: a prospective clinical, pharmacological, and genetic study**. *Lancet Infect Dis* 19, 952-961, doi:10.1016/s1473-3099(19)30391-3 (2019).
- 15 Phyto, A. P., Ashley, E. A., Anderson, T. J. C., Bozdech, Z., Carrara, V. I., Sriprawat, K., . . . Nosten, F. **Declining Efficacy of Artemisinin Combination Therapy Against P. Falciparum Malaria on the Thai-Myanmar Border (2003-2013): The Role of Parasite Genetic Factors**. *Clin Infect Dis* 63, 784-791, doi:10.1093/cid/ciw388 (2016).
- 16 Zhang, Y. L. y Pan, W. Q. **[The world's first malaria vaccine: Hope and challenge]**. *Zhongguo Xue Xi Chong Bing Fang Zhi Za Zhi* 33, 560-562, doi:10.16250/j.32.1374.2021283 (2022).
- 17 Waite, J. L., Suh, E., Lynch, P. A. y Thomas, M. B. **Exploring the lower thermal limits for development of the human malaria parasite, Plasmodium falciparum**. *Biol Lett* 15, 20190275, doi:10.1098/rsbl.2019.0275 (2019).
- 18 Capdevila, J. A. y Icart, R. **Malaria prophylaxis in the traveler**. *Rev Clin Esp* 210, 77-83, doi:10.1016/j.rce.2009.06.014 (2010).
- 19 Zekar, L. y Sharman, T. **Plasmodium falciparum Malaria**. (StatPearls, 2022).
- 20 Elvidge, C. D., Sutton, P. C., Ghosh, T., Tuttle, B. T., Baugh, K. E., Bhaduri, B. y Bright, E. A. **A global poverty map derived from satellite data**. *Comput Geosci-Uk* 35, 1652-1660, doi:10.1016/j.cageo.2009.01.009 (2009).

- 21 Sato, S. **Plasmodium-a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology.** *J Physiol Anthropol* 40, 1, doi:10.1186/s40101-020-00251-9 (2021).
- 22 Frischknecht, F. y Matuschewski, K. **Plasmodium Sporozoite Biology.** *Csh Perspect Med* 7, a025478, doi:10.1101/cshperspect.a025478 (2017).
- 23 Sturm, A., Amino, R., van de Sand, C., Regen, T., Retzlaff, S., Rennenberg, A., . . . Heussler, V. T. **Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids.** *Science* 313, 1287-1290, doi:10.1126/science.1129720 (2006).
- 24 Cowman, A. F., Healer, J., Marapana, D. y Marsh, K. **Malaria: Biology and Disease.** *Cell* 167, 610-624, doi:10.1016/j.cell.2016.07.055 (2016).
- 25 Arnot, D. E. y Gull, K. **The Plasmodium cell-cycle: facts and questions.** *Ann Trop Med Parasitol* 92, 361-365, doi:10.1080/00034989859357 (1998).
- 26 Reilly, H. B., Wang, H., Steuter, J. A., Marx, A. M. y Ferdig, M. T. **Quantitative dissection of clone-specific growth rates in cultured malaria parasites.** *Int J Parasitol* 37, 1599-1607, doi:10.1016/j.ijpara.2007.05.003 (2007).
- 27 Bancells, C., Llorà-Batlle, O., Poran, A., Nötzel, C., Rovira-Graells, N., Elemento, O., . . . Cortés, A. **Revisiting the initial steps of sexual development in the malaria parasite Plasmodium falciparum.** *Nat Microbiol* 4, 144-154, doi:10.1038/s41564-018-0291-7 (2019).
- 28 Joice, R., Nilsson, S. K., Montgomery, J., Dankwa, S., Egan, E., Morahan, B., . . . Marti, M. **Plasmodium falciparum transmission stages accumulate in the human bone marrow.** *Sci Transl Med* 6, 244re245, doi:10.1126/scitranslmed.3008882 (2014).
- 29 Bennink, S., Kiesow, M. J. y Pradel, G. **The development of malaria parasites in the mosquito midgut.** *Cell Microbiol* 18, 905-918, doi:10.1111/cmi.12604 (2016).
- 30 Sinden, R. E. y Hartley, R. H. **Identification of the meiotic division of malarial parasites.** *J Protozool* 32, 742-744, doi:10.1111/j.1550-7408.1985.tb03113.x (1985).
- 31 Siciliano, G., Costa, G., Suarez-Cortes, P., Valleriani, A., Alano, P. y Levashina, E. A. **Critical Steps of Plasmodium falciparum Ookinete Maturation.** *Front Microbiol* 11, 269, doi:10.3389/fmicb.2020.00269 (2020).
- 32 Smith, R. C. y Jacobs-Lorena, M. **Plasmodium-Mosquito Interactions: A Tale of Roadblocks and Detours.** *Adv In Insect Phys* 39, 119-149, doi:10.1016/b978-0-12-381387-9.00004-x (2010).
- 33 Orish, V., Afutu, L., Ayodele, O., Likaj, L., Marinkovic, A. y Sanyaolu, A. **A 4-Day Incubation Period of Plasmodium falciparum Infection in a Nonimmune Patient in Ghana: A Case Report.** *Open Forum Infect Di* 6, ofy169, doi:10.1093/ofid/ofy169 (2019).
- 34 Ashley, E. A., Pyae Phyo, A. y Woodrow, C. J. **Malaria.** *Lancet* 391, 1608-1621, doi:10.1016/S0140-6736(18)30324-6 (2018).
- 35 Balaji, S. N., Deshmukh, R. y Trivedi, V. **Severe malaria: Biology, clinical manifestation, pathogenesis and consequences.** *J Vector Borne Dis* 57, 1-13, doi:10.4103/0972-9062.308793 (2020).
- 36 Jensen, A. R., Adams, Y. y Hviid, L. **Cerebral Plasmodium falciparum malaria: The role of PfEMP1 in its pathogenesis and immunity, and PfEMP1-based vaccines to prevent it.** *Immunol Rev* 293, 230-252, doi:10.1111/imr.12807 (2020).
- 37 Miller, L. H., Baruch, D. I., Marsh, K. y Doumbo, O. K. **The pathogenic basis of malaria.** *Nature* 415, 673-679, doi:10.1038/415673a (2002).
- 38 Yam, X. Y., Niang, M., Madnani, K. G. y Preiser, P. R. **Three Is a Crowd - New Insights into Rosetting in Plasmodium falciparum.** *Trends Parasitol* 33, 309-320, doi:10.1016/j.pt.2016.12.012 (2017).
- 39 Sherman, I. W., Eda, S. y Winograd, E. **Cytoadherence and sequestration in Plasmodium falciparum: defining the ties that bind.** *Microbes Infect* 5, 897-909, doi:10.1016/s1286-4579(03)00162-x (2003).

- 40 McQuaid, F. y Rowe, J. A. **Rosetting revisited: a critical look at the evidence for host erythrocyte receptors in Plasmodium falciparum rosetting.** *Parasitology* 147, 1-11, doi:10.1017/s0031182019001288 (2020).
- 41 White, N. J., Turner, G. D., Day, N. P. y Dondorp, A. M. **Lethal malaria: Marchiafava and Bignami were right.** *J Infect Dis* 208, 192-198, doi:10.1093/infdis/jit116 (2013).
- 42 Uyoga, S., Skorokhod, O. A., Opiyo, M., Orori, E. N., Williams, T. N., Arese, P. y Schwarzer, E. **Transfer of 4-hydroxynonenal from parasitized to non-parasitized erythrocytes in rosettes. Proposed role in severe malaria anemia.** *Br J Haematol* 157, 116-124, doi:10.1111/j.1365-2141.2011.09015.x (2012).
- 43 Urban, B. C. y Roberts, D. J. **Malaria, monocytes, macrophages and myeloid dendritic cells: sticking of infected erythrocytes switches off host cells.** *Curr Opin Immunol* 14, 458-465, doi:10.1016/s0952-7915(02)00368-0 (2002).
- 44 Akinosoglou, K. S., Solomou, E. E. y Gogos, C. A. **Malaria: a haematological disease.** *Hematology* 17, 106-114, doi:10.1179/102453312X13221316477336 (2012).
- 45 Kurtzhals, J. A. L., Rodrigues, O., Addae, M., Commey, J. O. O., Nkrumah, F. K. y Hviid, L. **Reversible suppression of bone marrow response to erythropoietin in Plasmodium falciparum malaria.** *Brit J Haematol* 97, 169-174, doi:DOI 10.1046/j.1365-2141.1997.82654.x (1997).
- 46 Gerardin, P., Rogier, C., Ka, A. S., Jouvencel, P., Brousse, V. y Imbert, P. **Prognostic value of thrombocytopenia in African children with falciparum malaria.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 66, 686-691, doi:DOI 10.4269/ajtmh.2002.66.686 (2002).
- 47 Lampah, D. A., Yeo, T. W., Malloy, M., Kenangalem, E., Douglas, N. M., Ronaldo, D., . . . Price, R. N. **Severe Malarial Thrombocytopenia: A Risk Factor for Mortality in Papua, Indonesia.** *J Infect Dis* 211, 623-634, doi:10.1093/infdis/jiu487 (2015).
- 48 Kho, S., Barber, B. E., Johar, E., Andries, B., Poespoprodjo, J. R., Kenangalem, E., . . . McMorran, B. J. **Platelets kill circulating parasites of all major Plasmodium species in human malaria.** *Blood* 132, 1332-1344, doi:10.1182/blood-2018-05-849307 (2018).
- 49 Dobbs, K. R., Embury, P., Vulule, J., Odada, P. S., Rosa, B. A., Mitreva, M., . . . Dent, A. E. **Monocyte dysregulation and systemic inflammation during pediatric falciparum malaria.** *JCI Insight* 2, e95352, doi:10.1172/jci.insight.95352 (2017).
- 50 Fontana, M. F., Baccarella, A., Craft, J. F., Boyle, M. J., McIntyre, T. I., Wood, M. D., . . . Kim, C. C. **A Novel Model of Asymptomatic Plasmodium Parasitemia That Recapitulates Elements of the Human Immune Response to Chronic Infection.** *Plos One* 11, e0162132, doi:10.1371/journal.pone.0162132 (2016).
- 51 Kimbi, H. K., Sumbele, I. U. N., Nwebboh, M., Anchang-Kimbi, J. K., Lum, E., Nana, Y., . . . Lehman, L. G. **Malaria and haematologic parameters of pupils at different altitudes along the slope of Mount Cameroon: a cross-sectional study.** *Malaria J* 12, 193, doi:10.1186/1475-2875-12-193 (2013).
- 52 Erhart, L. M., Yingyuen, K., Chuanak, N., Buathong, N., Laoboonchai, A., Miller, R. S., . . . Wongsrichanalai, C. **Hematologic and clinical indices of malaria in a semi-immune population of western Thailand.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 70, 8-14, doi:DOI 10.4269/ajtmh.2004.70.8 (2004).
- 53 Chua, C. L. L., Brown, G., Hamilton, J. A., Rogerson, S. y Boeuf, P. **Monocytes and macrophages in malaria: protection or pathology?** *Trends Parasitol* 29, 26-34, doi:10.1016/j.pt.2012.10.002 (2013).
- 54 Ladhani, S., Lowe, B., Cole, A. O., Kowuondo, K. y Newton, C. R. J. C. **Changes in white blood cells and platelets in children with falciparum malaria: relationship to disease outcome.** *Brit J Haematol* 119, 839-847, doi:DOI 10.1046/j.1365-2141.2002.03904.x (2002).
- 55 Langhorne, J., Ndungu, F. M., Sponaas, A. M. y Marsh, K. **Immunity to malaria: more questions than answers.** *Nat Immunol* 9, 725-732, doi:10.1038/ni.f.205 (2008).

- 56 Chawla, S. y Manu, V. **Malaria in Pregnancy**. *Med J Armed Forces India* 63, 147-148, doi:10.1016/S0377-1237(07)80060-8 (2007).
- 57 Ashley, E. A. y Poespoprodjo, J. R. **Treatment and prevention of malaria in children**. *Lancet Child Adolesc Health* 4, 775-789, doi:10.1016/S2352-4642(20)30127-9 (2020).
- 58 Milner, D. A., Jr., Montgomery, J., Seydel, K. B. y Rogerson, S. J. **Severe malaria in children and pregnancy: an update and perspective**. *Trends Parasitol* 24, 590-595, doi:10.1016/j.pt.2008.09.001 (2008).
- 59 **New insights into malaria pathogenesis and prevention**. *Expert Rev Anti-Infe* 7, 911-911 (2009).
- 60 Hawkes, M., Elphinstone, R. E., Conroy, A. L. y Kain, K. C. **Contrasting pediatric and adult cerebral malaria: the role of the endothelial barrier**. *Virulence* 4, 543-555, doi:10.4161/viru.25949 (2013).
- 61 Chua, C. L. L., Khoo, S. K. M., Ong, J. L. E., Ramireddi, G. K., Yeo, T. W. y Teo, A. **Malaria in Pregnancy: From Placental Infection to Its Abnormal Development and Damage**. *Front Microbiol* 12, 777343, doi:10.3389/fmicb.2021.777343 (2021).
- 62 Rogerson, S. J., Hviid, L., Duffy, P. E., Leke, R. F. y Taylor, D. W. **Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity**. *Lancet Infect Dis* 7, 105-117, doi:10.1016/S1473-3099(07)70022-1 (2007).
- 63 Desai, M., Hill, J., Fernandes, S., Walker, P., Pell, C., Gutman, J., . . . Ter Kuile, F. O. **Prevention of malaria in pregnancy**. *Lancet Infect Dis* 18, e119-e132, doi:10.1016/s1473-3099(18)30064-1 (2018).
- 64 Okell, L. C., Ghani, A. C., Lyons, E. y Drakeley, C. J. **Submicroscopic Infection in Plasmodium falciparum-Endemic Populations: A Systematic Review and Meta-Analysis**. *J Infect Dis* 200, 1509-1517, doi:10.1086/644781 (2009).
- 65 Bousema, T., Okell, L., Felger, I. y Drakeley, C. **Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance**. *Nat Rev Microbiol* 12, 833-840, doi:10.1038/nrmicro3364 (2014).
- 66 Lindblade, K. A., Steinhart, L., Samuels, A., Kachur, S. P. y Slutsker, L. **The silent threat: asymptomatic parasitemia and malaria transmission**. *Expert Rev Anti Infect Ther* 11, 623-639, doi:10.1586/eri.13.45 (2013).
- 67 Ceesay, S. J., Casals-Pascual, C., Erskine, J., Anya, S. E., Duah, N. O., Fulford, A. J., . . . Conway, D. J. **Changes in malaria indices between 1999 and 2007 in The Gambia: a retrospective analysis**. *Lancet* 372, 1545-1554, doi:10.1016/s0140-6736(08)61654-2 (2008).
- 68 Stone, W., Gonçalves, B. P., Bousema, T. y Drakeley, C. **Assessing the infectious reservoir of falciparum malaria: past and future**. *Trends Parasitol* 31, 287-296, doi:10.1016/j.pt.2015.04.004 (2015).
- 69 Pousibet-Puerto, J., Cabezas-Fernández, M. T., Lozano-Serrano, A. B., Vázquez-Villegas, J., Soriano-Pérez, M. J., Cabeza-Barrera, I., . . . Salas-Coronas, J. **Submicroscopic Malaria in Migrants from Sub-Saharan Africa, Spain**. *Emerg Infect Dis* 25, 349-352, doi:10.3201/eid2502.180717 (2019).
- 70 Fradejas, I., Rubio, J. M., Martín-Díaz, A., Herrero-Martínez, J. M., Ruiz-Giardin, J. M., Rojo-Marcos, G., . . . Pérez-Ayala, A. **Prevalence of submicroscopic malaria infection in immigrants living in Spain**. *Malar J* 18, 242, doi:10.1186/s12936-019-2870-3 (2019).
- 71 Liu, J., Modrek, S., Gosling, R. D. y Feachem, R. G. A. **Malaria eradication: is it possible? Is it worth it? Should we do it?** *The Lancet Global Health* 1, e2-e3, doi:10.1016/S2214-109X(13)70002-0 (2013).
- 72 Zheng, Z. y Cheng, Z. **Advances in Molecular Diagnosis of Malaria**. *Adv Clin Chem* 80, 155-192, doi:10.1016/bs.acc.2016.11.006 (2017).
- 73 Krampa, F. D., Aniweh, Y., Kanyong, P. y Awandare, G. A. **Recent Advances in the Development of Biosensors for Malaria Diagnosis**. *Sensors (Basel)* 20, 799, doi:10.3390/s20030799 (2020).

