

53



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

Zej

**“Obtención de Antígenos de P.falciparum
in vitro y su aplicación inmunoproláctica”**



TRABAJO MONOGRAFICO
DE ACTUALIZACION MANCOMUNADA
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

PRESENTAN:
HERRERA CABRERA SILVIA
ROMERO DOMINGUEZ ELENA

MEXICO, D.F.

1995

FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A MI MADRE:

A MI ESPOSO E HIJOS:

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	Profr. OSCAR VELASCO CASTREJON
VOCAL:	Profr. ABEL GUTIERREZ RAMOS
SECRETARIO:	Profra. MAITE ASTIGARRAGA ZAVALETA
1er. SUPLENTE:	Profr. MISAEL GONZALEZ IBARRA
2do. SUPLENTE:	Profra. ROSANNA PELAYO CAMACHO

Este trabajo fué realizado en las bibliotecas: Biomédicas , Centro Médico Siglo XXI, Facultad de Química, Hospital General, Medicina, Unidad de Servicio de Información Científica y Tecnológica en Salud (CENIDS).

ASESOR DEL TEMA:

Profr. ABEL GUTIERREZ RAMOS



A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Abel Gutierrez Ramos', written over a horizontal line.

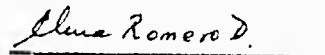
SUSTENTANTE:

HERRERA CABRERA SILVIA



A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Silvia Herrera Cabrera', written over a horizontal line.

ROMERO DOMINGUEZ ELENA



A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Elena Romero Dominguez', written over a horizontal line.

2019 MAY 10 10:00

RECEIVED
FOR THE STATES

INDICE

OBJETIVOS.....	7
INTRODUCCION.....	8
A. GENERALIDADES.....	10
A.1 CICLO BIOLOGICO.....	11
A.2 METABOLISMO Y BIOQUIMICA DE <u>P. falciparum</u>	15
A.3 DISTRIBUCION GEOGRAFICA.....	19
A.4 CARACTERISTICAS DEL TRANSMISOR.....	20
A.5 PATOGENIA.....	22
A.6 CUADRO CLINICO.....	24
B. PERFIL INMUNOLOGICO.....	25
B.1 ANTIGENOS.....	26
B.2 CARACTERISTICAS ANTIGENICAS.....	29
B.3 DETERMINANTE ANTIGENICO.....	32

C. RESPUESTA INMUNITARIA MEDIADA POR CELULAS.....	34
C.1 ANTICUERPOS.....	40
C.2 RESPUESTA PROLIFERATIVA.....	42
D. MECANISMOS DE EVASION.....	44
E. CULTIVO Y SINTESIS DE ANTIGENOS.....	47
F. AISLAMIENTO DE ANTIGENOS.....	54
F.1 METODOS DE CULTIVO <u>IN VITRO</u>	54
F.2 DESARROLLO DE PLASMODIUM.....	55
F.3 AISLAMIENTO DE ANTICUERPOS POR MEDIO DE DNA.....	56
F.4 SEPARACION DE ANTIGENOS.....	58
G. TECNICAS INMUNOLOGICAS DE IDENTIFICACION.....	60
H. PRUEBAS DE PROTECCION INMUNOLOGICA Y VACUNAS.....	66
I. CONCLUSION.....	80
J. BIBLIOGRAFIA.....	84

OBJETIVOS

- 1.-Revisar los recientes avances sobre la epidemiología del Plasmodium a nivel mundial.
- 2.-Estudiar los mecanismos inmunológicos involucrados en la infección por Plasmodium.
- 3.-Reportar las técnicas inmunológicas in vitro para identificación, purificación y obtención de antígenos de P.falciparum.
- 4.-Evaluar los parámetros biológicos y químicos sobre la reproducción del Plasmodium en medios de cultivo sintéticos.
- 5.-Revisar estudios recientes sobre inmunoprolifaxis de P.falciparum.

INTRODUCCION

El paludismo es una de las enfermedades que ha padecido el hombre desde fechas remotas, muy probablemente desde que la especie humana se diferenci6 como tal, encontr6ndose citado en los antiguos documentos literarios como las escrituras chinas y los papiros egipcios. Las descripciones m6s completas del paludismo fueron hechas en la Roma antigua, en donde la malaria caus6 m6s estragos que en cualquier otro pa6s europeo. Desde el siglo I A.C., los escritores romanos Marco Terencio Varr6n y Columela, asociaron la propagaci6n del paludismo con la existencia de mosquitos. En 1631, Don Juan de Vega, uso la infusi6n de la corteza del 6rbor de la quina para tratar de curar la malaria a Don Luis Ger6nimo de Cabrera y Bobadilla IV, conde de Chinch6n y siete a6os m6s tarde su uso se extendi6 a toda Europa. En 1880, Laver6n descubri6 el agente etiol6gico del paludismo y demostr6 que era un "microorganismo de naturaleza animal". En 1885, Danileuski, descubri6 el paludismo aviar, y cuatro a6os m6s tarde, Sajaron hizo por primera vez la descripci6n detallada de P. falciparum. En 1890, Romanowsky introdujo en el estudio microsc6pico de los plasmodios el m6todo pan6ptico de coloraci6n con azul de metileno y eosina.

En 1897 Ross, descubrió el transmisor del paludismo, el díptero Anopheles, y más tarde todos los estadios de la esporogonia en el mosquito, conformados experimentalmente por Bastianelli, Gignami y Grassi un año después en mosquitos alimentados con sangre de enfermos de paludismo. (92)

A. GENERALIDADES.

Los parásitos del paludismo humano son especies del género *Plasmodium*, familia Plasmodiidae del suborden Haemosporina de la clase Sporozoea phylum Apicomplexa. (12)

Existen cuatro especies de *Plasmodium* que parasitan exclusivamente al hombre: *P. vivax*, *P. malariae*, *P. falciparum* y *P. ovale*. Además algunos plasmodios de antropoides como *P. cynomolgi* y *P. brasilianum* han producido la enfermedad en forma espontánea en el hombre.

El desarrollo es heterogéneo con merogonia en los huéspedes vertebrados y esporogonia en los invertebrados, y la infección se transmite por insectos hematófagos. Los esquizontes se desarrollan en los eritrocitos, y la esquizogonia se produce también en ellos. El género *Plasmodium* se divide en nueve subgéneros. Tres especies del subgénero *P. Plasmodium* y uno del subgénero *P. (Laverania)* que causan paludismo en el hombre. (12)

A.1 CICLO BIOLÓGICO.

Los parásitos del paludismo humano tienen dos estadios: uno extrínseco en el Anopheles y otro intrínseco en el hombre. El primero, en el cual se lleva a cabo la reproducción sexual, se conoce como hospedero definitivo y el último, en el que tiene lugar la reproducción asexual, como intermediario. (12)

La fase en el invertebrado se lleva a cabo cuando los microgametocitos (machos) y los macrogametocitos (hembras) se introducen en el estómago de un mosquito y maduran a gametos. La fertilización tiene lugar cuando un microgameto se fusiona con un macrogameto y origina un cigoto que a los 20 minutos inicia la formación de pseudópodos, por los cuales fluye citoplasma y da lugar al oocineto o estadio móvil que secreta una fina pared, crece en forma esférica, recibe el nombre de oocisto que madura entre los 4 y los 15 días siguientes. El núcleo se multiplica y el citoplasma se transforma en miles de cuerpos independientes llamados esporozoitos. El oocisto se rompe, los esporozoitos caen en el hemocele del mosquito entrando en contacto con las glándulas salivales y permaneciendo en los conductos acinares. Cuando los mosquitos se alimentan inyectan saliva que lleva los esporozoitos. (12)

En los vertebrados, los esporozoitos abandonan el torrente circulatorio y pasan al hepatocito penetrando las células del parénquima hepático donde se lleva a cabo el siguiente estadio de desarrollo conocido como esquizogonia exoeritrocítica primaria (esquizogonia EE). Los esporozoitos se convierten en esquizontes exoeritrocíticos redondos u ovals y su núcleo se divide repetidamente. Cuando el esquizonte madura no hay pigmento y se libera un gran número de merozoitos exoeritrocíticos, las primeras dos o tres generaciones pueden invadir las células del parénquima hepático nuevamente, aunque esta esquizogonia exoeritrocítica tardía no se produce en P. falciparum. (12)

En la invasión sanguínea los merozoitos exoeritrocíticos penetran en eritrocitos y reticulocitos, donde se desarrollan a expensas de la célula hospedera. El merozoito tiene una superficie selectivamente adhesiva para la fijación al eritrocito y un complejo apical de roptrios, micronemas y anillos polares para la invasión, además posee los organelos metabólicos habituales como ribosomas y componentes nucleares.

En el eritrocito, el merozoito se presenta vacuolado, en forma de anillo uninucleado denominándose trofozoito, el cual se alimenta de hemoglobina que no se metaboliza en forma completa y deja residuos de globina conocida como pigmento palúdico.

Los trofozoitos crecen hasta que su núcleo se divide, por mitosis, sus vacuolas se llenan, sus movimientos ameboides cesan y se convierten en esquizonte maduro que lleva a cabo la esquizogonia eritrocítica, dando lugar a los merozoitos eritrocíticos. El eritrocito se rompe y los merozoitos caen al torrente sanguíneo donde muchos son destruidos por los mecanismos inmunes del hospedero pero otros invaden nuevos eritrocitos.

Después de dos o tres generaciones eritrocíticas se inicia el fenómeno de Gametocitogénesis y algunos de los merozoitos intracelulares desarrollan microgametocitos o macrogametocitos.

Los microgametocitos de P. falciparum producen de cuatro a seis microgametos (8 como máximo) por exflagelación que se inicia en el estómago del insecto a los 10 minutos de la ingestión y se encuentran listos para unirse al macrogameto.

P. falciparum alcanza el estadio de oocineto entre las 12 y las 18 horas después de que el insecto ha ingerido la sangre.

Los oocistos son por lo general pequeños y presentan una refringencia típica que los hace aparecer como pequeñas cuentas de cristal alcanzando su madurez a los 9 días a 30°C o a los 23 días a 20°C. (12)

Los esporozoitos tienen forma de hoz, invaden las glándulas salivales del mosquito a los nueve días y permanecen infectantes alrededor de 54 días. (12)

En el estadio exoeritrocítico, la esquizogonia parece estar limitada a una sola generación. El esquizonte exoeritrocítico crece rápidamente y por lo general alcanza la madurez a los 5 o 6 días. Un esquizonte exoeritrocítico puede liberar 30,000 o más merozoitos en toda una generación.

En el estadio eritrocítico de P. falciparum los merozoitos exoeritrocíticos invaden eritrocitos tanto jóvenes como maduros, siendo común encontrar muchos reticulocitos infectados. El eritrocito puede ser invadido por varios merozoitos, a veces hasta 8, lo cual se debe a invasión múltiple.

Los eritrocitos infectados suelen dejar la circulación periférica alojándose en la circulación de órganos internos por lo que en estadios finales del típico ciclo de 48 horas, son muy pocos los parásitos que se pueden observar en el frotis ordinario.

A medida que el parásito se desarrolla, la célula hospedera se vuelve más oscura, con bordes de color rojo intenso y aparecen gránulos que pueden observarse con coloración de Romanowsky, estas granulaciones se denominan gránulos de Maurer en P. falciparum.

La parasitemia máxima se observa a los 10 días o más después de iniciado el período de latencia. Como no existe esquizogonia exoeritrocítica secundaria no se producen recaídas verdaderas (recurrencias).

Los gametocitos llevan a cabo su desarrollo mientras los eritrocitos se encuentran fijos en la circulación del bazo, médula ósea y otros órganos internos. Al principio son redondos u ovales, y más tarde en forma de huso, puro o diamante, presentando pigmento disperso (y no en masa como los esquizontes). Se encuentran en la circulación periférica entre el octavo y undécimo día y adoptan su típica forma de media luna. Las células hospederas de gametocitos pueden presentar inclusiones corpusculares únicas descritas como cuerpos de Graham o hendiduras que son filamentos gruesos, barras o espirales que se tiñen de rojo intenso. (12)

A.2 METABOLISMO Y BIOQUIMICA DE P. falciparum.

Los plasmodios son parásitos intracelulares obligados y complejos, presumiblemente se alimentan del citoplasma de la célula hospedera por pinocitosis (minúsculas invaginaciones de su membrana citoplásmica), englobando y atrapando una parte del citoplasma, formando una vacuola en cuyo interior tiene lugar la digestión. La energía que necesita el parásito depende de la fosforilación de la glucosa, los procesos oxidativos son mantenidos por la oxihemoglobina del eritrocito, la globina de la hemoglobina es desdoblada por enzimas en aminoácidos y péptidos que forman las proteínas del parásito y se sintetizan lípidos en cantidades importantes.

Las alteraciones morfológicas típicas que se producen en el eritrocito infectado se deben al crecimiento de los parásitos, alterándose la forma y el tamaño del hematíe, además aparecen corpúsculos, puntos o hendiduras intracelulares.

La deficiencia genética de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PD) parece conferir alguna protección contra infecciones por P.falciparum. La baja actividad de esta enzima da como resultado una concentración subnormal de glutatión reducido en los glóbulos rojos, así como una limitación del monofosfato de hexosa. Los plasmodios usan en su metabolismo la vía de la derivación del monofosfato de hexosa y requieren de glutatión reducido para su desarrollo in vitro. (12)

La presencia del factor sanguíneo Duffy, aumenta la susceptibilidad individual de paludismo y la molécula que actúa como antígeno en los individuos Duffy-positivos sirve como punto de fijación o penetración en la superficie del hematíe.

La anemia de células falciformes es otro fenómeno hereditario responsable de resistencia al paludismo ya que origina una hemoglobina anormal, cuyas moléculas en ausencia de oxígeno, tienden a reunirse formando masas cilíndricas rígidas las cuales distorsionan al eritrocito dándole forma de media luna y los esquizontes parecen tener dificultad en utilizar esta hemoglobina anormal, interrumpiendo su crecimiento y esquizogonia. (12)

Otras hemoglobinas que pueden dar alguna protección contra el paludismo son la hemoglobina de la talasemia y la deficiencia de adenosintrifosfato que en varones de raza negra no inmunes parece también disminuir los niveles de morbilidad y mortalidad en infecciones por P. falciparum.

