

100



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

MECANISMOS QUE IMPIDEN LA PENETRACION DEL
ESPOROZOITO EN EL GLOBULO ROJO EN EL
PALUDISMO.



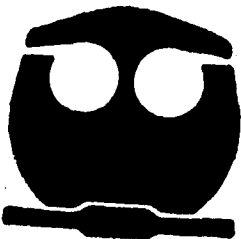
EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

Trabajo Monográfico de Actualización

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

SUSANA MA. RODRIGUEZ CORONA



México, 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.

FOR AL B. JURADO

10 NOV 1963

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	PROF.	ROSA MARIA RAMIREZ GAMA
VOCAL	PROF.	RODOLFO PASTELIN PALACIOS
SECRETARIO	PROF.	ABEL GUTIERREZ RAMOS
1er. SUPLENTE	PROF.	ADRIANA GUADALUPE MEJIA CHAVEZ
2do. SUPLENTE	PROF.	MAITE ASTIGARRAGA ZAVALA

Sitio donde se desarrolló el tema: FaC. DE Química, UNAM; Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM; Fac. de Medicina, UNAM; Centro Médico IMSS.

Asesor del Tema



Q.F.B. ABEL GUTIERREZ RAMOS

Sustentante



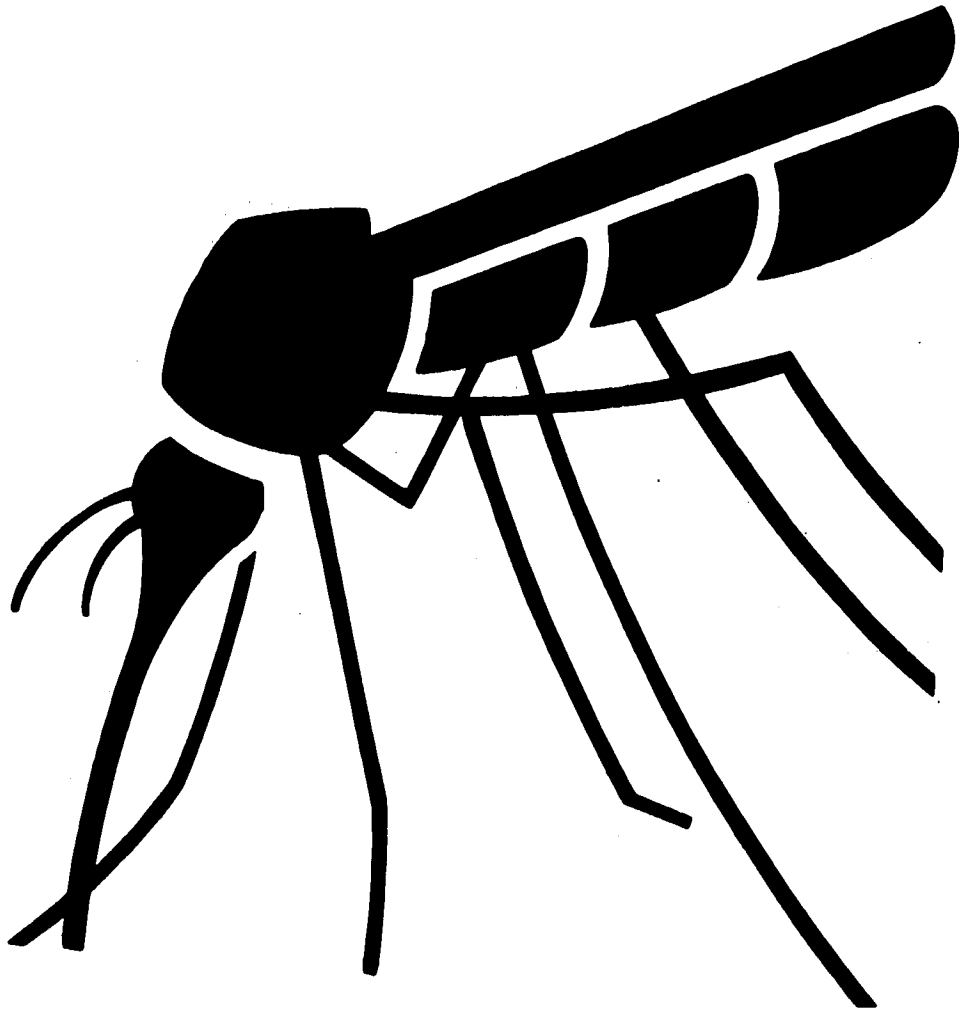
SUSANA MA. RODRIGUEZ CORONA

FALLA DE ORIGEN

A ese Ser que alumbra mi camino y me impulsa
a seguir siempre adelante... DIOS

A mis Padres
Por todo su apoyo y cariño.

A ti hija
Porque has sido una gran alegría y
amor en mi vida.



