



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

PROYECTO DE TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO GENETISTA BIOTECNÓLOGO

Comparación de la respuesta de anticuerpos ante *Plasmodium vivax* en
pacientes de la Amazonía Peruana según su severidad y episodios
previos mediante microarreglos de proteínas

TESISTA:

Bach. Andree Adolfo Valle Campos

ASESORES:

INTERNO: Dr. Juan Jiménez Chunga

EXTERNO: PhD. G. Christian Baldeviano

Lugar de Ejecución:

Centro de Enfermedades Tropicales de la Marina de los Estados Unidos NAMRU-6

Duración: 1 año

Lima - Perú

2021

Índice General

RESUMEN	1
1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
1.1 Formulación del problema	1
2 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	1
2.1 Justificación	1
2.2 Limitaciones	2
2.3 Viabilidad	2
3 FORMULACIÓN DE OBJETIVOS	2
3.1 Objetivos	2
3.1.1 General	2
3.1.2 Específicos	2
4 HIPÓTESIS Y VARIABLES DE INVESTIGACIÓN	3
4.1 Hipótesis	3
4.1.1 Alternativa	3
4.1.2 Nula	3
4.2 Variables	3
4.2.1 Operacionalización de variables	3
5 ANTECEDENTES	3
5.1 Antecedentes de la investigación	3
5.2 Bases teóricas	5
5.2.1 Malaria por <i>Plasmodium vivax</i>	5
5.2.2 Malaria Severa	6
5.2.3 Respuesta de anticuerpos	7
5.2.4 Microarreglos de proteínas	8
5.3 Definiciones conceptuales	9
6 MATERIAL Y MÉTODOS	10
6.1 Material biológico (Población y muestra)	10
6.1.1 Población	10
6.1.2 Criterios de inclusión y exclusión	10
6.1.3 Selección de participantes	10
6.2 Material de laboratorio	11
6.2.1 Instrumento de medición	11
6.3 Métodos:	11
6.3.1 Diseño	11
6.3.2 Recolección de los datos e instrumento	12
6.3.3 Codificación y creación del archivo de datos	12
6.3.4 Análisis de datos	12
7 CRONOGRAMA DE TRABAJO	13
8 PRESUPUESTO GLOBAL	13
9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13

RESUMEN

Plasmodium vivax es responsable del 80% de la malaria en el Perú. Casos de enfermedad severa por mono-infecciones de *P. vivax* han sido reportados tanto en el noreste amazónico como en norte costero; sin embargo, dicha condición aún está ausente en el actual Plan de Control y Eliminación, incrementando el riesgo de afectar la morbilidad y mortalidad por malaria en zonas endémicas. Con el fin de describir la respuesta inmune e identificar biomarcadores de relevancia clínica contra la malaria severa por *P. vivax*, el presente proyecto de tesis propone comparar la respuesta de anticuerpos ante la infección en pacientes severos y no-severos provenientes de un estudio prospectivo caso-control ejecutado en la ciudad de Iquitos, Loreto - Perú, empleando microarreglos de proteínas. Los resultados permitirán proponer marcadores serológicos de severidad con el potencial de implementarse en programas de serovigilancia en miras al control y eliminación de la malaria por *P. vivax* en la región.

1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Formulación del problema

La malaria es una enfermedad parasitaria causada por protozoarios del género *Plasmodium* y transmitida por mosquitos del género *Anopheles*. En el 2019 se estimaron 229 millones de casos en 87 países endémicos y 409 mil muertes atribuidas a esta infección a nivel mundial (WHO 2020). La especie *P. falciparum* representa el 97% de los casos y 99% de las muertes, pero en los continentes fuera de África *P. vivax* es responsable del 41% y 86%, respectivamente (WHO 2016b). Más aún, la región de las Américas tiene la mayor proporción de casos por *P. vivax* (72%) donde Perú es el cuarto país con más casos estimados (n=45,729), detrás de Venezuela, Brasil y Colombia (WHO 2020), causados en un 80% por *P. vivax* (Rosas-Aguirre et al. 2016; CDC Perú 2020).

Reportes recientes de malaria severa y fatal causados por *P. vivax* han desafiado su tradicional condición de enfermedad benigna (Baird 2009; Quispe et al. 2014; Tovar-Acero et al. 2021). Una hipótesis plantea que el incremento de estos casos pueden ser consecuencia de un retraso en la adquisición de inmunidad en la población debido a una reducción en la intensidad de transmisión (Reyburn 2005); sin embargo, se dispone de limitados estudios que describan la respuesta inmune en esta población. Un estudio en la Amazonía Peruana comparó la respuesta humoral contra PvMSP1₁₉, un marcador serológico tradicional, en pacientes con malaria por *P. vivax* severa y no complicada mostrando un grado similar de exposición previa en ambos grupos (Baldeviano et al. 2013). No obstante, estudios serológicos con múltiples antígenos han desafiado la validez de MSP1₁₉ como indicador de inmunidad o exposición (Crompton et al. 2010; Helb et al. 2015). Adicionalmente, la malaria severa por *P. vivax* está definida clínicamente en la actual norma técnica (MINSA 2015) pero está ausente en el plan de control y eliminación (MINSA 2017). El desconocimiento de la respuesta inmune de la malaria severa por *P. vivax*, marcadores serológicos para su vigilancia (Quispe et al. 2016) y su ausencia en planes de control podrían afectar la morbilidad y mortalidad por malaria en zonas endémicas al largo plazo.

Por esta razón, el presente estudio tiene como objetivo comparar la respuesta de anticuerpos ante la infección con *P. vivax* contra más de 500 antígenos del parásito en pacientes severos y no-severos de la ciudad de Iquitos, empleando microarreglos de proteínas. Nuestra hipótesis es que los no-severos poseen mayor reactividad serológica contra antígenos de exposición, invasión o adhesión celular, con respecto a los severos. Primero, se identificarán los antígenos con reactividad diferenciada entre ambos grupos. Luego, se realizará la misma comparación entre pacientes con y sin episodios previos de esta infección para identificar posibles antígenos de respuesta secundaria. Finalmente, se describirán sus características proteicas junto a los antígenos con mayor reactividad en toda la muestra con el propósito de proponerlos como candidatos a vigilancia seroepidemiológica.

2 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 Justificación

Ante la reemergencia repetitiva de la malaria en la Amazonía Peruana (Griffing et al. 2013; Rosas-Aguirre et al. 2016), es prioritario implementar vigilancias serológicas programáticas en nuestro país (Rosas-Aguirre et al. 2015). En zonas con baja transmisión, estos ensayos poseen una mayor

sensibilidad y representan un menor gasto económico en comparación a las estrategias convencionales de monitoreo y control (Elliott et al. 2014). Por esta razón, el presente estudio se justifica en el descubrimiento de antígenos potencialmente discriminantes de condiciones clínicas como severidad o exposición. Estos permitirán optimizar y acelerar la ejecución de vigilancias serológicas en los programas de salud pública contra la malaria en el Perú, en miras a su control y posterior eliminación (Quispe et al. 2016).

2.2 Limitaciones

Primero, las muestras a evaluar provienen de pacientes con infecciones no sincronizadas. Las muestras fueron colectadas en la fase sintomática, momento en el que los pacientes acuden al Hospital, con un desconocimiento del inicio de la infección por paciente; sin embargo, infecciones experimentales han estimado que dicha fase ocurre normalmente entre los 11 y 13 días de infección (Arévalo-Herrera et al. 2014).

Segundo, el estudio posee debilidades propias del diseño experimental a emplear. El diseño de tipo caso control posee dificultad para establecer relaciones causa-efecto y a través de él no se pueden calcular prevalencias o incidencias. Además, la ausencia de un seguimiento activo impide el registro de covariables relevantes para la caracterización de la enfermedad.

Tercero, los microarreglos de proteínas poseen limitantes propias a su fabricación (Vigil et al. 2010). Cada paso (amplificación, clonamiento, expresión de genes a larga escala e impresión del arreglo) posee una eficiencia límite que afectará la calidad final de las proteínas. Además, el plegamiento proteico no será posible de verificar a dicha escala. Por último, la identificación de antígenos con modificaciones postranscripcionales, particularmente relevantes en *Plasmodium* (Chung et al. 2009), no serán posibles de reproducir en su integridad en el sistema de expresión procarionte. A pesar de ello, se evaluará la validez del ensayo con controles internos.

2.3 Viabilidad

El proyecto es viable por la factibilidad de su ejecución, el interés de sus resultados para el área, la novedad de su enfoque y la relevancia de su método para la investigación biomédica.

Primero, su ejecución es factible por la disponibilidad inmediata de muestras provenientes de un estudio prospectivo ya realizado, su adecuado tamaño muestral ($n=60$), la objetividad de la pregunta planteada y la experiencia técnica del investigador en la herramienta de análisis R (R Core Team 2016) y Bioconductor (Gentleman et al. 2004). Segundo, el problema es de interés para la comunidad por la posibilidad de que sus resultados generen un cambio en la práctica médica. Tercero, la novedad de su enfoque a larga escala permitirá extender el estado del conocimiento y brindar mayor evidencia con respecto a la controversia mencionada. Cuarto, la relevancia de su método de análisis reproducible con software libre permitirá transparentar la generación de resultados y promover su puesta en práctica en futuras investigaciones.

3 FORMULACIÓN DE OBJETIVOS

3.1 Objetivos

3.1.1 General

- Identificar un subconjunto de antígenos con reactividad serológica diferenciada ante la infección por *P. vivax* según severidad y episodios previos.

3.1.2 Específicos

- Identificar antígenos de *P. vivax* con reactividad serológica diferenciada ante la infección entre pacientes severos y no-severos.
- Identificar antígenos de *P. vivax* con reactividad serológica diferenciada ante la infección entre pacientes con y sin episodios previos.
- Describir las características proteicas de los antígenos con reactividad diferenciada o predominante.