- 74 Mukkala, A. N., Kwan, J., Lau, R., Harris, D., Kain, D. y Boggild, A. K. **An Update on Malaria Rapid Diagnostic Tests.** *Curr Infect Dis Rep* 20, 49, doi:10.1007/s11908-018-0655-4 (2018).
- 75 Varo, R., Balanza, N., Mayor, A. y Bassat, Q. **Diagnosis of clinical malaria in endemic settings.** *Expert Rev Anti Infect Ther* 19, 79-92, doi:10.1080/14787210.2020.1807940 (2021).
- 76 Orish, V. N., De-Gaulle, V. F. y Sanyaolu, A. O. **Interpreting rapid diagnostic test (RDT) for Plasmodium falciparum.** *BMC Res Notes* 11, 850, doi:10.1186/s13104-018-3967-4 (2018).
- 77 Amexo, M., Tolhurst, R., Barnish, G. y Bates, I. **Malaria misdiagnosis: effects on the poor and vulnerable.** *Lancet* 364, 1896-1898, doi:10.1016/s0140-6736(04)17446-1 (2004).
- 78 Berry, A., Benoit-Vical, F., Fabre, R., Cassaing, S. y Magnaval, J. F. **PCR-based methods to the diagnosis of imported malaria.** *Parasite* 15, 484-488, doi:10.1051/parasite/2008153484 (2008).
- 79 Rich, S. M., Leendertz, F. H., Xu, G., LeBreton, M., Djoko, C. F., Aminake, M. N., . . . Wolfe, N. D. **The origin of malignant malaria.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 14902-14907, doi:10.1073/pnas.0907740106 (2009).
- 80 Whitfield, J. **Portrait of a serial killer.** *Nature*, doi:10.1038/news021001-6 (2002).
- 81 Kwiatkowski, D. P. **How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria.** *Am J Hum Genet* 77, 171-192, doi:10.1086/432519 (2005).
- 82 Haldane, J. B. S. **The rate of mutation of human genes.** *Hereditas* 35, 267-273, doi:10.1111/j.1601-5223.1949.tb03339.x (1949).
- 83 Akide-Ndunge, O. B., Ayi, K. y Arese, P. **The Haldane malaria hypothesis: facts, artifacts, and a prophecy.** *Redox Rep* 8, 311-316, doi:10.1179/135100003225002952 (2003).
- 84 Kariuki, S. N. y Williams, T. N. **Human genetics and malaria resistance.** *Hum Genet* 139, 801-811, doi:10.1007/s00439-020-02142-6 (2020).
- 85 Luzzatto, L. **Genetics of red cells and susceptibility to malaria.** *Blood* 54, 961-976 (1979).
- 86 Taylor, S. M. y Fairhurst, R. M. **Malaria parasites and red cell variants: when a house is not a home.** *Curr Opin Hematol* 21, 193-200, doi:10.1097/moh.0000000000000039 (2014).
- 87 Clegg, J. B. y Weatherall, D. J. **Thalassemia and malaria: new insights into an old problem.** *Proc Assoc Am Physicians* 111, 278-282, doi:10.1046/j.1525-1381.1999.99235.x (1999).
- 88 Wambua, S., Mwangi, T. W., Kortok, M., Uyoga, S. M., Macharia, A. W., Mwacharo, J. K., . . . Williams, T. N. **The effect of alpha+-thalassaemia on the incidence of malaria and other diseases in children living on the coast of Kenya.** *PLoS Med* 3, e158, doi:10.1371/journal.pmed.0030158 (2006).
- 89 Mockenhaupt, F. P., Ehrhardt, S., Gellert, S., Otchwemah, R. N., Dietz, E., Anemana, S. D. y Bienzle, U. **Alpha(+)-thalassemia protects African children from severe malaria.** *Blood* 104, 2003-2006, doi:10.1182/blood-2003-11-4090 (2004).
- 90 Williams, T. N. **Human red blood cell polymorphisms and malaria.** *Curr Opin Microbiol* 9, 388-394, doi:10.1016/j.mib.2006.06.009 (2006).
- 91 Flint, J., Harding, R. M., Boyce, A. J. y Clegg, J. B. **The population genetics of the haemoglobinopathies.** *Baillieres Clin Haematol* 11, 1-51, doi:10.1016/s0950-3536(98)80069-3 (1998).
- 92 Mandal, A. K., Mitra, A. y Das, R. **Sickle Cell Hemoglobin.** *Subcell Biochem* 94, 297-322, doi:10.1007/978-3-030-41769-7_12 (2020).
- 93 Allison, A. C. **Protection Afforded by Sickle-Cell Trait against Subtertian Malarial Infection.** *British Medical Journal* 1, 290-294, doi:DOI 10.1136/bmj.1.4857.290 (1954).

- 94 Williams, T. N., Mwangi, T. W., Wambua, S., Alexander, N. D., Kortok, M., Snow, R. W. y Marsh, K. **Sickle cell trait and the risk of Plasmodium falciparum malaria and other childhood diseases.** *J Infect Dis* 192, 178-186, doi:10.1086/430744 (2005).
- 95 Aidoo, M., Terlouw, D. J., Kolczak, M. S., McElroy, P. D., ter Kuile, F. O., Kariuki, S., . . . Udhayakumar, V. **Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality.** *Lancet* 359, 1311-1312, doi:10.1016/S0140-6736(02)08273-9 (2002).
- 96 Mackey, J. P. y Vivarelli, F. **Sickle-cell Anaemia.** *British Medical Journal* 1, 276-276, doi:10.1136/bmj.1.4856.276 (1954).
- 97 Miller, M. J., Neel, J. V. y Livingstone, F. B. **Distribution of parasites in the red cells of sickle-cell trait carriers infected with Plasmodium falciparum.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 50, 294-296, doi:10.1016/0035-9203(56)90037-2 (1956).
- 98 Luzzatto, L., Nwachuku-Jarrett, E. S. y Reddy, S. **Increased sickling of parasitised erythrocytes as mechanism of resistance against malaria in the sickle-cell trait.** *Lancet* 1, 319-321, doi:10.1016/s0140-6736(70)90700-2 (1970).
- 99 Opi, D. H., Ochola, L. B., Tendwa, M., Siddondo, B. R., Ocholla, H., Fanjo, H., . . . Williams, T. N. **Mechanistic Studies of the Negative Epistatic Malaria-protective Interaction Between Sickle Cell Trait and α (+)thalassemia.** *EBioMedicine* 1, 29-36, doi:10.1016/j.ebiom.2014.10.006 (2014).
- 100 Makani, J., Komba, A. N., Cox, S. E., Oruo, J., Mwamtemi, K., Kitundu, J., . . . Williams, T. N. **Malaria in patients with sickle cell anemia: burden, risk factors, and outcome at the outpatient clinic and during hospitalization.** *Blood* 115, 215-220, doi:10.1182/blood-2009-07-233528 (2010).
- 101 Williams, T. N., Mwangi, T. W., Roberts, D. J., Alexander, N. D., Weatherall, D. J., Wambua, S., . . . Marsh, K. **An immune basis for malaria protection by the sickle cell trait.** *Plos Medicine* 2, 441-445, doi:10.1371/journal.pmed.0020128 (2005).
- 102 Marsh, K., Otoo, L., Hayes, R. J., Carson, D. C. y Greenwood, B. M. **Antibodies to Blood Stage Antigens of Plasmodium-Falciparum in Rural Gambians and Their Relation to Protection against Infection.** *T Roy Soc Trop Med H* 83, 293-303, doi:10.1016/0035-9203(89)90478-1 (1989).
- 103 Verra, F., Simpo, J., Warimwe, G. M., Tetteh, K. K., Howard, T., Osier, F. H., . . . Modiano, D. **Haemoglobin C and S role in acquired immunity against Plasmodium falciparum malaria.** *PLoS One* 2, e978, doi:10.1371/journal.pone.0000978 (2007).
- 104 Miura, K., Diakite, M., Diouf, A., Doumbia, S., Konate, D., Keita, A. S., . . . Long, C. A. **Relationship between Malaria Incidence and IgG Levels to Plasmodium falciparum Merozoite Antigens in Malian Children: Impact of Hemoglobins S and C.** *Plos One* 8, e60182, doi:10.1371/journal.pone.0060182 (2013).
- 105 Gouagna, L. C., Bancone, G., Yao, F., Yameogo, B., Dabiré, K. R., Costantini, C., . . . Modiano, D. **Genetic variation in human HBB is associated with Plasmodium falciparum transmission.** *Nat Genet* 42, 328-331, doi:10.1038/ng.554 (2010).
- 106 Platt, O. S., Brambilla, D. J., Rosse, W. F., Milner, P. F., Castro, O., Steinberg, M. H. y Klug, P. P. **Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death.** *N Engl J Med* 330, 1639-1644, doi:10.1056/NEJM199406093302303 (1994).
- 107 Fischel-Ghodsian, N., Hirsch, P. C. y Bohlman, M. C. **Rapid detection of the hemoglobin C mutation by allele-specific polymerase chain reaction.** *Am J Hum Genet* 47, 1023-1024 (1990).
- 108 Allison, A. C. **Genetic factors in resistance to malaria.** *Ann N Y Acad Sci* 91, 710-729, doi:10.1111/j.1749-6632.1961.tb31102.x (1961).
- 109 Travassos, M. A., Coulibaly, D., Laurens, M. B., Dembele, A., Tolo, Y., Kone, A. K., . . . Thera, M. A. **Hemoglobin C Trait Provides Protection From Clinical Falciparum Malaria in Malian Children.** *J Infect Dis* 212, 1778-1786, doi:10.1093/infdis/jiv308 (2015).
- 110 Agarwal, A., Guindo, A., Cissoko, Y., Taylor, J. G., Coulibaly, D., Kone, A., . . . Diallo, D. **Hemoglobin C associated with protection from severe malaria in the Dogon of Mali, a**

- West African population with a low prevalence of hemoglobin S.** *Blood* 96, 2358-2363 (2000).
- 111 Rihet, P., Flori, L., Tall, F., Traore, A. S. y Fumoux, F. **Hemoglobin C is associated with reduced Plasmodium falciparum parasitemia and low risk of mild malaria attack.** *Hum Mol Genet* 13, 1-6, doi:10.1093/hmg/ddh002 (2004).
- 112 Fairhurst, R. M., Fujioka, H., Hayton, K., Collins, K. F. y Wellems, T. E. **Aberrant development of Plasmodium falciparum in hemoglobin CC red cells: implications for the malaria protective effect of the homozygous state.** *Blood* 101, 3309-3315, doi:10.1182/blood-2002-10-3105 (2003).
- 113 Fairhurst, R. M., Baruch, D. I., Brittain, N. J., Ostera, G. R., Wallach, J. S., Hoang, H. L., . . . Wellems, T. E. **Abnormal display of PfEMP-1 on erythrocytes carrying haemoglobin C may protect against malaria.** *Nature* 435, 1117-1121, doi:10.1038/nature03631 (2005).
- 114 Cappellini, M. D. y Fiorelli, G. **Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency.** *Lancet* 371, 64-74, doi:10.1016/S0140-6736(08)60073-2 (2008).
- 115 Mason, P. J., Bautista, J. M. y Gilsanz, F. **G6PD deficiency: the genotype-phenotype association.** *Blood Rev* 21, 267-283, doi:10.1016/j.blre.2007.05.002 (2007).
- 116 Luzzatto, L., Nannelli, C. y Notaro, R. **Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency.** *Hematol Oncol Clin North Am* 30, 373-393, doi:10.1016/j.hoc.2015.11.006 (2016).
- 117 Allison, A. C. **Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in red blood cells of East Africans.** *Nature* 186, 531-532, doi:10.1038/186531a0 (1960).
- 118 Motulsky, A. G. **Metabolic polymorphisms and the role of infectious diseases in human evolution.** *Hum Biol* 32, 28-62 (1960).
- 119 Ruwende, C., Khoo, S. C., Snow, R. W., Yates, S. N., Kwiatkowski, D., Gupta, S., . . . et al. **Natural selection of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria.** *Nature* 376, 246-249, doi:10.1038/376246a0 (1995).
- 120 Tishkoff, S. A., Varkonyi, R., Cahinhinan, N., Abbes, S., Argyropoulos, G., Destro-Bisol, G., . . . Clark, A. G. **Haplotype diversity and linkage disequilibrium at human G6PD: recent origin of alleles that confer malarial resistance.** *Science* 293, 455-462, doi:10.1126/science.1061573 (2001).
- 121 Howes, R. E., Piel, F. B., Patil, A. P., Nyangiri, O. A., Gething, P. W., Dewi, M., . . . Hay, S. I. **G6PD deficiency prevalence and estimates of affected populations in malaria endemic countries: a geostatistical model-based map.** *PLoS Med* 9, e1001339, doi:10.1371/journal.pmed.1001339 (2012).
- 122 Hirono, A. y Beutler, E. **Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human glucose-6-phosphate dehydrogenase variant A(-).** *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 3951-3954, doi:10.1073/pnas.85.11.3951 (1988).
- 123 Town, M., Bautista, J. M., Mason, P. J. y Luzzatto, L. **Both mutations in G6PD A- are necessary to produce the G6PD deficient phenotype.** *Hum Mol Genet* 1, 171-174, doi:10.1093/hmg/1.3.171 (1992).
- 124 Cappadoro, M., Giribaldi, G., O'Brien, E., Turrini, F., Mannu, F., Ulliers, D., . . . Arese, P. **Early phagocytosis of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient erythrocytes parasitized by Plasmodium falciparum may explain malaria protection in G6PD deficiency.** *Blood* 92, 2527-2534 (1998).
- 125 Méndez, D., Linares, M., Díez, A., Puyet, A. y Bautista, J. M. **Stress response and cytoskeletal proteins involved in erythrocyte membrane remodeling upon Plasmodium falciparum invasion are differentially carbonylated in G6PD A- deficiency.** *Free Radic Biol Med* 50, 1305-1313, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.02.024 (2011).
- 126 Ma, S., Cahalan, S., LaMonte, G., Grubaugh, N. D., Zeng, W., Murthy, S. E., . . . Patapoutian, A. **Common PIEZO1 Allele in African Populations Causes RBC Dehydration and Attenuates Plasmodium Infection.** *Cell* 173, 443-455 e412, doi:10.1016/j.cell.2018.02.047 (2018).