INDICE

	PAG.
1.- OBJETIVOS.....	1
2.- INTRODUCCIÓN.....	2
3.- ANTECEDENTES.....	5
3.1- Definición.....	5
3.2- Historia.....	6
3.3- El paludismo en México.....	8
4.- PLASMODIOS.....	10
4.1- Ciclo biológico.....	10
4.2- Ciclo eritrocítico.....	15
4.3- Ciclo sexual.....	15
4.4- Cuadro clínico.....	17
4.5- Patología.....	20
4.5- Diagnóstico.....	23
5.- PENETRACIÓN DEL ESPOROZOITO EN EL GLÓBULO ROJO.....	26
5.1- Antígenos.....	31
5.2- Antígenos naturales.....	32
5.3- Antígenos sintéticos.....	39
5.4- Respuesta inmune.....	43
5.5- Respuesta inmune celular.....	45
5.6- Respuesta inmune humoral.....	48
5.7- Influencia inmunológica hacia otros antígenos.....	52
6.- VACUNAS.....	53
7.- COMPUESTOS QUÍMICOS.....	66
7.1- Quinina.....	69
7.2- Cloroquina.....	70
7.3- Cloroguanida.....	73
7.4- 8-Aminoquinolinas.....	74
7.5- Quinacrina.....	75
8.- CONCLUSIONES.....	81
REFERENCIAS.....	83

1.- OBJETIVOS

- * Conocer los mecanismos que impiden la penetración del esporozoito en el glóbulo rojo.

- * Conocer los principales determinantes antigénicos, en base a la respuesta que inducen, y seleccionar el mejor inmunógeno.

- * Correlacionar la importancia de la respuesta inmune, con el desarrollo de una vacuna, así como el tratamiento con sustancias químicas para obtener una mejor protección e incluso la erradicación del paludismo.

2.- INTRODUCCION

El paludismo es una parasitosis que afecta las regiones húmedas, es transmitida por el mosquito Anopheles. Causa graves daños a la población, principalmente a la rural y por lo tanto es un pesado freno para el desarrollo agrícola.

El parásito presenta una gran diversidad antigénica porque pasa por varios ciclos de vida y se reproduce de manera sexual y asexual, tiene además la capacidad de mutación y es por esto que existe desde tiempos remotos -- hasta la fecha sin que se encuentre aún una vacuna eficaz.

Se realizó el análisis de los mecanismos que impiden la penetración del esporozoito que causa el paludismo en el organismo, porque una vez que penetra y suponiendo que se llega a curar de la infección, el ciclo paraeritrocítico, en algunas especies y la recrudescencia en el caso de P. falciparum es un gran problema. El ciclo paraeritrocítico sólo lo presentan P. malariae, P. ovale, y P. vivax y se inicia media hora después de que el mosquito infectado ha introducido los esporozoitos a una persona y ha llegado al hígado a infectar a los hepatocitos, reproduciéndose una y otra vez liberando mero-

zoitos criptozoicos, posteriormente salen del hígado a infectar al eritrocito. Lo importante es que una vez curada la infección pueden quedar merozoitos criptozoicos en el hígado sin que se detecte y en cualquier momento pasar a la fase eritrocítica para causar nuevamente la infección.

Uno de los mecanismos para impedir la penetración del esporozoito en el eritrocito es el inmunológico, que consta de la respuesta inmune humoral y la respuesta inmune celular. En el primer caso la respuesta inmune está mediada por las células B que se encargan de la producción de anticuerpos; y en segundo caso, la respuesta inmune esta mediada por las células T, a través de la activación de macrófagos, y promoviendo la producción de linfotoxinas.

Otro de los mecanismos es a través de las vacunas que se han desarrollado contra el paludismo, y que son específicas contra cada fase del ciclo de vida del parásito. Como son cuatro las especies que causan el paludismo en el ser humano y debido a su gran diversidad antigénica no responden de la misma manera. En la inducción de inmunidad se han utilizado esporozoitos inactivados, microgametocitos, células T sensibilizadas, y ciertas neoglicoproteínas que se encuentran como receptores en el eritrocito.

Los compuestos químicos han sido hasta ahora empleados como una terapéutica para combatir al paludismo. El problema es la resistencia que se presenta en un grado - cada vez mayor hacia éstos compuestos, por lo que se han tenido que administrar hasta dos y tres compuestos simultáneamente.

La profilaxis para quienes tienen que viajar a una zona endémica inicia al llegar con algún compuesto anti-palúdico y debe terminar cuatro semanas después de la salida de la zona, pero sigue siendo un grave problema para quienes viven en esos lugares.

3.- ANTECEDENTES

3.1 Definición.

El paludismo es una parasitosis de carácter agudo y con frecuencia crónico, es causado por protozoarios parásitos del género Plasmodium clase Sporozoa.

Se caracteriza por episodios febriles típicos que varían de acuerdo a la especie de Plasmodium infectante, precedidos por escalofrío intenso que terminan con diaforesis. Cursa con hepatoesplenomegalia y anemia y varían de leves a graves. Se sabe que son cuatro las especies de Plasmodium que en condiciones naturales infectan al hombre: Plasmodium ovale, Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, y Plasmodium malariae.

Los plasmodios del paludismo requieren dos hospederos para completar el ciclo de vida. El hospedero definitivo es el mosquito del género Anopheles y el hospedero-intermediario es el hombre. ^{79 50}

3.2.- Historia.

El hombre prehistórico probablemente estuvo sujeto al paludismo. Se han encontrado mosquitos fósiles y existen muchas pruebas fósiles de parasitismo, que se remontan hasta el periodo Paleozoico.