4 HIPÓTESIS Y VARIABLES DE INVESTIGACIÓN

4.1 Hipótesis

4.1.1 Alternativa

1. Los pacientes con malaria no-severa poseen mayor reactividad serológica contra antígenos de *P. vivax* asociados a exposición, invasión o adhesión celular con respecto a los pacientes severos.
2. Los pacientes con episodios previos de malaria poseen mayor reactividad serológica contra antígenos de *P. vivax* asociados a exposición con respecto a los pacientes sin episodios previos.
3. Los antígenos con reactividad diferenciada o predominante se caracterizan por poseer una localización extracelular y estar bajo presión selectiva por el sistema inmune.

4.1.2 Nula

1. Los pacientes con malaria no-severa no poseen mayor reactividad serológica contra antígenos de *P. vivax* asociados a exposición, invasión o adhesión celular con respecto a los pacientes severos.
2. Los pacientes con episodios previos de malaria no poseen mayor reactividad serológica contra antígenos de *P. vivax* asociados a exposición con respecto a los pacientes sin episodios previos.
3. Los antígenos con reactividad diferenciada o predominante no se caracterizan por poseer una localización extracelular y estar bajo presión selectiva por el sistema inmune.

4.2 Variables

El presente estudio busca contrastar la respuesta de anticuerpos ante la infección con *P. vivax* entre pacientes clasificados según su severidad y episodios previos. Para ello se medirá la variable de reactividad serológica de antígenos de *P. vivax* luego de sondear plasma de pacientes en un microarreglo de proteínas. Además se clasificará a los pacientes como severos o no-severos de acuerdo a diagnóstico clínico y bioquímico, y como con-episodios o sin-episodios previos de acuerdo a lo reportado en la encuesta con el médico tratante.

Primero, la reactividad serológica cuantificará la especificidad de los anticuerpos de respuesta contra los antígenos del patógeno *P. vivax*. Esta variable medirá indirectamente la interacción entre antígenos y anticuerpos, a través de la lectura de la intensidad fluorescente producto de esta reacción.

Segundo, los pacientes severos se definirán por la presencia de manifestaciones clínicas severas o complicaciones sistémicas. Esta variable será asignada por la presencia de uno o más criterios clínicos y de laboratorio para la malaria severa, según la clasificación recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) ([WHO 2014](#)).

Tercero, la clasificación por episodios previos reportados representará la presencia de infecciones previas con malaria y, consecuentemente, la presencia de una respuesta inmune humoral secundaria. Esta variable será reportada por el paciente como el número de eventos previos a la actual infección. Dada la incertidumbre de dicho dato, la variable será dicotomizada con el fin de facilitar su inclusión.

4.2.1 Operacionalización de variables

Ver [Tabla 1](#).

5 ANTECEDENTES

5.1 Antecedentes de la investigación

En África un hito en la aplicación de microarreglos de proteínas para el estudio de la respuesta humoral a escala epidemiológica fue la publicación de [Crompton et al. \(2010\)](#). Este estudio comparó la respuesta de anticuerpos contra el 23% del proteoma de *P. falciparum* antes y después de la temporada de malaria en 220 individuos de Mali, en dos grupos poblacionales: 2-10 y 18-25 años. Dentro del grupo de niños entre 8 y 10 años se identificaron 49 proteínas con mayor reactividad serológica en el grupo de infectados asintomáticos, en comparación a los sintomáticos. Cinco de los principales candidatos a vacuna (CSP,

Tabla 1: Operacionalización de variables

Variable	Definición		Instrumento de medición	Criterios de medición	Tipo de variable	Escala de medición	Fuente
	Conceptual	Operacional					
Dependiente Reactividad serológica	Especificidad de anticuerpos de respuesta contra un antígeno	Medida indirecta de la reacción antígeno-anticuerpo	Microarreglo de proteínas	0-6000 MFI o intensidad fluorescente promedio.	Numérica continua	Razón	Plasma sanguíneo
Independiente Severidad	Presencia de manifestaciones clínicas severas o complicaciones sistémicas	Número de criterios de la clasificación OMS para malaria severa	Diagnóstico clínico y pruebas bioquímicas	No-severa: 0 criterios Severa: 1 o más criterios.	Categorica dicotómica	Nominal	Historia clínica y muestra de sangre
Independiente Episodios previos	Exposición a la infección de malaria en el pasado	Número de episodios previos reportados	Encuesta	Sin: 0 episodios Con: 1 o más episodios	Categorica dicotómica	Nominal	Historia clínica

LSA-3, MSP1, MSP2, AMA1) no lograron discriminar ambos grupos. Sin embargo, cuatro candidatos secundarios (STARP, LSA-1, RESA, antígeno 332), con expresión en diferentes estadios del ciclo biológico, sí lograron tal discriminación.

Un segundo hito de interés en África se describe en el trabajo de [Helb et al. \(2015\)](#) donde reportaron una estrategia para identificar combinaciones de respuestas de anticuerpos contra más de un antígeno que maximicen la información de la exposición reciente al nivel de individuos. Para ello emplearon modelos basados en el aprendizaje automático o *machine learning* para el análisis de las respuestas contra 865 antígenos de *P. falciparum* en 186 niños (3-6 años) de Uganda en base al registro activo y pasivo de sus historias clínicas a los largo de un año. En contraste a los marcadores tradicionalmente empleados para evaluar exposición a nivel poblacional (CSP, MSP1, MSP2, AMA1) ([Elliott et al. 2014](#)), se identificaron marcadores más informativos como hyp2, GEXP18, EMP1, ETRAMP4, HSP40-II y PF70. La validación de este método permitirá optimizar la selección tradicional de marcadores.

En Perú el primer estudio en publicarse fue de [Torres et al. \(2014\)](#) donde reportaron marcadores de inmunidad clínica -no esterilizante- de adquisición natural a la malaria por *P. falciparum*. Además de ello, el resultado con mayor implicancias fue que estos marcadores presentaron un enriquecimiento de polimorfismos no-sinónimos, indicativo de una presión de selección positiva por parte del sistema inmune, a pesar de provenir de una zona con baja transmisión. Las 51 proteínas con mayor reactividad en 14 pacientes infectados y asintomáticos se obtuvieron al comparar las respuestas con 24 paciente sintomáticos provenientes de la Amazonía Peruana (Departamento de Loreto, Provincia de Maynas y Requena) contra 824 fragmentos (699 proteínas) de *P. falciparum*.

El segundo y último estudio sobre malaria y microarreglo de proteínas en Perú en ser publicado ha sido el de [Chuquiyauri et al. \(2015\)](#). Aquí compararon la respuesta contra *P. vivax* de pacientes con relapsos y reinfección, sin encontrar diferencia alguna entre ambos grupos. Sin embargo, al igual que el anterior estudio, identificaron un enriquecimiento de proteínas con polimorfismos no-sinónimos en el grupo de antígenos reactivos. Además, dentro del grupo con mayor reactividad en toda la muestra, resaltaron a PvMSP-10 como potencial candidato a vacuna al presentar la expresión más consistente y validar lo reportado por dos estudios previos con enfoque tradicional donde emplean ambos sistemas de expresión: eucariota y procariota. Aquí emplearon un arreglo con 2233 fragmentos (1936 proteínas) en

106 individuos de la ciudad de Maynas, Loreto - Perú.

5.2 Bases teóricas

5.2.1 Malaria por *Plasmodium vivax*

a. Epidemiología

A nivel mundial *P. vivax* y *P. falciparum* son los principales responsables de los casos de malaria en humanos. Ambas especies exponen aproximadamente a 2.5 mil millones de personas en riesgo de infección (Howes et al. 2016); sin embargo, *P. vivax* es el parásito dominante en las regiones fuera del África subsahariana, en su mayoría densamente pobladas y empobrecidas. Entre ellas, Etiopía, India, Indonesia y Pakistán acumularon el 78% de casos de *P. vivax* a nivel mundial. A su vez, la región de las Américas tuvo la mayor proporción de estos, con un 69% (WHO 2016b). A pesar de ello, hasta el momento la mayoría de la investigación y financiamiento está destinado a la prevención, tratamiento y control de *P. falciparum* (PATH 2011).

Con respecto a Perú, en el 2015 este fue el tercer país con más casos reportados en Latinoamérica (19%), detrás de Brasil (24%) y Venezuela (30%) (WHO 2016b). El 80% fueron causados por *P. vivax* (63,153 en total), en regiones con endemismo y transmisión heterogénea (Rosas-Aguirre et al. 2016). El 95% pertenecieron al noreste amazónico (con una razón Pv/Pf de 4/1) y el resto al norte costero y la región minera del Suroeste. Notablemente, comunidades en Madre de Dios no han registrado caso por *P. falciparum* en una década (2001-2012) (Rosas-Aguirre et al. 2016). Con respecto a factores ambientales, en el año 1998 durante el fenómeno El Niño-Oscilación Sur (ENSO) se produjo el mayor pico de casos anuales en la historia (200,000 casos), donde la región del norte costero representó el 48% de los casos a nivel nacional (Gagnon et al. 2002).

b. Biología

i. Ciclo de vida

La ecología natural del parásito de la malaria involucra a dos hospederos, el humano y el mosquito, y tres ciclos de vida:

1. El *ciclo hepático o exo-eritrocítico* inicia con la picadura del mosquito infectado, la liberación de los esporozoitos al fluido sanguíneo del humano y su ingreso a las células hepáticas. Aquí se da su desarrollo asexual donde se multiplican hasta formar esquizontes, los cuales egresan al torrente sanguíneo en la forma de merozoitos.
2. El *ciclo eritrocítico* se inicia con la invasión de glóbulos rojos (RBC) y el desarrollo consecutivo de trofozoitos inmaduros, maduros y esquizontes, los cuales a su ruptura liberan nuevos merozoitos que reinfectan a más RBC. Por motivos aún no determinados, a partir de los trofozoitos inmaduros se inicia el desarrollo de gametocitos diferenciándose sexualmente dentro del torrente sanguíneo del humano.
3. El *ciclo esporogónico* o fase sexual se inicia en el mosquito hembra mediante la ingestión accidental de gametocitos en la alimentación sanguínea, con la intención inicial de proveer de nutrientes a sus huevos. En su tracto digestivo se generan cigotos móviles que invaden las paredes intestinales para formar un oocisto donde los esporozoitos se desarrollan y replican hasta su ruptura y liberación. Finalmente migran a las glándulas salivares para continuar la transmisión en la siguiente ingesta de sangre del mosquito hospedero.

ii. Particularidades

P. vivax posee importantes variantes biológicas que caracterizan su epidemiología y dinámica de infección (Howes et al. 2016). Tres de las más importantes son:

1. Presencia de relapsos por la activación de hipnozoitos, el cual es un estado de latencia o dormancia en el *ciclo hepático*, condición que puede generar tanto una liberación prolongada y lenta de merozoitos como reservorios de infección que prolongan su transmisión;
2. Tropismo hacia reticulocitos o RBC inmaduros (1-2% de RBC circulantes) en el *ciclo eritrocítico*, condición que genera bajas parasitemias en comparación a *P. falciparum*; y
3. Dependencia del antígeno *Duffy* para la invasión de RBC, cuya ausencia en individuos con ancestría africana ha sido considerada como un factor de resistencia a *P. vivax*.