- 127 Nguetse, C. N., Purington, N., Ebel, E. R., Shakya, B., Tetard, M., Kremsner, P. G., . . . Egan, E. S. **A common polymorphism in the mechanosensitive ion channel PIEZO1 is associated with protection from severe malaria in humans.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 117, 9074-9081, doi:10.1073/pnas.1919843117 (2020).
- 128 Zarychanski, R., Schulz, V. P., Houston, B. L., Maksimova, Y., Houston, D. S., Smith, B., . . . Gallagher, P. G. **Mutations in the mechanotransduction protein PIEZO1 are associated with hereditary xerocytosis.** *Blood* 120, 1908-1915, doi:10.1182/blood-2012-04-422253 (2012).
- 129 Bruce, L. J. **Hereditary stomatocytosis and cation-leaky red cells--recent developments.** *Blood Cells Mol Dis* 42, 216-222, doi:10.1016/j.bcmd.2009.01.014 (2009).
- 130 Coste, B., Mathur, J., Schmidt, M., Earley, T. J., Ranade, S., Petrus, M. J., . . . Patapoutian, A. **Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels.** *Science* 330, 55-60, doi:10.1126/science.1193270 (2010).
- 131 Coste, B., Xiao, B., Santos, J. S., Syeda, R., Grandl, J., Spencer, K. S., . . . Patapoutian, A. **Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels.** *Nature* 483, 176-181, doi:10.1038/nature10812 (2012).
- 132 Wu, J., Lewis, A. H. y Grandl, J. **Touch, Tension, and Transduction - The Function and Regulation of Piezo Ion Channels.** *Trends Biochem Sci* 42, 57-71, doi:10.1016/j.tibs.2016.09.004 (2017).
- 133 Faucherre, A., Kissa, K., Nargeot, J., Mangoni, M. E. y Jopling, C. **Piezo1 plays a role in erythrocyte volume homeostasis.** *Haematologica* 99, 70-75, doi:10.3324/haematol.2013.086090 (2014).
- 134 Brugnara, C. **Erythrocyte dehydration in pathophysiology and treatment of sickle cell disease.** *Curr Opin Hematol* 2, 132-138, doi:10.1097/00062752-199502020-00005 (1995).
- 135 Tiffert, T., Lew, V. L., Ginsburg, H., Krugliak, M., Croisille, L. y Mohandas, N. **The hydration state of human red blood cells and their susceptibility to invasion by Plasmodium falciparum.** *Blood* 105, 4853-4860, doi:10.1182/blood-2004-12-4948 (2005).
- 136 Ma, S., Dubin, A. E., Zhang, Y., Mousavi, S. A. R., Wang, Y., Coombs, A. M., . . . Patapoutian, A. **A role of PIEZO1 in iron metabolism in mice and humans.** *Cell* 184, 969-982 e913, doi:10.1016/j.cell.2021.01.024 (2021).
- 137 Zanella, A., Fermo, E., Bianchi, P., Chiarelli, L. R. y Valentini, G. **Pyruvate kinase deficiency: the genotype-phenotype association.** *Blood Rev* 21, 217-231, doi:10.1016/j.blre.2007.01.001 (2007).
- 138 Ayi, K., Min-Oo, G., Serghides, L., Crockett, M., Kirby-Allen, M., Quirt, I., . . . Kain, K. C. **Pyruvate kinase deficiency and malaria.** *N Engl J Med* 358, 1805-1810, doi:10.1056/NEJMoa072464 (2008).
- 139 Durand, P. M. y Coetzer, T. L. **Pyruvate kinase deficiency protects against malaria in humans.** *Haematologica* 93, 939-940, doi:10.3324/haematol.12450 (2008).
- 140 Grace, R. F. y Barcellini, W. **Management of pyruvate kinase deficiency in children and adults.** *Blood* 136, 1241-1249, doi:10.1182/blood.2019000945 (2020).
- 141 Machado, P., Manco, L., Gomes, C., Mendes, C., Fernandes, N., Salome, G., . . . Arez, A. P. **Pyruvate kinase deficiency in sub-Saharan Africa: identification of a highly frequent missense mutation (G829A;Glu277Lys) and association with malaria.** *PLoS One* 7, e47071, doi:10.1371/journal.pone.0047071 (2012).
- 142 Min-Oo, G., Fortin, A., Tam, M. F., Nantel, A., Stevenson, M. M. y Gros, P. **Pyruvate kinase deficiency in mice protects against malaria.** *Nat Genet* 35, 357-362, doi:10.1038/ng1260 (2003).
- 143 Rochford, R. y Kazura, J. **Introduction: Immunity to malaria.** *Immunol Rev* 293, 5-7, doi:10.1111/imr.12831 (2020).

- 144 Doolan, D. L., Mu, Y., Unal, B., Sundaresh, S., Hirst, S., Valdez, C., . . . Felgner, P. L. **Profiling humoral immune responses to P-falciparum infection with protein microarrays.** *Proteomics* 8, 4680-4694, doi:10.1002/pmic.200800194 (2008).
- 145 Crompton, P. D., Moebius, J., Portugal, S., Waisberg, M., Hart, G., Garver, L. S., . . . Pierce, S. K. **Malaria immunity in man and mosquito: insights into unsolved mysteries of a deadly infectious disease.** *Annu Rev Immunol* 32, 157-187, doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120220 (2014).
- 146 Male, D., Brostoff, J., Roth, D. B. y Roitt, I. M. **Inmunología.** 8 edn, (Elsevier Saunders, 2013).
- 147 Abbas, A. K., Lichtman, A. H. y Pillai, S. **Inmunología celular y molecular.** 6 edn, (Elsevier Saunders, 2008).
- 148 Wykes, M. N., Liu, X. Q., Beattie, L., Stanisic, D. I., Stacey, K. J., Smyth, M. J., . . . Good, M. F. **Plasmodium strain determines dendritic cell function essential for survival from malaria.** *Plos Pathog* 3, e96, doi:10.1371/journal.ppat.0030096 (2007).
- 149 Stevenson, M. M. y Riley, E. M. **Innate immunity to malaria.** *Nat Rev Immunol* 4, 169-180, doi:10.1038/nri1311 (2004).
- 150 Regueiro González, J. R., López Larrea, C., González Rodríguez, S. y Martínez Naves, E. **Inmunología. Biología y patología del sistema inmune.** 3 edn, (Editorial Médica Paramericana, 2003).
- 151 Murphy, K., Travers, P. y Walport, M. **Inmunobiología de Janeway.** 7 edn, (McGraw-Hill, 2010).
- 152 Ma, H. y O'Kennedy, R. **The Structure of Natural and Recombinant Antibodies.** *Methods Mol Biol* 1348, 7-11, doi:10.1007/978-1-4939-2999-3_2 (2015).
- 153 Chi, X., Li, Y. y Qiu, X. **V(D)J recombination, somatic hypermutation and class switch recombination of immunoglobulins: mechanism and regulation.** *Immunology* 160, 233-247, doi:10.1111/imm.13176 (2020).
- 154 Yuseff, M. I., Pierobon, P., Reversat, A. y Lennon-Dumenil, A. M. **How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity.** *Nature Reviews Immunology* 13, 475-486, doi:10.1038/nri3469 (2013).
- 155 Palm, A. E. y Henry, C. **Remembrance of Things Past: Long-Term B Cell Memory After Infection and Vaccination.** *Front Immunol* 10, 1787, doi:10.3389/fimmu.2019.01787 (2019).
- 156 Nutt, S. L., Hodgkin, P. D., Tarlinton, D. M. y Corcoran, L. M. **The generation of antibody-secreting plasma cells.** *Nat Rev Immunol* 15, 160-171, doi:10.1038/nri3795 (2015).
- 157 Hwang, J. K., Alt, F. W. y Yeap, L. S. **Related Mechanisms of Antibody Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination.** *Microbiol Spectr* 3, Mdna3-0037-2014, doi:10.1128/microbiolspec.MDNA3-0037-2014 (2015).
- 158 Seifert, M. y Küppers, R. **Human memory B cells.** *Leukemia* 30, 2283-2292, doi:10.1038/leu.2016.226 (2016).
- 159 Brewer, J. W., Randall, T. D., Parkhouse, R. M. E. y Corley, R. B. **IgM hexamers?** *Immunology Today* 15, 165-168, doi:10.1016/0167-5699(94)90313-1 (1994).
- 160 Wipasa, J., Elliott, S., Xu, H. y Good, M. F. **Immunity to asexual blood stage malaria and vaccine approaches.** *Immunol Cell Biol* 80, 401-414, doi:10.1046/j.1440-1711.2002.01107.x (2002).
- 161 Beeson, J. G., Osier, F. H. A. y Engwerda, C. R. **Recent insights into humoral and cellular immune responses against malaria.** *Trends Parasitol* 24, 578-584, doi:10.1016/j.pt.2008.08.008 (2008).
- 162 King, C. L., Davies, D. H., Felgner, P., Baum, E., Jain, A., Randall, A., . . . Greenhouse, B. **Biosignatures of Exposure/Transmission and Immunity.** *Am J Trop Med Hyg* 93, 16-27, doi:10.4269/ajtmh.15-0037 (2015).
- 163 McCallum, F. J., Persson, K. E., Fowkes, F. J., Reiling, L., Mugenyi, C. K., Richards, J. S., . . . Beeson, J. G. **Differing rates of antibody acquisition to merozoite antigens in malaria:**

- implications for immunity and surveillance. *J Leukoc Biol* 101, 913-925, doi:10.1189/jlb.5MA0716-294R (2017).
- 164 Dent, A. E., Nakajima, R., Liang, L., Baum, E., Moormann, A. M., Sumba, P. O., . . . Kazura, J. W. **Plasmodium falciparum Protein Microarray Antibody Profiles Correlate With Protection From Symptomatic Malaria in Kenya.** *J Infect Dis* 212, 1429-1438, doi:10.1093/infdis/jiv224 (2015).
- 165 Crompton, P. D., Kayala, M. A., Traore, B., Kayentao, K., Ongoiba, A., Weiss, G. E., . . . Pierce, S. K. **A prospective analysis of the Ab response to Plasmodium falciparum before and after a malaria season by protein microarray.** *P Natl Acad Sci USA* 107, 6958-6963, doi:10.1073/pnas.1001323107 (2010).
- 166 Gonzales, S. J., Reyes, R. A., Braddom, A. E., Batugedara, G., Bol, S. y Bunnik, E. M. **Naturally Acquired Humoral Immunity Against Plasmodium falciparum Malaria.** *Frontiers in Immunology* 11, 594653, doi:10.3389/fimmu.2020.594653 (2020).
- 167 Volkman, S. K., Sabeti, P. C., DeCaprio, D., Neafsey, D. E., Schaffner, S. F., Milner, D. A., Jr., . . . Wirth, D. F. **A genome-wide map of diversity in Plasmodium falciparum.** *Nat Genet* 39, 113-119, doi:10.1038/ng1930 (2007).
- 168 Murungi, L. M., Kamuyu, G., Lowe, B., Bejon, P., Theisen, M., Kinyanjui, S. M., . . . Osier, F. H. A. **A threshold concentration of anti-merozoite antibodies is required for protection from clinical episodes of malaria.** *Vaccine* 31, 3936-3942, doi:10.1016/j.vaccine.2013.06.042 (2013).
- 169 Cohen, S., Mc, G. I. y Carrington, S. **Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria.** *Nature* 192, 733-737, doi:10.1038/192733a0 (1961).
- 170 Dobbs, K. R. y Dent, A. E. **Plasmodium malaria and antimalarial antibodies in the first year of life.** *Parasitology* 143, 129-138, doi:10.1017/s0031182015001626 (2016).
- 171 Charnaud, S. C., McGready, R., Herten-Crabb, A., Powell, R., Guy, A., Langer, C., . . . Fowkes, F. J. **Maternal-foetal transfer of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax antibodies in a low transmission setting.** *Sci Rep* 6, 20859, doi:10.1038/srep20859 (2016).
- 172 Chiu, C. Y. H., Hodder, A. N., Lin, C. S., Hill, D. L., Suen, C. S. N. L. W., Schofield, L., . . . Hansen, D. S. **Antibodies to the Plasmodium falciparum Proteins MSPDBL1 and MSPDBL2 Opsonize Merozoites, Inhibit Parasite Growth, and Predict Protection From Clinical Malaria.** *J Infect Dis* 212, 406-415, doi:10.1093/infdis/jiv057 (2015).
- 173 Chiu, C. Y. H., Healer, J., Thompson, J. K., Chen, L., Kaul, A., Savergave, L., . . . Hansen, D. S. **Association of antibodies to Plasmodium falciparum reticulocyte binding protein homolog 5 with protection from clinical malaria.** *Frontiers in Microbiology* 5, 314, doi:10.3389/fmicb.2014.00314 (2014).
- 174 Richards, J. S., Stanisic, D. I., Fowkes, F. J. I., Tavul, L., Dabod, E., Thompson, J. K., . . . Beeson, J. G. **Association between Naturally Acquired Antibodies to Erythrocyte-Binding Antigens of Plasmodium falciparum and Protection from Malaria and High-Density Parasitemia.** *Clin Infect Dis* 51, E50-E60, doi:10.1086/656413 (2010).
- 175 Fowkes, F. J. I., Richards, J. S., Simpson, J. A. y Beeson, J. G. **The Relationship between Anti-merozoite Antibodies and Incidence of Plasmodium falciparum Malaria: A Systematic Review and Meta-analysis.** *Plos Medicine* 7, e1000218, doi:10.1371/journal.pmed.1000218 (2010).
- 176 Tarlinton, D. y Good-Jacobson, K. **Diversity among memory B cells: origin, consequences, and utility.** *Science* 341, 1205-1211, doi:10.1126/science.1241146 (2013).
- 177 Wipasa, J., Suphailai, C., Okell, L. C., Cook, J., Corran, P. H., Thaikla, K., . . . Hafalla, J. C. **Long-lived antibody and B Cell memory responses to the human malaria parasites, Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax.** *Plos Pathog* 6, e1000770, doi:10.1371/journal.ppat.1000770 (2010).