El paludismo aparece como mal endémico en Grecia, - en el año 400 a.c. y pudo haber sido un factor de decadencia del vigor físico, fuerza mental y poder moral de los griegos, tan evidente un siglo después. Los médicos griegos diferenciaron las fiebres cotidianas, terciarias o cuartanas y hasta los escritores que no eran médicos - como Platón usaron éstos términos. En Roma las referencias de tales fiebres provienen de escritores como Platón, Terencio, Cicerón y Plinio el viejo. Tanto los griegos como los romanos sugirieron una relación etiológica entre los pantanos y las fiebres intermitentes, iniciando el análisis de la estación y el terreno, y su relación con éstas fiebres. En ambos casos se recomendó el desague de los pantanos como medida preventiva.

En 1631 Don Juan de la Vega, usó la infusión de la corteza de la quina para tratar y curar de malaria a Don Luis Jerónimo de Cabrera y Bobadilla, IV Conde de Chin-

chon. Siete años más tarde, su uso se extendió a toda -
Europa. Es posible que no haya existido el paludismo en -
América antes de Colón. Los portadores humanos y los - -
trasmisores anofelinos propagaron el mal a través de Amé -
rica tropical y hacia el Norte. Pero gracias a que del -
Perú se llevó a Europa la corteza de la quina, se tuvo -
el supremo remedio para las fiebres paroxismales.

En 1820 se separó la quinina y otros alcaloides de -
la corteza de la quina, y estuvo disponible comercialmen -
te en los Estados Unidos hasta 1823, y no fué desplazada
por un espacio de más de cien años.

En 1880 Laveran descubrió el agente etiológico del -
paludismo y demostró que era un microorganismo de natura -
leza animal. En 1885 Danileuski, descubrió el paludismo -
aviar. Cuatro años más tarde Sajaron, hizo por primera -
vez la descripción detallada de P.falciparum. En 1890 -
Romanowski, introdujo en el estudio microscópico de los
plasmidios, el método panóptico de coloración con azul -
de metileno y eosina.

En 1897, Ross descubrió el trasmisor del paludismo -
el díptero Anopheles, y más tarde todos los estadios de -
la esporogonia en el mosquito, fueron confirmados experi -
mentalmente por Bastiane Lli, Gignami y Grassi, en mos -
quitos alimentados con sangre de enfermos de paludismo.

En 1922, fué descubierto P. ovale en Africa.

En 1934, Raffaele y colaboradores, descubrieron la fase exoeritrocítica apigmentada en el ciclo esquizogónico de los plasmodios del paludismo en las aves. En 1948 Garnham, descubrió en los monos infectados con P. cynomolgi el ciclo esquizogónico, y el mismo año describe la fase exoeritrocítica de P. vivax, en los hepatocitos humanos.³⁸

3.3.- El paludismo en México.

En México el paludismo fué introducido alrededor -- de 1519 por los conquistadores españoles, ya que los -- plasmodios encontraron excelentes vectores en los anofelinos mexicanos, iniciándose rápidamente gravísimos brotes epidémicos que además de causar gran mortalidad, -- coadyuvaron a la conquista. Esta parasitosis se convirtió en un verdadero azote; de 1922 a 1929 fué la 2a. causa de mortalidad; de 1930 a 1939 constituyó la 3a. En 1959 descendió al noveno, hasta desaparecer del grupo de las 10 primeras causas de defunción en 1960.⁵⁰

En 1955 se creó la Comisión Nacional de la Erradica-
ción del paludismo. Los casos de paludismo se han incre-
mentado debido a una serie de factores por el deterioro
del programa por fallas presupuestales, por la rutiniza-
ción de las actividades, por los defectos en los estu-
dios epidemiológicos, por carecer de apoyo en cambios de
estrategia, por la resistencia del mosquito hacia los in-
secticidas convencionales, por las migraciones sociales,
por subdesarrollo económico, y porque la educación sani-
taria es insuficiente.

Durante mucho tiempo el paludismo ocasionado por --
P. falciparum desapareció de México, pero en 1977, hubo-
un sólo caso en el país que ocurrió en el distrito de --
Tapachula, Chiapas. En 1979, se registraron 21,761 casos
de paludismo en México, en 1980 26,609 casos, siendo las
entidades más afectadas en orden decreciente: Chiapas, -
con 1032 casos, Oaxaca, Sinaloa, Michoacán y Guerrero, -
que contribuyen con el 80% del total nacional.⁵⁰

4.- PLASMODIOS.

Los parásitos palúdicos del hombre, simios, pájaros y otros vertebrados, son protozoos de la clase Sporozoa y del género Plasmodium. Existen cuatro especies reconocidas en el hombre que corresponden a:

Plasmodium malariae (Laveran) 1881.

Plasmodium vivax (Grass y Felletti) 1890.