5.2.2 Malaria Severa

a. Definición

Ante la ausencia de una descripción especie-específica, la malaria severa por *P. vivax* está definida por los criterios para *P. falciparum* otorgados por la OMS en el 2014 (WHO 2014), el cual incluye una o más de las siguientes (todas registradas en mono-infecciones por *P. vivax*):

1. Condición neurológica: coma, mareo, pérdida de conciencia;
2. Condición hematológica: anemia/trombocitopenia severa;
3. Síntomas sistémicos: shock circulatorio; y
4. Fallo de órganos vitales: disfunción respiratoria, estrés respiratorio agudo, daño renal agudo, ruptura esplénica, disfunción hepática e ictericia (hiperbilirrubina).

b. Epidemiología

A nivel mundial, entre el 2005 y 2015, 1-3% de casos no-complicados fueron asumidos como malaria severa. Esta causó la muerte de 429,000 personas (WHO 2016b), en su mayoría (90%) niños menores de 5 años en África (Wassmer et al. 2015). La vulnerabilidad a esta manifestación ha sido asociada con la intensidad de transmisión y el desarrollo de la inmunidad dependiente a la edad (Reyburn 2005). 1. En zonas de *alta transmisión* como en el África subsahariana, las poblaciones más vulnerables son: niños menores de 5 años con un desarrollo incompleto de inmunidad parcial contra la malaria (Stanisic et al. 2015), mujeres embarazadas en parte a la adhesión placentaria de glóbulos rojos infectados (iRBC) (Rogerson et al. 2007), y viajeros o migrantes sin inmunidad provenientes de áreas con baja o ninguna transmisión de malaria. 2. En zonas de *baja transmisión* como en Asia y América Latina, al haber una menor exposición a la infección, la mayoría de la población llega a la adultez sin haber desarrollado una inmunidad protectora. Como consecuencia, la población adolescente y adulta joven es la más susceptible a desarrollar esta patología (Llanos-Chea et al. 2015), comúnmente al iniciar trabajos a campo abierto, e.g. actividades madereras o mineras, en zonas de alto riesgo de contacto con mosquitos infectados (MINSA 2001).

Con respecto a Perú, en el norte costero Quispe et al. (2014) mediante un estudio retrospectivo (2008-2009) identificaron 81/6502 casos de malaria severa por *P. vivax* con anemia severa (57%), shock circulatorio (25%), hiperbilirrubina (25%), daño pulmonar (21%), daño renal agudo (14%) y Glasgow $\leq 9/14$ (11%). Comparados con los pacientes no complicados, los severos fueron mayores (38 vs 26 años, $P < 0.001$).

Adicionalmente, en el noreste amazónico un reciente estudio prospectivo dirigido por El Centro de Enfermedades Tropicales de la Marina de los Estados Unidos NAMRU-6 (2012-2013) (Smith-Nuñez et al. 2013) identificó 55/164 casos de malaria severa por *P. vivax* con shock circulatorio (27.6%), daño pulmonar (24.5%) hiperbilirrubina (18.1%), daño renal agudo (2%), Glasgow $\leq 9/14$ (2%) y anemia severa (1.7%). No se encontraron diferencias con respecto a la edad entre no-severos y severos (33 vs 29 años, $P = 0.497$). Sin embargo, sí se identificó una mayor proporción de malaria severa en mujeres (52 vs 35%, $P = 0.039$).

c. Biología

i. Patogénesis

Se han propuesto mecanismos en base a lo observado en los casos por *P. falciparum*, donde los procesos de invasión y adhesión parasitaria son relevantes. La respuesta celular contra la parasitemia, sumada a la citoadherencia de iRBC en estadio esquizonte a endotelio o RBC no infectados (proceso llamado “rosetamiento”), desencadena una obstrucción microvascular que activa a las células endoteliales. En respuesta, estas liberan una mayor cantidad de citoquinas proinflamatorias, provocando la pérdida de perfusión y una consecuente disfunción microvascular que progresa por retroalimentación positiva.

ii. Comparación

Históricamente, la malaria por *P. vivax* ha sido considerada como “benigna” en comparación a *P. falciparum* debido a su: (1) baja invasión parasitaria, sesgada a reticulocitos y rutas alternas de menor efectividad; y (2) pobre citoadhesión de sus iRBC, dada por la ausencia de protrusiones abastoadas o *knob protrusions*, codificadas por genes *var*. Sin embargo, la identificación de genes homólogos a *Pf var* (*Pv vir*) y evidencias *post mortem* de iRBC

en capilares pulmonares han sugerido la posibilidad de secuestro tisular por *P. vivax* (Wassmer et al. 2015). En línea con esta evidencia, recientemente se ha demostrado que en los casos severos por *P. vivax* la parasitemia periférica subestima la biomasa parasitaria total, siendo la fracción oculta la mayor contribuyente de citoquinas proinflamatorias, semejante a los casos por *P. falciparum* (Barber et al. 2015).

5.2.3 Respuesta de anticuerpos

La concentración de anticuerpos contra antígenos de *Plasmodium* es un biomarcador sensible a la exposición de malaria (Elliott et al. 2014); sin embargo, las evidencias a favor de dianas para *P. vivax* continúan estando limitadas por la ausencia de cultivos *in vitro* y modelos animales de infección. Este problema se ve reflejado en su escaso número de candidatos a vacuna (PvDBP y PvCSP) en comparación a los 23 de *P. falciparum* (WHO 2016a). Por ello, la principal fuente de evidencia a favor de biomarcadores para *P. vivax* está en la identificación de antígenos con respuestas de anticuerpos asociadas a la adquisición natural de inmunidad en poblaciones endémicas.

a. Marcadores

i. de exposición

Estudios longitudinales han sugerido que, en un inicio, la intensidad de la respuesta de anticuerpos actúa como marcador de exposición la cual, luego de una constante exposición, incrementa hasta superar un umbral de protección (Stanisic et al. 2015). En este sentido, estudios seroepidemiológicos en *P. vivax* han logrado asociar marcadores con exposición (PvCSP, PvMSP-1₁₉, PvMSP-9_{RIRH} y PvAMA-1) e inmunidad (PvMSP-1₁₉, PvMSP-1_{NT}, PvMSP-3 α y PvMSP-9_{NT}) (Cutts et al. 2014).

ii. de inmunidad

En áreas de alta transmisión, los niños adquieren resistencia a la *manifestación severa* de la malaria a la edad de cinco años, aproximadamente. Sin embargo, continúan siendo susceptibles a episodios no-complicados hasta la adolescencia, donde adquieren un estado resistente a la *malaria sintomática*. A pesar de ello, no se ha demostrado que esta adquisición natural de inmunidad por la exposición acumulada a malaria otorgue una *protección esterilizante* o de resistencia a la infección (Crompton et al. 2014). Los detalles de los procesos involucrados en cada una de estas tres fases no están completamente entendidos, pero se tiene detalles de algunos componentes:

1. contra la severidad

La adquisición de anticuerpos que bloqueen la adhesión de iRBC o invasión parasitaria son candidatos a otorgar una protección a este nivel (Wassmer et al. 2015). Antígenos referenciales son (i) las proteínas VIR en *P. vivax*, homólogas a VAR en *P. falciparum*, posiblemente secretadas en iRBC y causantes de adhesividad a endotelio o RBC no infectados, condición que desencadena el rosetamiento y posterior obstrucción microvascular (Portillo et al. 2001), y (ii) las proteínas de la familia PvDBP y PvRBP (*Duffy- y Reticulocyte- binding proteins*), responsables de la invasión a reticulocitos por la ruta tradicional y alternativa, respectivamente (Galinski et al. 1992).

2. contra la enfermedad

En el caso de *P. vivax*, su adquisición ocurre con una mayor rapidez, posiblemente facilitada por sus particularidades biológicas (Mueller et al. 2013). Los antígenos propuestos hasta el momento para esta especie son proteínas del micronema de merozoitos como DBP y AMA1, y proteínas de superficie como MSP1, MSP1-P (región C-terminal), MSP3 (PvMSP-3 α , PvMSP-3 β) y MSP9 (López et al. 2017).

3. contra la parasitemia

La adquisición de una inmunidad esterilizante solo ha sido comprobada mediante la inmunización con esporozoitos atenuados por radiación. Tanto en *P. falciparum* como en *P. vivax* se ha confirmado esta respuesta. Un reciente ensayo clínico de fase 2 en Colombia con *P. vivax* encontró que luego de siete inmunizaciones a lo largo de 56 semanas y una reexposición con esporozoitos infecciosos, 5/12 voluntarios obtuvieron dicha protección

y la respuesta de anticuerpos IgG1 anti-PvCSP estuvo asociada a ella (Arévalo-Herrera et al. 2016).

b. Enfoques a larga escala

El parásito de la malaria, al tener un ciclo de vida complejo con múltiples estadios de desarrollo en el humano, posee también un transcriptoma, proteoma y, por lo tanto, un *inmunoma* estadio-específico que deriva de un total de ~5300 proteínas putativas. Por este motivo, tanto los esfuerzos de vacunas por subunidades como por organismos completos atenuados han fracasado, en contraste a su eficacia en otras infecciones como hepatitis B (HBsAg) y tuberculosis (BCG), respectivamente (De Sousa y Doolan 2016).

i. Inmunómica

En respuesta a las limitaciones de la *vacunología reversa*, basada en el uso inicial de la información genómica de patógenos, el enfoque *inmunómico* hace uso de la información de ambos agentes interactuantes: patógeno y hospedero. Su estrategia selecciona inmunógenos tanto por (1) *métodos empíricos*, usando data transcriptómica y proteómica de patógenos dinámicos más la información clínica del hospedero, como por (2) *métodos teóricos*, empleando algoritmos computacionales predictivos que tomen en cuenta la afinidad entre péptidos del patógeno y moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) del hospedero.