- 178 Akpogheneta, O. J., Duah, N. O., Tetteh, K. K. A., Dunyo, S., Lanar, D. E., Pinder, M. y Conway, D. J. **Duration of naturally acquired antibody responses to blood-stage *Plasmodium falciparum* is age dependent and antigen specific.** *Infection and Immunity* 76, 1748-1755, doi:10.1128/iai.01333-07 (2008).
- 179 Thouvenel, C. D., Fontana, M. F., Netland, J., Krishnamurty, A. T., Takehara, K. K., Chen, Y., . . . Pepper, M. **Multimeric antibodies from antigen-specific human IgM+ memory B cells restrict *Plasmodium* parasites.** *J Exp Med* 218, e20200942, doi:10.1084/jem.20200942 (2021).
- 180 Krishnamurty, A. T., Thouvenel, C. D., Portugal, S., Keitany, G. J., Kim, K. S., Holder, A., . . . Pepper, M. **Somatically Hypermutated *Plasmodium*-Specific IgM(+) Memory B Cells Are Rapid, Plastic, Early Responders upon Malaria Rechallenge.** *Immunity* 45, 402-414, doi:10.1016/j.immuni.2016.06.014 (2016).
- 181 Stone, S. L. y Lund, F. E. **IgM Memory Cells: First Responders in Malaria.** *Immunity* 45, 235-237, doi:10.1016/j.immuni.2016.08.005 (2016).
- 182 Hopp, C. S., Sekar, P., Diouf, A., Miura, K., Boswell, K., Skinner, J., . . . Crompton, P. D. ***Plasmodium falciparum*-specific IgM B cells dominate in children, expand with malaria, and produce functional IgM.** *J Exp Med* 218, e20200901, doi:10.1084/jem.20200901 (2021).
- 183 Couper, K. N., Phillips, R. S., Brombacher, F. y Alexander, J. **Parasite-specific IgM plays a significant role in the protective immune response to asexual erythrocytic stage *Plasmodium chabaudi* AS infection.** *Parasite Immunol* 27, 171-180, doi:10.1111/j.1365-3024.2005.00760.x (2005).
- 184 Boyle, M. J., Chan, J. A., Handayani, I., Reiling, L., Feng, G., Hilton, A., . . . Beeson, J. G. **IgM in human immunity to *Plasmodium falciparum* malaria.** *Sci Adv* 5, eaax4489, doi:10.1126/sciadv.aax4489 (2019).
- 185 Kurtovic, L., Behet, M. C., Feng, G., Reiling, L., Chelimo, K., Dent, A. E., . . . Beeson, J. G. **Human antibodies activate complement against *Plasmodium falciparum* sporozoites, and are associated with protection against malaria in children.** *Bmc Med* 16, 61, doi:10.1186/s12916-018-1054-2 (2018).
- 186 Mbengue, B., Fall, M. M., Varela, M. L., Loucoubar, C., Joos, C., Fall, B., . . . Perraut, R. **Analysis of antibody responses to selected *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigens in mild and cerebral malaria and associations with clinical outcomes.** *Clin Exp Immunol* 196, 86-96, doi:10.1111/cei.13254 (2019).
- 187 Bolad, A., Farouk, S. E., Israelsson, E., Dolo, A., Doumbo, O. K., Nebié, I., . . . Troye-Blomberg, M. **Distinct interethnic differences in immunoglobulin G class/subclass and immunoglobulin M antibody responses to malaria antigens but not in immunoglobulin G responses to nonmalarial antigens in sympatric tribes living in West Africa.** *Scand J Immunol* 61, 380-386, doi:10.1111/j.1365-3083.2005.01587.x (2005).
- 188 Arama, C., Skinner, J., Doumtable, D., Portugal, S., Tran, T. M., Jain, A., . . . Crompton, P. D. **Genetic Resistance to Malaria Is Associated With Greater Enhancement of Immunoglobulin (Ig)M Than IgG Responses to a Broad Array of *Plasmodium falciparum* Antigens.** *Open Forum Infect Di* 2, ofv118, doi:10.1093/ofid/ofv118 (2015).
- 189 de Sousa-Pereira, P. y Woof, J. M. **IgA: Structure, Function, and Developability.** *Antibodies (Basel)* 8, 57, doi:10.3390/antib8040057 (2019).
- 190 Tyagi, P. y Biswas, S. **Naturally occurring plasmodia-specific circulating immune complexes in individuals of malaria endemic areas in India.** *Indian J Malariol* 36, 12-18 (1999).
- 191 Kassim, O. O., Ako-Anai, K. A., Torimiro, S. E., Hollowell, G. P., Okoye, V. C. y Martin, S. K. **Inhibitory factors in breastmilk, maternal and infant sera against in vitro growth of *Plasmodium falciparum* malaria parasite.** *J Trop Pediatr* 46, 92-96, doi:10.1093/tropej/46.2.92 (2000).

- 192 Leke, R. G., Ndansi, R., Southerland, N. J., Quakyi, I. A. y Taylor, D. W. **Identification of anti-Plasmodium falciparum antibodies in human breast milk.** *Scand J Immunol Suppl* 11, 17-22, doi:10.1111/j.1365-3083.1992.tb01612.x (1992).
- 193 Berry, A. A., Obiero, J. M., Travassos, M. A., Ouattara, A., Coulibaly, D., Adams, M., . . . Lyke, K. E. **Immunoprofiles associated with controlled human malaria infection and naturally acquired immunity identify a shared IgA pre-erythrocytic immunoproteome.** *NPJ Vaccines* 6, 115, doi:10.1038/s41541-021-00363-y (2021).
- 194 Duah, N. O., Miles, D. J., Whittle, H. C. y Conway, D. J. **Acquisition of antibody isotypes against Plasmodium falciparum blood stage antigens in a birth cohort.** *Parasite Immunol* 32, 125-134, doi:10.1111/j.1365-3024.2009.01165.x (2010).
- 195 Tan, J., Cho, H., Pholcharee, T., Pereira, L. S., Doumbo, S., Doumtabe, D., . . . Crompton, P. D. **Functional human IgA targets a conserved site on malaria sporozoites.** *Sci Transl Med* 13, eabg2344, doi:10.1126/scitranslmed.abg2344 (2021).
- 196 Wilson, N. O., Adjei, A. A., Anderson, W., Baidoo, S. y Stiles, J. K. **Detection of Plasmodium falciparum histidine-rich protein II in saliva of malaria patients.** *Am J Trop Med Hyg* 78, 733-735 (2008).
- 197 Shi, J., McIntosh, R. S., Adame-Gallegos, J., Dehal, P. K., van Egmond, M., van de Winkel, J., . . . Pleass, R. J. **The generation and evaluation of recombinant human IgA specific for Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1-19 (PfMSP1 19).** *BMC Biotechnol* 11, 77, doi:10.1186/1472-6750-11-77 (2011).
- 198 Valmaseda, A., Macete, E., Nhabomba, A., Guinovart, C., Aide, P., Bardají, A., . . . Mayor, A. **Identifying Immune Correlates of Protection Against Plasmodium falciparum Through a Novel Approach to Account for Heterogeneity in Malaria Exposure.** *Clin Infect Dis* 66, 586-593, doi:10.1093/cid/cix837 (2018).
- 199 Mayor, A., Dobaño, C., Nhabomba, A., Guinovart, C., Jiménez, A., Manaca, M. N., . . . Alonso, P. L. **IgM and IgG against Plasmodium falciparum lysate as surrogates of malaria exposure and protection during pregnancy.** *Malar J* 17, 182, doi:10.1186/s12936-018-2331-4 (2018).
- 200 Adamou, R., Dechavanne, C., Sadissou, I., d'Almeida, T., Bouraima, A., Sonon, P., . . . Courtin, D. **Plasmodium falciparum merozoite surface antigen-specific cytophilic IgG and control of malaria infection in a Beninese birth cohort.** *Malar J* 18, 194, doi:10.1186/s12936-019-2831-x (2019).
- 201 Drakeley, C. J., Corran, P. H., Coleman, P. G., Tongren, J. E., McDonald, S. L. R., Carneiro, I., . . . Riley, E. M. **Estimating medium- and long-term trends in malaria transmission by using serological markers of malaria exposure.** *P Natl Acad Sci USA* 102, 5108-5113, doi:10.1073/pnas.0408725102 (2005).
- 202 Drakeley, C. y Cook, J. **Chapter 5. Potential contribution of sero-epidemiological analysis for monitoring malaria control and elimination: historical and current perspectives.** *Adv Parasitol* 69, 299-352, doi:10.1016/s0065-308x(09)69005-9 (2009).
- 203 Yman, V., White, M. T., Asghar, M., Sundling, C., Sonden, K., Draper, S. J., . . . Farnert, A. **Antibody responses to merozoite antigens after natural Plasmodium falciparum infection: kinetics and longevity in absence of re-exposure.** *Bmc Med* 17, 22, doi:10.1186/s12916-019-1255-3 (2019).
- 204 Kyei-Baafour, E., Oppong, M., Kusi, K. A., Frempong, A. F., Aculley, B., Arthur, F. K. N., . . . Ofori, M. F. **Suitability of IgG responses to multiple Plasmodium falciparum antigens as markers of transmission intensity and pattern.** *PLoS One* 16, e0249936, doi:10.1371/journal.pone.0249936 (2021).
- 205 Liu, E. W., Skinner, J., Tran, T. M., Kumar, K., Narum, D. L., Jain, A., . . . Crompton, P. D. **Protein-Specific Features Associated with Variability in Human Antibody Responses to Plasmodium falciparum Malaria Antigens.** *Am J Trop Med Hyg* 98, 57-66, doi:10.4269/ajtmh.17-0437 (2018).

- 206 Wahlgren, M., Goel, S. y Akhouri, R. R. **Variant surface antigens of Plasmodium falciparum and their roles in severe malaria.** *Nat Rev Microbiol* 15, 479-491, doi:10.1038/nrmicro.2017.47 (2017).
- 207 Kanoi, B. N., Nagaoka, H., White, M. T., Morita, M., Palacpac, N. M. Q., Ntege, E. H., . . . Takashima, E. **Global Repertoire of Human Antibodies Against Plasmodium falciparum RIFINs, SURFINs, and STEVORs in a Malaria Exposed Population.** *Front Immunol* 11, 893, doi:10.3389/fimmu.2020.00893 (2020).
- 208 Hviid, L. y Jensen, A. T. **PfEMP1 - A Parasite Protein Family of Key Importance in Plasmodium falciparum Malaria Immunity and Pathogenesis.** *Adv Parasitol* 88, 51-84, doi:10.1016/bs.apar.2015.02.004 (2015).
- 209 Bautista, J. M., Marín-García, P., Diez, A., Azcárate, I. G. y Puyet, A. **Malaria proteomics: insights into the parasite-host interactions in the pathogenic space.** *J Proteomics* 97, 107-125, doi:10.1016/j.jprot.2013.10.011 (2014).
- 210 Chan, J. A., Boyle, M. J., Moore, K. A., Reiling, L., Lin, Z., Hasang, W., . . . Beeson, J. G. **Antibody Targets on the Surface of Plasmodium falciparum-Infected Erythrocytes That Are Associated With Immunity to Severe Malaria in Young Children.** *J Infect Dis* 219, 819-828, doi:10.1093/infdis/jiy580 (2019).
- 211 Duffy, M. F., Noviyanti, R., Tsuboi, T., Feng, Z. P., Trianty, L., Sebayang, B. F., . . . Papenfuss, A. T. **Differences in PfEMP1s recognized by antibodies from patients with uncomplicated or severe malaria.** *Malar J* 15, 258, doi:10.1186/s12936-016-1296-4 (2016).
- 212 Tessema, S. K., Nakajima, R., Jasinskas, A., Monk, S. L., Lekieffre, L., Lin, E., . . . Barry, A. E. **Protective Immunity against Severe Malaria in Children Is Associated with a Limited Repertoire of Antibodies to Conserved PfEMP1 Variants.** *Cell Host Microbe* 26, 579-+, doi:10.1016/j.chom.2019.10.012 (2019).
- 213 Travassos, M. A., Niangaly, A., Bailey, J. A., Ouattara, A., Coulibaly, D., Lyke, K. E., . . . Plowe, C. V. **Children with cerebral malaria or severe malarial anaemia lack immunity to distinct variant surface antigen subsets.** *Sci Rep* 8, 6281, doi:10.1038/s41598-018-24462-4 (2018).
- 214 Chan, J. A., Howell, K. B., Reiling, L., Ataide, R., Mackintosh, C. L., Fowkes, F. J., . . . Beeson, J. G. **Targets of antibodies against Plasmodium falciparum-infected erythrocytes in malaria immunity.** *J Clin Invest* 122, 3227-3238, doi:10.1172/JCI62182 (2012).
- 215 Petter, M., Haeggstroem, M., Khattab, A., Fernandez, V., Klinkert, M. Q. y Wahlgren, M. **Variant proteins of the Plasmodium falciparum RIFIN family show distinct subcellular localization and developmental expression patterns.** *Mol Biochem Parasit* 156, 51-61, doi:10.1016/j.molbiopara.2007.07.011 (2007).
- 216 Saito, F., Hirayasu, K., Satoh, T., Wang, C. W., Lusingu, J., Arimori, T., . . . Arase, H. **Immune evasion of Plasmodium falciparum by RIFIN via inhibitory receptors.** *Nature* 552, 101-105, doi:10.1038/nature24994 (2017).
- 217 Zhou, A. E., Berry, A. A., Bailey, J. A., Pike, A., Dara, A., Agrawal, S., . . . Travassos, M. A. **Antibodies to Peptides in Semiconserved Domains of RIFINs and STEVORs Correlate with Malaria Exposure.** *mSphere* 4, e00097-00019, doi:10.1128/mSphere.00097-19 (2019).
- 218 Abdel-Latif, M. S., Dietz, K., Issifou, S., Kremsner, P. G. y Klinkert, M. Q. **Antibodies to Plasmodium falciparum rifin proteins are associated with rapid parasite clearance and asymptomatic infections.** *Infect Immun* 71, 6229-6233, doi:10.1128/IAI.71.11.6229-6233.2003 (2003).
- 219 Wichers, J. S., Scholz, J. A. M., Strauss, J., Witt, S., Lill, A., Ehnold, L. I., . . . Bachmann, A. **Dissecting the Gene Expression, Localization, Membrane Topology, and Function of the Plasmodium falciparum STEVOR Protein Family.** *mBio* 10, e01500-01519, doi:10.1128/mBio.01500-19 (2019).