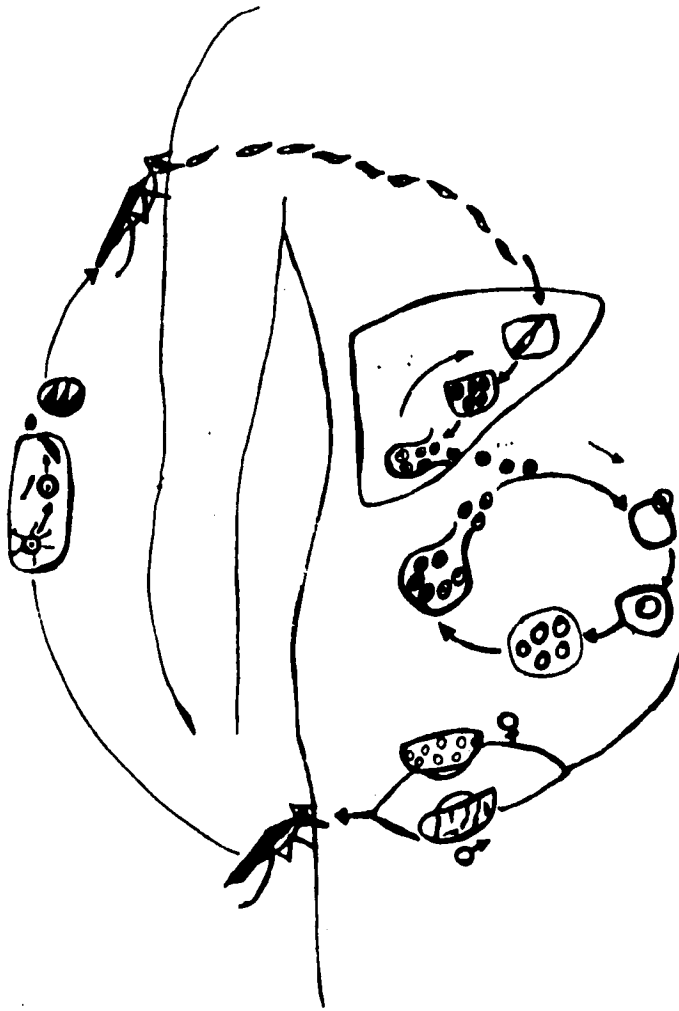
Plasmodium falciparum (Welch) 1897.

Plasmodium ovale (Stephens) 1922.

4.1.- Ciclo biológico.

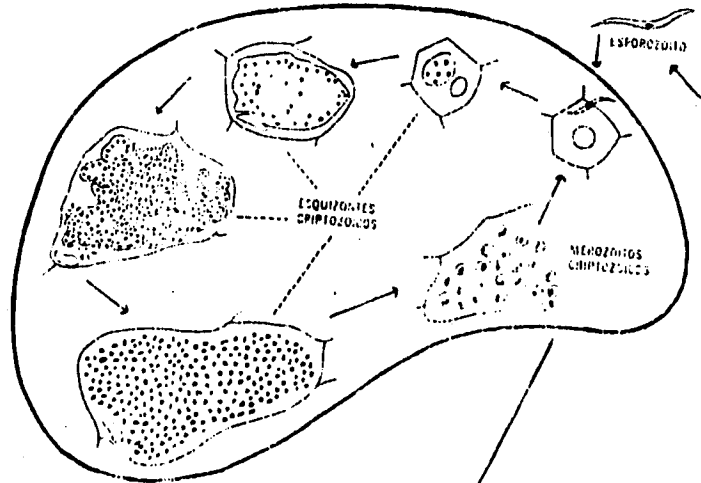
El ciclo biológico (ver esquema 1,2, y 3) se inicia cuando un mosquito o zancudo infectado pica a una persona sana susceptible y le introduce los esporozoitos, los cuales después de 30 a 40 minutos inician el ciclo exo-