La esquizogonia en P.falciparum se completa en un lapso de tiempo de 48 horas. En frotis de sangre periférica sólo se observan trofozoitos o "formas de anillo" y gametocitos, ya que las células infectadas por este parásito tienden a quedarse en capilares y sinusoides sanguíneos de órganos internos y de la médula ósea, aunque pueden observarse fácilmente en sangre cuando se utiliza el microhematocito fluorescente (QBC). Los trofozoitos aparecen primero como cuerpos hialinos bien definidos "en forma de anillo". Las formas anulares aumentan lentamente de tamaño y al cabo de 24 horas ocupan cerca de un sexto del eritrocito infectado, son ameboides y emiten y retraen pequeños pseudópodos afilados. Cuando el anillo crece, el citoplasma se vuelve más hialino a un lado del anillo.

En preparaciones sin teñir, los gametocitos se reconocen fácilmente por su forma peculiar, los microgametocitos tienen forma de riñón o de frijol y los macrogametocitos tienen la forma típica de una media luna. Son hialinos en apariencia y a menudo presentan un reborde doble. (12)

En preparaciones teñidas el citoplasma es azul, la cromatina nuclear roja o violeta. Los trofozoitos aparecen con el típico anillo de citoplasma azul y un punto de cromatina rojo en la periferia. Los anillos presentan frecuentemente dos puntos de cromatina y es común la infección múltiple de eritrocitos.

En preparaciones teñidas, los trofozoitos tienen a veces forma irregular. La célula huésped puede mostrar gránulos rojizos (gránulos de Maurer).

Los gametocitos aparecen inicialmente en forma ovoide o redondeada, teñidos de azul, con un punto de cromatina en el centro. Con el desarrollo aumentan de tamaño y cambian gradualmente su forma hasta alcanzar su desarrollo completo (forma de media luna o de riñón). El macrogametocito se tiñe de azul lila, la cromatina roja se agrupa en una masa compacta cerca del centro y el pigmento aparece en grandes gránulos. En sangre periférica rara vez se observan estadios tempranos de desarrollo de los gametocitos.

Por el método de gota gruesa es fácil reconocer y diagnosticar al P. falciparum ya que el trofozoito joven esta total o parcialmente teñido de azul y el punto de cromatina adquiere un color rojo intenso. En sangre de placenta, un trofozoito maduro tiende a convertirse en una masa sólida e irregular con obliteración de la vacuola. (12)

Los gametocitos maduros también pueden ser falciformes, ovoides o de contorno irregular con abundancia de pigmento que puede estar disperso (gametocito macho) o concentrado (gametocito hembra).

A.3 DISTRIBUCION GEOGRAFICA.

P.falciparum predomina en los trópicos y subtropicos y sigue siendo el mayor asesino de la raza humana en gran parte de Africa donde mata a más de un millón de niños por año. También es común en el Asia tropical y subtropical y en Sudamérica.

Aparentemente el paludismo en América, fue introducido por los colonizadores españoles pues antes de ellos sólo existía anofelismo sin paludismo.

El paludismo en México, probablemente fué introducido en 1519 por los conquistadores españoles y los plasmodios del Viejo Mundo encontraron excelentes transmisores en los anofelinos mexicanos.

En el pasado, la malaria fue común en los E.U. de América, especialmente en el Valle de Missisipi, las tasas de morbilidad, eran tan altas como el 50% de la población en algunas comunidades. En la actualidad el paludismo se ha erradicado en ese país y en América Latina aparentemente, el único país en el cual nunca ha existido la malaria es Uruguay. (92)

La enfermedad se considera endémica donde hay una incidencia de los casos constantes y transmisión natural durante un largo período de años. Es epidémica cuando la incidencia de casos se eleva rápida y notablemente.

Las tasas de los parásitos son elevadas en el grupo de edad de 4 meses a 3 años, disminuyen en el grupo de 10 a 15 y se mantiene bajas en los adultos. Los lactantes de menos de 3 meses de edad son relativamente resistentes al paludismo, probablemente porque han recibido anticuerpos protectores de sus madres por transferencia pasiva. (12)

A.4 CARACTERISTICAS DEL TRANSMISOR.

Los únicos transmisores naturales son ciertas especies del género *Anopheles*, el ciclo de desarrollo de los plasmodios en los mosquitos varía con la temperatura externa y no se lleva a cabo por debajo de los 15.6°C ni por encima de 37.8° C, el promedio para *P. falciparum* es de 22 días a 20°C.

Los esporozoitos pueden permanecer infectantes en un mosquito hasta 90 días.

Las razones principales por las que el mosquito funciona como transmisor de paludismo son: a) no es inmune a la infección del parásito; b) existe en número suficiente cerca de las viviendas del hombre; c) tiene preferencia por la

sangre humana; d) su promedio de vida es suficiente para que los gametocitos se desarrollen en esporozoitos.

Los mosquitos son huéspedes definitivos de las especies de Plasmodium de mamíferos y los agentes causales sólo son transmitidos por mosquitos Anopheles que para ser eficaces como transmisores deben reunir las características anteriormente descritas.

Los mosquitos hembras se alimentan normalmente de sangre, la sangre se digiere completamente en un período de dos días a dos semanas, dependiendo de la temperatura. El insecto absorbe la globina pero elimina el heme de la hemoglobina.

Los mosquitos machos adultos se alimentan normalmente con jugos de plantas, están incapacitados para perforar la piel. Tanto los machos como las hembras se mantienen con una dieta de azúcar y agua aunque mediante esta dieta la mayor parte de las hembras no maduran sus huevecillos, y para ello la sangre es necesaria. Las distintas especies de mosquitos pueden reaccionar de forma diferente a varias clases de alimento de sangre, poniendo por ejemplo, más huevecillos mientras toman una dieta de sangre de conejo, que cuando se alimenta con sangre humana. (70)

A.5 PATOGENIA.

Los esporozoitos inoculados abandonan pronto la corriente sanguínea sin haber producido lesión aparente y se alojan en las células del parénquima hepático, donde se produce la esquizogonia exoeritrocítica. Las células hepáticas invadidas son destruidas, los merozoitos exoeritrocíticos invaden los hematíes y es entonces cuando se ponen de manifiesto los efectos patógenos. Los plasmodios rompen las células del hospedero cuando se completa la esquizogonia. Al principio la cantidad de pirógenos liberados no son suficientes para producir una reacción importante, aunque puede provocar síntomas prodrómicos. Al aumentar la cantidad de hematíes invadidos se sincroniza más el ciclo asexual del parásito, la cantidad de pirógenos liberados se hace suficiente para producir los escalofríos y la fiebre característicos de la crisis palúdica.

El P. falciparum invade eritrocitos de todas las edades, por lo que es capaz de parasitar un porcentaje muy elevado de estas células y debido al número variable de merozoitos producidos en la esquizogonia, éste se multiplica con más rapidez.

En P. falciparum la parasitemia suele ser superior ya que con frecuencia se desarrolla más de un parásito en un sólo eritrocito. (12)

El fenómeno de la dominancia parece guardar correspondencia con los atributos de capacidad invasiva y multiplicación rápida. Entendiéndose por dominancia la tendencia de P. falciparum a reprimir la parasitemia de P. vivax o P. malarie en las infecciones mixtas. (12)

Con cada esquizogonia se destruyen las células parasitadas pero también existe una destrucción considerable de células no parasitadas por lisis y fagocitosis. Una parasitemia muy elevada puede ir acompañada de ictericia hemolítica y de anemia a veces intensa. El carácter maligno del paludismo falciparum no guarda tanta relación con su multiplicación rápida y su capacidad invasiva como la forma en que produce lesiones en el hospedero.

Los hematíes parasitados se vuelven pegajosos y tienden a adherirse entre si a la pared de los vasos sanguíneos, a medida que los parásitos envejecen (salvo los gametocitos), sólo se encuentran típicamente anillos jóvenes y gametocitos en los frotis de sangre periférica. Las lesiones características se deben al bloqueo de los pequeños vasos por hematíes parasitados "pegajosos", bloqueo que provoca detención, seguida de anoxia local y aumento de permeabilidad vascular que permite la salida de plasma y hematíes no parasitados hacia el espacio perivascular. (12)

A.6 CUADRO CLINICO.

Los síntomas típicos del paludismo consisten en paroxismos de escalofríos, fiebre y sudoración, que se presentan a intervalos regulares dependiendo del tiempo de segmentación del plasmodio causante de la infección, aunque los escalofríos y la fiebre no son tan importantes como la periodicidad. El P. falciparum es más irregular y produce un paroxismo cada 48 horas, algunas infecciones causan paroxismo febril cada 24 horas. El período de incubación varía según la resistencia del hospedero y la cepa de Plasmodium, en la infección por falciparum, los síntomas aparecen de 8 a 15 días. El escalofrío es menos acentuado pero el período febril es mayor y los intervalos entre paroxismos son más cortos. El paroxismo completo dura cerca de 36 horas y se repite a las 48 horas. En los períodos febriles normalmente hay bradicardia.

Se pueden presentar uno o más de los síntomas siguientes: cefalea, dolor de espalda, dolor en el dorso del cuello o dolor generalizado; dolor o rigidez muscular; síntomas gastrointestinales como malestar gástrico con vómito, diarrea o constipación, disenteria sin tenesmo, generalmente con vómito, en ocasiones un síndrome que sugiere apendicitis aguda; síntomas respiratorios con bronquitis subaguda; ictericia y tintes de las conjuntivas, convulsiones y coma. (12)

B. PERFIL INMUNOLOGICO.

La respuesta inmune se considera como un mecanismo de defensa contra cualquier agente infeccioso presentando las siguientes características: A) Es inducido con capacidad para responder en forma específica ante ciertas sustancias; B) Es transferible ya que puede donarse de una persona a otra;

C) tiene memoria, presentando cambios en sus parámetros cuando el individuo se pone en contacto con el antígeno en repetidas ocasiones. (73)

La inmunidad, en el paludismo, es un grupo de mecanismos que tiende a prevenir la infección, reinfección o superinfección destruyendo a los plasmodios o limitando su multiplicación.(68) La inmunidad natural (innata ó genética) es inespecífica. Independientemente de las infecciones previas la inmunidad adquirida se presenta como el resultado de la estimulación antigénica por el parásito o sus productos antigénicos, ésta puede ser pasiva (transferida por vía materna o inyección) o activa (por medio de una infección palúdica). Así mismo, la inmunidad activa puede ser concomitante (que se presenta mientras existe una parasitemia) o residual (que persiste aún después de la erradicación de los parásitos).(68)

La parasitemia puede causar trastornos patológicos importantes si se presenta una multiplicación incontrolada del parásito, aunque en la mayoría, estas infecciones son de duración limitada y dejan pocas secuelas gracias a la acción del sistema inmune. (68)

El esporozoito es el primer punto de contacto entre el hospedero y el parásito. Este contacto es extremadamente breve (entre 15 y 20 minutos) y la invasión puede ser incierta cuando es eliminado por el sistema retículo endotelial (Macrófagos de los Tejidos) (12)

La respuesta inmunológica se debe a la producción de anticuerpos independientes del complemento, los cuales inhiben la entrada de los merozoitos a los eritrocitos. (En los individuos que residen en las zonas endémicas, se observa que disminuye su parasitemia a medida que su edad avanza). En los niños se considera que están protegidos durante el primer año de vida, gracias a la inmunoglobulina G de la madre, que atraviesa la barrera placentaria. (30)

B.1 ANTIGENOS.

La inmunidad palúdica es específica para cepas homólogas de parásitos, presentando un mecanismo protector importante contra la inmunidad del hospedero por medio de la variación continua de su estructura antigénica. (12)

Algunos antígenos pueden ser originados por el esporozoi-
to, puesto que la incubación con suero inmune induce a la
acumulación de material fibrilar sobre la superficie de los
mismos, aunque otros antígenos plasmodiales son presumiblemente
derivados de los estadios eritrocíticos. (94, 95) Los parásitos
sensibilizan al sistema inmune del hospedero, solo que su
sobrevivencia depende de la evasión de los mecanismos
inmunológicos. (17)

Se ha determinado que en el caso del P. falciparum, se
liberan antígenos espontáneamente in vitro, al romperse el
esquizonte maduro. (95)

La inducción de protección inmunitaria contempla dos
criterios: A) El de ubicación que indica que sólo los antígenos
accesibles localizados en las superficies del parásito y de las
células infectadas, pueden inducir los mecanismos efectores de
la inmunidad. B) El segundo involucra la presencia de
anticuerpos contra determinantes antigénicas del parásito en el
suero de sujetos inmunocompetentes, aún así la presencia o
ausencia de anticuerpos específicos, no es por si mismo un buen
indicador de inmunidad funcional. (57)

Se ha demostrado que un complejo polipeptídico es el que
induce la respuesta inmune; un pequeño fragmento de éste es
retenido sobre la superficie del parásito y transportado dentro
de la recién infectada célula roja. (5)

Los antígenos análogos de P. falciparum activan la liberación de TNF (factor de necrosis tumoral), desde los monocitos. El antisuero obtenido de la inmunización de ratones con antígeno hervido, inhibe la estimulación de la secreción de TNF por antígenos plasmodiales. Los neutrófilos rodean y destruyen el plasmodio, pero sustancialmente la muerte del parásito requiere la presencia de anticuerpos opsonizantes termoestables. Se ha determinado que los recombinantes de TNF-alfa a concentraciones de 5 a 50,000 U/ml no causan efectos directos sobre el parásito, ya que ésta citocina aumenta la actividad antipalúdica de los neutrófilos a dosis de 20 a 250 U/10. . Lo que sugiere que el TNF-alfa es un inmunomodulador muy importante en el mecanismo efector de la fagocitosis. (43)

Se ha observado que en poblaciones seropositivas al virus HIV-1, que tienen características propias de la enfermedad que cursa con niveles bajos de anticuerpos, durante una infección plasmodial la actividad policlonal de células B no se desarrolla debido a que la estimulación parece estar disminuida. (93)

B.2 CARACTERISTICAS ANTIGENICAS.