Particularmente, el primer método ha permitido obtener datos empíricos sobre diferencias en la amplitud, intensidad, cinética y longevidad de respuestas inmunes inducidas por patógenos. Además de mayor información sobre aspectos clave como el porcentaje del proteoma reconocido por el hospedero, la capacidad predictiva de anticuerpos sobre el estado de la enfermedad o de las secuencias de aminoácidos sobre su inmunogenicidad (Davies et al. 2015).

5.2.4 Microarreglos de proteínas

Esta es una técnica empleada en la medición a larga escala de las interacciones o actividades de proteínas capaz de reconstruir redes biológicas entre diferentes clases de moléculas y estados celulares (Uzoma y Zhu 2013). Su empleo en el contexto *inmunómico*, con la cuantificación de las interacciones antígeno-anticuerpo, posee características analíticas similares a los microarreglos de ADN (Sundaresh et al. 2006), lo que ha facilitado la adaptación de los componentes estandarizados para el diseño de experimentos en esta tecnología (Allison et al. 2006).

a. Componentes

i. Diseño

El desarrollo de un plan de experimentación tiene el objetivo de maximizar la calidad y cantidad de la información obtenida. Una de las secciones clave dentro del MIAME o “información mínima sobre experimentos basados en microarreglos” (Brazma et al. 2001) es el detalle de la información de los elementos a incluir (e.g., secuencias de moléculas correspondiente a genes específicos). El primer diseño de microarreglos para *P. vivax* y *P. falciparum* fue estandarizado por Finney et al. 2014 (Finney et al. 2014) en base a la evidencia transcriptómica, proteómica y características inmunogénicas de proteínas predichas en ambos genomas. Posteriormente, en el 2015 el Centro Internacional de Excelencia para la Investigación de la Malaria (ICEMR) realizó una subselección empírica de este microarreglo con 142 muestras de 10 países con malaria endémica, entre ellos Perú (King et al. 2015).

ii. Pre procesamiento

Con el objetivo de remover variaciones sistemáticas en el experimento, se ejecutan en forma consecutiva los tres siguientes pasos:

1. Normalización: Permite homogeneizar la variabilidad entre arreglos en base a controles, los cuales se asume que son invariantes entre muestras. Este procedimiento es ejecutado tradicionalmente a través de la sustracción de controles o *fold over control* (FOC), obteniendo el cociente de las lecturas objetivo con respecto a la mediana de los controles negativos por muestra (King et al. 2015);
2. Transformación: Reduce la heterocedasticidad o heterogeneidad de varianzas entre las observaciones por errores aleatorios en el proceso de hibridación (Kreil y Russell 2005).

Este fenómeno se evidencia en el incremento de la varianza directamente proporcional al incremento de su intensidad (Brown et al. 2001). Dependiendo de la dispersión de los datos, se asumen modelos de error multiplicativo o aditivo, donde la transformación logarítmica o arcoseno hiperbólico es ejecutada sobre los valores normalizados.

3. Filtrado: En experimentos a larga escala permite incrementar el poder de detección de elementos con expresión diferenciada (Bourgon et al. 2010). En estos, las estrategias de corrección posteriores a la comparación de múltiples hipótesis son sensibles a esta cantidad. En este sentido, este procedimiento retira de forma preliminar a los elementos con reducidas probabilidades de expresarse diferencialmente.

iii. Inferencia

Su objetivo es poner a prueba hipótesis estadísticas relacionadas a la expresión o reactividad diferencial de elementos entre grupos. Sin embargo, a esta escala se posee dos principales problemas: (1) presencia de varianzas artificialmente altas o bajas producto del bajo número de réplicas entre arreglos o muestras (Baldi y Long 2001) y (2) un amplio número de hipótesis puestas a prueba en forma simultánea, donde los test estadísticos tradicionales pueden generar un largo número de falsos positivos (Kayala y Baldi 2012).

1. Test-t moderado: Un enfoque bayesiano empírico permite reducir (o moderar) las varianzas de todas las lecturas. Bajo el supuesto que las diferencias entre grupos generan cambios en la intensidad promedio del gen mas no en su varianza, se estima una varianza general como probabilidad previa para actualizar (corregir) todas las varianzas observadas en el experimento (Smyth 2004) Con ello, es posible obtener inferencias más estables que el test-t ordinario bajo un contexto limitado de réplicas (Kayala y Baldi 2012).
2. Razón de falsos descubrimientos (FDR): Los métodos de corrección o ajuste de valores P permiten que el investigador pueda controlar la razón de falsos descubrimientos con respecto al total de hipótesis positivas (Brazma et al. 2001). El método Benjamini-Hochberg determina un valor crítico dependiente del total de hipótesis puestas a prueba y el FDR que se desee tolerar, comúnmente del 5% (Benjamini y Hochberg 1995).

iv. Clasificación

Este proceso involucra la asignación de objetos (e.g., genes) en categorías pre-existentes (clasificación supervisada), o el desarrollo progresivo de un conjunto de categorías por características de los objetos. (clasificación no supervisada) (Allison et al. 2006). Ejemplos de esta técnica son *support vector machines* (SVM) con validación por *leave-one-out cross-validation* (LOOCV) y el agrupamiento jerárquico o *hierarchical clustering* de acuerdo a la distancia Euclidiana entre elementos.

v. Parámetros adicionales

Además de la reactividad serológica, dos parámetros han demostrado ser de vital importancia para la caracterización de la respuesta humoral: la amplitud e intensidad de respuesta (Crompton et al. 2010; Helb et al. 2015; King et al. 2015). El primero se obtiene calculando el número de antígenos reactivos por individuo y el segundo por el promedio de sus intensidades. Particularmente, la amplitud ha demostrado ser tan relevante como la reactividad de antígenos individuales en el desarrollo de inmunidad contra la malaria (Crompton et al. 2010).

5.3 Definiciones conceptuales

a. Acrónimos

IVTT: (Proteína) transcrita/traducida *in vitro*.

MFI: Unidad de lectura cruda expresada como intensidad fluorescente promedio de todos los píxeles de cada *spot*, normalizada localmente mediante la sustracción de la intensidad de fondo presente a su alrededor.

RTS: Sistema rápido de traducción de proteínas recombinantes libre de células.

b. Términos

Antígeno-IVTT: Antígeno objetivo o *spot* con proteína IVTT a partir de un plásmido con ADN insertado correspondiente al polipéptido, segmento o exón de interés.

Control-IVTT: Control negativo o *spot* con mix de expresión RTS y plásmido sin ADN insertado, representante de la intensidad de fondo específica del paciente.

Proteína purificada: Control de comparación o *spot* con proteína de antigenicidad conocida expresada dentro de célula.

Intensidad de antígeno: Lectura normalizada de cada antígeno-IVTT entre individuos. También llamada “reactividad serológica”.

Antígeno reactivo: Lectura transformada de cada antígeno-IVTT mayor o igual a dos veces la mediana de los control-IVTT por individuo.

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Material biológico (Población y muestra)

6.1.1 Población

La población está delimitada por pacientes diagnosticados con malaria por *P. vivax* de la ciudad de Iquitos, Loreto - Perú, entre enero del 2012 y junio del 2013 a lo largo de un estudio prospectivo ejecutado en dos hospitales de referencia: Hospital de Apoyo y Hospital Regional.

6.1.2 Criterios de inclusión y exclusión

a. Criterios de inclusión

En el estudio prospectivo mencionado, 164 pacientes con malaria por *P. vivax* fueron enrolados mediante vigilancia pasiva. Según la presencia de uno o más criterios clínicos y de laboratorio de la clasificación OMS para la malaria severa (WHO 2014), los pacientes fueron estratificados como severos o no-severos.

Los criterios clínicos de la clasificación OMS son: Shock circulatorio (presión sanguínea sistólica < 80 mmHg), Deterioro del nivel de conciencia (puntaje Glasgow $\leq 9/14$), Daño del sistema nervioso central (convulsión), Daño pulmonar (síndrome de dificultad respiratoria aguda o edema pulmonar).

Los criterios de laboratorio de la clasificación OMS son: Hipoglicemia (glucosa < 40 mg/dL), Anemia severa (hemoglobina < 7 g/dL), Daño renal (creatinina > 3 mg/dl), e Hiperbilirrubina (bilirrubina sérica > 2.5 mg/dL).

b. Criterios de exclusión

Dos criterios de exclusión fueron empleados: (i) Presencia de coinfecciones con especies de *Plasmodium* distintas a *P. vivax* determinadas por PCR, y (ii) presencia de coinfecciones como leptospirosis, dengue u otra arbovirosis determinada por técnicas de aislamiento viral e inmunofluorescencia.

6.1.3 Selección de participantes

A partir de esta estratificación, se ejecutará una selección arbitraria de 30 pacientes representativos de malaria severa con uno o más criterios de la clasificación OMS para el grupo de casos y una selección aleatoria simple de 30 no-severos para el grupo control.

- Tipo de muestra: No probabilística para los casos y probabilística para los controles. Los elementos del grupo caso provendrán de una selección arbitraria, mientras que el grupo control será seleccionado al azar, i.e. con probabilidad de selección conocida.

6.2 Material de laboratorio

6.2.1 Instrumento de medición

El presente estudio hará uso de microarreglos diseñados con 1014 fragmentos proteicos recombinantes (498 de *P. falciparum* y 516 de *P. vivax*, expresado como Pf498/Pv516 o PfPv500) representando 873 proteínas predichas (427 de *P. falciparum* y 446 de *P. vivax*, ~8% del total predicho para el genoma de *P. vivax* Sal1) seleccionadas luego de una extensiva evaluación serológica con uno de mayor escala (Pf2208/Pv2233) (Finney et al. 2014). Este diseño ha sido validado mediante el sondeo con plasma colectado de pacientes con malaria y controles sanos alrededor del mundo (King et al. 2015) y depositado en la base de datos GEO (GPL18316).