ESQUEMA 1

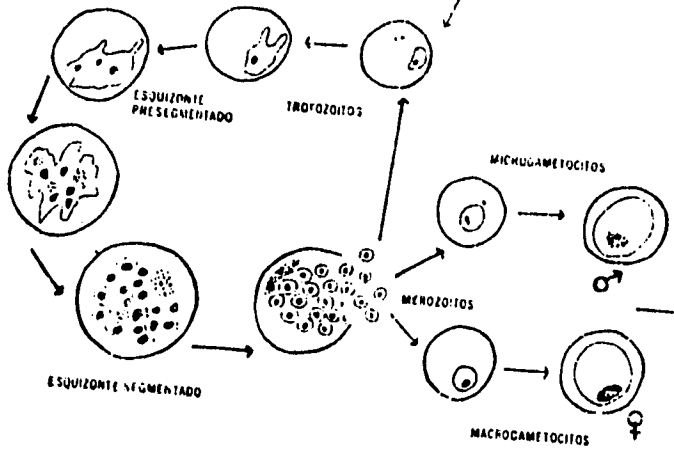


ESQUEMA 2

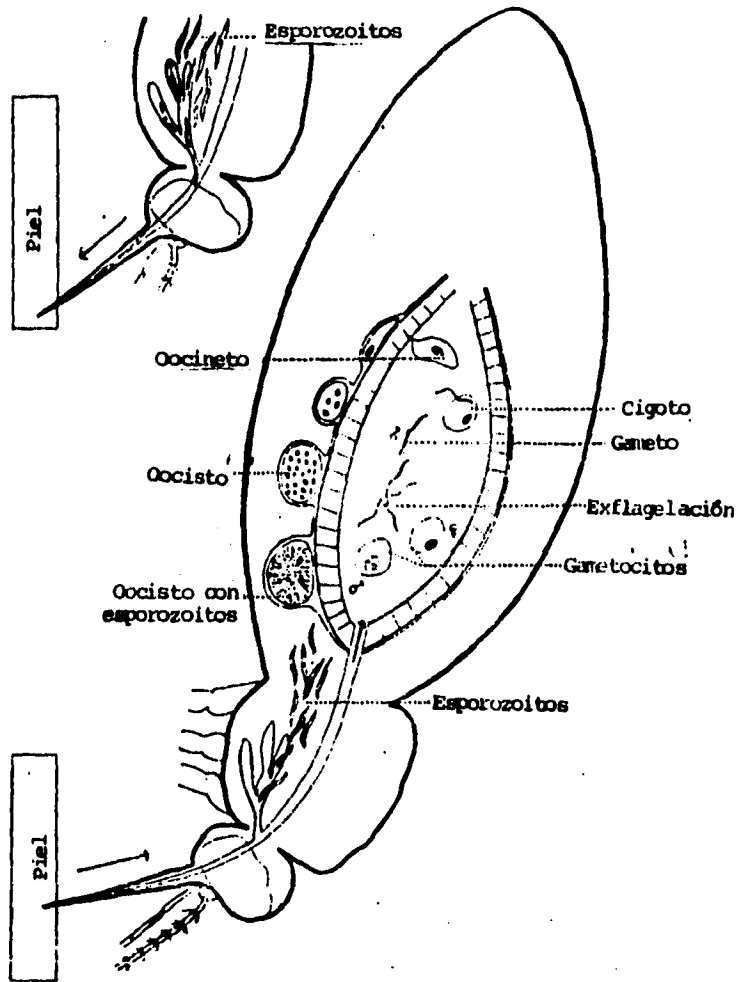
CICLO EXOERITROCITICO EN CELULAS HEPATICAS



CICLO ERITROCITICO



ESQUEMA 3



Ciclo vital sexual del parásito palídico

eritrocítico mediante la invasión de los hepatocitos. -
Dentro de los hepatocitos, el parásito se multiplica y -
determina el aumento del volumen de la célula parasitada
transformándose de esporozoito a esquizonte criptozoico-
apigmentado, reproduciéndose hasta contener cada uno - -
40,000 criptomerozoitos en P. falciparum y sólo 800 a --
1000 en las otras especies.⁵⁰

Al romperse el hepatocito los criptomerozoitos o me
rozoitos criptozoicos (con excepción de los de P. falcipa
rum) invaden otros hepatocitos dando lugar a la fase pa-
raeritrocítica del ciclo exoeritrocítico además de pene-
trar a los eritrocitos, iniciando el ciclo eritrocítico.

Se llama ciclo preeritrocítico cuando los esporozoi
tos inoculados dan origen a las formas eritrocíticas. Se
llama ciclo paraeritrocítico a la parasitación de los he
patocitos que ocurren en forma simultánea a la de los
eritrocitos. P. falciparum carece de ciclo paraeritrocí-
tico. El ciclo paraeritrocítico, es el responsable de -
las recaídas y por lo tanto en el paludismo causado por-
P. falciparum no existen recaídas.⁵⁰

4.2.- Ciclo eritrocítico.

Se inicia cuando los criptomerozoitos invaden los eritrocitos. El eritrocito invadido y el parásito invasor sufren cambios durante éste proceso. Al penetrar al eritrocito el criptomerozoito, crece, se redondea y le aparece una gran vacuola, de tal manera que el citoplasma y el gránulo de cromatina dan la apariencia de un anillo. A ésta forma se le conoce como trofozoito. Al romperse la pared del eritrocito los trofozoitos quedan en libertad e invaden nuevos glóbulos rojos. Después de ocurridos varios ciclos eritrocíticos, algunos de los trofozoitos se transforman en gametocitos, iniciándose el ciclo sexual.^{38.50.}

4.3.- Ciclo sexual.

Solamente el mosquito hembra Anopheles se alimenta de sangre, y al succionar la sangre de un individuo parasitado, ingiere gametocitos, éstos maduran y se transforman en gametos en el estómago del mosquito. Enseguida el microgametocito sufre exflagelación, formando abundantes cuerpos filiformes con funciones de espermatozoides los cuales se dirigen al macrogameto, y sólo uno de ellos lo

gra fecundarlo formando un cigoto ó huevo en el que combinan ambos tipos de cromatina. Dentro de la pared gástrica del insecto el huevo se transforma en oocineto, este se adelgaza y por su movilidad atraviesa la pared gástrica del mosquito, llegando a la capa serosa en donde se convierte en oocisto, y pasa a la cavidad interna general del mosquito, cada oocisto contiene miles de esporozoitos los cuales al romperse la pared del oocisto, quedan libres y emigran hacia las glándulas salivales del mosquito. En éste momento están listos para infectar a un nuevo hospedero.