Como el parásito sufre una serie de cambios en su desarrollo y su morfología, en cada estadio tiene una forma característica y una serie de funciones diferentes, aunque todos los estadios tienen el mismo genoma o complejo de genes.⁽²⁸⁾

Las proteínas de superficie del parásito son altamente específicas para cada estadio y sus genes podrían estar sujetos a regulación rigurosa. Además están implicadas en el accionamiento de la respuesta inmune del hospedero.⁽³²⁾

En el mosquito, los esporozoitos, exhiben diferencias antigénicas desde la migración del intestino medio hasta las glándulas salivales acompañándose por un incremento infeccioso y por la expresión de un antígeno en la superficie del mismo.⁽¹⁹⁾ Los merozoitos no contienen glucoproteínas, encontrándose gran proporción de antígenos específicos y evidenciando componentes de superficie con un peso molecular de 22,000 a 150,000 d. y polipeptídicos de 105,000 a 150,000 d., que pueden unir a los merozoitos con la membrana de los eritrocitos.⁽¹⁹⁾ De acuerdo a Harold A. Stanley el P. falciparum induce dos modificaciones estructurales en el eritrocito, tanto en las estructuras electrodensas por debajo de la prominencia de la membrana plasmática como la estructura de la membrana, presumiblemente las aberturas de Maurer que se

observan, al microscopio de luz y tinción de Giemsa; en el citoplasma de eritrocitos infectados son debidas a estas modificaciones. (85)

La proteína inmunogénica de la membrana del Plasmodium, tiene un peso molecular de aproximadamente 41,000 d., por medio de la inmunoprecipitación de esporozoitos maduros se ha determinado la presencia de tres polipéptidos específicos; Pb 52, Pb 44 y Pb 54. (19) De igual manera se han determinado cinco clonas diferentes de cDNA, cuya proteína es rica en asparagina (Asn). Dos de las clonas, R5 y G5, contienen secuencias imperfectas repetidas basadas sobre Asn-Asn-Thr (NNT) y Asn-Asn-Met (NNM) y las otras tres clonas E4, C5 y R13, contienen poliasparagina longitudinal de 2 a 26 residuos. Cada una de estas clonas corresponden a diferentes genes de P. falciparum. (1)

El antígeno soluble está constituido en ciertos productos del parásito que son encontrados fuera de la estructura del mismo y en los tejidos del hospedero. (95)

Este se encuentra regularmente en el citoplasma del paciente con malaria, es heterogéneo en sus propiedades físicas y serológicas y puede ser modificado por componentes de los eritrocitos. Los niños y los adultos expuestos repetidamente a la parasitemia, crean una respuesta a base de anticuerpos restringiendo a estos antígenos. (90) Se ha determinado la presencia de un antígeno soluble (Ag S) en sujetos infectados, pudiendo ser un antígeno modificado de los eritrocitos. (96)

El antígeno de superficie de los esporozoitos se llama "proteína circumesporozoítica" (CS), y es específico de este estadio. Es la proteína principal más sintetizada en las glándulas salivales del mosquito y cubre la superficie entera de la célula, por lo que el sistema inmune es forzado a realizar un ataque mayor debido a; los múltiples epitopos, a que la cubierta superficial es continuamente reemplazada, además de que las moléculas desprendidas actúan como señuelo que engaña al sistema inmune.⁽³²⁾

Esta proteína (CS), tiene propiedades físicas peculiares deducidas de la secuencia de aminoácidos de la unidad repetida. El péptido de la región del epitopo tiene tres glicinas, tres alaninas, tres glutaminas y un ácido aspártico, una prolina y una asparagina y los aminoácidos polares hidrofílicos están alternados con aminoácidos hidrofóbicos grandes.⁽³²⁾

La proteína CS parece promover la evasión del esporozoito contra la respuesta inmune, concentrándose en un blanco para perder su habilidad a encontrar otros blancos.

Se ha demostrado experimentalmente que muchos de los anticuerpos liberados se dirigen contra la proteína CS y específicamente contra el epitopo en repetición, lo que sugiere que la cadena de la proteína está doblada de tal forma que solamente el 45% se encuentra expuesta sobre la superficie.

Cada molécula de CS presenta un sitio vulnerable, repetido doce veces y muestra múltiples puntos idénticos. (32)

El antígeno aislado por Mattei y cols, presenta una serie de aminoácidos degenerados repetitivos mostrando una afinidad del anticuerpo humano hacia las proteínas del parásito. Así mismo Dubois y cols, identificaron un antígeno de reacción cruzada por la presencia de aminoácidos homólogos y que además comparten algunas de las actividades biológicas. (21,53)

B.3 DETERMINANTE ANTIGENICO.

Un pequeño fragmento del cDNA del esporozoito, incluye la región del gene que codifica para la porción inmunoreactiva del antígeno. Los determinantes antigénicos son de tamaño pequeño siendo equivalentes en volumen a unos 4 ó 5 aminoácidos. La reacción entre el antígeno y el anticuerpo correspondiente, lleva una combinación efectiva entre ambos.

El epitopo es una cadena de 12 aminoácidos repetidos colocados uno tras otro, con un genoma del parásito que contienen solamente un gene para la proteína. La región codificada del mismo no se interrumpe por la intervención de secuencias no codificadas uniéndose sólo cuando el RNAm es procesado. (32)

Todas las proteínas de la cubierta del estadio de esporozoito y merozoito del Plasmodium, contienen tramos repetidos y la mayoría presentan un pequeño residuo de proteína formado por epítomos inmunodominantes. Los anticuerpos contra estos segmentos de péptidos son protectores y causan el derramamiento de la proteína circumesporozoítica (CS) conocido como reacción de la proteína del circumesporozoito ("reacción CSP"). (24)

El epitopo en repetición es esencialmente una trampa renovable y múltiple, ya que existe la evidencia de que la cubierta de los esporozoitos se desprende y se restaura continuamente por proteínas sintetizadas y secretadas en la superficie.⁽³²⁾ Los epítomos llegan a estar expuestos en la superficie de las células infectadas, después de la modificación de los lípidos.⁽⁴⁾

Las proteínas híbridas contienen regiones selectivas en la superficie del antígeno en el estadio de esporozoito y merozoito. Estas proteínas recombinantes contienen la señal del péptido en la superficie del antígeno (PMMSA), que se encuentra fusionado en un fragmento carboxilo terminal del mismo por lo que tiende a la reducción sensitiva conformacional de epítomos dentro del fragmento del carbono terminal.⁽⁵⁶⁾

C. RESPUESTA INMUNITARIA MEDIADA POR CELULAS

Las infecciones parasitarias estimulan una serie de mecanismos de defensa mediados por anticuerpos y por células, las respuestas más efectivas dependen del tipo de parásitos en particular y del estadio de la infección.

Las enfermedades causadas por parásitos son diversas; y las respuestas inmunitarias que resultan efectivas contra los diferentes parásitos varían considerablemente. La inmunidad mediada por células es más efectiva contra los protozoos intracelulares, mientras que los anticuerpos lo son contra los parásitos extracelulares presentes en sangre.

En el paludismo, el anticuerpo contra las formas extracelulares bloquea su capacidad para invadir nuevas células, la inmunidad celular impide el desarrollo de la fase hepática dentro de los hepatocitos. La inmunidad protectora contra el paludismo no guarda relación con los niveles de anticuerpos y ocurre en ausencia de estos. (68)

Las células T cooperadoras (Th) desempeñan diversas funciones como son: Determinar los antígenos y sus epitopos que van a reconocer; seleccionar los mecanismos efectores que se han de dirigir contra los antígenos diana seleccionados; proliferar tipos apropiados de células efectoras e incrementar las funciones de los fagocitos. (68)

Las células Th al interactuar con las células presentadoras de antígeno (APC) determinan cuales epitopos se van a convertir en diana.

Los mecanismos efectores son: células T citotóxicas (Tc), anticuerpos, mastocitos, eosinófilos y la activación de macrófagos e hipersensibilidad retardada. La activación de mecanismos efectores inapropiados puede conducir a una mayor susceptibilidad al agente patógeno más que a una protección.

Tras la estimulación crónica surgen subpoblaciones especializados Th1 y Th2. Las células Th1 liberan interleucina-2 e interferón gamma y las Th2 liberan IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Las Th1 activan los macrófagos y responden al antígeno presentado por éstos, las Th2 aumentan la producción de eosinófilos y mastocitos favoreciendo la producción de anticuerpos, incluidos los IgEs, las células Th1, hacen frente a los parásitos intracelulares y las Th2 a los extracelulares. El IFN γ procedente de Th1 inhibe la proliferación de células Th2, y la IL-10 reduce la secreción de Th1. (68)

Las células efectoras lisan células diana a las que están unidas. La citotoxicidad mediada por células es una propiedad que poseen las células Tc y otras subpoblaciones de células linfoides y mieloides. Distintos receptores intervienen en la unión de células citotóxicas con sus dianas. (68)

Existen varios tipos de interacción receptor-ligando como:

- 1) Antígeno específico reconocido por receptores antigénicos restringidos por MHC de células Tc;
- 2) Determinantes reconocidas por receptores de células agresora natural (NK) y
- 3) Anticuerpo unido al antígeno reconocido por receptores Fc de células K y dependiente de anticuerpos.

Las células Tc restringidas por MHC son una subpoblación de linfocitos pequeños procedentes de células precursoras no líticas. La mayoría son CD8+(Tc) y reconocen antígenos asociados con moléculas MHC clase I, cerca del 10% de células restringidas por MHC clase II son CD4+(Th). Las moléculas CD4 ó CD8 interaccionan con la molécula MHC apropiada, esta interacción ayuda a estabilizar el reconocimiento célula-célula. (68)

En el paludismo se requieren células CD4+ y CD8+ para proteger contra diferentes fases de la infección .

Hay poblaciones relacionadas entre sí que son citotóxicas sin especificidad antigénica y sin restricción por el MHC. Encontrándose entre ellas las células NK que están presentes en bazo y sangre periférica; las células agresoras activadas por linfocinas (LAK), son células activadas por cultivos con IL-2.

Los mecanismos que intervienen en la citotoxicidad son similares ya sean Tc, NK ó K; en cambio las células de la serie mieloide utilizan otras vías. (68)

En el caso de células linfoides el mecanismo de citotoxicidad comprende: 1) La célula se une a la diana; 2) Fase dependiente de Ca^{2+} con secreción del contenido vesicular de la célula citotóxica lo que modifica la célula diana quedando programada su destrucción y 3) Una fase tardía en la que la célula diana se destruye.

Las células LGL, NK y algunas Tc contienen perforina que se haya en relación con el componente CIq del complemento. Esta destrucción es distinta en la lisis causada por el complemento y se observa apoptosis, fragmentación de DNA y desintegración de la célula en pequeños fragmentos unidos a la membrana.

Los macrófagos intervienen en todos los estadios de respuesta inmunitaria además de actuar como célula presentadora de antígenos al inicio de esta respuesta, estos influyen de dos maneras en el curso de la infección parasitaria; primero actúan como células efectoras que inhiben la multiplicación del parásito ó lo destruyen y segundo secretan moléculas que regulan la respuesta inflamatoria, algunas de ellas son IL-1, TNF α y los CFS que refuerzan la actividad de otras células ó estimulan su proliferación. (68)

La activación de macrófagos es una característica de las fases precoces de la infección, tras lo cual activan todas las funciones de aquellos. Los macrófagos se activan principalmente por citocinas secretadas por células T (IFN γ , GM-CSF, IL-3 e IL-4) pero no toda la activación está mediada por linfocitos.

Algunos productos de los parásitos, como los antígenos solubles del paludismo inducen a los macrófagos a secretar TNF α , que a su vez activa otros macrófagos.

Cuando los macrófagos humanos se exponen al IFN γ , expresan una 1-Hidroxilasa, ésta enzima los capacita para convertir el 25 Hidroxicolecalciferol inactivo circulante en el metabolito activo, 1,25 Dihidrocolecalciferol (vitamina D3 Ocalcitriol). Los macrófagos tienen receptores para éste derivado.

Esta vía tiene importancia en el hombre ya que la producción de calcitriol puede ser tan considerable que escape del sitio de activación de los macrófagos y pasar a la circulación periférica, donde puede ejercer sus efectos sobre el equilibrio calcio-fósforo apareciendo hipercalcemia detectable.

Los monocitos circulantes destruyen algunos microorganismos. Esta capacidad es inhibida si se cultivan in vitro, pero la exposición a las linfocinas, particularmente IFN γ la recupera y activa otras vías destructivas que no expresan, los monocitos normales. La destrucción de muchos parásitos intracelulares y algunas células tumorales in vitro requiere esta activación de macrófagos mediada por linfocinas.

Los linfocitos secretan TNF α , los macrófagos activados constituyen la fuente más importante de ésta molécula. (68)

En algunas infecciones parasitarias , el sistema inmunitario no puede eliminar completamente al parásito y el organismo reduce el efecto lesivo al aislar el parásito tabicandolo con una cápsula de células inflamatorias. Esta reacción T dependiente, es una respuesta crónica mediada por células frente al antígeno liberado localmente, y esta mediada por las citocinas incluidas IFN γ e TNF α . Los macrófagos se acumulan y liberan factores fibrogénicos, que estimulan la formación de tejido granulatoso y, finalmente de fibrosis.

Existen patrones de efectos mediados por linfocinas y son: los efectos mediados por una sola linfocina que actúa por sí misma; efectos cuantitativos aumentados ó disminuidos según el estado de señales secundarios y por último el efecto sinérgico en que un mediador carece de acción si no está presente un segundo mediador ó producto parasitario. (68)

Algunas veces la respuesta inmune-celular fracasa en cuanto a eliminar rápidamente un microorganismo infectante , o no puede eliminarse el material antigénico porque es resistente a la degradación ó deriva de componentes propios. En tales casos si las células T continuan acumulando y liberando linfocinas ésto conduce a la formación de granulomas. Estos son característicos de infecciones por microorganismos que viven, al menos en parte, dentro de la célula. Los granulomas tienen tipos celulares que derivan de los macrófagos, células epitelioides y células gigantes tipo Langhans. (68)

Existen diversas circunstancias en las que la respuesta mediada por células es en sí misma responsable de la totalidad ó parte de las alteraciones hísticas resultantes de la enfermedad infecciosa.