- 220 Sanyal, S., Egee, S., Bouyer, G., Perrot, S., Safeukui, I., Bischoff, E., . . . Lavazec, C. **Plasmodium falciparum STEVOR proteins impact erythrocyte mechanical properties.** *Blood* 119, e1-8, doi:10.1182/blood-2011-08-370734 (2012).
- 221 Beeson, J. G., Drew, D. R., Boyle, M. J., Feng, G., Fowkes, F. J. y Richards, J. S. **Merozoite surface proteins in red blood cell invasion, immunity and vaccines against malaria.** *FEMS Microbiol Rev* 40, 343-372, doi:10.1093/femsre/fuw001 (2016).
- 222 Richards, J. S., Arumugam, T. U., Reiling, L., Healer, J., Hodder, A. N., Fowkes, F. J., . . . Beeson, J. G. **Identification and prioritization of merozoite antigens as targets of protective human immunity to Plasmodium falciparum malaria for vaccine and biomarker development.** *J Immunol* 191, 795-809, doi:10.4049/jimmunol.1300778 (2013).
- 223 de Macedo, C. S., Shams-Eldin, H., Smith, T. K., Schwarz, R. T. y Azzouz, N. **Inhibitors of glycosyl-phosphatidylinositol anchor biosynthesis.** *Biochimie* 85, 465-472, doi:10.1016/s0300-9084(03)00065-8 (2003).
- 224 Greenhouse, B., Ho, B., Hubbard, A., Njama-Meya, D., Narum, D. L., Lanar, D. E., . . . John, C. C. **Antibodies to Plasmodium falciparum antigens predict a higher risk of malaria but protection from symptoms once parasitemic.** *J Infect Dis* 204, 19-26, doi:10.1093/infdis/jir223 (2011).
- 225 Sheehy, S. H., Duncan, C. J., Elias, S. C., Collins, K. A., Ewer, K. J., Spencer, A. J., . . . Draper, S. J. **Phase Ia clinical evaluation of the Plasmodium falciparum blood-stage antigen MSP1 in ChAd63 and MVA vaccine vectors.** *Mol Ther* 19, 2269-2276, doi:10.1038/mt.2011.176 (2011).
- 226 Lyon, J. A., Angov, E., Fay, M. P., Sullivan, J. S., Girourd, A. S., Robinson, S. J., . . . Barnwell, J. W. **Protection induced by Plasmodium falciparum MSP1(42) is strain-specific, antigen and adjuvant dependent, and correlates with antibody responses.** *PLoS One* 3, e2830, doi:10.1371/journal.pone.0002830 (2008).
- 227 Diggs, C. L., Ballou, W. R. y Miller, L. H. **The major merozoite surface protein as a malaria vaccine target.** *Parasitol Today* 9, 300-302, doi:10.1016/0169-4758(93)90130-8 (1993).
- 228 Genton, B., Al-Yaman, F., Betuela, I., Anders, R. F., Saul, A., Baea, K., . . . Alpers, M. P. **Safety and immunogenicity of a three-component blood-stage malaria vaccine (MSP1, MSP2, RESA) against Plasmodium falciparum in Papua New Guinean children.** *Vaccine* 22, 30-41, doi:10.1016/s0264-410x(03)00536-x (2003).
- 229 Reiling, L., Boyle, M. J., White, M. T., Wilson, D. W., Feng, G. Q., Weaver, R., . . . Beeson, J. G. **Targets of complement-fixing antibodies in protective immunity against malaria in children.** *Nat Commun* 10, 610, doi:10.1038/s41467-019-08528-z (2019).
- 230 Kaneko, O. **Erythrocyte invasion: vocabulary and grammar of the Plasmodium rhoptry.** *Parasitol Int* 56, 255-262, doi:10.1016/j.parint.2007.05.003 (2007).
- 231 Counihan, N. A., Kalanon, M., Coppel, R. L. y de Koning-Ward, T. F. **Plasmodium rhoptry proteins: why order is important.** *Trends Parasitol* 29, 228-236, doi:10.1016/j.pt.2013.03.003 (2013).
- 232 Iriko, H., Kaneko, O., Otsuki, H., Tsuboi, T., Su, X. Z., Tanabe, K. y Torii, M. **Diversity and evolution of the rhoph1/clag multigene family of Plasmodium falciparum.** *Mol Biochem Parasitol* 158, 11-21, doi:10.1016/j.molbiopara.2007.11.004 (2008).
- 233 Cowman, A. F. y Crabb, B. S. **Invasion of red blood cells by malaria parasites.** *Cell* 124, 755-766, doi:10.1016/j.cell.2006.02.006 (2006).
- 234 Lal, K., Prieto, J. H., Bromley, E., Sanderson, S. J., Yates, J. R., 3rd, Wastling, J. M., . . . Sinden, R. E. **Characterisation of Plasmodium invasive organelles; an ookinete microneme proteome.** *Proteomics* 9, 1142-1151, doi:10.1002/pmic.200800404 (2009).
- 235 Arumugam, T. U., Takeo, S., Yamasaki, T., Thonkukiatkul, A., Miura, K., Otsuki, H., . . . Tsuboi, T. **Discovery of GAMA, a Plasmodium falciparum merozoite micronemal protein, as a novel blood-stage vaccine candidate antigen.** *Infect Immun* 79, 4523-4532, doi:10.1128/iai.05412-11 (2011).

- 236 Naung, M. T., Martin, E., Munro, J., Mehra, S., Guy, A. J., Laman, M., . . . Barry, A. E. **Global diversity and balancing selection of 23 leading *Plasmodium falciparum* candidate vaccine antigens.** *PLoS Comput Biol* 18, e1009801, doi:10.1371/journal.pcbi.1009801 (2022).
- 237 Iriemenam, N. C., Khirelsied, A. H., Nasr, A., ElGhazali, G., Giha, H. A., Elhassan, A. E. T. M., . . . Berzins, K. **Antibody responses to a panel of *Plasmodium falciparum* malaria blood-stage antigens in relation to clinical disease outcome in Sudan.** *Vaccine* 27, 62-71, doi:10.1016/j.vaccine.2008.10.025 (2009).
- 238 Ambroggio, X., Jiang, L., Aebig, J., Obiakor, H., Lukszo, J. y Narum, D. L. **The epitope of monoclonal antibodies blocking erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum* map to the dimerization and receptor glycan binding sites of EBA-175.** *PLoS One* 8, e56326, doi:10.1371/journal.pone.0056326 (2013).
- 239 Sheehy, S. H., Duncan, C. J., Elias, S. C., Choudhary, P., Biswas, S., Halstead, F. D., . . . Draper, S. J. **ChAd63-MVA-vectored blood-stage malaria vaccines targeting MSP1 and AMA1: assessment of efficacy against mosquito bite challenge in humans.** *Mol Ther* 20, 2355-2368, doi:10.1038/mt.2012.223 (2012).
- 240 El Sahly, H. M., Patel, S. M., Atmar, R. L., Lanford, T. A., Dube, T., Thompson, D., . . . Keitel, W. A. **Safety and immunogenicity of a recombinant nonglycosylated erythrocyte binding antigen 175 Region II malaria vaccine in healthy adults living in an area where malaria is not endemic.** *Clin Vaccine Immunol* 17, 1552-1559, doi:10.1128/cvi.00082-10 (2010).
- 241 Knapp, B., Nau, U., Hundt, E. y Kupper, H. A. **A new blood stage antigen of *Plasmodium falciparum* highly homologous to the serine-stretch protein SERP.** *Mol Biochem Parasitol* 44, 1-13, doi:10.1016/0166-6851(91)90215-r (1991).
- 242 Palacpac, N. M., Ntege, E., Yeka, A., Balikagala, B., Suzuki, N., Shirai, H., . . . Horii, T. **Phase 1b randomized trial and follow-up study in Uganda of the blood-stage malaria vaccine candidate BK-SE36.** *PLoS One* 8, e64073, doi:10.1371/journal.pone.0064073 (2013).
- 243 Horii, T., Shirai, H., Jie, L., Ishii, K. J., Palacpac, N. Q., Tougan, T., . . . Takahashi, M. **Evidences of protection against blood-stage infection of *Plasmodium falciparum* by the novel protein vaccine SE36.** *Parasitol Int* 59, 380-386, doi:10.1016/j.parint.2010.05.002 (2010).
- 244 Theisen, M., Soe, S., Oeuvray, C., Thomas, A. W., Vuust, J., Danielsen, S., . . . Druilhe, P. **The glutamate-rich protein (GLURP) of *Plasmodium falciparum* is a target for antibody-dependent monocyte-mediated inhibition of parasite growth in vitro.** *Infection and Immunity* 66, 11-17, doi:Doi 10.1128/lai.66.1.11-17.1998 (1998).
- 245 Mbabazi, P., Hopkins, H., Osilo, E., Kalungu, M., Byakika-Kibwika, P. y Kamya, M. R. **Accuracy of two malaria rapid diagnostic tests (RDTs) for initial diagnosis and treatment monitoring in a high transmission setting in Uganda.** *Am J Trop Med Hyg* 92, 530-536, doi:10.4269/ajtmh.14-0180 (2015).
- 246 Boyce, R., Reyes, R., Matte, M., Ntaro, M., Mulogo, E. y Siedner, M. J. **Use of a Dual-Antigen Rapid Diagnostic Test to Screen Children for Severe *Plasmodium falciparum* Malaria in a High-Transmission, Resource-Limited Setting.** *Clin Infect Dis* 65, 1509-1515, doi:10.1093/cid/cix592 (2017).
- 247 Poti, K. E., Sullivan, D. J., Dondorp, A. M. y Woodrow, C. J. **HRP2: Transforming Malaria Diagnosis, but with Caveats.** *Trends Parasitol* 36, 112-126, doi:10.1016/j.pt.2019.12.004 (2020).
- 248 Shiff, C. J., Premji, Z. y Minjas, J. N. **The rapid manual ParaSight-F test. A new diagnostic tool for *Plasmodium falciparum* infection.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87, 646-648, doi:10.1016/0035-9203(93)90273-s (1993).
- 249 Beadle, C., Long, G. W., Weiss, W. R., McElroy, P. D., Maret, S. M., Oloo, A. J. y Hoffman, S. L. **Diagnosis of malaria by detection of *Plasmodium falciparum* HRP-2 antigen with**

- a rapid dipstick antigen-capture assay. *Lancet* 343, 564-568, doi:10.1016/s0140-6736(94)91520-2 (1994).
- 250 Kong, A., Wilson, S. A., Ah, Y., Nace, D., Rogier, E. y Aidoo, M. **HRP2 and HRP3 cross-reactivity and implications for HRP2-based RDT use in regions with *Plasmodium falciparum* hrp2 gene deletions.** *Malar J* 20, 207, doi:10.1186/s12936-021-03739-6 (2021).
- 251 Laganá, G., Barreca, D., Calderaro, A. y Bellocco, E. **Lactate Dehydrogenase Inhibition: Biochemical Relevance and Therapeutical Potential.** *Curr Med Chem* 26, 3242-3252, doi:10.2174/0929867324666170209103444 (2019).
- 252 Bell, D., Wongsrichanalai, C. y Barnwell, J. W. **Ensuring quality and access for malaria diagnosis: how can it be achieved?** *Nat Rev Microbiol* 4, 682-695, doi:10.1038/nrmicro1474 (2006).
- 253 World Health Organization. **Malaria Rapid Diagnostic Test Performance.** (2016-2018).
- 254 Thezenas, M. L., Huang, H., Njie, M., Ramaprasad, A., Nwakanma, D. C., Fischer, R., . . . Casals-Pascual, C. **PfHPRT: a new biomarker candidate of acute *Plasmodium falciparum* infection.** *J Proteome Res* 12, 1211-1222, doi:10.1021/pr300858g (2013).
- 255 Krause, R. G. E., Hurdal, R., Choveaux, D., Przyborski, J. M., Coetzer, T. H. T. y Goldring, J. P. D. ***Plasmodium* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: A potential malaria diagnostic target.** *Exp Parasitol* 179, 7-19, doi:10.1016/j.exppara.2017.05.007 (2017).
- 256 Lim, K. J., Park, J. W., Yeom, J. S., Lee, Y. H., Yoo, S. B., Oh, J. H., . . . Kim, Y. S. **Humoral responses against the C-terminal region of merozoite surface protein 1 can be remembered for more than 30 years in persons exposed to *Plasmodium vivax*.** *Parasitol Res* 92, 384-389, doi:10.1007/s00436-003-1009-0 (2004).
- 257 Zimmerman, P. A. y Howes, R. E. **Malaria diagnosis for malaria elimination.** *Curr Opin Infect Dis* 28, 446-454, doi:10.1097/QCO.000000000000191 (2015).
- 258 Park, J. W., Yoo, S. B., Oh, J. H., Yeom, J. S., Lee, Y. H., Bahk, Y. Y., . . . Lim, K. J. **Diagnosis of vivax malaria using an IgM capture ELISA is a sensitive method, even for low levels of parasitemia.** *Parasitol Res* 103, 625-631, doi:10.1007/s00436-008-1023-3 (2008).
- 259 Kassegne, K., Abe, E. M., Cui, Y. B., Chen, S. B., Xu, B., Deng, W. P., . . . Zhou, X. N. **Contribution of *Plasmodium* immunomics: potential impact for serological testing and surveillance of malaria.** *Expert Rev Proteomics* 16, 117-129, doi:10.1080/14789450.2019.1554441 (2019).
- 260 Bousema, T., Youssef, R. M., Cook, J., Cox, J., Alegana, V. A., Amran, J., . . . Drakeley, C. **Serologic markers for detecting malaria in areas of low endemicity, Somalia, 2008.** *Emerg Infect Dis* 16, 392-399, doi:10.3201/eid1603.090732 (2010).
- 261 van den Hoogen, L. L., Walk, J., Oulton, T., Reuling, I. J., Reiling, L., Beeson, J. G., . . . Tetteh, K. K. A. **Antibody Responses to Antigenic Targets of Recent Exposure Are Associated With Low-Density Parasitemia in Controlled Human *Plasmodium falciparum* Infections.** *Front Microbiol* 9, 3300, doi:10.3389/fmicb.2018.03300 (2018).
- 262 Helb, D. A., Tetteh, K. K., Felgner, P. L., Skinner, J., Hubbard, A., Arinaitwe, E., . . . Greenhouse, B. **Novel serologic biomarkers provide accurate estimates of recent *Plasmodium falciparum* exposure for individuals and communities.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E4438-4447, doi:10.1073/pnas.1501705112 (2015).
- 263 World Health Organization. **World Malaria report 2018, Ghana country profile.**, (2018).
- 264 Schwartz, A., Baidjoe, A., Rosenthal, P. J., Dorsey, G., Bousema, T. y Greenhouse, B. **The Effect of Storage and Extraction Methods on Amplification of *Plasmodium falciparum* DNA from Dried Blood Spots.** *Am J Trop Med Hyg* 92, 922-925, doi:10.4269/ajtmh.14-0602 (2015).
- 265 Chaorattanakawee, S., Natalang, O., Hananantachai, H., Nacher, M., Brockman, A., Krudsood, S., . . . Patarapotikul, J. **Storage duration and polymerase chain reaction detection of *Plasmodium falciparum* from blood spots on filter paper.** *Am J Trop Med Hyg* 69, 42-44 (2003).