En general se afirma que el ciclo exoeritrocítico es el responsable de las recaídas y el ciclo eritrocítico del cuadro clínico sexual de la transmisión.⁵⁰

El ciclo paraeritrocítico puede durar en P. vivax 7 años, en P. malariae aproximadamente 35 años y P. falciparum carece del ciclo paraeritrocítico. Debido a la gran longevidad de éstos parásitos se producen frecuentemente recaídas. Esta larga duración del ciclo exoeritrocítico es la responsable de la transmisión por hemotransfusión. El riesgo de transmisión por hemotransfusión es nulo después de un cuadro clínico curado, siendo esto más complicado con P. vivax y P. malariae que a pesar de llegar a tener un buen tratamiento supresivo además -

de una elevada capacidad de causar recaídas pueden dar lugar a paludismo inducido varios años después. Cuando se repite un cuadro clínico por P. falciparum después de una aparente curación clínica se debe a una recrudescencia y no a una recaída, es decir, a la sobrevivencia de algunas formas sanguíneas, que al principio fueron incapaces de producir la enfermedad, debido a su escasez, pero al continuar multiplicándose en sucesivas esquizogonias eritrocíticas traspasan la resistencia del hospedero y dan origen a nuevos cuadros febriles típicos.^{38.50.}

4.4.- Cuadro clínico.

Un ataque primario dejado evolucionar espontáneamente suele terminar con rapidez. En caso de paludismo por P. falciparum rara vez excede de 2 a 3 semanas, en cambio en el causado por otros agentes etiológicos, suele evolucionar de 3 semanas a más de 2 meses.

El periodo de incubación varía de acuerdo a la especie infectante y aún de acuerdo con la cepa. P. vivax y P. ovale tienen un periodo de incubación de 10 a 17 días P. falciparum de 8 a 12 y P. malariae de 27 a 40 días. - Los últimos días del periodo de incubación se caracterizan por signos y síntomas de tipo inespecífico, como ce-

falalgia, fotofobia, dolores musculares, anorexia, e incluso vómitos, pero a menudo éstos síntomas no se observan.

Durante los primeros días de un ataque primario, - rara vez hay crisis febriles típicas y el enfermo puede tener fiebre continua, remitente o intermitente. El paroxismo febril casi siempre es precedido por un escalofrío repentino, que estremece al enfermo, al principio dura - 10 a 15 minutos, y se alarga un poco a medida que el cuadro clínico se repite. Se acompaña por cefalea frontal - intensa y dolores de tronco y miembros. En caso de P. falciparum estos síntomas son poco notables. La etapa febril dura 2 a 6 horas y es seguida por una etapa de sudoración intensa (diaforesis), el paciente termina débil y agotado, quedando casi siempre dormido. Al despertar, su temperatura es normal hasta el comienzo de la siguiente crisis. La periodicidad de la crisis varía según la especie, que corresponde al periodo de esquizogonia eritrocítica. Los cuadros clínicos más graves son los causados - por P. falciparum, llegando a ser mortales. Las crisis - son terciarias excepto en P. malariae que es de aproximadamente de 72 horas.^{38.50.}

Las complicaciones graves son muy frecuentes y pueden ocurrir en cualquier momento de la enfermedad causada por P. falciparum, la mayor parte de ellas obedecen a

fenómenos tromboembólicos causadas por masas de eritrocitos y parásitos.

Otra complicación en este tipo de paludismo es la fiebre biliosa en la que existe grave daño hepático y el paludismo disentérico, así como también la fiebre de aguas negras o hemoglobinuria, que suele ocurrir en el paludismo causado por P. malariae y P. falciparum, se caracteriza por una hemólisis intravascular rápida, algunos autores sugieren que está mediado por un mecanismo de autoinmunidad, donde el autoantígeno involucrado, probablemente está formado por la asociación eritrocito, parásito y quinina. Casi siempre se observan reinfecciones por la misma cepa. Ocasionalmente se instala insuficiencia renal aguda, desencadenada por anoxia renal.

La esplenomegalia puede volverse apreciable al final de la primera semana de evolución aumentando en forma progresiva, ocurriendo lo mismo con la hepatomegalia.

La anemia es secundaria a la destrucción de los eritrocitos parasitados (fenómeno autoinmune) y es mucho más importante en el paludismo causado por P. falciparum que ataca todas las etapas de eritrocitos. En los causados por P. vivax sólo parasita reticulocitos y por P. malariae ataca a los eritrocitos viejos.^{38.50.}

Los plasmodios son parásitos intracelulares obliga-

dos muy complejos, y ha sido difícil determinar cómo ingieren y metabolizan su alimento. El parásito se alimenta del citoplasma de la célula huésped por pinocitosis, es decir por medio de minúsculas invaginaciones de su membrana citoplásmica, aparentemente al azar, para englobar y atrapar una parte del citoplasma de la célula huésped, formando una vacuola en cuyo interior tiene lugar la digestión. En general, los requerimientos energéticos del parásito dependen de la glucosa, los procesos oxidativos son mantenidos por medio de la oxihemoglobina del eritrocito, la globina de la hemoglobina es fragmentada por enzimas en aminoácidos y péptidos, que pasan a formar las proteínas del parásito.³⁷

4.5.- Patología.