1).-Las células citotóxicas pueden destruir células diana; 2).-Los mecanismos mediados por células pueden dirigirse hacia los autoantígenos y producir inflamaciones crónicas con alteración hística; 3).-El tamaño absoluto de los granulomas puede comprometer la función del tejido huesped; 4).-La liberación excesiva de citocinas (especialmente TNF α), puede conducir a síndromes de shock, necrosis hemorrágica y reacción de Shwartzman contribuyendo también a la necrosis en los lugares donde se produce la respuesta celular. (68)

C.1 ANTICUERPOS

Debido a los complejos ciclos vitales del Plasmodium, los anticuerpos producidos contra un estadio no pueden ser eficaces contra otro. Los anticuerpos protectores contra la malaria son generalmente IgG, que puede transferirse de la madre al feto y el recién nacido permanece inmune durante unos seis meses. Además se producen IgM e IgA y posiblemente IgD, aunque no se ha determinado la función de éstas dos últimas en la malaria. (11)

Los anticuerpos inhiben la reinvasión del merozoito, por lo que se considera que al reaccionar con el antígeno original tienen importancia biológica. (77)

Los anticuerpos contra la proteína del circumesporozoito (CS), interaccionan con el centro dominante que contiene arriba de 40 tetrapéptidos repetidos Asn-Ala-Asn-Pro (NANP), y reaccionan también con regiones repetitivas de la proteína CS que contribuye al mantenimiento de su variabilidad genética. (79)

El complejo polipeptídico del antígeno es captado por el anticuerpo en la superficie del esporozoito, presentándose subsecuentemente desprendimiento de complejos antígeno-anticuerpo, que son capaces de neutralizar la infectividad del esporozoito.

Al purificar los fragmentos de Fab de las IgG se ha demostrado que es capaz de inhibir in vitro la invasión del esporozoito.

Se produjeron anticuerpos monoclonales directamente contra una superficie antigénica determinada en el parásito, el anticuerpo monoclonal puede desarrollar una reacción cruzada con diferentes especies de Plasmodium, involucrando, un determinante antigénico específico de superficie. (57)

Se ha determinado que el anticuerpo monoclonal estudiado por Sjolander (1990), reacciona con la membrana de células endoteliales de monocitos por lo que inhibe e invierte la adherencia in vitro de eritrocitos infectados hacia las células

blanco por lo que éste polipéptido de 88 Kd., juega un papel muy importante en la citoadherencia. (3)

La inmunización con el adyuvante completo de Freund produce un alto nivel de IgG específica en un período de un año. (77)

C.2 RESPUESTA PROLIFERATIVA

La respuesta proliferativa de los linfocitos T contra antígenos específicos y no específicos para paludismo, durante infecciones agudas con P. falciparum y durante su convalecencia se presenta en sujetos independientemente de la parasitemia o severidad de las manifestaciones clínicas. (54)

En donadores sanos expuestos al antígeno palúdico, in vitro se presenta la proliferación de antígenos plasmodiales formando cordones de células monoclonales en la sangre durante seis días, lo que depende posiblemente de la presencia de células de memoria que se expresan en niveles altos. (41)

La infección palúdica está asociada característicamente con la fiebre por lo que la producción de prostaglandina E puede también estar elevada.

Las prostaglandinas pueden tener un papel generalizado de inmunosupresión debido a que las células T específicas del paludismo, son sensibles, específicamente a los efectos de las prostaglandinas. (66)

La respuesta proliferativa de células mononucleares en sangre periférica contra esquizontes inmaduros de P. falciparum indica que la producción de IFN- γ es paralela a la respuesta proliferativa.(15)

D. MECANISMOS DE EVASION

Los mecanismos de evasión se presentan de diversas maneras: A) El recubrimiento del parásito con macromoléculas del hospedero que no le causan daño; B) Producción de macromoléculas que evitan que la respuesta inmune cause daño (activador policlonal, antígenos solubles, anticuerpos anti-idiotipo); C) La superficie del parásito no dañable (variación antigénica). (26) Estos mecanismos dan origen a: A) reducción neta de la antigenicidad del parásito; B) Modificación del medio intracelular y C) Modulación de la respuesta inmune del hospedero por el parásito.

Los parásitos intracelulares tienen desarrollados varios tipos de acciones evasivas que escapan de los lisosomas o de los fagosomas para multiplicarse dentro del citoplasma. " Los factores que pueden promover la evasión inmune son: A) La entrada rápida de esporozoitos a las células parenquimales hepáticas, B) La localización intraeritrocítica, C) La variación antigénica, D) Los cambios marcados en la respuesta inmune relacionados a disfunción de macrófagos, activación de linfocitos policlonales y posibles efectos de anticuerpos linfocitotóxicos, antígenos solubles y complejos inmunes. (16)

En el desarrollo dentro de las células parenquimales hepáticas (esquizogonia exoeritrocítica), no existe una reacción celular por lo que las células del hígado no expresan antígenos plasmodiales de superficie y el parásito es protegido del ataque inmune. Las células rojas maduras parasitadas acarrean antígenos plasmodiales de superficie que pueden interactuar con anticuerpos para mediar la lisis dependiente de complemento; la endocitosis por macrófagos y posiblemente anticuerpos dependientes de citotoxicidad mediada por células.

Muchas respuestas citotóxicas de células T, involucran el reconocimiento de productos de genes del MHC y los eritrocitos poseen cantidades pequeñas o nulas de este determinante por lo que se presenta un fracaso de citotoxicidad de las células T contra los glóbulos rojos parasitados. (16)

La desviación inmune es otra forma de inmunosupresión, inducida por el antígeno resultante de la presentación simultánea de antígenos solubles parasitarios y formas particuladas. Los efectos del antígeno soluble sobre la respuesta inmune es que una descarga de éste podría bloquear o neutralizar una respuesta inmune efectiva. (20)

Los anticuerpos anti-idiotipo son un mecanismo de regulación de la respuesta inmune, considerándose como un mecanismo de evasión en el que se producen anticuerpos anti-IgG (específicos contra el parásito).

La aparición de anticuerpos citotóxicos dirigidos contra los linfocitos presentes en el suero de pacientes infectados con P. falciparum, ha demostrado la relación de estos anticuerpos reactivos fríos para disminuir la cantidad de linfocitos circulantes que es característico en el paludismo. (16)

Los mecanismos de evasión observados en el Plasmodium, presentan una variación antigénica en los diferentes estadios de su ciclo de vida siendo apto a evadir la respuesta inmune del hospedero. (32)

El antígeno de superficie "S" del merozoito es una proteína que forma una capa vellosa envolviendo al mismo. Al parecer actúa como trampa inmune que es continuamente secretada, cambia y presenta un epitopo repetido al sistema inmune. Los péptidos en repetición incluyen una prolina que permite obtener una extensión beta plegada en los antígenos plasmodiales de superficie por lo que la mayoría de las proteínas de esporozoitos y merozoitos, son trampas inmunes ya que los anticuerpos inducidos no siempre son protectores pues no incapacitan al parásito. (32)

E. CULTIVO Y SINTESIS DE ANTIGENOS.

Los primeros intentos de cultivar parásitos palúdicos in vitro consiguieron la maduración de trofozoitos de P. falciparum en esquizontes en sangre desfibrinada con dextrosa, pero en cultivos de sangre total se observó que los merozoitos no volvían a invadir los eritrocitos. Sin embargo, en cultivos libres de leucocitos, los parásitos se desarrollaban y segmentaban, y la mayoría de los merozoitos penetraban en otros hematíes. Se observaban 2 ó 3 generaciones sucesivas. En los primeros cultivos continuos se hizo crecer P. falciparum por un método que aseguraba un flujo lento de medio de cultivo sobre una capa fina de eritrocitos humanos (flujo continuo).⁽¹²⁾

Los parásitos intraeritrocíticos son verdaderos aerobios ya que la tensión de oxígeno en la sangre indica que en su hábitat normal los esporozoos hemáticos están en continuo contacto con cantidades apreciables de oxígeno, aunque las altas concentraciones son perjudiciales para su crecimiento.

Es muy importante el proporcionar las siguientes constantes físicas del medio: pH, tensión de oxígeno y CO₂, presión osmótica y otros factores los más parecidos posibles a los de la sangre; los nutrientes apropiados para el desarrollo y crecimiento y los productos metabólicos de consumo.

Para el cultivo de Plasmodium se ha utilizado un medio compuesto que incluye sales inorgánicas, vitaminas (en forma hidrosoluble), purinas y pirimidinas así como eritrocitos enteros. (11)

En cultivos experimentales de P. falciparum se ha demostrado que la adición de glucosa y de ácido p-aminobenzoico es necesaria para el buen desarrollo del cultivo. El plasmodio puede oxidar otros azúcares como manosa y fructuosa y también la glicerina. Sin embargo sólo la glucosa puede mantener a largo plazo el crecimiento y la reproducción. Las células parasitadas utilizan de 25 a 100 veces más glucosa que las normales.

La adición de metionina incrementa el crecimiento y, la adición de metionina, junto con ácido p-aminobenzoico, glucosa y coenzima A tienen una notable influencia en los cultivos de los estadios eritrocíticos.

La eliminación del ácido ascórbico de la dieta del hospedador afecta a los parásitos palúdicos, pero los cultivos de estos medios carentes de ácido ascórbico no revelan ningún efecto apreciable.

Las diferentes especies de Plasmodium tienen necesidades extracelulares ligeramente distintas con respecto a la supervivencia y la oxidación del ácido pirúvico, además de que el plasma añadido es determinante. (11)

Sólo una cantidad proporcionalmente pequeña de glucosa es asimilada por el protoplasma del parásito, ya que la mayoría se emplea en la producción de energía. Bajo condiciones anaeróbicas, la glucosa se convierte en su totalidad en ácido láctico y las enzimas de la vía glicolítica de Embder-Meyerhof se encuentran presentes lo que indica la existencia de la ruta glicolítica fosforilativa. El proceso de oxidación de los azúcares incluye el ciclo de Krebs.

Los organismos productores de paludismo al metabolizar los azúcares por vía anaeróbica en mucho mayor cantidad que por vía aeróbica, desechan una gran cantidad de energía potencial, originando una acumulación de ácido láctico que, si no se elimina o neutraliza en los medios de cultivo transtorna la actividad respiratoria. El 90% de la energía requerida lo suministra la transferencia al oxígeno de los electrones liberados durante el ciclo de Krebs. (11)

El Plasmodium cuando se encuentra en el interior de los eritrocitos del hospedador, ingiere como alimento grandes cantidades de la hemoglobina presente, mediante fagocitosis citoplásmica. Los plasmodios poseen enzimas que son capaces de romper la hemoglobina en fracciones no proteicas y globina. Observando que 76% de la hemoglobina del eritrocito es destruida mientras la fracción no proteica rota es la hematina, que no es utilizada por el parásito y se elimina en forma de pigmento palúdico.

La mayoría de las necesidades proteicas y de aminoácidos se cubren con las proteínas del hospedador, los requerimientos de metionina no lo son en su totalidad, ya que es pequeña la concentración en las células del hospedador, por lo que el resto de metionina que precisa lo obtiene del plasma circulante, lo que indica que aunque el protozoo parece ser un parásito intracelular de eritrocitos fisiológicamente parasita la célula del hospedador, el plasma y también otras células; una vez en el interior del parásito, los polipéptidos y los aminoácidos se emplean en la síntesis de proteínas y sólo pequeñas cantidades en procesos oxidativos productores de energía. (11)

El contenido lipídico total de los hematíes infectados aumenta más de un 400% respecto a las células sanas. El contenido de ácidos grasos de las células infectadas es superior 4 a 5 veces al de las células no infectadas. Es muy característico encontrar un ácido graso monocarboxílico de 18 átomos de carbono con propiedades líticas. Se ha sugerido que éste ácido graso puede tener alguna relación con el proceso de ruptura del eritrocito que permite la salida de los merozoitos.

La síntesis de DNA y del RNA en Plasmodium es similar a la de otros organismos. Es interesante destacar que en el caso de los eritrocitos de mamíferos hay poco o ningún, DNA y; sólo una baja concentración de RNA. (11)

En consecuencia, se supone que el DNA y el RNA presentes en el parásito se sintetizan de nuevo a partir de precursores no eritrocíticos. (11)

El suero de individuos de áreas endémicas puede ser usado en inmunoprecipitados metabólicos para clasificar el antígeno parasitario de cultivos in vitro o en comparaciones con el control de sueros de infecciones primarias para anticuerpos específicos a ciertos polipéptidos. La diversidad antigénica de aislamientos del antígeno de paludismo es importante por lo que debe tomarse en cuenta la relación entre el suero empleado y la fuente geográfica.

En ocasiones es improbable que los parásitos crezcan en suficientes cantidades in vitro para surtir una buena fuente antigénica por lo que generalmente es utilizada una producción de antígeno artificial por la síntesis química de un péptido inmunogénico adecuado. (57)

Con suero de sujetos inmunológicamente sanos y con antecedentes de una infección aguda por P. falciparum se observa una producción elevada de IgG. No presentándose de igual manera con el mAg, donde expresan una baja producción de inmunoglobulinas. Los niveles de inmunoglobulinas no arrojan diferencias de producción en presencia de agentes mitogénicos.

La adición de células T con efecto supresor y T citotóxica, reconocen al antígeno asociado a moléculas de clase I, que se encuentran en las membranas de todas las células nucleares. Está constituida por una cadena alfa que tiene un peso molecular de 45 KD, codificada en la región A, B, C del MHC. En cultivos de células Th y células DTH (linfocitos T de la hipersensibilidad tardía), reconocen al antígeno asociado a moléculas de clase II que constituyen la superfamilia de las inmunoglobulinas por la similitud estructural, se diferencian por ser significativamente supresoras en la producción de inmunoglobulinas en agentes mitogénicos pero no en cultivos de mAg activados.¹³

Al comparar la reactividad de anticuerpos desarrollados por exposición frecuente de P. falciparum en individuos infectados, contra epitopos de una molécula originaria en la superficie del esporozoito, se determina que en ensayos de unión directa y ensayos competitivos entre anticuerpos artificiales y monoclonales anti-CS, los anticuerpos humanos responden preferentemente para epitopos que no contienen repeticiones de la proteína CS. En la reactividad de anticuerpos monoclonales humanos a esporozoitos de P. falciparum, los antígenos superficiales fueron producidos por transformación del virus Epstein-Barr de linfocitos humanos, lo que indica la existencia de varios epitopos en la superficie del parásito.⁽³¹⁾

En una suspensión de cultivo con 1% de eritrocitos humanos, se promueve el crecimiento de P. falciparum, el crecimiento es exponencial con una media de multiplicación proporcional de 7.7 ± 1.0 (n=5) doblando por 48 horas el ciclo. (23)

En un cultivo continuo in vitro, derivado de P. falciparum se mostró que el metabolismo sincronizado incrementa la maduración del parásito hacia el estadio de esquizonte predominando las proteínas de alto peso molecular que fueron sintetizadas durante su desarrollo. (97)

Al cultivar esquizontes de P. falciparum en un medio que contiene una mezcla de 10 microgramos/ml de leupeptina, quimostatina, peptastina y antipapaína, se observa que la proteasa no inhibe la síntesis de macromoléculas, sino que se asocia con la reinvasión decreciente de células rojas y la acumulación de merozoitos agrupados alrededor de gránulos pigmentados (PCM, grupo inhibidor de proteasa de merozoito). (49)

F. AISLAMIENTO DE ANTIGENOS.

F.1 METODOS DE CULTIVO IN VITRO

El diagnóstico del paludismo con pruebas de anticuerpos por fluorescencia indirecta (IFA) es ampliamente usado, principalmente para propósitos epidemiológicos. El antígeno es usualmente preparado en cultivos continuos de P. falciparum y debe ser conservado a -20° C o menos.