6.2.1.1 Aplicación La aplicación del instrumento consiste en tres pasos: sondeo, escaneo y análisis, tal como ha sido publicado previamente (Driguez et al. 2015). Primero, previo al sondeo los microarreglos se hidratan con buffer de bloqueo dentro de cámaras de incubación. Paralelamente, el plasma de los pacientes se diluye con aquel buffer en 1:100 y se pre-absorbe con lisado de *E. coli* en 10%(w/v), con el objetivo de reducir ruido de fondo en las mediciones tanto por uniones inespecíficas con el sustrato como por antígenos bacterianos del sistema de expresión RTS. Segundo, aspirado el buffer de bloqueo del microarreglo, se procede con el sondeo al agregar el plasma pre-absorbido e incubar *overnight* en cámara húmeda a 4 °C con leve agitación. Tercero, con lavados y aspirados repetitivos antes y después de cada paso, se agrega la solución con anticuerpos secundarios biotinilados y posteriormente la solución con fluoróforos conjugados con estreptavidina. Cuarto, luego de centrifugar las láminas, se procede al escaneo de las fluorescencias con lectores de microarreglos de láser confocal (e.g., Genepix 4300A). Las medidas crudas se obtienen al aplicar una normalización local mediante la sustracción de la intensidad de fondo presente alrededor de cada *spot*, ejecutada en el software del lector (Genepix Pro 7).

6.2.1.2 Validez La validez o exactitud del experimento será evaluada mediante la correlación lineal entre las lecturas de los antígenos-IVTT y sus correspondientes proteínas purificadas por muestra, compuestas por proteínas de inmunogenicidad conocida y expresadas por un sistema dentro de célula (Crompton et al. 2010).

6.2.1.3 Adquisición Todos los reactivos, incluidos los microarreglos, anticuerpos secundarios biotinilados y fluoróforos conjugados con estreptavidina serán adquiridos a la empresa Antigen Discovery, INC (Liang et al. 2004).

6.3 Métodos:

6.3.1 Diseño

El diseño del estudio es de tipo caso-control. Su aplicación consistirá en la selección de la población objetivo por presencia (casos) o ausencia (controles) del evento en estudio. Además se fijará el número de eventos a estudiar, así como el número de sujetos sin evento que se incluirán en la población de comparación.

6.3.1.1 Tipo de investigación

- Por la finalidad: Analítico. A diferencia de un descriptivo, realizaremos comparaciones entre grupos y evaluaremos una posible relación causal entre el factor y el efecto.
- Por el control de la asignación: Observacional. A diferencia de un experimental, no controlaremos la asignación de los factores (severidad y episodios previos). Es decir, procederemos a observar el fenómeno, ejecutar la medición y analizar los resultados.
- Por el seguimiento: Transversal. A diferencia de uno longitudinal, no ejecutaremos un seguimiento. Las variables se medirán una sola vez, en un mismo instante.
- Por la relación cronológica: Prospectivo. A diferencia de un retrospectivo, recolectaremos los datos después de planificado el estudio.

6.3.2 Recolección de los datos e instrumento

6.3.2.1 Técnica para la recolección de datos Previo al tratamiento antimalárico del paciente, se extrajeron las muestras de sangre tanto para el diagnóstico de malaria por *P. vivax* con la técnica de frotis como para las pruebas bioquímicas. Al momento del diagnóstico positivo, bajo consentimiento informado y de forma voluntaria, el plasma sanguíneo fue colectado y conservado a -80 °C hasta su uso.

6.3.3 Codificación y creación del archivo de datos

Cada paciente del estudio estará identificado con un código de estructura LIM####, e.g.: LIM1063. Los antígenos proteicos estarán identificados con el código asignado a sus genes en la base de datos PlasmoDB, e.g.: PF3D7_0202500 o PVX_091315, ya sea un gen de *P. falciparum* o *P. vivax*, respectivamente. En caso los genes posean múltiples exones, se amplificarán por separado y se extenderá el código de cada uno con su número de orden y el total, e.g.: _1o2 exón 1 de un gen con 2 exones. En caso los genes posean una longitud mayor a 3000 nucleótidos (nt), se dividirán en segmentos sobrelapantes entre 300-3000nt y se extenderá el código de cada uno con su respectivo número, e.g.: _S1 para el primer segmento de un gen.

Los datos serán organizados en dos matrices: (i) archivo `samples.csv` con los códigos de los pacientes y sus covariables epidemiológicas y (ii) archivo `RawData.csv` con los códigos de las proteínas y sus lecturas crudas en MFI por código de paciente.

6.3.4 Análisis de datos

Se hará uso del software de computación estadística R (R Core Team 2016), complementado con funciones de distintos paquetes pertenecientes a dos principales ambientes de análisis: Bioconductor (Gentleman et al. 2004) y Tidyverse (Wickham y Grolemund 2016).

6.3.4.1 Control de calidad y pre procesamiento Preliminarmente, se describirá la distribución y proporción de las covariables epidemiológicas, clínicas y bioquímicas de los pacientes de la muestra. Luego, con las lecturas crudas en MFI se evaluará la validez del ensayo mediante un test de asociación entre variables continuas con la correlación de Pearson (r) o Spearman (ρ), de acuerdo a la distribución, asumiendo un error del 5%. Posteriormente, se procederá con la normalización entre muestras de cada antígeno-IVTT con respecto a la mediana de los control-IVTT por individuo, transformación a escala logarítmica en base 2, y filtrado de todo antígeno que posea una frecuencia de reactividad menor al 10% de individuos en la muestra. Para ello, un antígeno reactivo será definido operacionalmente como el antígeno-IVTT con intensidad normalizada mayor o igual a 1. Por último, se asociarán ambas matrices de datos en un `ExpressionSet`, a través de los códigos de pacientes, empleando el paquete `Biobase` (Huber et al. 2015).

6.3.4.2 Prueba de hipótesis Las dos hipótesis de diferencia entre grupos seguirán el siguiente protocolo. Primero, se contrastará la amplitud e intensidad de respuesta con un test de diferencias entre variables continuas y no pareadas de dos grupos usando t-Student o Mann-Whitney, dependiendo de la distribución, con un 5% de error asumido. Segundo, se realizará un test de reactividad diferenciada de anticuerpos entre dos grupos, usando el test-t moderado (Smyth 2004) con corrección por comparación múltiple de la razón de falsos descubrimientos (FDR) por el método de Benjamini-Hochberg, disponible en el paquete `limma` (Ritchie et al. 2015), con un 5% de error asumido. Tercero, se realizará un agrupamiento jerárquico o *hierarchical clustering* de los antígenos identificados en base a su distancia euclidiana, disponible en el paquete `NMF` (Gaujoux y Seoighe 2010). Finalmente, se describirá la presencia de dominios transmembrana, péptido señal, número de ortólogos en *Plasmodium*, ontología génica, número de polimorfismos de nucleótido simple y la razón de mutaciones no-sinónimas por sinónimas para el subgrupo de interés, disponible en la base de datos PlasmoDB (Aurrecochea et al. 2008).

6.3.4.3 Reporte de resultados Las correlaciones y pruebas de hipótesis serán reportadas con el valor del estadístico de prueba y el valor P. Las distribuciones serán visualizadas con diagramas de dispersión para la correlación entre variables continuas, diagramas de cajas y barras para la comparación de variables continuas y frecuencias, respectivamente. Las comparaciones múltiples reportarán el valor P-ajustado y serán visualizadas con dos gráficos: un diagrama tipo volcán o *volcano plot* con el tamaño del efecto o diferencia de reactividad entre grupos en escala logarítmica contra sus respectivos valores P y un mapa de calor o *heat map* segmentado por racimos o *clusters*. El informe final consistirá de un

reporte en formato R Notebook con extensión .Rmd que integrará texto, código y resultados (Xie 2013), siguiendo principios de reproducibilidad (Rodríguez-Sánchez et al. 2016).

7 CRONOGRAMA DE TRABAJO

El Proyecto de Tesis fue trabajado en el Departamento de Parasitología del Centro de Enfermedades Tropicales de la Marina de los Estados Unidos NAMRU-6, del 01 de enero del 2016 al 31 de diciembre del 2016, de acuerdo al cronograma de la Tabla 2.

Tabla 2: Cronograma

ACTIVIDAD	2016											
	ene	feb	mar	abr	may	jun	jul	ago	set	oct	nov	dic
Recolección de datos	x											
Análisis de datos		x	x	x	x	x						
Interpretación de resultados						x	x	x				
Redacción de discusión								x	x	x		
Redacción de conclusiones										x	x	x

8 PRESUPUESTO GLOBAL

El presupuesto detallado en la Tabla 3 fue ejecutado con financiamiento interno de la institución.

Tabla 3: Presupuesto

DESCRIPCIÓN	MONTO (\$/)
Bienes	
Papelería, útiles y material de oficina	50.00
Insumos e instrumental de laboratorio	200.00
Servicios	
Compra, sondeo y lectura de microarreglos	29,610.00
Gastos en el transporte de muestras	2,000.00
TOTAL	31,860.00

9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLISON, David B., CUI, Xiangqin, PAGE, Grier P. y SABRIPOUR, Mahyar, 2006. Microarray data analysis: from disarray to consolidation and consensus. *Nature reviews genetics*, vol. 7, no. 1, pp. 55-65. DOI [10.1038/nrg1749](https://doi.org/10.1038/nrg1749).
- ARÉVALO-HERRERA, Myriam, FORERO-PENÑA, David A., RUBIANO, Kelly, GÓMEZ-HINCAPIE, José, MARTÍNEZ, Nora L., LOPEZ-PEREZ, Mary, CASTELLANOS, Angélica, CÉSPEDES, Nora, PALACIOS, Ricardo, OÑATE, José Millán y HERRERA, Sócrates, 2014. Plasmodium vivax Sporozoite Challenge in Malaria-Naïve and Semi-Immune Colombian Volunteers. En: A. GREGSON (ed.), *PLoS ONE* [en línea], vol. 9, no. 6, pp. e99754. DOI [10.1371/journal.pone.0099754](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099754). Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099754>.
- ARÉVALO-HERRERA, Myriam, VÁSQUEZ-JIMÉNEZ, Juan M., LOPEZ-PEREZ, Mary, VALLEJO, Andrés F., AMADO-GARAVITO, Andrés B., CÉSPEDES, Nora, CASTELLANOS, Angélica, MOLINA, Karen, TREJOS, Johanna, OÑATE, José, EPSTEIN, Judith E., RICHIE, Thomas L. y HERRERA, Sócrates, 2016. Protective Efficacy of Plasmodium vivax Radiation-Attenuated Sporozoites in Colombian Volunteers: A Randomized Controlled Trial. En: D.J. DIEMERT (ed.), *PLOS Neglected Tropical Diseases* [en línea], vol. 10, no. 10, pp. e0005070. DOI [10.1371/journal.pntd.0005070](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005070). Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005070>.