- 266 Okai, C. A., Wölter, M., Russ, M., Koy, C., Petre, B. A., Rath, W., . . . Glocker, M. O. **Profiling of intact blood proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry without the need for freezing - Dried serum spots as future clinical tools for patient screening.** *Rapid Commun Mass Spectrom* 35, e9121, doi:10.1002/rcm.9121 (2021).
- 267 World Health Organization. **World Malaria report 2018, Democratic Republic of Congo country profile.**, (2018).
- 268 Rantala, A. M., Taylor, S. M., Trottman, P. A., Luntamo, M., Mbewe, B., Maleta, K., . . . Meshnick, S. R. **Comparison of real-time PCR and microscopy for malaria parasite detection in Malawian pregnant women.** *Malar J* 9, 269, doi:10.1186/1475-2875-9-269 (2010).
- 269 Radfar, A., Méndez, D., Moneriz, C., Linares, M., Marín-García, P., Puyet, A., . . . Bautista, J. M. **Synchronous culture of Plasmodium falciparum at high parasitemia levels.** *Nat Protoc* 4, 1899-1915, doi:10.1038/nprot.2009.198 (2009).
- 270 Linares, M., Albizua, E., Mendez, D., Rubio, J. M., Martinez-Serna, A., Martinez, M. A., . . . Bautista, J. M. **Malaria hidden in a patient with diffuse large-B-cell lymphoma and sickle-cell trait.** *J Clin Microbiol* 49, 4401-4404, doi:10.1128/JCM.00911-11 (2011).
- 271 Bradford, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem* 72, 248-254, doi:10.1006/abio.1976.9999 (1976).
- 272 Corran, P. H., Cook, J., Lynch, C., Leendertse, H., Manjurano, A., Griffin, J., . . . Riley, E. **Dried blood spots as a source of anti-malarial antibodies for epidemiological studies.** *Malaria J* 7, 195, doi:10.1186/1475-2875-7-195 (2008).
- 273 Sanger, F. y Coulson, A. R. **A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase.** *J Mol Biol* 94, 441-448, doi:10.1016/0022-2836(75)90213-2 (1975).
- 274 Aebersold, R. y Mann, M. **Mass spectrometry-based proteomics.** *Nature* 422, 198-207, doi:10.1038/nature01511 (2003).
- 275 Sechi, S. y Chait, B. T. **Modification of cysteine residues by alkylation. A tool in peptide mapping and protein identification.** *Anal Chem* 70, 5150-5158, doi:10.1021/ac9806005 (1998).
- 276 Kim, S. y Pevzner, P. A. **MS-GF+ makes progress towards a universal database search tool for proteomics.** *Nat Commun* 5, 5277, doi:10.1038/ncomms6277 (2014).
- 277 Elias, J. E. y Gygi, S. P. **Target-decoy search strategy for mass spectrometry-based proteomics.** *Methods Mol Biol* 604, 55-71, doi:10.1007/978-1-60761-444-9_5 (2010).
- 278 da Veiga Leprevost, F., Haynes, S. E., Avtonomov, D. M., Chang, H. Y., Shanmugam, A. K., Mellacheruvu, D., . . . Nesvizhskii, A. I. **Philosopher: a versatile toolkit for shotgun proteomics data analysis.** *Nat Methods* 17, 869-870, doi:10.1038/s41592-020-0912-y (2020).
- 279 Fermin, D., Basrur, V., Yocum, A. K. y Nesvizhskii, A. I. **Abacus: a computational tool for extracting and pre-processing spectral count data for label-free quantitative proteomic analysis.** *Proteomics* 11, 1340-1345, doi:10.1002/pmic.201000650 (2011).
- 280 Wootton, J. C. y Federhen, S. **Statistics of Local Complexity in Amino-Acid-Sequences and Sequence Databases.** *Comput Chem* 17, 149-163, doi:Doi 10.1016/0097-8485(93)85006-X (1993).
- 281 Tusnády, G. E. y Simon, I. **Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction.** *J Mol Biol* 283, 489-506, doi:10.1006/jmbi.1998.2107 (1998).
- 282 Hansen, L. B., Buus, S. y Schafer-Nielsen, C. **Identification and mapping of linear antibody epitopes in human serum albumin using high-density Peptide arrays.** *PLoS One* 8, e68902, doi:10.1371/journal.pone.0068902 (2013).

- 283 Chen, H. y Boutros, P. C. **VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R.** *BMC Bioinformatics* 12, 35, doi:10.1186/1471-2105-12-35 (2011).
- 284 Yu, G., Wang, L. G., Han, Y. y He, Q. Y. **clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters.** *Omics* 16, 284-287, doi:10.1089/omi.2011.0118 (2012).
- 285 Howick, V. M., Russell, A. J. C., Andrews, T., Heaton, H., Reid, A. J., Natarajan, K., . . . Lawniczak, M. K. N. **The Malaria Cell Atlas: Single parasite transcriptomes across the complete Plasmodium life cycle.** *Science* 365, eaaw2619, doi:10.1126/science.aaw2619 (2019).
- 286 Huber, W., von Heydebreck, A., Sultmann, H., Poustka, A. y Vingron, M. **Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression.** *Bioinformatics* 18 Suppl 1, S96-104, doi:10.1093/bioinformatics/18.suppl_1.s96 (2002).
- 287 Zhang, X., Smits, A. H., van Tilburg, G. B., Ovaa, H., Huber, W. y Vermeulen, M. **Proteome-wide identification of ubiquitin interactions using UbIA-MS.** *Nat Protoc* 13, 530-550, doi:10.1038/nprot.2017.147 (2018).
- 288 Kolde, R. *Pheatmap: pretty heatmaps. R package version 1.0.12*, <<https://CRAN.R-project.org/package=pheatmap>> (2019).
- 289 Kassambara, A. y Mundt, F. *Factoextra: Extract and visualize the results of multivariate data analyses. R package version 1.0.7*, <<https://CRAN.R-project.org/package=factoextra>> (2020).
- 290 Oyong, D. A., Loughland, J. R., Soon, M. S. F., Chan, J. A., Andrew, D., Wines, B. D., . . . Boyle, M. J. **Adults with Plasmodium falciparum malaria have higher magnitude and quality of circulating T-follicular helper cells compared to children.** *EBioMedicine* 75, 103784, doi:10.1016/j.ebiom.2021.103784 (2021).
- 291 Baird, J. K., Jones, T. R., Danudirgo, E. W., Annis, B. A., Bangs, M. J., Basri, H., . . . Masbar, S. **Age-dependent acquired protection against Plasmodium falciparum in people having two years exposure to hyperendemic malaria.** *Am J Trop Med Hyg* 45, 65-76, doi:10.4269/ajtmh.1991.45.65 (1991).
- 292 Biswas, S., Choudhary, P., Elias, S. C., Miura, K., Milne, K. H., de Cassan, S. C., . . . Draper, S. J. **Assessment of humoral immune responses to blood-stage malaria antigens following ChAd63-MVA immunization, controlled human malaria infection and natural exposure.** *PLoS One* 9, e107903, doi:10.1371/journal.pone.0107903 (2014).
- 293 Perkins, M. D. y Bell, D. R. **Working without a blindfold: the critical role of diagnostics in malaria control.** *Malar J* 7 Suppl 1, S5, doi:10.1186/1475-2875-7-s1-s5 (2008).
- 294 WHO. **Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity.** *Vitamin and Mineral Nutrition Information System.* WHO/NMH/NHD/MNM/11.1 (2011).
- 295 Antrobus, R. y Borner, G. H. **Improved elution conditions for native co-immunoprecipitation.** *PLoS One* 6, e18218, doi:10.1371/journal.pone.0018218 (2011).
- 296 Kaboord, B., Smith, S., Patel, B. y Meier, S. **Enrichment of low-abundant protein targets by immunoprecipitation upstream of mass spectrometry.** *Methods Mol Biol* 1295, 135-151, doi:10.1007/978-1-4939-2550-6_12 (2015).
- 297 Sakuma, C., Tomioka, Y., Li, C., Shibata, T., Nakagawa, M., Kurosawa, Y., . . . Akuta, T. **Analysis of protein denaturation, aggregation and post-translational modification by agarose native gel electrophoresis.** *Int J Biol Macromol* 172, 589-596, doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.01.075 (2021).
- 298 Timp, W. y Timp, G. **Beyond mass spectrometry, the next step in proteomics.** *Sci Adv* 6, eaax8978, doi:10.1126/sciadv.aax8978 (2020).
- 299 Proietti, C., Krause, L., Trieu, A., Dodoo, D., Gyan, B., Koram, K. A., . . . Doolan, D. L. **Immune Signature Against Plasmodium falciparum Antigens Predicts Clinical**

- Immunity in Distinct Malaria Endemic Communities. *Mol Cell Proteomics* 19, 101-113, doi:10.1074/mcp.RA118.001256 (2020).
- 300 Matz, J. M., Beck, J. R. y Blackman, M. J. **The parasitophorous vacuole of the blood-stage malaria parasite.** *Nat Rev Microbiol* 18, 379-391, doi:10.1038/s41579-019-0321-3 (2020).
- 301 Hou, N., Jiang, N., Ma, Y., Zou, Y., Piao, X., Liu, S. y Chen, Q. **Low-Complexity Repetitive Epitopes of Plasmodium falciparum Are Decoys for Humoural Immune Responses.** *Front Immunol* 11, 610, doi:10.3389/fimmu.2020.00610 (2020).
- 302 Zilversmit, M. M., Volkman, S. K., DePristo, M. A., Wirth, D. F., Awadalla, P. y Hartl, D. L. **Low-complexity regions in Plasmodium falciparum: missing links in the evolution of an extreme genome.** *Mol Biol Evol* 27, 2198-2209, doi:10.1093/molbev/msq108 (2010).
- 303 Marsh, K. y Kinyanjui, S. **Immune effector mechanisms in malaria.** *Parasite Immunol* 28, 51-60, doi:10.1111/j.1365-3024.2006.00808.x (2006).
- 304 Portugal, S., Pierce, S. K. y Crompton, P. D. **Young Lives Lost as B Cells Falter: What We Are Learning About Antibody Responses in Malaria.** *J Immunol* 190, 3039-3046, doi:10.4049/jimmunol.1203067 (2013).
- 305 Filipe, J. A., Riley, E. M., Drakeley, C. J., Sutherland, C. J. y Ghani, A. C. **Determination of the processes driving the acquisition of immunity to malaria using a mathematical transmission model.** *PLoS Comput Biol* 3, e255, doi:10.1371/journal.pcbi.0030255 (2007).
- 306 Struik, S. S. y Riley, E. M. **Does malaria suffer from lack of memory?** *Immunol Rev* 201, 268-290, doi:DOI 10.1111/j.0105-2896.2004.00181.x (2004).
- 307 Drakeley, C., Abdulla, S., Agnandji, S. T., Fernandes, J. F., Kremsner, P., Lell, B., . . . Bahmanyar, E. R. **Longitudinal estimation of Plasmodium falciparum prevalence in relation to malaria prevention measures in six sub-Saharan African countries.** *Malar J* 16, 433, doi:10.1186/s12936-017-2078-3 (2017).
- 308 Noland, G. S., Graves, P. M., Sallau, A., Eigege, A., Emukah, E., Patterson, A. E., . . . Richards, F. O. **Malaria prevalence, anemia and baseline intervention coverage prior to mass net distributions in Abia and Plateau States, Nigeria.** *Bmc Infect Dis* 14, 168, doi:doi: 10.1186/1471-2334-14-168. (2014).
- 309 Mogeni, P., Williams, T. N., Omedo, I., Kimani, D., Ngoi, J. M., Mwacharo, J., . . . Bejon, P. **Detecting Malaria Hotspots: A Comparison of Rapid Diagnostic Test, Microscopy, and Polymerase Chain Reaction.** *J Infect Dis* 216, 1091-1098, doi:10.1093/infdis/jix321 (2017).
- 310 Boyce, M. R. y O'Meara, W. P. **Use of malaria RDTs in various health contexts across sub-Saharan Africa: a systematic review.** *Bmc Public Health* 17, 470, doi:10.1186/s12889-017-4398-1 (2017).
- 311 Amoah, L. E., Abankwa, J. y Oppong, A. **Plasmodium falciparum histidine rich protein-2 diversity and the implications for PfHRP 2: based malaria rapid diagnostic tests in Ghana.** *Malaria J* 15, 101, doi:10.1186/s12936-016-1159-z (2016).
- 312 Williams, J. E., Cairns, M., Njie, F., Quaye, S. L., Awine, T., Oduro, A., . . . Greenwood, B. **The Performance of a Rapid Diagnostic Test in Detecting Malaria Infection in Pregnant Women and the Impact of Missed Infections.** *Clin Infect Dis* 62, 837-844, doi:10.1093/cid/civ1198 (2016).
- 313 Elbadry, M. A., Tagliamonte, M. S., Raccurt, C. P., Lemoine, J. F., Existe, A., Boncy, J., . . . Okech, B. A. **Submicroscopic malaria infections in pregnant women from six departments in Haiti.** *Trop Med Int Health* 22, 1030-1036, doi:10.1111/tmi.12909 (2017).
- 314 Brabin, B. J. **An analysis of malaria in pregnancy in Africa.** *Bull World Health Organ* 61, 1005-1016 (1983).
- 315 Ghana Malaria Operational Plan. **USAID President's malaria initiative FY. Ghana.** (2021).

- 316 Malaria Operational Plan. **USAID President's Malaria initiative FY. Democratic Republic of the Congo.** (2021).
- 317 Romi, R., Sabatinelli, G., Majori, G., Ralamboranto, L., Raveloarifera, F. y Ranaivoharimina, H. **Plasmodium-Falciparum Circumsporozoite Antibody Prevalence in Madagascar - a Longitudinal-Study in 3 Different Epidemiologic Areas.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 51, 856-863, doi:DOI 10.4269/ajtmh.1994.51.856 (1994).
- 318 Kwenti, T. E., Kukwah, T. A., Kwenti, T. D. B., Nyassa, B. R., Dilonga, M. H., Enow-Orock, G., . . . Nkuo-Akenji, T. **Comparative analysis of IgG and IgG subclasses against Plasmodium falciparum MSP-1(19) in children from five contrasting bioecological zones of Cameroon.** *Malar J* 18, 16, doi:10.1186/s12936-019-2654-9 (2019).
- 319 Stanisic, D. I., Fowkes, F. J., Koinari, M., Javati, S., Lin, E., Kiniboro, B., . . . Beeson, J. G. **Acquisition of antibodies against Plasmodium falciparum merozoites and malaria immunity in young children and the influence of age, force of infection, and magnitude of response.** *Infect Immun* 83, 646-660, doi:10.1128/IAI.02398-14 (2015).
- 320 Suau, R., Vidal, M., Aguilar, R., Ruiz-Olalla, G., Vazquez-Santiago, M., Jairoce, C., . . . Dobano, C. **RTS,S/AS01(E) malaria vaccine induces IgA responses against CSP and vaccine-unrelated antigens in African children in the phase 3 trial.** *Vaccine* 39, 687-698, doi:10.1016/j.vaccine.2020.12.038 (2021).
- 321 Tao, D., McGill, B., Hamerly, T., Kobayashi, T., Khare, P., Dziedzic, A., . . . Dinglasan, R. R. **A saliva-based rapid test to quantify the infectious subclinical malaria parasite reservoir.** *Sci Transl Med* 11, ean4479, doi:10.1126/scitranslmed.aan4479 (2019).
- 322 Okell, L. C., Bousema, T., Griffin, J. T., Ouedraogo, A. L., Ghani, A. C. y Drakeley, C. J. **Factors determining the occurrence of submicroscopic malaria infections and their relevance for control.** *Nat Commun* 3, ofv118, doi:10.1038/ncomms2241 (2012).
- 323 Niang, M., Thiam, L. G., Sane, R., Diagne, N., Talla, C., Doucoure, S., . . . Toure-Balde, A. **Substantial asymptomatic submicroscopic Plasmodium carriage during dry season in low transmission areas in Senegal: Implications for malaria control and elimination.** *PLoS One* 12, e0182189, doi:10.1371/journal.pone.0182189 (2017).
- 324 Katrak, S., Murphy, M., Nayebare, P., Rek, J., Smith, M., Arinaitwe, E., . . . Greenhouse, B. **Performance of Loop-Mediated Isothermal Amplification for the Identification of Submicroscopic Plasmodium falciparum Infection in Uganda.** *Am J Trop Med Hyg* 97, 1777-1781, doi:10.4269/ajtmh.17-0225 (2017).
- 325 Ewusie, J. E., Ahiadeke, C., Beyene, J. y Hamid, J. S. **Prevalence of anemia among under-5 children in the Ghanaian population: estimates from the Ghana demographic and health survey.** *Bmc Public Health* 14, 626, doi:10.1186/1471-2458-14-626 (2014).
- 326 Starck, T., Bulstra, C. A., Tinto, H., Rouamba, T., Sie, A., Jaenisch, T. y Barnighausen, T. **The effect of malaria on haemoglobin concentrations: a nationally representative household fixed-effects study of 17,599 children under 5 years of age in Burkina Faso.** *Malar J* 20, 416, doi:10.1186/s12936-021-03948-z (2021).
- 327 Obonyo, C. O., Vulule, J., Akhwale, W. S. y Grobbee, D. E. **In-hospital morbidity and mortality due to severe malarial anemia in western Kenya.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77, 23-28 (2007).
- 328 Menendez, C., Fleming, A. F. y Alonso, P. L. **Malaria-related anaemia.** *Parasitol Today* 16, 469-476, doi:10.1016/s0169-4758(00)01774-9 (2000).
- 329 Baum, E., Sattabongkot, J., Sirichaisinthop, J., Kiattibutr, K., Davies, D. H., Jain, A., . . . Yan, G. **Submicroscopic and asymptomatic Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax infections are common in western Thailand - molecular and serological evidence.** *Malar J* 14, 95, doi:10.1186/s12936-015-0611-9 (2015).
- 330 Hedrick, P. W. **Population genetics of malaria resistance in humans.** *Heredity (Edinb)* 107, 283-304, doi:10.1038/hdy.2011.16 (2011).