En cultivos continuos y por el método de Trager-Jensen usando clonas de P. falciparum , con esquizontes que fueron lavados tres veces con solución salina normal centrifugados a 627 rpm, descartando el sobrenadante, el sedimento fué resuspendido en ficol al 1% en solución salina; para su liofilización.

Las ampollitas que contienen el antígeno liofilizado fueron almacenadas de 4 a 35° C durante un mes como mínimo, sin pérdida de actividad. Cada ampollita dá aproximadamente de 15 a 20 esquizontes por campo en el microscopio de inmersión.(69)

F.2 DESARROLLO DE PLASMODIUM.

La IgM monoclonal y el factor reumatoide, son producidos por estimulación in vitro de células de bazo BALB/c con lipopolisacáridos y por hiperinmunización con merozoitos de P. falciparum. In vitro, las antiinmunoglobulinas aumentaron los efectos antiinhibitorios del suero de ratón policlonal específico de P. falciparum por medio de anticuerpos monoclonales IgG1 e IgG2b que comprometen al fragmento Fc de la molécula.

La presencia de la antiglobulina relacionada con el incremento en el número de esquizontes representó un fracaso para dispersar merozoitos, ya que ocasionalmente la parasitemia permanece bajo la ausencia del fenómeno de inhibición de esquizontes, por lo que la antiglobulina contribuyó para que las células de protección del hospedero aglutinaran a los merozoitos además de incrementar la diversidad del anticuerpo circumesporozoito interrumpiendo las interacciones de ligadura de eritrocito-receptor con el parásito. (81)

Al evaluar las proteínas de la membrana de los eritrocitos en la invasión y maduración de P. falciparum en eritrocitos con anormalidades cuali y cuantitativas, con defectos que incluyen esferocitosis hereditaria (HS) y eliptosis hereditaria (HE), se

observa que la invasión del parásito 18 horas después de la inoculación con merozoitos, es normal en todas las células rojas patológicas. En contraste las células rojas de seis sujetos con esferocitosis hereditaria mostraron marcada inhibición en el crecimiento aparentemente después del primer o segundo ciclo de crecimiento. Preincubando eritrocitos con esferocitosis en cultivo de tres días, no se alteran estos resultados ya que el parásito crece.

El crecimiento disminuye en eritrocitos infectados, el ATP no está disminuído, y los niveles de glutatión o de la hemólisis del eritrocito se incrementan. Por lo que la funcionalidad y estructuralidad de la membrana del hospedero es indispensable para el crecimiento y desarrollo del parásito.
(70)

F.3 AISLAMIENTO DE ANTICUERPOS POR MEDIO DE DNA.

El Codón de DNA para la proteína CS puede ser clonado en un baculovirus y expresado en Spodoptera frugiperda, insecto celular (Sf 9). Construyendo tres DNA's diferentes. El primero es dirigido a la síntesis completa CSP (aminoácido 1-412); el segundo interviene en la producción de una serie desprovista de un enlazante o ancla dominante y el tercero una molécula desprovista de ambos con señal de membrana con enlaces de aminoácidos 18-391.

Estas tres recombinantes de CSP son producidas alrededor de 3 millones de microgramos y están caracterizadas en términos de inmunorreactividad y peso molecular aparente. La purificación de la proteína recombinante fue lograda por una combinación de tratamiento térmico, acidificación, enfoque isoeléctrico y cromatografía de intercambio iónico. Al inocular ratones se generó una leve respuesta de anticuerpos. (39)

La deficiencia de riboflavina inhibe el desarrollo de parásitos palúdicos tanto in vivo como in vitro; aunque aún no se ha determinado el mecanismo de acción de la riboflavina en los parásitos.

En eritrocitos (5-8% de parasitemia), infectados y no infectados; incubados de 0 a 3 horas, a 37°C en una solución salina amortiguadora de fosfatos que contiene magnesio, glucosa y riboflavina (2.5-7.5 µg), donde las muestras fueron centrifugadas, lavadas dos veces con amortiguador frío y previamente lisadas, el porcentaje de la biosíntesis in vitro de FMN y FAD de riboflavina en eritrocitos, es medida por cromatografía de intercambio iónico y técnicas de dilución de isótopos invertidos. Se encuentra que el porcentaje de riboflavina producida y la biosíntesis de FMN y FAD están incrementadas en eritrocitos con parasitemia, siendo lo contrario en eritrocitos no parasitados. La síntesis de riboflavina en eritrocitos es proporcional a la extensión de la parasitemia y especialmente al porcentaje de esquizontes presentes en el eritrocito

ya que el aumento en el requerimiento de riboflavina puede ser debido a la rápida multiplicación, elevado porcentaje metabólico y la extrema vulnerabilidad a tensión oxidativa del parásito. (22)

F.4 SEPARACION DE ANTIGENOS.

Un antígeno soluble aislado por Orlandi denominado EBA-175 Kd es liberado en el sobrenadante de cultivos durante la ruptura del eritrocito por el esquizonte infectante.

Las características principales de este antígeno son: 1) Difiere bioquímica e inmunológicamente de otros antígenos palúdicos. 2) Seis antígenos aislados, conservan su antigenicidad. 3) Se expresa durante la esquizogonia como una proteína de 190 Kd, la cual es larga y el sobrenadante del cultivo forma al antígeno. 4) La liberación de EBA-175 soluble en el sobrenadante del cultivo coincide con la ruptura del esquizonte. 5) No se observa cambio de potencial iónico ($pI=6.8$) del enfoque isoelectrico entre la célula y la especie sobrenadante de la proteína. 6) La liberación de EBA-175 en el sobrenadante del cultivo se inhibe por la adición de leupeptina y quimostatina. (58)

Los antígenos liberados en el medio durante un cultivo in vitro pueden ser purificados para obtener una mejor caracterización. Esta purificación se efectúa en dos pasos: a) el medio de cultivo crudo es pasado mediante un gel de intercambio catiónico sobre una columna de giro, b) el suero contaminante es removido por cromatografía de afinidad inversa (utilizando como absorbente suero de caballo antihumano). La calidad de los antígenos obtenidos se analiza por reactividad metabólica marcando con leucina tritiada y por cromatografía de arrastre de líquidos de alta resolución; la antigenicidad es cuantificada por la técnica de ELISA. (85)

G. TECNICAS INMUNOLOGICAS DE IDENTIFICACION.

El exámen con microscopio óptico es la base principal del diagnóstico en los estudios epidemiológicos sobre los que se apoyan las actuales estrategias de control de paludismo.

Para los propósitos de serodiagnóstico se han empleado, la prueba de precipitación en gel, la hemaglutinación indirecta (IHA7), la prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes (IFA), el radioinmunoanálisis (RIA) y el ensayo inmunoenzimático (ELISA). Hoy en día, rara vez se emplean las pruebas de precipitación y las radioinmunológicas, por su poca sensibilidad, y por haber sido remplazadas casi completamente por el inmuno ensayo enzimático (ELISA). (68)

Con el reciente aislamiento de antígenos purificados de todas las fases de desarrollo del parásito y la obtención de anticuerpos monoclonales, se han elaborado reactivos más sensibles. Las sondas de DNA específicas de los parásitos han ampliado la posibilidad de mejorar los estudios epidemiológicos, así como nuevas pruebas de diagnóstico más específicas y susceptibles de ser automatizadas.

El DNA genómico de P. falciparum tiene las características necesarias para la identificación específica del parásito en el diagnóstico clínico. Posee abundantes secuencias repetitivas que son específicas del plasmodio y al parecer no persisten en la corriente sanguínea después de la lisis de éste.

Estas secuencias pueden detectarse por medio de la hibridación, donde las dos cadenas complementarias DNA del parásito se separan, es decir, se desnaturalizan por tratamiento químico ó térmico y se ligan a una superficie sólida. Se mezclan con una sonda de DNA que también se ha desnaturalizado y contiene una secuencia de nucleótidos complementaria de una secuencia repetitiva en el DNA del parásito. Un segundo tratamiento permite la hibridación de las cadenas con el DNA del parásito. Esa reacción puede visualizarse detectando la emisión de isótopos ó la actividad de una enzima ligada al DNA de la sonda. (68)

Oligonucleótidos sintéticos que contienen las repeticiones de 21 pares de bases, se han ensayado como sondas diagnósticas para P.falciparum. Las sondas sintéticas no tienen DNA vector y, por tanto, producen un número menor de reacciones cruzadas con el DNA contaminante de la muestra. Se pueden marcar con P32 que emite radioactividad específica ó con una enzima como fosfatasa alcalina que produce una reacción cromática.

Las sondas marcadas con enzimas exigen un tratamiento más extenso de las muestras y son menos sensibles que las marcadas con P32. Esta técnica ha producido resultados negativos y positivos falsos en relación con parasitemias de 5 a 2000 parásitos/microlitro. (68)

La sensibilidad de la sonda de DNA se compara en forma favorable con la microscopia ordinaria; aquella detecta densidades mínimas hasta de 40 parásitos por microlitro de sangre. Además, ofrece la ventaja de ser un procedimiento estandarizado que se puede automatizar. Una característica importante de éste método es su reproductibilidad en un gran número de muestras. El método de la sonda de DNA ofrece más ventajas que el examen microscópico para la detección de infecciones mixtas.

Al emplear antígenos definidos y purificados en la prueba ELISA, se puede medir la cantidad de anticuerpo contra las fases eritrocíticas asexuales de P.falciparum con el fin de incrementar la sensibilidad y especificidad del método. Se han producido varios antígenos específicos de las fases eritrocíticas asexuales aislando el gen en cuestión y expresándolo en un vector idóneo, mediante síntesis de polipéptidos y purificación de extractos de parásitos.

Las pruebas inmunológicas permiten estudiar: a) La relación entre las concentraciones de anticuerpos de especificidad conocida y la aparición y gravedad de la infección; b) La importancia de la diversidad antigénica y de la reactividad cruzada de los antígenos de diferentes especies en la epidemiología de paludismo; c) La restricción genética de las respuestas de anticuerpos. (68)

Las principales técnicas inmunológicas de identificación de anticuerpos palúdicos son:

a) Análisis inmunoabsorbente unido a una enzima (ELISA)

El antígeno en solución salina, se incuba en un tubo ó placa de plástico ó papel, la superficie adsorbente retiene pequeñas cantidades de antígeno. El antígeno libre se elimina por lavado, (la placa puede bloquearse después con un exceso de una proteína irrelevante, para evitar la posterior unión inespecífica de proteínas). Al añadir la muestra de anticuerpo problema, éste se une al antígeno.

Otras proteínas y anticuerpos no específicos se eliminan por lavado; posteriormente se añade un segundo anticuerpo al que se halla unido covalentemente una enzima (peroxidasa).

La actividad enzimática se cuantifica mediante la adición de un cromógeno, sustancia incolora que debido a la acción enzimática pasa a formar un producto colorido, el cual es medido por espectrofotometría. Este método permite detectar parasitemias de 0.01 a 0.001%. (68)

b) Inmunofluorescencia de anticuerpos (IFA)

Directa: La solución de anticuerpos fluoresceinados se aplica sobre un corte de tejido congelado, se incuba y se lava. Los anticuerpos unidos se revelan después con un microscopio provisto de lámpara de luz ultravioleta; la luz ultravioleta se dirige hacia el corte a través del objetivo, con lo que el campo aparece oscuro y las áreas con anticuerpo presentan fluorescencia verde. El patrón de fluorescencia es característico para cada antígeno hístico. (68)

Indirecta: El anticuerpo se aplica sobre un corte de tejido congelado y luego, después de lavarlo, se añade un segundo anticuerpo fluoresceinado contra la Ig del primero.

Indirecta amplificada por el complemento: Este método es una modificación de la técnica indirecta para detectar anticuerpos fijadores de complemento.

En el segundo paso después de haber aplicado el anticuerpo se añade complemento fresco, que se fija alrededor del lugar donde se han unido los anticuerpos. Debido a los pasos de ampliación en la vía clásica del complemento, una molécula de anticuerpo puede causar la fijación de muchas moléculas de C3b al corte de tejido congelado; éstas moléculas se visualizan después con un antisuero anti-C3 fluoresceinado. (68)

c) WESTERN BLOT

Esta prueba está basada en el principio de ELISA indirecta con un soporte de nitrocelulosa conteniendo todas las proteínas que constituyen al parásito. Este método hace uso de tiras de papel que han sido impregnadas con las diferentes proteínas constitutivas del parásito, mediante un proceso previo de inmunotransferencia.

Las proteínas se encuentran distribuidas a lo largo de la tira de papel en orden decreciente de peso molecular. En espacios discretos y bien definidos.

La tira así preparada se coloca en un canal de plástico y se sumerge en una cierta dilución de suero problema; en caso de existir anticuerpos contra el parásito estos se uniran a la tira del papel en el punto correspondiente a la localización de la proteína para la cual sean específicos. Tal unión se pondrá de manifiesto mediante un conjugado enzimático antiinmunoglobulínico y el sustrato correspondiente, que dará lugar a la aparición de bandas oscuras sobre la tira.