- AURRECOECHEA, Cristina, BRESTELLI, John, BRUNK, Brian P., DOMMER, Jennifer, FISCHER, Steve, GAJRIA, Bindu, GAO, Xin, GINGLE, Alan, GRANT, Greg, HARB, Omar S., HEIGES, Mark, INNAMORATO, Frank, IODICE, John, KISSINGER, Jessica C., KRAEMER, Eileen, LI, Wei, MILLER, John A., NAYAK, Vishal, PENNINGTON, Cary, PINNEY, Deborah F., ROOS, David S., ROSS, Chris, STOECKERT, Jr., Christian J., TREATMAN, Charles y WANG, Haiming, 2008. PlasmoDB: a functional genomic database for malaria parasites. *Nucleic Acids Research* [en línea], vol. 37, pp. D539-D543. ISSN 0305-1048. DOI [10.1093/nar/gkn814](https://doi.org/10.1093/nar/gkn814). Disponible en: <https://doi.org/10.1093/nar/gkn814>.
- BAIRD, J. Kevin, 2009. Severe and fatal vivax malaria challenges 'benign tertian malaria' dogma. *Annals of tropical paediatrics*, vol. 29, no. 4, pp. 251-252. DOI [10.1179/027249309X12547917868808](https://doi.org/10.1179/027249309X12547917868808).
- BALDEVIANO, G. Christian, LEIVA, Karina P., QUISPE, Antonio M., VENTOCILLA, Julio, TAPIA, L. Lorena, DURAND, Salomon, SANTOLALLA, Meddy L., RICOPA, Leonila, CAMPOS, Karen, SIHUINCHA, Moises, SMITH, Edward S., EDGEL, Kimberly A. y LESCANO, Andres G., 2013. Serum Markers of Severe clinical complications during Plasmodium vivax malaria monoinfections in the Peruvian Amazon basin. *Abstract Book of the ASTMH 62nd Annual Meeting, Nov. 13-17, Washington D.C., United States* [en línea]. S.l.: s.n., pp. 340. Disponible en: <http://www.astmh.org/ASTMH/media/Documents/AbstractBook2013Final.pdf>.
- BALDI, Pierre y LONG, Anthony D., 2001. A Bayesian framework for the analysis of microarray expression data: regularized t-test and statistical inferences of gene changes. *Bioinformatics*, vol. 17, no. 6, pp. 509-519. DOI [10.1093/bioinformatics/17.6.509](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.6.509).
- BARBER, Bridget E., WILLIAM, Timothy, GRIGG, Matthew J., PARAMESWARAN, Uma, PIERA, Kim A., PRICE, Ric N., YEO, Tsin W. y ANSTEY, Nicholas M., 2015. Parasite biomass-related inflammation, endothelial activation, microvascular dysfunction and disease severity in vivax malaria. *PLoS Pathog* [en línea], vol. 11, no. 1, pp. 1-13. DOI [10.1371/journal.ppat.1004558](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004558). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371>.
- BENJAMINI, Yoav y HOCHBERG, Yosef, 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the royal statistical society. Series B (Methodological)*, pp. 289-300. DOI [10.2307/2346101](https://doi.org/10.2307/2346101).
- BOURGON, Richard, GENTLEMAN, Robert y HUBER, Wolfgang, 2010. Independent filtering increases detection power for high-throughput experiments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en línea], vol. 107, no. 21, pp. 9546-9551. DOI [10.1073/pnas.0914005107](https://doi.org/10.1073/pnas.0914005107). Disponible en: <http://www.pnas.org/content/107/21/9546.abstract>.
- BRAZMA, Alvis, HINGAMP, Pascal, QUACKENBUSH, John, SHERLOCK, Gavin, SPELLMAN, Paul, STOECKERT, Chris, AACH, John, ANSORGE, Wilhelm, BALL, Catherine A., CAUSTON, Helen C., GAASTERLAND, Terry, GLENNISON, Patrick, HOLSTEGE, Frank C.P., KIM, Irene F., MARKOWITZ, Victor, MATESE, John C., PARKINSON, Helen, ROBINSON, Alan, SARKANS, Ugis, SCHULZE-KREMER, Steffen, STEWART, Jason, TAYLOR, Ronald, VILO, Jaak y VINGRON, Martin, 2001. Minimum information about a microarray experiment (MIAME) toward standards for microarray data. *Nature Genetics* [en línea], vol. 29, no. 4, pp. 365-371. DOI [10.1038/ng1201-365](https://doi.org/10.1038/ng1201-365). Disponible en: <https://doi.org/10.1038/ng1201-365>.
- BROWN, Carl S., GOODWIN, Paul C. y SORGER, Peter K., 2001. Image metrics in the statistical analysis of DNA microarray data. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 98, no. 16, pp. 8944-8949. DOI [10.1073/pnas.161242998](https://doi.org/10.1073/pnas.161242998).
- CDC PERÚ, 2020. *Sala Situacional de Malaria, Perú 2015-2020 hasta la Semana Epidemiológica 25* [en línea]. S.l.: Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades - Ministerio de Salud. ISBN RM-244-2017. Disponible en: <https://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2020/SE25/malaria.pdf>.
- CHUNG, Duk-Won, DONG, PONTIS, Nadia, CERVANTES, Serena y LE ROCH, Karine G., 2009. Post-translational modifications in Plasmodium: more than you think! *Molecular and biochemical parasitology*, vol. 168, no. 2, pp. 123-134. DOI [10.1016/j.molbiopara.2009.08.001](https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.08.001).
- CHUQUIYAURI, Raul, BROUWER, Kimberly C., FELGNER, Philip, GILMAN, Robert H., MOSS, Eli L., VINETZ, Joseph M., GARDNER, Malcolm J., NEAFSEY, Daniel E., MOLINA, Douglas M., TORRES, Sonia, LLANOS-CUENTAS, Alejandro, LIANG, Xiaowu y WANG, Ruobing, 2015.

- Genome-Scale Protein Microarray Comparison of Human Antibody Responses in Plasmodium vivax Relapse and Reinfection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* [en línea], vol. 93, no. 4, pp. 801-809. DOI [10.4269/ajtmh.15-0232](https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0232). Disponible en: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0232>.
- CROMPTON, Peter D., KAYALA, Matthew A., TRAORE, Boubacar, KAYENTAO, Kassoum, ONGOIBA, Aissata, WEISS, Greta E., MOLINA, Douglas M., BURK, Chad R., WAISBERG, Michael, JASINSKAS, Algis, TAN, Xiaolin, DOUMBO, Safiatou, DOUMTABE, Didier, KONE, Younoussou, NARUM, David L., LIANG, Xiaowu, DOUMBO, Ogobara K., MILLER, Louis H., DOOLAN, Denise L., BALDI, Pierre, FELGNER, Philip L. y PIERCE, Susan K., 2010. A prospective analysis of the Ab response to Plasmodium falciparum before and after a malaria season by protein microarray. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en línea], vol. 107, no. 15, pp. 6958-6963. ISSN 0027-8424. DOI [10.1073/pnas.1001323107](https://doi.org/10.1073/pnas.1001323107). Disponible en: <https://www.pnas.org/content/107/15/6958>.
- CROMPTON, Peter D., MOEBIUS, Jacqueline, PORTUGAL, Silvia, WAISBERG, Michael, HART, Geoffrey, GARVER, Lindsey S., MILLER, Louis H., BARILLAS-MURY, Carolina y PIERCE, Susan K., 2014. Malaria immunity in man and mosquito: insights into unsolved mysteries of a deadly infectious disease. *Annual review of immunology* [en línea], vol. 32, pp. 157-187. DOI [10.1146/annurev-iy-32-060414-200001](https://doi.org/10.1146/annurev-iy-32-060414-200001). Disponible en: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-iy-32-060414-200001>.
- CUTTS, Julia C., POWELL, Rosanna, AGIUS, Paul A., BEESON, James G., SIMPSON, Julie A. y FOWKES, Freya JI, 2014. Immunological markers of Plasmodium vivax exposure and immunity: a systematic review and meta-analysis. *BMC medicine* [en línea], vol. 12, no. 1, pp. 150. ISSN 1741-7015. DOI [10.1186/s12916-014-0150-1](https://doi.org/10.1186/s12916-014-0150-1). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s12916-014-0150-1>.
- DAVIES, D.Huw, DUFFY, Patrick, BODMER, Jean-Luc, FELGNER, Philip L. y DOOLAN, Denise L., 2015. Large screen approaches to identify novel malaria vaccine candidates. *Vaccine* [en línea], vol. 33, no. 52, pp. 7496-7505. DOI [10.1016/j.vaccine.2015.09.059](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.09.059). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.09.059>.
- DE SOUSA, Karina P. y DOOLAN, Denise L., 2016. Immunomics: a 21st century approach to vaccine development for complex pathogens. *Parasitology*, vol. 143, no. 02, pp. 236-244. DOI [10.1017/S0031182015001079](https://doi.org/10.1017/S0031182015001079).
- DRIGUEZ, Patrick, DOOLAN, Denise L., MOLINA, Douglas M., LOUKAS, Alex, TRIEU, Angela, FELGNER, Phil L. y MCMANUS, Donald P., 2015. Protein microarrays for parasite antigen discovery. *Parasite genomics protocols*, pp. 221-233. DOI [10.1007/978-1-4939-1438-8_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1438-8_13).
- ELLIOTT, Salenna R., FOWKES, FJ, RICHARDS, Jack S., REILING, Linda, DREW, Damien R. y BEESON, James G., 2014. Research priorities for the development and implementation of serological tools for malaria surveillance. *F1000Prime Rep*, vol. 6, pp. 100. DOI [10.12703/P6-100](https://doi.org/10.12703/P6-100).
- FINNEY, Olivia C., DANZIGER, Samuel A., MOLINA, Douglas M., VIGNALI, Marissa, TAKAGI, Aki, JI, Ming, STANISIC, Danielle I., SIBA, Peter M., LIANG, Xiawu, AITCHISON, John D., MUELLER, Ivo, GARDNER, Malcolm J. y WANG, Ruobing, 2014. Predicting Antidisease Immunity Using Proteome Arrays and Sera from Children Naturally Exposed to Malaria. *Molecular & Cellular Proteomics* [en línea], vol. 13, no. 10, pp. 2646-2660. DOI [10.1074/mcp.M113.036632](https://doi.org/10.1074/mcp.M113.036632). Disponible en: <http://www.mcponline.org/content/13/10/2646.abstract>.
- GAGNON, Alexandre S., SMOYER-TOMIC, Karen E. y BUSH, Andrew B., 2002. The El Niño southern oscillation and malaria epidemics in South America. *International Journal of Biometeorology*, vol. 46, no. 2, pp. 81-89. DOI [10.1007/s00484-001-0119-6](https://doi.org/10.1007/s00484-001-0119-6).
- GALINSKI, Mary R., MEDINA, Claudia Corredor, INGRAVALLO, Paul y BARNWELL, John W., 1992. A reticulocyte-binding protein complex of Plasmodium vivax merozoites. *Cell*, vol. 69, no. 7, pp. 1213-1226. DOI [10.1016/0092-8674\(92\)90642-P](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90642-P).
- GAUJOUX, Renaud y SEOIGHE, Cathal, 2010. A flexible R package for nonnegative matrix factorization. *BMC Bioinformatics* [en línea], vol. 11, no. 1, pp. 367. DOI [10.1186/1471-2105-11-367](https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-367). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-11-367>.