- 331 Allison, A. C. y Clyde, D. F. **Malaria in African children with deficient erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase.** *Br Med J* 1, 1346-1349, doi:10.1136/bmj.1.5236.1346 (1961).
- 332 Allison, A. C. **Malaria in carriers of the sickle-cell trait and in newborn children.** *Exp Parasitol* 6, 418-447, doi:10.1016/0014-4894(57)90032-2 (1957).
- 333 van Bruggen, R., Gualtieri, C., Iliescu, A., Louicharoen Cheepsunthorn, C., Mungkalasut, P., Trape, J. F., . . . Gros, P. **Modulation of Malaria Phenotypes by Pyruvate Kinase (PKLR) Variants in a Thai Population.** *PLoS One* 10, e0144555, doi:10.1371/journal.pone.0144555 (2015).
- 334 Thye, T., Evans, J. A., Ruge, G., Loag, W., Ansong, D., Agbenyega, T., . . . Schuldt, K. **Human genetic variant E756del in the ion channel PIEZO1 not associated with protection from severe malaria in a large Ghanaian study.** *J Hum Genet* 67, 65-67, doi:10.1038/s10038-021-00958-2 (2022).
- 335 Ruwende, C. y Hill, A. **Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria.** *J Mol Med (Berl)* 76, 581-588, doi:10.1007/s001090050253 (1998).
- 336 Luzzatto, L., Usanga, F. A. y Reddy, S. **Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient red cells: resistance to infection by malarial parasites.** *Science* 164, 839-842, doi:10.1126/science.164.3881.839 (1969).
- 337 Modiano, D., Luoni, G., Sirima, B. S., Simporé, J., Verra, F., Konate, A., . . . Coluzzi, M. **Haemoglobin C protects against clinical Plasmodium falciparum malaria.** *Nature* 414, 305-308, doi:10.1038/35104556 (2001).
- 338 Berghout, J., Higgins, S., Loucoubar, C., Sakuntabhai, A., Kain, K. C. y Gros, P. **Genetic diversity in human erythrocyte pyruvate kinase.** *Genes Immun* 13, 98-102, doi:10.1038/gene.2011.54 (2012).
- 339 Patel, J. C., Mwapasa, V., Kalilani, L., Ter Kuile, F. O., Khairallah, C., Thwai, K. L., . . . Taylor, S. M. **Absence of Association Between Sickle Trait Hemoglobin and Placental Malaria Outcomes.** *Am J Trop Med Hyg* 94, 1002-1007, doi:10.4269/ajtmh.15-0672 (2016).
- 340 van Dongen, P. W. y van't Hof, M. A. **Sickle cell trait, malaria and anaemia in pregnant Zambian women.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 77, 402-404, doi:10.1016/0035-9203(83)90173-6 (1983).
- 341 Chauvet, M., Tétard, M., Cottrell, G., Aussenac, F., Brossier, E., Denoyel, L., . . . Merckx, A. **Impact of Hemoglobin S Trait on Cell Surface Antibody Recognition of Plasmodium falciparum-Infected Erythrocytes in Pregnancy-Associated Malaria.** *Open Forum Infect Dis* 6, ofz156, doi:10.1093/ofid/ofz156 (2019).
- 342 Ofori, M., Ansah, E., Agyepong, I., Ofori-Adjei, D., Hviid, L. y Akanmori, B. **Pregnancy-associated malaria in a rural community of Ghana.** *Ghana Med J* 43, 13-18 (2009).
- 343 Vollmer-Conna, U., Piraino, B. F., Cameron, B., Davenport, T., Hickie, I., Wakefield, D. y Lloyd, A. R. **Cytokine polymorphisms have a synergistic effect on severity of the acute sickness response to infection.** *Clin Infect Dis* 47, 1418-1425, doi:10.1086/592967 (2008).
- 344 Takahashi, M. y Kimura, A. **HLA and CTLA4 polymorphisms may confer a synergistic risk in the susceptibility to Graves' disease.** *J Hum Genet* 55, 323-326, doi:10.1038/jhg.2010.20 (2010).
- 345 Ahmed, J. S., Guyah, B., Sang', D., Webale, M. K., Mufyongo, N. S., Munde, E. y Ouma, C. **Influence of blood group, Glucose-6-phosphate dehydrogenase and Haemoglobin genotype on Falciparum malaria in children in Vihiga highland of Western Kenya.** *Bmc Infect Dis* 20, 487, doi:10.1186/s12879-020-05216-y (2020).
- 346 Okator, I. M., Okoroiwu, H. U. y Ekechi, C. A. **Hemoglobin S and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency Coinheritance in AS and SS Individuals in Malaria-Endemic Region: A Study in Calabar, Nigeria.** *J Glob Infect Dis* 11, 118-122, doi:10.4103/jgid.jgid_154_18 (2019).

- 347 Mbanefo, E. C., Ahmed, A. M., Titouna, A., Elmaraezy, A., Trang, N. T., Phuoc Long, N., . . . Hirayama, K. **Association of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria: a systematic review and meta-analysis.** *Sci Rep* 7, 45963, doi:10.1038/srep45963 (2017).
- 348 Frimpong, A., Kusi, K. A., Ofori, M. F. y Ndifon, W. **Novel Strategies for Malaria Vaccine Design.** *Front Immunol* 9, 2769, doi:10.3389/fimmu.2018.02769 (2018).
- 349 Nilsson, S. K., Ahmad, R., Dantzler, K., Lukens, A. K., De Niz, M., Szucs, M. J., . . . Marti, M. **Quantitative Proteomic Profiling Reveals Novel Plasmodium falciparum Surface Antigens and Possible Vaccine Candidates.** *Molecular & Cellular Proteomics* 17, 57-74, doi:10.1074/mcp.RA117.000076 (2018).
- 350 Azcarate, I. G., Marin-Garcia, P., Abad, P., Perez-Benavente, S., Paz-Artal, E., Reche, P. A., . . . Bautista, J. M. **Plasmodium falciparum immunodominant IgG epitopes in subclinical malaria.** *Sci Rep-Uk* 10, 9398, doi:10.1038/s41598-020-66384-0 (2020).
- 351 Pleass, R. J., Moore, S. C., Stevenson, L. y Hviid, L. **Immunoglobulin M: Restrainer of Inflammation and Mediator of Immune Evasion by Plasmodium falciparum Malaria.** *Trends Parasitol* 32, 108-119, doi:10.1016/j.pt.2015.09.007 (2016).
- 352 Patgaonkar, M., Herbert, F., Powale, K., Gandhe, P., Gogtay, N., Thatte, U., . . . Pathak, S. **Vivax infection alters peripheral B-cell profile and induces persistent serum IgM.** *Parasite Immunol* 40, e12580, doi:10.1111/pim.12580 (2018).
- 353 Gautam, S. y Loh, K. C. **Immunoglobulin-M purification--challenges and perspectives.** *Biotechnol Adv* 29, 840-849, doi:10.1016/j.biotechadv.2011.07.001 (2011).
- 354 Ehrenstein, M. R. y Notley, C. A. **The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator.** *Nat Rev Immunol* 10, 778-786, doi:10.1038/nri2849 (2010).
- 355 Cabral, F. J., Vianna, L. G., Medeiros, M. M., Carlos, B. C., Martha, R. D., Silva, N. M., . . . Wunderlich, G. **Immunoproteomics of Plasmodium falciparum-infected red blood cell membrane fractions.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 112, 850-856, doi:10.1590/0074-02760170041 (2017).
- 356 Fulton, K. M., Baltat, I. y Twine, S. M. **Immunoproteomics Methods and Techniques.** *Methods Mol Biol* 2024, 25-58, doi:10.1007/978-1-4939-9597-4_2 (2019).
- 357 Beutgen, V. M., Perumal, N., Pfeiffer, N. y Grus, F. H. **Autoantibody Biomarker Discovery in Primary Open Angle Glaucoma Using Serological Proteome Analysis (SERPA).** *Front Immunol* 10, 381, doi:10.3389/fimmu.2019.00381 (2019).
- 358 Macheleidt, J. y Kniemeyer, O. **Serological Proteome Analysis for the Characterization of Secreted Fungal Protein Antigens.** *Methods Mol Biol* 2260, 15-26, doi:10.1007/978-1-0716-1182-1_2 (2021).
- 359 Tjalsma, H., Schaeps, R. M. y Swinkels, D. W. **Immunoproteomics: From biomarker discovery to diagnostic applications.** *Proteomics Clin Appl* 2, 167-180, doi:10.1002/prca.200780012 (2008).
- 360 Vila, A. M., de Arrilucea, P. R., Peláez, E. C. y Gago-Martínez, A. **Development of a new magnetic beads-based immunoprecipitation strategy for proteomics analysis.** *J Proteomics* 73, 1491-1501, doi:10.1016/j.jprot.2010.02.015 (2010).
- 361 Cao, J., Xu, J. J., Liu, X. G., Wang, S. L. y Peng, L. Q. **Screening of thrombin inhibitors from phenolic acids using enzyme-immobilized magnetic beads through direct covalent binding by ultrahigh-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry.** *J Chromatogr A* 1468, 86-94, doi:10.1016/j.chroma.2016.09.022 (2016).
- 362 Desai, M., ter Kuile, F. O., Nosten, F., McGready, R., Asamo, K., Brabin, B. y Newman, R. D. **Epidemiology and burden of malaria in pregnancy.** *Lancet Infect Dis* 7, 93-104, doi:10.1016/S1473-3099(07)70021-X (2007).
- 363 Steketee, R. W., Nahlen, B. L., Parise, M. E. y Menendez, C. **The burden of malaria in pregnancy in malaria-endemic areas.** *Am J Trop Med Hyg* 64, 28-35, doi:10.4269/ajtmh.2001.64.28 (2001).

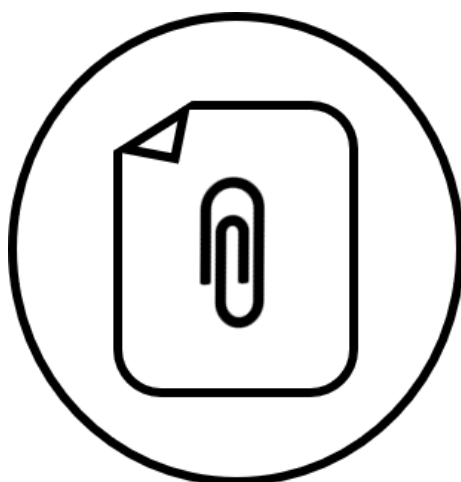
- 364 Cottrell, G., Moussiliou, A., Luty, A. J., Cot, M., Fievet, N., Massoughbodji, A., . . . Tuikue Ndam, N. **Submicroscopic Plasmodium falciparum Infections Are Associated With Maternal Anemia, Premature Births, and Low Birth Weight.** *Clin Infect Dis* 60, 1481-1488, doi:10.1093/cid/civ122 (2015).
- 365 Fried, M., Nosten, F., Brockman, A., Brabin, B. J. y Duffy, P. E. **Maternal antibodies block malaria.** *Nature* 395, 851-852, doi:10.1038/27570 (1998).
- 366 Jiang, L., Gaur, D., Mu, J., Zhou, H., Long, C. A. y Miller, L. H. **Evidence for erythrocyte-binding antigen 175 as a component of a ligand-blocking blood-stage malaria vaccine.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 7553-7558, doi:10.1073/pnas.1104050108 (2011).
- 367 Dutta, S., Haynes, J. D., Barbosa, A., Ware, L. A., Snavely, J. D., Moch, J. K., . . . Lanar, D. E. **Mode of action of invasion-inhibitory antibodies directed against apical membrane antigen 1 of Plasmodium falciparum.** *Infect Immun* 73, 2116-2122, doi:10.1128/IAI.73.4.2116-2122.2005 (2005).
- 368 Siau, A., Huang, X., Loh, H. P., Zhang, N., Meng, W., Sze, S. K., . . . Preiser, P. **Immunomic Identification of Malaria Antigens Associated With Protection in Mice.** *Mol Cell Proteomics* 18, 837-853, doi:10.1074/mcp.RA118.000997 (2019).
- 369 Sam-Yellowe, T. Y., Florens, L., Wang, T., Raine, J. D., Carucci, D. J., Sinden, R. y Yates, J. R., 3rd. **Proteome analysis of rhoptry-enriched fractions isolated from Plasmodium merozoites.** *J Proteome Res* 3, 995-1001, doi:10.1021/pr049926m (2004).
- 370 Kaneko, O., Tsuboi, T., Ling, I. T., Howell, S., Shirano, M., Tachibana, M., . . . Torii, M. **The high molecular mass rhoptry protein, RhopH1, is encoded by members of the clag multigene family in Plasmodium falciparum and Plasmodium yoelii.** *Mol Biochem Parasitol* 118, 223-231, doi:10.1016/s0166-6851(01)00391-7 (2001).
- 371 Singh, M., Mukherjee, P., Narayanasamy, K., Arora, R., Sen, S. D., Gupta, S., . . . Malhotra, P. **Proteome analysis of Plasmodium falciparum extracellular secretory antigens at asexual blood stages reveals a cohort of proteins with possible roles in immune modulation and signaling.** *Mol Cell Proteomics* 8, 2102-2118, doi:10.1074/mcp.M900029-MCP200 (2009).
- 372 Xue, H. Y. y Forsdyke, D. R. **Low-complexity segments in Plasmodium falciparum proteins are primarily nucleic acid level adaptations.** *Mol Biochem Parasit* 128, 21-32, doi:10.1016/S0166-6851(03)00039-2 (2003).
- 373 DePristo, M. A., Zilversmit, M. M. y Hartl, D. L. **On the abundance, amino acid composition, and evolutionary dynamics of low-complexity regions in proteins.** *Gene* 378, 19-30, doi:10.1016/j.gene.2006.03.023 (2006).
- 374 Pizzi, E. y Frontali, C. **Low-complexity regions in Plasmodium falciparum proteins.** *Genome Res* 11, 218-229, doi:DOI 10.1101/gr.GR-1522R (2001).
- 375 Hughes, A. L. **The evolution of amino acid repeat arrays in Plasmodium and other organisms.** *Journal of Molecular Evolution* 59, 528-535, doi:10.1007/s00239-004-2645-4 (2004).
- 376 Ferreira, M. U., Ribeiro, W. L., Tonon, A. P., Kawamoto, F. y Rich, S. M. **Sequence diversity and evolution of the malaria vaccine candidate merozoite surface protein-1 (MSP-1) of Plasmodium falciparum.** *Gene* 304, 65-75, doi:10.1016/s0378-1119(02)01180-0 (2003).
- 377 Verstrepen, K. J., Jansen, A., Lewitter, F. y Fink, G. R. **Intragenic tandem repeats generate functional variability.** *Nat Genet* 37, 986-990, doi:10.1038/ng1618 (2005).
- 378 Freire, M. C. L. C., Pol-Fachin, L., Coelho, D. F., Viana, I. F. T., Magalhaes, T., Cordeiro, M. T., . . . Lins, R. D. **Mapping Putative B-Cell Zika Virus NS1 Epitopes Provides Molecular Basis for Anti-NS1 Antibody Discrimination between Zika and Dengue Viruses.** *Acs Omega* 2, 3913-3920, doi:10.1021/acsomega.7b00608 (2017).
- 379 Weber, L. K., Isse, A., Rentschler, S., Kneusel, R. E., Palermo, A., Hubbuch, J., . . . Loeffler, F. F. **Antibody fingerprints in lyme disease deciphered with high density peptide arrays.** *Eng Life Sci* 17, 1078-1087, doi:10.1002/elsc.201700062 (2017).