H. PRUEBAS DE PROTECCION INMUNOLOGICA Y VACUNAS.

Los estudios de vacunación contra paludismo han sido importantes, pues en la primera vacunación experimental en los años 70's se utilizaron rayos X contra estadios extracelulares del parásito (esporozoito, gametocito, gametos) produciendo una respuesta deficiente cuando se inoculaba en el hospedero; estos experimentos confirmaron la hipótesis de que una vacuna puede ser viable. En el segundo experimento, donde aún continúan las investigaciones, se tienen antígenos depurados del parásito con un gran número de moléculas en donde se identifican sus clonas con genes secuenciados. (37)

Recientes avances en el campo de la biología molecular han permitido el desarrollo de vacunas de subunidades destinadas a luchar contra enfermedades parasitarias que tienen importancia para el hombre, una de las mayores dificultades que esto representa es la naturaleza polimórfica y cambiante de muchos antígenos parasitarios. Además la inmunización puede llevar a la selección de otros nuevos antígenos e inducir una nueva variante.

Para que una vacuna sea efectiva debe inducir una respuesta duradera (es decir, con memoria) en la clase adecuada de células T que dan lugar a una potente inmunidad mediada por células y que no inducen supresión.

Dado que los antígenos que son reconocidos por células T presentan una restricción genética, el antígeno que se emplee como vacuna debe ser presentado por la mayoría de haplótipos MHC clase II, evitando que los antígenos induzcan una clase errónea de respuesta inmunitaria o la aparición de autoinmunidad. Los antígenos parasitarios pueden producir anticuerpos que causen diseminación de los parásitos, y algunas respuestas mediadas por las células pueden causar patología.

Lo habitual es identificar los antígenos protectores y después, la porción inmunogénica clave de la molécula, que probablemente, es distinta de la porción que provoca supresión.

Los antígenos se identifican más rápidamente por las reacciones con anticuerpos, los antígenos que son útiles en la vacunación se han de identificar por sus reacciones con las células ya que la protección depende del desarrollo de una buena inmunidad celular.

Es probable que la respuesta de anticuerpos sea más potente contra los antígenos superficiales del parásito pero es también posible que éste sea capaz de escapar a la acción de tales anticuerpos. La inmunidad mediada por células es independiente de los antígenos superficiales. Se logra una mayor protección si se utilizan antígenos procedentes del interior del parásito. Los antígenos internos estimulan a las células T a que liberen citocinas y activen macrófagos, aunque no pueda lograrse una protección completa, puede tener interés desarrollar una vacuna que reduzca la carga total de parásitos.

En el paludismo, dado que individuos inmunes pueden llevar los parásitos en la sangre sin que presente efecto perjudicial, el objetivo sería vacunar contra los antígenos que inducen citocinas como $TNF\alpha$, que es responsable, según se cree de muchos síntomas de la enfermedad. (68)

Se han clonado diversos antígenos de P. falciparum que son posibles candidatos de vacunas, las moléculas estudiadas son:

- 1) La presencia de proteínas de CSP;
- 2) El antígeno presente en la superficie del esquizonte que es precursor de un mínimo de tres diferentes merozoitos o antígenos de superficie (PMMSA);
- 3) Una proteína también presente en la membrana en el estadio circular del eritrocito infectado (RESA). (37)

Tanto los antígenos clonados como los péptidos sintéticos inducen el desarrollo de anticuerpos neutralizantes contra los esporozoitos.

Lamentablemente, estas respuestas muestran restricción genética, rasgo propio de epitopos muy repetitivos. (68)

Muchos de los antígenos clonados muestran regiones que varían de un antígeno a otro. El grado de diversidad es extenso dando algunas veces diferentes respuestas inmunes en el hospedero, lo que sugiere una diversidad en un epitopo inmunodominante. En la proteína circumesporozoito, la diversidad antigénica ocurre con las células T por reconocimiento de sitios inmunodominantes en la molécula mientras el reconocimiento de estos sitios por las células B son variables. (37)

En el paludismo el parásito altera sus antígenos expresados ya sea espontáneamente o bajo presión de la respuesta inmune, la variación antigénica, los anticuerpos y las células mediadoras de inmunidad juegan un papel importante en el efecto dominante. Las pruebas del polipéptido NANP para preparar vacunas para el hombre fracasaron en cuanto a la protección requerida. Se espera que la inmunización para CSP tenga acción por medio de anticuerpos bloqueadores de la invasión de esporozoitos dentro del hepatocito. La respuesta del anticuerpo al polipéptido NANP puede ser aparente, siendo una característica que puede relacionarse con observaciones seroepidemiológicas mostrando una ausencia de relación entre la presencia de anticuerpos anti-NANP y el nivel de protección en pacientes que viven en áreas endémicas, la inmunidad contra estadios del ciclo eritrocítico es más confusa por la protección activada por medio de: a) Un bloqueo en la invasión de merozoitos por cualquier anticuerpo enlazante en la superficie del merozoito en las moléculas liberadas durante la invasión; b) Un efecto sobre el eritrocito asociado a la superficie del antígeno (antígeno de citoadherencia) el cual puede dirigir un secuestro reducido, con opsonización aumentada y fagocitosis de células infectadas; c) El efecto de citocinas producidas por el hospedero puede dañar al parásito intracelularmente; d) Un mecanismo de células mediadoras que aún no se establece. (37)

Una forma de atacar al parásito cuando se encuentra libre en el torrente sanguíneo, es durante el proceso de invasión a la célula hepática o al eritrocito, donde el parásito detecta algunos receptores específicos sobre la superficie de la célula considerada como blanco. (37)

La selección del epitopo es aún un problema para el desarrollo de la vacuna debido a las bases precisas para una protección inmunitaria contra el paludismo, aunque en el hombre se desconocen, se tiene la ventaja de poder usar una subunidad de una vacuna construida antes que la proteína nativa del parásito. (10)

En 1987 un reporte de una proteína de un DNA recombinante para producir una vacuna de P.falciparum, dió a conocer que la respuesta que produce la protección en humanos puede estar dada por la proteína circumesporozoito.

En contraste, las investigaciones de campo, han sugerido que los anticuerpos dirigidos contra la CSP no previenen de la infección palúdica. (10)

Están en curso ensayos de vacunas formadas por una mezcla de péptidos sintéticos. Finalmente, las combinaciones de antígenos dan mejores resultados, administrados juntos con un portador, un adyuvante y quizás una citocina. La vía de administración es importante ya que influye en la presentación del antígeno. Los portadores vivos tienen una gran ventaja ya que se multiplican. Los bacilos BCG se usan como vacuna y actúan por sí mismos como adyuvantes. (68)

Un estudio con dos pruebas en humanos para comprobar la eficacia y seguridad de la vacuna contra esporozoitos estuvo basada en el epitopo inmunodominante de la proteína del circumesporozoito (NANP), conjugada con toxoide tetánico, el otro es una proteína recombinante R32tet32 producida en E. coli por Cattani. Ambas vacunas sintéticas fueron toleradas con efectos mínimos, la elevación de títulos antiesporozoitos IgG e IgM es paralela a la dosis con la vacuna. La estimulación de células T no fue prominente en voluntarios con el péptido sintético, sin embargo fue significativo para los voluntarios con el péptido recombinante. Voluntarios con niveles altos de anticuerpos en el grupo del epitopo conjugado con toxoide tetánico recibieron proteína recombinante y fueron expuestos a picadura de mosquitos con esporozoitos.

Otro grupo de voluntarios libres de parásitos presentan períodos de incubación prolongados en comparación con los controles, las manifestaciones clínicas fueron inmodificadas en éstos. Aún no se aclara la adquisición natural de anticuerpos antiesporozoito como protección debido a que en una región palúdica endémica no hubo diferencia entre adultos que tuvieron y los que no tuvieron parasitemia desarrollada, lo que demuestra que la síntesis de anticuerpos, desistió en presencia del parásito intraeritrocítico lo que sugiere una inmunosupresión inducida por la infección en los estadios sanguíneos.

Otra hipótesis es la carencia de efectos de una dosis subsecuente de vacuna, lo que indica una deficiencia en la estimulación de las células T. La activación de células T puede mediar mecanismos independientes de anticuerpos (linfocinas, células T citotóxicas), aunque existen problemas para la activación de células T. En una vacuna de esporozoitos los epitopos adicionales reconocidos por células T pueden estar dispuestos y pueden proveer de otros esporozoitos o antígenos de estadios en el hígado.

La meta principal de las vacunas incluye antígenos sobre la superficie del merozoito o esquizonte maduro; antígenos de merozoitos liberados durante la invasión a células rojas y antígenos parasitarios sobre la superficie de células rojas infectadas. Los genes codificantes de estos antígenos se han clonado e investigado en primates.

Investigando al mono Aotus trivigartus, Cattani diseñó dos péptidos híbridos de polímeros de proteínas: el primer compuesto de tres péptidos sintéticos de proteína del merozoito específico de P. falciparum ; el segundo contenía además un circumesporozoito repetido.

Los voluntarios fueron seleccionados para participar en una prueba de seguridad y eficacia de esta proteína sintética, recibiendo dos o tres miligramos de la proteína absorbida en hidróxido de aluminio como adyuvante. (10)

Tres controles recibieron solución salina con el mismo adyuvante sin presentar efectos locales o sistémicos. En tres de los cinco voluntarios que recibieron el primer péptido sintético, la parasitemia desapareció espontáneamente, los tres sujetos previamente protegidos mostraron por la técnica de ELISA una activación de anticuerpos a dicho péptido, y por IFA un incremento de anticuerpos contra esquizontes. El voluntario no protegido no mostró incremento en el título de anticuerpos y mostró títulos bajos de esquizontes; dos de los tres voluntarios cuyas pruebas fueron positivas por ELISA o IFA, sugieren la posibilidad de exposiciones previas a paludismo. Esta es una hipótesis en la cual la vacuna pudo haber actuado como refuerzo de una inmunidad parcialmente adquirida en éstos. Uno de los tres voluntarios parcialmente protegido presentó una baja y pasajera parasitemia.

Esta investigación sugiere que los sucesos estan limitados cuando: a) El anticuerpo bloqueador de la invasión de eritrocitos y las proteínas requeridas como ligandos están incluidas durante la invasión de estas; b) Cuando suficientes células T den una respuesta en la mayoría de la población al utilizar una misma vacuna.

Pacientes de Sri Lanka desarrollaron anticuerpos al interrumpir la transmisión palúdica durante infecciones primarias agudas, incrementándose los títulos en ataques subsecuentes. (10)

En experimentos en que se evaluó la infectividad de pacientes a mosquitos un ataque en menos de cuatro meses se relaciona con un efecto mayor de la interrupción de la transmisión.

La vacuna puede tener un efecto inmunológico cuando se interrumpe la transmisión en una gran población que tiende a presentar una infección palúdica. (10)

La interleucina 4 intracelular (IL-4) puede ser inducida en células T de donadores que tuvieron concentraciones elevadas de anticuerpos, existiendo una relación entre la activación de la IL-4, producción de células T y la producción de anticuerpos específicos anti-Pf 155/RESA individuales donde la inmunidad es inducida por la infección natural. (90)

En el P. falciparum se presentan reacciones cruzadas por ejemplo; anti P. Knowlesi , que reacciona con el intermediario CS precursor de P. falciparum. El suero de un humano protegido de P. vivax reacciona con el CS precursor de P. falciparum. La repetición de epitopos como blanco de protección de inmunidad protectora sobre datos de neutralización in vitro no es confiable debido a la reactividad cruzada con anticuerpos monoclonales y a la habilidad de los fragmentos Fab a veces es más efectiva in vitro con parásitos muertos que con anticuerpos intactos. (57)

El enlace peptídico de CS a las proteínas de DR5 o DRW6 se determinó por un ensayo de proliferación, utilizando dos proteínas establecidas de clonas de células T restringidas con especificidad para el péptido estimulador como células de respuesta. Uno de los péptidos del circumesporozoito; que abarca alrededor del 50% de la secuencia de proteína del CS, fué creado para competir con los enlaces en los péptidos estimuladores DR5 o DRW6 que son capaces de una inducción primaria in vitro con respuestas de células T de donadores con haplotipos DR5 o DRW6. La proteína del CS estudiada por Kilgus induce respuesta en clonas de células T no solo en péptidos homólogos, sino en proteína nativa del circumesporozoito de células presentadoras de antígeno (APCs) apropiadas. (42)

La utilización de vacunas selectivas de DNA recombinante, representa un acercamiento para la producción del antígeno, realizando la vacunación de monos Aotus con antígenos recombinantes en estadios de la sangre (recombinante p41 y 190 N), se considera un candidato para una vacuna porque es un antígeno derivado del parásito que sirve para proteger a los monos de la susceptibilidad de otra infección por paludismo. En contraste, el antígeno natural, la proteína recombinante p41 (P. falciparum aldolasa) puede no proteger a los monos aunque todos sean seroconvertidos. El antígeno 190 N contiene una proteína recombinante conservando la secuencia mayor del antígeno de superficie del merozoito. (36)

El antisuero que reconoce fragmentos de la proteína 41da, tiene reacción cruzada con aldolasas de especies diferentes lo cual confirma la fuerza de conservación de esta enzima ya que la aldolasa puede estar localizada en el citoplasma del parásito como una forma activa y soluble mientras que la forma inactiva estuvo asociada a la fracción de la membrana. (40)

El científico Manuel Elkin Pantarroyo es el inventor de la vacuna sintética contra el paludismo por lo que en Colombia lo declararon el "Hombre del Año". Pantarroyo presentó su vacuna en 1990 en medio del escepticismo de la comunidad científica internacional; después de 40 000 pruebas en América Latina y Africa con una inmunización hasta de 60% ha ganado el reconocimiento Mundial.

Donó a la Organización Mundial de la Salud (OMS) la vacuna que es la única esperanza de vida de millones de personas que son afectadas por el paludismo; se comprobó el éxito en Africa, Venezuela y Ecuador.

En 1991 se realizaron pruebas de vacunación utilizando un polipéptido híbrido sintético que contenía epitopos de cuatro proteínas de P. falciparum, vacunando voluntarios con diferentes planes de inmunización en donde el análisis de la respuesta humoral de la vacuna medidos por títulos de anticuerpos IgG al polipéptido mostraron una distribución bimodal, lo que sugiere un control genético de la respuesta inmune a esta proteína.