- GENTLEMAN, Robert C., CAREY, Vincent J., BATES, Douglas M., BOLSTAD, Ben, DETTLING, Marcel, DUDOIT, Sandrine, ELLIS, Byron, GAUTIER, Laurent, GE, Yongchao, GENTRY, Jeff, HORNIK, Kurt, HOTHORN, Torsten, HUBER, Wolfgang, IACUS, Stefano, IRIZARRY, Rafael, LEISCH, Friedrich, LI, Cheng, MAECHLER, Martin, ROSSINI, Anthony J., SAWITZKI, Gunther, SMITH, Colin, SMYTH, Gordon, TIERNEY, Luke, YANG, Jean YH y ZHANG, Jianhua, 2004. *Genome Biology* [en línea], vol. 5, no. 10, pp. R80. DOI [10.1186/gb-2004-5-10-r80](https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-10-r80). Disponible en: <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-10-r80>.
- GRIFFING, Sean M., GAMBOA, Dionicia y UDHAYAKUMAR, Venkatachalam, 2013. The history of 20 th century malaria control in Peru. *Malaria journal* [en línea], vol. 12, no. 1, pp. 303. DOI [10.1186/1475-2875-12-303](https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-303). Disponible en: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-12-303>.
- HELB, Danica A., TETTEH, Kevin K.A., FELGNER, Philip L., SKINNER, Jeff, HUBBARD, Alan, ARINAITWE, Emmanuel, MAYANJA-KIZZA, Harriet, SSEWANYANA, Isaac, KAMYA, Moses R., BEESON, James G., TAPPERO, Jordan, SMITH, David L., CROMPTON, Peter D., ROSENTHAL, Philip J., DORSEY, Grant, DRAKELEY, Christopher J. y GREENHOUSE, Bryan, 2015. Novel serologic biomarkers provide accurate estimates of recent Plasmodium falciparum exposure for individuals and communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en línea], vol. 112, no. 32, pp. E4438-E4447. DOI [10.1073/pnas.1501705112](https://doi.org/10.1073/pnas.1501705112). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1501705112>.
- HOWES, Rosalind E., BATTLE, Katherine E., MENDIS, Kamini N., SMITH, David L., CIBULSKIS, Richard E., BAIRD, J. Kevin y HAY, Simon I., 2016. Global epidemiology of Plasmodium vivax. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* [en línea], vol. 95, no. 6 Suppl, pp. 15-34. DOI [10.4269/ajtmh.16-0141](https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0141). Disponible en: <http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.16-0141>.
- HUBER, Wolfgang, CAREY, Vincent J., GENTLEMAN, Robert, ANDERS, Simon, CARLSON, Marc, CARVALHO, Benilton S., BRAVO, Hector Corrada, DAVIS, Sean, GATTO, Laurent, GIRKE, Thomas, GOTTARDO, Raphael, HAHNE, Florian, HANSEN, Kasper D., IRIZARRY, Rafael A., LAWRENCE, Michael, LOVE, Michael I., MACDONALD, James, OBENCHAIN, Valerie, OLEŚ, Andrzej K., PAGÈS, Hervé, REYES, Alejandro, SHANNON, Paul, SMYTH, Gordon K., TENENBAUM, Dan, WALDRON, Levi y MORGAN, Martin, 2015. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nature Methods* [en línea], vol. 12, no. 2, pp. 115-121. DOI [10.1038/nmeth.3252](https://doi.org/10.1038/nmeth.3252). Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nmeth.3252>.
- KAYALA, Matthew A. y BALDI, Pierre, 2012. Cyber-T web server: differential analysis of high-throughput data. *Nucleic acids research*, vol. 40, no. W1, pp. W553-W559. DOI [10.1093/nar/gks420](https://doi.org/10.1093/nar/gks420).
- KING, Christopher L., DAVIES, D. Huw, FELGNER, Phil, BAUM, Elizabeth, JAIN, Aarti, RANDALL, Arlo, TETTEH, Kevin, DRAKELEY, Christopher J. y GREENHOUSE, Bryan, 2015. Biosignatures of Exposure/Transmission and Immunity. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* [en línea], vol. 93, no. 3_Suppl, pp. 16-27. DOI [10.4269/ajtmh.15-0037](https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0037). Disponible en: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0037>.
- KREIL, David P. y RUSSELL, Roslin R., 2005. Tutorial section: There is no silver bullet—a guide to low-level data transforms and normalisation methods for microarray data. *Briefings in bioinformatics*, vol. 6, no. 1, pp. 86-97. DOI [10.1093/bib/6.1.86](https://doi.org/10.1093/bib/6.1.86).
- LIANG, Xiaowu, YEE, Angela, CAMPO, Joe, HERMANSON, Gary, RANDALL, Arlo y FELGNER, Philip L., 2004. *Antigen Discovery Incorporated* [en línea]. S.l.: s.n. Disponible en: www.antigendiscovery.com.
- LLANOS-CHEA, Fiorella, MARTÍNEZ, Dalila, ROSAS, Angel, SAMALVIDES, Frine, VINETZ, Joseph M. y LLANOS-CUENTAS, Alejandro, 2015. Characteristics of Travel-Related Severe Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum Malaria in Individuals Hospitalized at a Tertiary Referral Center in Lima, Peru. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* [en línea], vol. 93, no. 6, pp. 1249-1253. DOI [10.4269/ajtmh.14-0652](https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0652). Disponible en: <http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.14-0652>.
- LÓPEZ, Carolina, YEPES-PÉREZ, Yoelis, HINCAPIÉ-ESCOBAR, Natalia, DÍAZ-ARÉVALO, Diana y PATARROYO, Manuel A., 2017. what is Known about the immune Response induced by