El paroxismo palúdico es desencadenado por la liberación de metabolitos que al ponerse en contacto con los neutrófilos inducen la liberación de una lipoproteína que actúa sobre el centro termoregulador del hipotálamo. La gran invasividad de P. falciparum así como la intensa esquizogonia exoeritrocítica que produce, lo hacen ser la especie más peligrosa.

La hepatomegalia y la esplenomegalia obedecen a hiperplasia compensadora de éstas vísceras debido al incre

mento en la destrucción y fagocitosis de células sanguíneas parasitadas; a este mismo mecanismo se debe también la anemia, así como el agotamiento de las reservas de -- hierro del organismo.

El bazo crece y al principio es blando. Al tratar - la parasitosis este órgano recupera su volumen normal pe ro en el paludismo crónico, crece, se endurece y el pigmento palúdico le da un color oscuro. El hígado palúdico incrementa su volumen por congestionamiento, y los macrófagos fijos (células de Kupffer) se llenan de hemozoína- que proviene de la hemoglobina del eritrocito destruido.

El mecanismo patogénico más importante en el palu- - dismo causado por P. falciparum y en algunas ocasiones - por P. vivax y P. malariae, es la gran adhesividad que - muestran entre sí y con el endotelio vascular de los eri trocitos parasitados, lo que da origen a fenómenos trom- boembólicos que suelen ser graves.

Diversas hemoglobinopatías tienen relación con la - resistencia a la enfermedad por P. falciparum, en espe- - cial la deficiencia de deshidrogenasa de glucosa 6-fosfa to en los eritrocitos así como la anemia de células fal- ciformes, la talasemia y la presencia de hemoglobina s.- c. y e.

La deficiencia genética de la glucosa-6-fosfato-des hidrogenasa parece conferir alguna protección contra in-

fecciones por P. falciparum. Cerca del 11% de negros americanos y numerosos individuos en algunas áreas altamente palúdicas tales como África Oriental, heredan esta deficiencia. 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, sustancia clave en la vía metabólica. Los plasmodios usan en su metabolismo la vía de las hexosas en la producción de ribosa fosfato. Requieren también del glutatión reducido para su desarrollo. Estos hallazgos explican en parte porque la deficiencia de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa parece conferir algunas protecciones contra P. falciparum.

Otro fenómeno hereditario responsable de la resistencia al paludismo, es la anemia de células falciformes. El gen de las células falciformes es común en algunas áreas del sur de Europa, Asia y África y origina una hemoglobina anormal, cuyas moléculas, en ausencia de oxígeno tiende a reducirse y forman masas cilíndricas rígidas, las cuáles distorsionan el eritrocito dándole forma de media luna. Los esquizontes de P. falciparum parecen tener dificultad en utilizar esta hemoglobina anormal, de suerte que su crecimiento y esquizogonia se interrumpe.

La incidencia de la infección, como la parasitemia - son bajas, y la duración de la infección, es más corta - en los portadores del gen de células falciformes.

Otras hemoglobinas que pueden dar alguna protección contra el paludismo, son la hemoglobina de la talasemia - y la hemoglobina E contra P. vivax, y la hemoglobina fetal humana contra todos los plasmodios que atacan al hombre.

Las variaciones antigénicas debidas a los cambios - morfológicos del parásito, le permiten protegerse mejor - del embate de las células inmunes del huésped por lo que a pesar de que esté presente una sólida inmunidad, nó es posible la aniquilación pronta del parásito.^{34.37.38.}

4.6.- Diagnóstico.

El diagnóstico del paludismo se realiza mediante el frotis y la gota gruesa sanguínea. La sangre debe tomarse unos minutos antes de que inicie el paroxismo palúdico, porque en ese momento se van a encontrar esquizontes en gran número que además serán de mucha utilidad en el diagnóstico específico.

En el 98% de sueros palúdicos comprobados por frotis ó gota gruesa, se obtienen resultados positivos.

Entre las técnicas ó pruebas más comúnmente utilizada

das en el diagnóstico serológico se encuentran el ELISA, la Inmunofluorescencia Indirecta y la Hemaglutinación Indirecta. Las dos primeras tienen una sensibilidad del 94-95% debiendo usarse como antígenos plasmodios que ataquen al hombre. En la actualidad P. falciparum y P. vivax pueden ser mantenidos en Aotus trivirgatus, un mono sudamericano común. En la hemaglutinación indirecta, se emplea como antígeno eritrocitos sensibilizados con P. cynomolgi, P. coatnegi y P. knowlesi. 12.38.50.

En frotis sanguíneos teñidos con Giemsa y Wright, el citoplasma de los plasmodios se tiñen de azul, y la cromatina nuclear de rojo o violeta, mientras que el citoplasma de los eritrocitos infectados se tiñe de un color amarillo o rosado.

Al crecer el plasmodio, el anillo se hace irregular y más grande, conteniendo puntas o filamentos de cromatina teñida de rojo y gránulos de pigmento negro. La célula huésped está algo alargada. Pueden aparecer en el citoplasma puntos anaranjados o rosados, conocidos como gránulos de Schuffner. Estos gránulos son demostrables cuando los frotis son teñidos con un colorante de Romanowsky a pH de 7.2 a 7.4. A medida que el parásito crece, adquiere la forma de un cuerpo redondo u oval teñido de azul, el esquizonte, cuyo citoplasma contiene al

principio pocos y más tarde muchos gránulos o masas de -
cromatina teñidos de rojo, irregularmente distribuidos,-
y muchos gránulos de pigmento color marrón distribuidos-
a través del citoplasma.