Un pequeño grupo dió una respuesta baja y un grupo grande dió una buena respuesta.

El fenotipo HLA de estos dos grupos reveló una asociación en la respuesta baja hacia el antígeno HLA-DR4. El control genético de la respuesta inmune a esta vacuna está asociado con alelos del antígeno HLA clase II lo que dá una explicación para guiar el mecanismo que involucra la susceptibilidad de la enfermedad y la necesidad de usar una vacuna totalmente efectiva. (59)

Posteriormente se encontró que la secuencia KEK (lisina-ácido glutámico-lisina) es frecuente en la estructura primaria de ciertas proteínas palúdicas incluidas en la invasión, puesto que interaccionan con el eritrocito. Estas secuencias estan contenidas en el péptido que forma parte del polímero sintético de la vacuna palúdica Spf66 experimentada en humanos.

Al analizar los títulos de anticuerpos contra la subunidad de péptidos que incluye esta vacuna, estos mostraban que la protección está asociada con altos títulos de KEK contenidos en el péptido . Se examinó esta secuencia con suero policlonal de individuos protegidos con la vacuna, y el papel que juega la interacción del par de iones formado por el aminoácido terminal lisina (K) y ácido glutámico (E) el cual actúa como contacto de residuos para una proporción importante de la población de anticuerpos dirigidos contra la vacuna. (63)

Los voluntarios vacunados con la vacuna sintética SPf66 mostraron que es segura, inmunogénica y efectiva en pruebas realizadas con grupos expuestos natural y experimentalmente a la enfermedad. En orden de continuidad la prueba es en poblaciones abiertas, siendo necesaria la estandarización de las características de la vacuna.

Usando la reacción en cadena de polimerasa (PCR), una preferencia selectiva y específica fué mostrada para la serie V β del receptor antigénico de la célula T en la respuesta alta del grupo que involucra el gen V β 8. (61)

El grupo de baja respuesta mostró la secuencia de una diferente serie de genes y una asociación particular con V β 10. (61)

Se interpretaron cuatro pruebas de campo: la definición del número de dosis requerida, el intervalo de las aplicaciones, la concentración de la proteína y el adyuvante usado. En estas pruebas, los individuos vacunados dieron la respuesta inmune evaluada por ensayos de títulos de anticuerpos anti-SPf66 y desarrollaron inhibición in vitro de P.falciparum. (62)

La capacidad de esta vacuna reconoce a la proteína nativa de P.falciparum frente a estos resultados, se concluye de la vacunación que el mejor esquema para adultos es administrar una dosis subcutánea entre 0.30 y 180 días conteniendo 2 mg del polipéptido sintético SPf66 adsorbida en hidróxido de

aluminio.(62)También la vacuna SPf66 es segura y altamente
inmunogénica en niños mayores de 1 año. (60)

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

I. CONCLUSION

1.-La transmisión del Paludismo en zonas endémicas tiene las siguientes características:

a) Es focal y a menudo se limita al interior de la selva con poca transmisión en los poblados y aldeas, en Africa pero en otros sitios es común en las comunidades pequeñas de las áreas endémicas.

b) Es estacional presentando una elevación después del comienzo de la estación lluviosa y otra cuando ésta termina.

c) Implica exposición ocupacional con grupos de alto riesgo bien definidos (por ejemplo: recolectores nocturnos de latex; trabajadores de minas de piedras preciosas que duermen en la selva, trabajadores que desbrozan la selva o construyen caminos, cortadores de caña de azúcar, labradores que trabajan en huertas de té ó árboles frutales, cazadores o recolectores y grupos militares en maniobras).

d) Incluye varias especies, de las cuales las más comunes son: P.falciparum, P.vivax, aunque también se ha encontrado P.malariae y se han observado casos esporádicos de P.ovale, en el este de Asia. En algunas regiones, como la parte continental del sudeste asiático, la especie predominante es P.falciparum y en otras como México y Sri Lanka, P.vivax.

2.-En el Paludismo se estimulan diferentes mecanismos de defensa mediados por células y anticuerpos, dependiendo en particular del estadio de la infección lo cual produce una inmunidad estadio-específica.

La inmunidad por paludismo comprende:

a)Mecanismos efectores: como son células T, citocinas, interleucinas, Interferón gamma, macrófagos (fagocitosis) factor de necrosis tumoral (alfa), granulocitos (neutrófilos, eosinófilos), mastocitos y plaquetas.

b)Mecanismos de evasión ó escape en donde se observa:

i)Recubrimiento del parásito con macromoléculas; ii)Producción de macromoléculas (activador policlonal, antígeno de superficie, anticuerpo antiidiotipo) y iii)Variación antigénica.

3.-Las principales técnicas de identificación son: ELISA, IFA, WESTERN-BLOT; para la purificación y obtención de antígenos se requiere de cultivos continuos por el método TRAGER-JENSEN con los parámetros biológicos y químicos requeridos; para la purificación se utiliza la liofilización.

4.-P. falciparum requiere cantidades apreciables de O₂, así como de CO₂. Una presión osmótica y un pH lo más parecido posible a los de la sangre. Para un cultivo de Plasmodium se necesitan

sales inorgánicas, vitaminas hidrosolubles, purinas, pirimidinas, eritrocitos enteros, manosa, fructosa, glucosa, ácido p-aminobenzoico, glicerina, metionina. La metionina junto con ácido p-aminobenzoico, glucosa y CoA influyen favorablemente en el desarrollo; así como ácido pirúvico y el plasma son determinantes. Se debe neutralizar la acumulación de ácido láctico para evitar trastornos en la actividad respiratoria. En cultivos continuos in vitro el metabolismo sincronizado favorece la maduración del parásito, predominando proteínas de alto peso molecular.

5.-Una vacuna antiesporozoito es ideal en la medida que induce la producción de anticuerpos y puede neutralizar al esporozoito al principio de la infección antes de que éste penetre más células del hígado, interrumpiendo el vínculo entre el mosquito propagador del parásito y el hombre. Una vacuna antimerozoito tiene la ventaja de neutralizar al parásito en el curso de la infección y representa la segunda línea de defensa contra la enfermedad. Finalmente, una vacuna antigametocito tiene la ventaja de interrumpir el vínculo entre el hombre y el mosquito.

Una vacuna antipalúdica eficaz debe inmunizar a los individuos contra una mezcla de antígenos correspondientes a diferentes estadios del ciclo de desarrollo del parásito, a este tipo de vacunas se le conoce como vacuna multivalente.

6.-En la actualidad la única vacuna sintética que ha alcanzado una inmunización de 60% es la obtenida por Manuel Elkin Patarroyo utilizando un polipéptido híbrido sintético en la vacuna palúdica SPf 66 la cual confiere un control genético de la respuesta inmune, asociada con alelos del antígeno HLA clase II que explica el mecanismo que involucra la susceptibilidad de la enfermedad y la necesidad de usar una vacuna totalmente efectiva.

Se demostró que esta vacuna es segura, inmunogénica y efectiva en pacientes expuestos naturalmente y experimentalmente a la enfermedad. Los individuos vacunados dieron una buena respuesta inmune la cual se evaluó por medio de ensayos de título de anticuerpo anti-SPf 66 y desarrollo de inhibición in vitro de P.falciparum.

El mejor esquema de vacunación para adultos es administrar una dosis subcutánea entre 0,30 y 180 días que contenga 2mg. del polipéptido sintético SPf 66 adsorbido en hidróxido de aluminio; así también se demostró que dicha vacuna es segura e inmunogénica para niños mayores de un año.

J. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Ardeshir F; Howard R.F; Viriyakosol S; Arado; Reese R.T.:
Cross-reactive asparagine-rich determinants shared between several blood-stage antigens of Plasmodium falciparum and the circumsporozoite protein.
Mol Biochem Parasitol. 1990, 40 (1): 113-28.
- 2.- Armah G E; Nishikawas; Mikis; Omata Y; Nakabayashiti T
tomitak.: Conformation and immunogenicity of engineered repeating segment of the circumsporozoite surface protein of Plasmodium falciparum.
Mol Biochem Parasitol. 1990, 38 (1):135-40.
- 3.- Barnwell John W et al.: Monoclonal antibody OKM5 inhibits the in vitro binding of Plasmodium falciparum infected erythrocytes to monocytes endothelial and C32 melanoma cells.
J. immunol. 1985, 135(5): 3494-97.
- 4.- Baruch D et al.: Passive modulation of antigen expression in the surface of normal and malaria erythrocytes.
Mol Biochem Parasitol. 1989, Vol?: 127-37.
- 5.- Blackman MJ; Heidrich HG; Donachie S; Mc Bride J S; Holder:
A single fragment of a malaria merozoite surface protein remain on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies.
J Exp Med 1990, 172 (1): 379-82.

- 6.- Brabin et al.: The relation ship between splenomegaly and antibody to the circumsporozoite protein of Plasmodium falciparum in two graves of women with high and low enlarged spleen rates in Madag Papua New Guinea.
Trans R Soc Trop Med Hyg 1990, 84 (1):40-5.
- 7.- Brasseur P et al.: Impairment of Plasmodium falciparum - specific antibody response in severe Malaria.
J. Clin. Microbiol. 1990, 28 (2):265-8.
- 8.- Butcher G A. In vitro responses of human peripheral blood mononuclear cells to Plasmodium falciparum.
Int. J Parasit. 1990, 20(2): 211-6.
- 9.- Carter R et al.: Two apparently nonrepeat epitopes on game tes P. falciparum are targets of transmission-blocking antibodies.
Infect Immun. 1985, 50(1): 102-6.
- 10.- Cattani, J.A. Malaria vaccines: Results of Human Trials and Directions of Curret Reseach.
Exp Parasitol. 1989, 68 (2): 242-7 (ref 23).
- 11.- Cheng, Thomas C. General Parasitology; Editores A.C.; Segunda edición; España 1978.
- 12.- Chester Braver, Paul. :Parasitología clínica. Segunda edición. 1986; Salvat Editores. pags. 203-14.
- 13.- Chizzolini, C. Geinoz, A. Kaufmman, M, H; Schrijvers D. Detec- tive in vitro production of anti Plasmodium falciparum antibodies in some malaria-immune subjects.
Cell Immunol. 1990, 129 (1); 151-60.

- 14.- Chizzolini C. y cols.: Producción de linfocitos T, interferón-gamma inducidos por antígenos de P. falciparum es alto en infectados no inmunes y bajo en sujetos inmunes.
Clin Exp Immunol. 1990, 79 (1); 95-9.
- 15.- Chizzolini, C; Nicholson, JK; Genoiz, A; Olen-Rasmussen MA; Schrijvers D.: In vivo decreased expression of (p 55 chain of IL-2 receptor) on CD3+ T cells correlates with low in vitro responsiveness to Plasmodium falciparum antigen in subjects living in a Malaria endemic area.
Clin. Immunol, Immunopathol. 1991, 60 (2): 6209-19.
- 16.- Cohen, S. Plasmodium-mechanisms of survival. The host invader interplay. H. Van den Bossche Ed. Elsevier/North Holland.
Biomedical Press. Amsterdam. 1980, 191-200.
- 17.- Cohen, S. The immune response to parasites. A ciba foundation Symposium. Elsevier Excerpta Medica. North Holland. 1974, 3-20.
- 18.- Dame, J. B.; Williams, J.L.; Mc Cutchan, T.F.; Weber, J. Wirtz, R.A.; Hockmeyer, W.T.; Maloy, W.L.: Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite Plasmodium falciparum.
Science. 1984, 255 (4662): 593-599.
- 19.- Deans, J.A. and Cohen, S.: Immunology of malaria.
Ann. Rev. of Microb. 1983, 37 :25-49.

- 20.- Diffley, P. Strickler, J.E.; Patton, C.L. y Waksman, B.H.:
Detection and quantification of variant specific antigen
in the plasma of rats and mice infected with Trypanosoma
brucei brucei.
J. Parasitol. 1980, 66 :185-91.
- 21.- Dubois, P, et al. :Structure and function of a Thymic
peptide is mimicked by P. falciparum peptides.
Ann Inst. Pasteur Immunol. 1988, 139 (5): 557-67.
- 22.- Dutta, P. Enhanced uptake and metabolism of riboflavin
erythrocytes infected with Plasmodium falciparum.
J. Protozool. 1991, 38 (5): 479-83.
- 23.- Fairlam A.H., et al. :An improved technique for the
cultivation of Plasmodium falciparum in vitro without
daily medium change.
Ann Trop Med Parasitol. 1985, 79 (4): 379-384.
- 24.- Fasman G.D. et al. Conformational Analysis of the Immuno
dominant Epitopes of the Circumsporozoite Protein
of Plasmodium falciparum and P. knowlesi.
Biopolymers. 1990, 29 (1): 123-30.
- 25.- Ferrante, A.; Stangas, R.E.; Romankelly, B.; Bresatz S.;
Kumaratilake L.M.; Rzepczyk C.M.; Adolf G.R.: Production of
tumor necrosis factors alpha and beta by stimulated with
mitogens, bacteria and malarial parasites.
Infect Immun. 1990, 58 (12): 3996-4003.

- 26.- Flisser, A.A. Relación huésped-parásito.
Inst. Inv. Biom. UNAM 1985.
- 27.- Forsyth K.P. et al. :Diversity of antigens expressed on
the surface of erythrocytes infected with nature
P. falciparum parasites in Papua New Guinea.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 1989, 41 (3):259-65.
- 28.- Freeman, R.R, et al. :Protective monoclonal antibodies
recognising stage-specific merozoite antigens of a rodent
Malaria parasite.
Nature. 1980, 284 : 366-368.
- 29.- Fries, H.C. et al.: Characterization of epitopes on the 25
KD protein of the macrogametes/zygotes of P. falciparum.
Parasite Immunol. 1989, 11 (1): 31-45.
- 30.- Fudenberg H.H. Manual de inmunología clínica
Editorial El manual Moderno, S.A. Segunda edición, México.
1980, 746-756.
- 31.- Galey B; Druie P; Ploton, I. Desgranges, C.;
Asavanich A.; Harinasulta T; Marchand D.C.; Brahimi K;
Charoenvit Y; Paul, C. et al. :Evidence for diversity of
P.falciparum sporozoite surface antigens derived from
analysis of antibodies-elicited in humans.
Infect Immun. 1990, Sep; 58(9): 2995-3001.
- 32.- Godson, N. Molecular approaches to malaria vaccines.
Scient. Am. 1985, 252 (5): 32-39.