- Plasmodium vivax Malaria vaccine Candidates? *Frontiers in immunology* [en línea], vol. 8. DOI 10.3389/fimmu.2017.00126. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.00126>.
- MINSA, 2001. *Factores de riesgo de la malaria grave en el Perú* [en línea]. S.l.: Ministerio de Salud: Proyecto Vigía (MINSA-USAID). ISBN 9972-820-24-6. Disponible en: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/minsa/1772.pdf>.
- MINSA, 2015. *Norma Técnica de Salud para la atención de la Malaria y Malaria Grave en el Perú* [en línea]. S.l.: Ministerio de Salud. ISBN RM-116-2015. Disponible en: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/4373.pdf>.
- MINSA, 2017. *Plan Malaria Cero. Periodo 2017-2021* [en línea]. S.l.: Ministerio de Salud. ISBN RM-244-2017. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/minsa/normas-legales/189846-244-2017-minsa>.
- MUELLER, Ivo, GALINSKI, Mary R., TSUBOI, Takafumi, ARÉVALO-HERRERA, Myriam, COLLINS, William E. y KING, Christopher L., 2013. Natural acquisition of immunity to Plasmodium vivax: epidemiological observations and potential targets. *Adv Parasitol* [en línea], vol. 81, pp. 77-131. DOI 10.1016/B978-0-12-407826-0.00003-5. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124078260000035?via>.
- PATH, 2011. *Staying the Course? Malaria Research and Development in a Time of Economic Uncertainty* [en línea]. S.l.: Seattle, WA: PATH. ISBN 978-0-9829522-0-7. Disponible en: www.malariavaccine.org/files/RD-report-June2011.pdf.
- PORTILLO, Hernando A. del, FERNANDEZ-BECERRA, Carmen, BOWMAN, Sharen, OLIVER, Karen, PREUSS, Martin, SANCHEZ, Cecilia P., SCHNEIDER, Nick K., VILLALOBOS, Juan M., RAJANDREAM, Marie-Adele, HARRIS, David, SILVA, Luiz H.Pereira da, BARRELL, Bart y LANZER, Michael, 2001. A superfamily of variant genes encoded in the subtelomeric region of Plasmodium vivax. *Nature* [en línea], vol. 410, no. 6830, pp. 839-842. DOI 10.1038/35071118. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/35071118>.
- QUISPE, Antonio, LLANOS-CUENTAS, Alejandro, RODRIGUEZ, Hugo, CLENDENES, Martin, CABEZAS, Cesar, LEON, Luis M., CHUQUIYAURI, Raul, MORENO, Marta, KASLOW, David C., GROGL, Max, HERRERA, Sócrates, MAGILL, Alan J., KOSEK, Margaret, VINETZ, Joseph M., LESCANO, Andres G. y GOTUZZO, Eduardo, 2016. Accelerating to Zero: Strategies to Eliminate Malaria in the Peruvian Amazon. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* [en línea], vol. 94, no. 6, pp. 1200-1207. DOI 10.4269/ajtmh.15-0369. Disponible en: <http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.15-0369>.
- QUISPE, Antonio, POZO, Edwar, GUERRERO, Edith, DURAND, Salomón, BALDEVIANO, G.Christian, EDGEL, Kimberly A., GRAF, Paul CF y LESCANO, Andres G., 2014. Plasmodium vivax hospitalizations in a monoendemic malaria region: severe vivax malaria? *The American journal of tropical medicine and hygiene* [en línea], vol. 91, no. 1, pp. 11-17. DOI 10.4269/ajtmh.12-0610. Disponible en: <http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.12-0610>.
- R CORE TEAM, 2016. *R: A Language and Environment for Statistical Computing* [en línea]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Disponible en: <https://www.R-project.org/>.
- REYBURN, Hugh, 2005. Association of Transmission Intensity and Age With Clinical Manifestations and Case Fatality of Severe Plasmodium falciparum Malaria. *JAMA* [en línea], vol. 293, no. 12, pp. 1461. DOI 10.1001/jama.293.12.1461. Disponible en: <https://doi.org/10.1001/jama.293.12.1461>.
- RITCHIE, Matthew E., PHIPSON, Belinda, WU, Di, HU, Yifang, LAW, Charity W., SHI, Wei y SMYTH, Gordon K., 2015. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, vol. 43, no. 7, pp. e47. DOI 10.1093/nar/gkv007.
- RODRÍGUEZ-SANCHEZ, Francisco, PÉREZ-LUQUE, Antonio Jesús, BARTOMEUS, Ignasi y VARELA, Sara, 2016. Ciencia reproducible: qué, por qué, cómo? *ECOS* [en línea], vol. 25, no. 2, pp. 83-92. DOI 10.7818/ecos.2016.25-2.11. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.7818/ECOS.2016.25-2.11>.
- ROGERSON, Stephen J., HVIID, Lars, DUFFY, Patrick E., LEKE, Rose FG y TAYLOR, Diane W., 2007. Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. *The Lancet infectious diseases*, vol. 7, no.

- 2, pp. 105-117. DOI [10.1016/S1473-3099\(07\)70022-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70022-1).
- ROSAS-AGUIRRE, Angel, GAMBOA, Dionicia, MANRIQUE, Paulo, CONN, Jan E., MORENO, Marta, LESCOANO, Andres G., SANCHEZ, Juan F., RODRIGUEZ, Hugo, SILVA, Hermann, LLANOS-CUENTAS, Alejandro y VINETZ, Joseph M., 2016. Epidemiology of Plasmodium vivax Malaria in Peru. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* [en línea], vol. 95, no. 6 Suppl, pp. 133-144. DOI [10.4269/ajtmh.16-0268](https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0268). Disponible en: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0268>.
- ROSAS-AGUIRRE, Angel, SPEYBROECK, Niko, LLANOS-CUENTAS, Alejandro, ROSANAS-URGELL, Anna, CARRASCO-ESCOBAR, Gabriel, RODRIGUEZ, Hugo, GAMBOA, Dionicia, CONTRERAS-MANCILLA, Juan, ALAVA, Freddy, SOARES, Irene S., REMARQUE, Edmond, DALESSANDRO, Umberto y ERHART, Annette, 2015. Hotspots of Malaria Transmission in the Peruvian Amazon: Rapid Assessment through a Parasitological and Serological Survey. En: L.H. CARVALHO (ed.), *PLOS ONE* [en línea], vol. 10, no. 9, pp. e0137458. DOI [10.1371/journal.pone.0137458](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137458). Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137458>.
- SMITH-NUÑEZ, Edward S., DURAND, Salomon, BALDEVIANO, G.Christian, QUISPE, Antonio M., JACQUERIOZ, Frederique, SIHUINCHA, Moises, CELIS, Juan C., TAPIA, Lorena, CAMPOS, Karen, EDGEL, Kimberly A. y LESCOANO, andres G., 2013. WHO criteria for severe malaria in identifying severe vivax malaria: Preliminary data from a study in Iquitos, Peru. *Abstract Book of the ASTMH 62nd Annual Meeting, Nov. 13-17, Washington D.C., United States* [en línea]. S.l.: s.n., pp. 398. Disponible en: <http://www.astmh.org/ASTMH/media/Documents/AbstractBook2013Final.pdf>.
- SMYTH, Gordon K., 2004. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*, vol. 3, no. 1, pp. 3. DOI [10.2202/1544-6115.1027](https://doi.org/10.2202/1544-6115.1027).
- STANISIC, Danielle I., FOWKES, Freya J.I., KOINARI, Melanie, JAVATI, Sarah, LIN, Enmoore, KINIBORO, Benson, RICHARDS, Jack S., ROBINSON, Leanne J., SCHOFIELD, Louis, KAZURA, James W., KING, Christopher L., ZIMMERMAN, Peter, FELGER, Ingrid, SIBA, Peter M., MUELLER, Ivo y BEESON, James G., 2015. 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. *Infection and Immunity* [en línea], vol. 83, no. 2, pp. 646-660. DOI [10.1128/IAI.02398-14](https://doi.org/10.1128/IAI.02398-14). Disponible en: <http://iai.asm.org/content/83/2/646.abstract>.
- SUNDARESH, Suman, DOOLAN, Denise L., HIRST, Siddiqua, MU, Yunxiang, UNAL, Berkay, DAVIES, D.Huw, FELGNER, Philip L. y BALDI, Pierre, 2006. Identification of humoral immune responses in protein microarrays using DNA microarray data analysis techniques. *Bioinformatics*, vol. 22, no. 14, pp. 1760-1766. DOI [10.1093/bioinformatics/btl162](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl162).
- TORRES, Katherine J., CASTRILLON, Carlos E., MOSS, Eli L., SAITO, Mayuko, TENORIO, Roy, MOLINA, Douglas M., DAVIES, Huw, NEAFSEY, Daniel E., FELGNER, Philip, VINETZ, Joseph M. y GAMBOA, Dionicia, 2014. Genome-Level Determination of Plasmodium falciparum Blood-Stage Targets of Malarial Clinical Immunity in the Peruvian Amazon. *The Journal of Infectious Diseases* [en línea], vol. 211, no. 8, pp. 1342-1351. DOI [10.1093/infdis/jiu614](https://doi.org/10.1093/infdis/jiu614). Disponible en: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu614>.
- TOVAR-ACERO, Catalina, VELASCO, María Camila, AVILÉS-VERGARA, Paula Andrea, RICARDO-CALDERA, Dina Marcela, ALVIS, Erasmo Manuel, MONTTOYA, Javier Ramirez - y ACOSTA, Maria Fernanda Yasnot, 2021. Liver and kidney dysfunction, hypoglycemia, and thrombocytopenia in Plasmodium vivax malaria patients at a Colombian Northwest region. *Parasite Epidemiology and Control* [en línea], vol. 13, pp. e00203. DOI [10.1016/j.parepi.2021.e00203](https://doi.org/10.1016/j.parepi.2021.e00203). Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2021.e00203>.
- UZOMA, Ijeoma y ZHU, Heng, 2013. Interactome mapping: using protein microarray technology to reconstruct diverse protein networks. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, vol. 11, no. 1, pp. 18-28. DOI [10.1016/j.gpb.2012.12.005](https://doi.org/10.1016/j.gpb.2012.12.005).
- VIGIL, Adam, DAVIES, D.Huw y FELGNER, Philip L., 2010. Defining the humoral immune response to infectious agents using high-density protein microarrays. *Future microbiology*, vol. 5, no. 2, pp. 241-251. DOI [10.2217/fmb.09.127](https://doi.org/10.2217/fmb.09.127).

- WASSMER, Samuel C., TAYLOR, Terrie E., RATHOD, Pradipsinh K., MISHRA, Saroj K., MOHANTY, Sanjib, AREVALO-HERRERA, Myriam, DURAISINGH, Manoj T. y SMITH, Joseph D., 2015. Investigating the pathogenesis of severe malaria: a multidisciplinary and cross-geographical approach. *The American journal of tropical medicine and hygiene* [en línea], vol. 93, no. 3 Suppl, pp. 42-56. DOI 10.4269/ajtmh.14-0841. Disponible en: <http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.14-0841>.
- WHO, 2014. Severe Malaria. *Trop Med Int Health* [en línea], vol. 19, pp. 7-131. DOI 10.1111/tmi.12313_2. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1111/tmi.12313_2.
- WHO, 2016a. Malaria Vaccine Rainbow Tables. En: Accessed: 15-june-2017 [en línea]. S.l.: World Health Organization. Accessed: 15-june-2017, Disponible en: http://www.who.int/vaccine_research/links/Rainbow/en/index.html.
- WHO, 2016b. *World malaria report 2016* [en línea]. S.l.: Geneva: World Health Organization. ISBN 978-92-4-151171-1. Disponible en: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2016/report/en/>.
- WHO, 2020. World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges.,
- WICKHAM, Hadley y GROLEMUND, Garrett, 2016. *R for data science* [en línea]. S.l.: Sebastopol, CA: O'Reilly. ISBN 978-1-4919-1039-9. Disponible en: <http://r4ds.had.co.nz/>.
- XIE, Yihui, 2013. knitr: A general-purpose Tool for dynamic report generation in R. *R package version* [en línea], vol. 1, no. 1. Disponible en: <http://yihui.name/knitr/>.