- 380 Gardner, T. J., Stein, K. R., Duty, J. A., Schwarz, T. M., Noriega, V. M., Kraus, T., . . . Tortorella, D. **Functional screening for anti-CMV biologics identifies a broadly neutralizing epitope of an essential envelope protein.** *Nat Commun* 7, 13627, doi:10.1038/ncomms13627 (2016).
- 381 Khairy, W. O. A., Qian, K., Shao, H. X., Ye, J. Q. y Qin, A. J. **Identification of two conserved B-cell epitopes in the gp90 of reticuloendothelial virus using peptide microarray.** *Vet Microbiol* 211, 107-111, doi:10.1016/j.vetmic.2017.10.009 (2017).
- 382 Jaenisch, T., Heiss, K., Fischer, N., Geiger, C., Bischoff, F. R., Moldenhauer, G., . . . Loeffler, F. F. **High-density Peptide Arrays Help to Identify Linear Immunogenic B-cell Epitopes in Individuals Naturally Exposed to Malaria Infection.** *Molecular & Cellular Proteomics* 18, 642-656, doi:10.1074/mcp.RA118.000992 (2019).
- 383 Loeffler, F. F., Pfeil, J. y Heiss, K. **High-Density Peptide Arrays for Malaria Vaccine Development.** *Vaccine Design: Methods and Protocols, Vol 1: Vaccines for Human Diseases* 1403, 569-582, doi:10.1007/978-1-4939-3387-7_32 (2016).
- 384 Imholte, G. C., Sauteraud, R., Korber, B., Bailer, R. T., Turk, E. T., Shen, X., . . . Gottardo, R. **A computational framework for the analysis of peptide microarray antibody binding data with application to HIV vaccine profiling.** *J Immunol Methods* 395, 1-13, doi:10.1016/j.jim.2013.06.001 (2013).
- 385 Sachse, K., Rahman, K. S., Schnee, C., Muller, E., Peisker, M., Schumacher, T., . . . Ehrlich, R. **A novel synthetic peptide microarray assay detects Chlamydia species-specific antibodies in animal and human sera.** *Sci Rep-Uk* 8, 4701, doi:10.1038/s41598-018-23118-7 (2018).
- 386 Peterson, M. G., Marshall, V. M., Smythe, J. A., Crewther, P. E., Lew, A., Silva, A., . . . Kemp, D. J. **Integral Membrane-Protein Located in the Apical Complex of Plasmodium-falciparum.** *Mol Cell Biol* 9, 3151-3154, doi:Doi 10.1128/Mcb.9.7.3151 (1989).
- 387 Treeck, M., Zacherl, S., Herrmann, S., Cabrera, A., Kono, M., Struck, N. S., . . . Gilberger, T. W. **Functional Analysis of the Leading Malaria Vaccine Candidate AMA-1 Reveals an Essential Role for the Cytoplasmic Domain in the Invasion Process.** *Plos Pathog* 5, e1000322, doi:10.1371/journal.ppat.1000322 (2009).
- 388 Bargieri, D. Y., Andenmatten, N., Lagal, V., Thiberge, S., Whitelaw, J. A., Tardieux, I., . . . Menard, R. **Apical membrane antigen 1 mediates apicomplexan parasite attachment but is dispensable for host cell invasion.** *Nat Commun* 4, 2552, doi:10.1038/ncomms3552 (2013).
- 389 Ridley, R. G., Takacs, B., Lahm, H. W., Delves, C. J., Goman, M., Certa, U., . . . Scaife, J. G. **Characterisation and sequence of a protective rhoptry antigen from Plasmodium falciparum.** *Mol Biochem Parasitol* 41, 125-134, doi:10.1016/0166-6851(90)90103-s (1990).
- 390 Doury, J. C., Bonnefoy, S., Roger, N., Dubremetz, J. F. y Mercereau-Puijalon, O. **Analysis of the high molecular weight rhoptry complex of Plasmodium falciparum using monoclonal antibodies.** *Parasitology* 108 (Pt 3), 269-280, doi:10.1017/s0031182000076113 (1994).
- 391 Magowan, C., Coppel, R. L., Lau, A. O., Moronne, M. M., Tchernia, G. y Mohandas, N. **Role of the Plasmodium falciparum mature-parasite-infected erythrocyte surface antigen (MESA/PfEMP-2) in malarial infection of erythrocytes.** *Blood* 86, 3196-3204 (1995).
- 392 Reeder, S. M., Reuschel, E. L., Bah, M. A., Yun, K., Tursi, N. J., Kim, K. Y., . . . Aly, A. S. I. **Synthetic DNA Vaccines Adjuvanted with pIL-33 Drive Liver-Localized T Cells and Provide Protection from Plasmodium Challenge in a Mouse Model.** *Vaccines (Basel)* 8, 21, doi:10.3390/vaccines8010021 (2020).
- 393 Demarta-Gatsi, C., Rivkin, A., Di Bartolo, V., Peronet, R., Ding, S., Commere, P. H., . . . Mécheri, S. **Histamine releasing factor and elongation factor 1 alpha secreted via**

- malaria parasites extracellular vesicles promote immune evasion by inhibiting specific T cell responses.** *Cell Microbiol* 21, e13021, doi:10.1111/cmi.13021 (2019).
- 394 Wang, W., Huang, P., Jiang, N., Lu, H., Zhang, D., Wang, D., . . . Chen, Q. **A Thioredoxin Homologous Protein of Plasmodium falciparum Participates in Erythrocyte Invasion.** *Infect Immun* 86, e00289-00218, doi:10.1128/IAI.00289-18 (2018).
- 395 Matesanz, F., Duran-Chica, I. y Alcina, A. **The cloning and expression of Pfacs1, a Plasmodium falciparum fatty acyl coenzyme A synthetase-1 targeted to the host erythrocyte cytoplasm.** *J Mol Biol* 291, 59-70, doi:DOI 10.1006/jmbi.1999.2964 (1999).
- 396 Matesanz, F., Tellez, M. D. y Alcina, A. **The Plasmodium falciparum fatty acyl-CoA synthetase family (PfACS) and differential stage-specific expression in infected erythrocytes.** *Mol Biochem Parasit* 126, 109-112, doi:Doi 10.1016/S0166-6851(02)00242-6 (2003).
- 397 Cui, Y. y Bastien, D. A. **Molecular dynamics simulations of PfAQP from the malarial parasite Plasmodium falciparum.** *Mol Med Rep* 5, 1197-1201, doi:10.3892/mmr.2012.822 (2012).
- 398 Promeneur, D., Liu, Y. J., Maciel, J., Agre, P., King, L. S. y Kumar, N. **Aquaglyceroporin PbAQP during intraerythrocytic development of the malaria parasite Plasmodium berghei.** *P Natl Acad Sci USA* 104, 2211-2216, doi:10.1073/pnas.0610843104 (2007).
- 399 Promeneur, D., Mlambo, G., Agre, P. y Coppens, I. **Aquaglyceroporin PbAQP is required for efficient progression through the liver stage of Plasmodium infection.** *Sci Rep* 8, 655, doi:10.1038/s41598-017-18987-3 (2018).
- 400 Peng, X., Wang, N., Zhu, A., Xu, H., Li, J., Zhou, Y., . . . Deng, D. **Structural characterization of the Plasmodium falciparum lactate transporter PfFNT alone and in complex with antimalarial compound MMV007839 reveals its inhibition mechanism.** *PLoS Biol* 19, e3001386, doi:10.1371/journal.pbio.3001386 (2021).
- 401 Marchetti, R. V., Lehane, A. M., Shafik, S. H., Winterberg, M., Martin, R. E. y Kirk, K. **A lactate and formate transporter in the intraerythrocytic malaria parasite, Plasmodium falciparum.** *Nat Commun* 6, 6721, doi:10.1038/ncomms7721 (2015).
- 402 Hapuarachchi, S. V., Cobbold, S. A., Shafik, S. H., Dennis, A. S., McConville, M. J., Martin, R. E., . . . Lehane, A. M. **The Malaria Parasite's Lactate Transporter PfFNT Is the Target of Antiplasmodial Compounds Identified in Whole Cell Phenotypic Screens.** *Plos Pathog* 13, e1006180, doi:10.1371/journal.ppat.1006180 (2017).
- 403 Lilburn, T. G., Cai, H., Gu, J., Zhou, Z. y Wang, Y. **Exploring systems affected by the heat shock response in Plasmodium falciparum via protein association networks.** *Int J Comput Biol Drug Des* 7, 369-383, doi:10.1504/IJCBD.2014.066554 (2014).
- 404 Joët, T., Morin, C., Fischbarg, J., Louw, A. I., Eckstein-Ludwig, U., Woodrow, C. y Krishna, S. **Why is the Plasmodium falciparum hexose transporter a promising new drug target?** *Expert Opin Ther Targets* 7, 593-602, doi:10.1517/14728222.7.5.593 (2003).
- 405 Joët, T. y Krishna, S. **The hexose transporter of Plasmodium falciparum is a worthy drug target.** *Acta Trop* 89, 371-374, doi:10.1016/j.actatropica.2003.11.003 (2004).
- 406 Jiang, X., Yuan, Y., Huang, J., Zhang, S., Luo, S., Wang, N., . . . Yan, N. **Structural Basis for Blocking Sugar Uptake into the Malaria Parasite Plasmodium falciparum.** *Cell* 183, 258-268.e212, doi:10.1016/j.cell.2020.08.015 (2020).
- 407 Annoura, T., van Schaijk, B. C., Ploemen, I. H., Sajid, M., Lin, J. W., Vos, M. W., . . . Khan, S. M. **Two Plasmodium 6-Cys family-related proteins have distinct and critical roles in liver-stage development.** *Faseb j* 28, 2158-2170, doi:10.1096/fj.13-241570 (2014).
- 408 Wicht, K. J., Mok, S. y Fidock, D. A. **Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Plasmodium falciparum Malaria.** *Annu Rev Microbiol* 74, 431-454, doi:10.1146/annurev-micro-020518-115546 (2020).
- 409 Hanssen, E., Hawthorne, P., Dixon, M. W., Trenholme, K. R., McMillan, P. J., Spielmann, T., . . . Tilley, L. **Targeted mutagenesis of the ring-exported protein-1 of Plasmodium**

- falciparum disrupts the architecture of Maurer's cleft organelles.** *Mol Microbiol* 69, 938-953, doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06329.x (2008).
- 410 Hawthorne, P. L., Trenholme, K. R., Skinner-Adams, T. S., Spielmann, T., Fischer, K., Dixon, M. W., . . . Gardiner, D. L. **A novel Plasmodium falciparum ring stage protein, REX, is located in Maurer's clefts.** *Mol Biochem Parasitol* 136, 181-189, doi:10.1016/j.molbiopara.2004.03.013 (2004).
- 411 Jaeger, T. y Flohé, L. **The thiol-based redox networks of pathogens: unexploited targets in the search for new drugs.** *Biofactors* 27, 109-120, doi:10.1002/biof.5520270110 (2006).
- 412 McIntosh, M. T., Drozdowicz, Y. M., Laroia, K., Rea, P. A. y Vaidya, A. B. **Two classes of plant-like vacuolar-type H(+)-pyrophosphatases in malaria parasites.** *Mol Biochem Parasitol* 114, 183-195, doi:10.1016/s0166-6851(01)00251-1 (2001).
- 413 Bertin, G. I., Sabbagh, A., Argy, N., Salnot, V., Ezinmegnon, S., Agbota, G., . . . Deloron, P. **Proteomic analysis of Plasmodium falciparum parasites from patients with cerebral and uncomplicated malaria.** *Sci Rep* 6, 26773, doi:10.1038/srep26773 (2016).
- 414 Ruecker, A., Shea, M., Hackett, F., Suarez, C., Hirst, E. M., Milutinovic, K., . . . Blackman, M. J. **Proteolytic activation of the essential parasitophorous vacuole cysteine protease SERA6 accompanies malaria parasite egress from its host erythrocyte.** *J Biol Chem* 287, 37949-37963, doi:10.1074/jbc.M112.400820 (2012).
- 415 Boudin, C., Chumpitazi, B., Dziegiel, M., Peyron, F., Picot, S., Hogh, B. y Ambroise-Thomas, P. **Possible role of specific immunoglobulin M antibodies to Plasmodium falciparum antigens in immunoprotection of humans living in a hyperendemic area, Burkina Faso.** *J Clin Microbiol* 31, 636-641, doi:10.1128/jcm.31.3.636-641.1993 (1993).
- 416 Lin, J. T., Saunders, D. L. y Meshnick, S. R. **The role of submicroscopic parasitemia in malaria transmission: what is the evidence?** *Trends Parasitol* 30, 183-190, doi:10.1016/j.pt.2014.02.004 (2014).
- 417 Kusi, K. A., Aguiar, J., Kumordjie, S., Aggor, F., Bolton, J., Renner, A., . . . Sedegah, M. **Antigenicity and immune correlate assessment of seven Plasmodium falciparum antigens in a longitudinal infant cohort from northern Ghana.** *Sci Rep* 9, 8621, doi:10.1038/s41598-019-45092-4 (2019).
- 418 Calle, C. L., Mordmüller, B. y Singh, A. **Immunosuppression in Malaria: Do Plasmodium falciparum Parasites Hijack the Host?** *Pathogens* 10, 1277, doi:10.3390/pathogens10101277 (2021).
- 419 Cunningham, A. J. y Riley, E. M. **Suppression of vaccine responses by malaria: insignificant or overlooked?** *Expert Rev Vaccines* 9, 409-429, doi:10.1586/erv.10.16 (2010).
- 420 Gardner, M. J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R. W., . . . Barrell, B. **Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum.** *Nature* 419, 498-511, doi:10.1038/nature01097 (2002).

10. ANEXOS



10.1. ANEXO I

Intensidad de señal de la IgM en el microarray a lo largo de la secuencia de los 25 antígenos seleccionados para la identificación de epítomos de *P. falciparum* reconocidos por IgM.