- 33.- Graves P M, et al. :Association between HLA type and antibody response to malaria sporozoite and gametocyte epitopes is not evident in immune Papua New Guinea. Clin Exp Immunol. 1989, 78 (3): 418-23.
- 34.- H.M. Etlinger, et al. :Use of Prior Vaccinations for the Development of New Vaccines. Reports 27. 1990, 423-425.
- 35.- Herreras, et al. :Immunization of Aotus monkeys with P.falciparum blod-stage recombinant proteins. Proc Natl Acad Sci USA. 1990, 87 (10):4017-21.
- 36.- Hollingdale H R et al. :Activity of human volunteer sera to candidate Plasmodium falciparum circumsporozoite protein vaccines in the inhibition of sporozoite. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1990, 84 (3): 325-9.
- 37.- Hommel M. Future potential of malaria vaccine. J R Soc Med. 1989, 82 Suppl (17): 57-62.
- 38.- I Rubik, P. Morovsky and H. Dyntarova. Use of lyophilized antigen prepared from continuos cultures of P. falciparum for serol6gical doagnosis by the indirect fluorescent antiby test. The Roy Soc of Trop Med. Hyg vol 83. 1989, 83(6).
- 39.- Jacobs P; Massaer M; Heinderyckx M; Milican F; Gilles P; van Opstal o; Gheysen D; Bollen A. P. falciparum: recombi nant baculoviruses direct the expression of circumesporo zoite proteins in Spodoptera frugiperda cell cultures. Mol Biol. May 1991, 15 (2):73-79.

- 40.- Knapp, Bernhard, et al. P.falciparum aldolase: gene structure and localization.
Molecular and Biochemical Parasitology.
1990, 40 (1):1-12.
- 41.- Jones K.R., et al. :Polyclonal in vitro proliferative responses from nonimmune donors to P. falciparum malaria antigens require UCHL1 + (memory) T cells.
Eur J Immunol. 1990, 20 (2): 307-15.
- 42.- Kilgus Jochen et al. :Vaccine T-cell epitope selectin by a peptide competition assay.
Nat. Acad. of Sc. 1989, 86 (5):1629-33.
- 43.- Kumaratilake LM., et al. :Tumor necrosis factor enhances neutrophil mediated killing of P. falciparum.
Infect Immun. 1990, 58 (3): 688-93.
- 44.- Karav, et al. :Chemical characterization of the parasitophorous vacuole membrane antigen QF 116 from P. falciparum.
Mol Biochem Parasitol. 1990, 38 (1): 19-23.
- 45.- Khapp B, et al. : P. falciparum aldolase: gene structure and localization.
Mol Biochem Parasitol. 1990, 40 (1): 1-12.
- 46.- Kilgus, et al. :Vaccine T-cell epitope selection by a peptide competition assay.
Proc Natl Acad Sci USA. 1989, 86 (5): 1629-33.
- 47.- Kremmsner Pg, et al. :Immune response in patients during and after P. falciparum infection.
J Infect Dis. 1990, 161 (5): 1025-8.

- 48.- Kurdi-Haidar B; Luzzatto L.:Expression and characteriza-
tion of glucose-6-phosphate dehydrogenase of
P. falciparum.
Mol Biochem Parasitol. 1990, 41 (1):83-91.
- 49.- Lyon JA, et al.:P. falciparum antigens synthesized by
schizonts and stabilized at the merozoite surface when
schizonts mature in the presence of protease inhibitors.
J Immunol. 1986, 15 ;136(6): 2245-51.
- 50.- Maguire PA; Prudhomme J; Sherman IW. :Alterations in
erythrocyte membrane phospholipid organization due to the
intracellular growth of the human malaria parasite,
P. falciparum.
Parasitology. 1991, 102 Pt (2):179-86.
- 51.- Malhotra K; Salmon D; Le Brans J; Vilde JL. Potentiation
of chloroquine activity against P. falciparum by the
peroxidase-hydrogen peroxide system.
Antimicrob Agents Chemother 190, -34 (10): 1981-5.
- 52.- Marsh K. et al. :Anti-sporozoite antibodies and immunity
to malaria in a rural Gambian population.
Trans R Soc Trop Med Hyg. 1988, 82 (4): 532-7.
- 53.- Mattei D, et al. :Reactive antigenic determinants present
on different P. falciparum blood-stage antigens.
Parasite Immunol. 1989, 11 (1):15-29.

- 54.- May Ho, H. Kyle Webster.et al. :Antigen-specific
Immunosuppression in human malaria due to
Plasmodium falciparum .
J. Inf. dis. 1986, 55 (4):763-771.
- 55.- Mbaya B; Rigomier D; Edorh GG; Karst F; Schrevel J. Iso
pre noid metabolismin P. falciparum during the in
traerythorocytic phase of malaria.
Biochem Biophys Res Commun. 1990, 173 (3): 849-54.
763-771.
- 56.- Murphy VF, et al. :Expression of hibrid malaria antigens
in insect cells and their engineering for correct
folding and secretion.
Parasitology. 1990, 100 pt. (2):177-83.
- 57.- Newbold, C.I. :Parasite antigens in protection, diagnosis
and escape: Plasmodium.
Curr. trop. Microb. immunol. 1985, 20:69-104.
- 58.- Orlandi, P.A.; Sim, B.K.; Churlay J.D.; Haynes, J.D.:
Characterization of the 175 Kilodalton erythrocyte binding
antigen of P. falciparum.
Mol Biochem Parasitol. 1990, 40 (2): 285-94.
- 59.- Patarroyo et al.: Genetic control of the immune response
to a synthetic vaccine against Plasmodium falciparum.
Parasite Immunol (ENGLAND) Sep. 1991, 13:(5);509-16.

- 60.- Patarroyo et al.: Study of the safety and immunogenicity of the synthetic malaria SPf66 vaccine in children aged 1-14 years.
Vaccine (ENGLAND) 1992, 10:3;175-8.
- 61.- Patarroyo et al.: A specific T-cell receptor genotype preference in the immune response to a synthetic P.falciparum malaria vaccine.
Parasite Immunol. Jan. 1992, 14:(I);87-94.
- 62.- Patarroyo et al.: Determination of the immunization schedule for field trials with the synthetic malaria vaccine SPf66.
Parasite Immunol. 1992, 14:95-109.
- 63.- Patarroyo et al.: In human malaria protective antibodies are directed mainly against the Lys-Glution pair within the Lys-Glu-Lys motif of the synthetic vaccine SPf66.
Parasite Immunol. Jan. 1992, 14:(I);III-24.
- 64.- Playfair, J.H.L. and De Souza, J.B. :Lymphocyte traffic and lymphocyte destruction in murine malaria.
Immunology. 1982, 46 :125.
- 65.- Ramassamy, R; Jones, G; Lord, R. :Characterization of an inhibitory monoclonal antibody-defined, epitope on a malaria vaccine candidate antigen.
Immuno Let. 1990, 23 (4); 305-9.

- 66.- Riley, E.M., Maclennan, C. Kwiatrowski, D and Greenwood, B.M. :Suppression of in vitro lymphoproliferative responses in acute malaria patients can be partially reversed by indometacin.
Parasite Immunology. 1989, 11 :509-517.
- 67.- Riley, E.M., et al. :Association between HLA type and antibody response to malaria sporozoite and gametocyte epitopes is not evident in immune Papua New Guineans.
J. Immunol. 1990, 144 (12): 4810-6.
- 68.- Roitt, M. Inmunología. Ed. Masson-Salvat Medicina Barcelona, España. 3ª Edición 1993.
- 69.- Rubik, et al. :Use of lyophilized antigen prepared from continuous cultures of Plasmodium falciparum for serological diagnosis by the indirect fluorescent antibody test.
The Roy Soc. Trop. Med. Hyg. 1989, 83(6):750.
- 70.- Russel, Paul F. :Paludismo Compendio Básico; La Prensa Médica Mexicana; 1ª Edición, 1953. México D.F.
- 71.- Russo, D. M., et al. :Potenciación de células mediadoras de respuesta inmune directa contra péptidos de esporozoitos de P. falciparum.
Adv. Exp. Med. Biol. 1989, 251 :203-7.
- 72.- Russo, D.M. et al. :Cell-mediated immune responses to vaccine peptides derived from the circumsporozoite protein of P. falciparum.
J. Immunol. 1989, 143 (2):655-9.

- 73.- Ruy Pérez Tamayo. Introducción a la Patología. Instituto Nacional de Nutrición, 1979.
- 74.- Schofield, L. Vadia, P. :Lack of Ir gene control in the immune reponse to the repetitive surface protein of sporozoites.
J. Immunol. 1990, 144 (7): 2781-8.
- 75.- Schulman, S; Roth, E.F. Jr; Cheng B; Rybicki; Sussman 11; Wong, M; Wang, W; Ranney H.M.; Nagel R.L.; Schwartz R.S.: Growth of P. falciparum in human erythrocytes containing abnormal membrane proteins.
Proc. Natl. Acad. SCI U.S.A. 1990, 87(18): 7339-43.
- 76.- Sehgal V.M.; Siddjiqui W.A.; Alpers MP. A seroepidemiological study to malaria in infants.
Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1989, 83 Suppl: 105-6.
- 77.- Sjolander A; Stahl; Nygren PA; Aslund L; Ahlborg N; Wahlin Scherf A; Berzins K; Uhl: en M; Perlmann P. Immunogenicity and antigenicity in rabbits of a repeated sequence of P. falciparum antigen Pf155/RESA fused two immunoglobulin G-binding domains of Staphylococcal protein A.
Infect Immun. 1990, 58 (4): 854-9.
- 78.- Strayer. Bioquímica. Tercera edición. Ed. Reverte, 1990.

- 79.- Stuber, D., et al. :Mee B cell epitopes in the P. falciparum malaria circumsporozoite (CS) react with its central domain, which contains about 40 repeats of the tetrapeptide.
Eur. J. Immunol. 1990, 29 (4):819-24.
- 80.- Stanley H.A. et al. : P. falciparum antigens associated with membrane structures in the host erythrocyte cytoplasm.
Biochem Parasitol. 1989, 36 (2): 139-49.
- 81.- Stuart, M.K.; Green, T.J. Monoclonal IgM rheumatoid factor-like anti-globulins enhance the inhibitory effects of P. falciparum specific monoclonal antibodies in vitro.
Parasitology. 1990, 101 Pt (2): 177-85.
- 82.- Sutar, N.K. :Renapurkar D.M. Influence of some growth promoting substances on multiplication of P. falciparum in vitro.
Indian J. Malariol. 1990, 27 (4): 217-22.
- 83.- Taverne J.; Bate C.A.; Kwiatkowski D; Jakobsen P.H.; Playfair. Two soluble antigens of P. falciparum induce tumor necrosis factor release from macrophages.
Infect. Immun. 1990, 58 : 2923-8.
- 84.- Taverne, J.; Bate C. A., et al. :Human and murine macrophages produce TNF in response to soluble antigens of P.falciparum.
Parasite Immunol. 1990, 12 (1): 33-43.

- 85.- Thelu J. et al. :Purificación de exoantígenos de P. falciparum. por cromatografía de giro y por cromatografía de afinidad inversa.
Ann Trop Med Parasitol. 1989, 83 (1): 11-7.
- 86.- Thelu J., et al. :Purification and immunochemical study of P. falciparum exoantigens.
J. Parasitol. 1985, 71 (5): 542-6.
- 87.- Taravanij S; Tapchaisri P.; Ketrangsee S.; Kunnaphuti J.; Mahakunkijgharoen Y.; Chitayothin O.; Thammapalera N.
Assessment of putative tests for protective immunity to falciparum malaria.
Southeast Asian J Trop Med Public Health.
1989, 20 (3):385-97.
- 88.- Todd Sanford Diagnóstico clínico por el laboratorio. Sexta edición. Editorial Salvat. 1979
- 89.- Trouet, A.; Tulkens, P.; Schneider, Y. J. Subcellular localization of infectious agents:pharmacological and pharmacokinetic implications. The host invader interplay
H. Van der bojsche ed.
Biomedical Press Amsterdam. 1980, 31-44.
- 90.- Troye Blomberg M.; Rkey E.M.; Kabilan L.; Holmberg M; Perlmann H.; Anderson U.; Heusser CH.; Perlmann P.
Production by activated human T cells of interleukin-4 but not interferon-gamma is associated with elevated levels of serum antibodies to activating malaria antigens.
Proc. Natl Acad Sci USA. 1990, 87 (14): 5484-8.

- 91.- Van Vian en PH; Thaithongg S; Reinders PP; Van Engen A;
Van der Keur M; Tanke HJ; Van der Kayy HJ; Mons B.:
Automated flow cytometric analysis of drug
susceptibility of malaria parasites.
Am. J. Trop. Med Hyg. 1990, 43 (6): 602-7.
- 92.- Velasco, O., Tay, J., Lara R., Gutierrez, M. Parasitología
Médica. Editorial Francisco Méndez Cervantes.
México V-XXII; 1982.
- 93.- Wabwire-Mangen F, et al. :Immunological effects of HIV-1
infection on the humoral response to malaria in a African
population.
Am J Trop Med Hyg 1989, 41 (5): 504-11.
- 94.- Wijesundra MD.; Peiris JS.; Ariyaratne YG.; Verdini AS.;
Pessi A.; Del Giudice G. Antibodies P. falciparum
sporozoites following a malarial outbreak in a non-endemic
area of Sri-Lanka.
Trans R Soc Trop Med Hyg 1990, 84 (1): 35-9.
- 95.- Wilson, R.J.M. Soluble antigens as bloking antigens.
Ciba Foundation Symposium (24 New series): Parasites in
the immunized host: Mechanisn of survival.
Elseivier, Amsterdam. 1974, 185-1961.
- 96.- Wilson R.J.M. y McGregor, I.A. Immunolobulin
characteristics of antibodies to malaria S-antigens
in man.
Immunology. 1973, 25:385-398.

97.- Yamaga KM, et al. P. falciparum: Comparative analysis of antigens from continuous in vitro cultured and in vivo derived malaria parasites.

Exp Parasitol. 1984, 58 (2):138-46.