5.- Penetración del esporozoito en el glóbulo rojo.

Los parásitos que causan el paludismo son protozoarios de la clase Sporozoa y del género Plasmodium. Hasta donde se sabe todos los plasmodios que infectan al hombre y a los animales pasan parte de su existencia en huéspedes vertebrados y parte en los mosquitos.

Los esporozoitos circulan en la sangre por espacio de media hora después de su inoculación, y luego desaparecen. Después de esto, la sangre no es infecciosa hasta que se acerca el fin del periodo de incubación.

En las infecciones por P. vivax ó P. falciparum no se ha descubierto etapa alguna del parásito durante los tres primeros días. No se sabe si los esporozoitos entran directamente a las células del parenquima hepático, en donde algunos observadores indican haber encontrado esquizontes -- preeritrocíticos desde el cuarto día.^{1.42.}

En la esquizogonia eritrocítica, cuando se observa por primera vez el plasmodio sobre ó dentro del eritrocito aparece como un punto minúsculo de cromatina, rodeado por escaso citoplasma, y gradualmente toma la forma anular y -

se le denomina anillo o trofozoito. Se cree que antes de penetrar en el eritrocito, queda adherido en la parte exterior del glóbulo rojo. Al desarrollarse el trofozoito, cuando la cromatina está a punto de dividirse se convierte en esquizonte, después de iniciarse la división los esquizontes se llaman presegmentantes hasta que la cromatina ha sido dividida completamente y los merozoitos han adquirido forma. Cuando esto ocurre, el parásito se denomina esquizonte adulto, roseta o segmentante. La esquizogonia se completa cuando los merozoitos se separan completamente y el eritrocito hospedero se desintegra, esparciendo los merozoitos. La mayoría de éstos entran en nuevos glóbulos rojos, pero algunos pueden penetrar en las células fijas de tejido. Durante éste ciclo asexual, hay una periodicidad característica que se manifiesta en paroxismos clínicos cotidianos, terciarios ó cuartanos. Estos ocurren cuando el plasma se inunda con merozoitos, pigmento palúdico y restos de glóbulos rojos, en el momento de efectuarse la esporulación o esquizogonia. Algunos de los merozoitos que penetran en los glóbulos rojos no sufren una esquizogonia, sino que se transforman, dentro de los eritrocitos en gametocitos sexuales. Los machos son llamados microgametocitos, las hembras son macrogametocitos y son mas numerosas que los primeros. Los gametocitos alcanzan su madurez, pe-

ro no cumplen su misión de hospedero vertebrado, son ingeridos por el mosquito Anopheles, y si esto no ocurre, son fagocitados y destruidos en pocos días.^{38.40.} El ataque inicial entre los merozoitos y los eritrocitos, puede ocurrir en cualquier punto de la superficie del glóbulo rojo. El merozoito se reorienta, en el final apical, el cual contiene un par de organelos que se denominan "rhoptries" y "micronemas", que se ponen en contacto con el eritrocito llevándose a cabo una unión entre el final apical del merozoito y la membrana del eritrocito. Tales organelos liberan su contenido dentro del eritrocito causando una ola de deformación y la formación de una vacuola en el eritrocito - en la parte opuesta del contacto apical, el merozoito entra en la vacuola por medio del movimiento de la unión. -- Los merozoitos reconocen ligandos específicos, que se encuentran en la superficie del eritrocito, y que al parecer son el Acido siálico de la glicoforina A y una molécula de tripsina sensible. Al parecer los ligandos están envueltos en la invasión del eritrocito, uno para el reconocimiento inicial, y otro para la formación de la unión apical.^{11.24.}
37.

Se han llevado a cabo estudios para identificar a las proteínas de que constan dichos ligandos. En un ensayo con

eritocitos humanos utilizados como ligandos, se observó -- que se unieron a tres proteínas de P. falciparum, éstas -- proteínas de 175 Kd, 155 Kd y otra de 41 Kd se usaron posteriormente en una vacuna separada, en Monos aotus. Este -- trabajo dió como resultado una protección parcial, que sólo redujo la virulencia de la infección.^{3.26.45.}

En células de mamíferos se han encontrado sitios biológicos de reconocimiento específico, que frecuentemente -- residen en glicoproteínas y glicolípidos, de la membrana del eritrocito. Las interacciones carbohidratos y proteínas son muy importantes en la invasión de los eritocitos, ya que pueden seleccionar e incluso inhibir la invasión--- por el parásito.^{3.15.17.}

Se encontró que en un estudio, que la N-acetil-D-glucosamina (N-Ac-Glu), bloquea completamente la invasión del parásito al eritrocito, más efectivo cuando se le acopló -- con suero de albúmina bovina. Se probaron diferentes concentraciones de algunos carbohidratos en solución dentro -- de los liposomas y acompañados de la glicoforina A; al añadir 2.8 mg/ml la inhibición que se logró fué de 45%. Por -- lo que la interacción entre los eritrocitos y los merozoitos de P. falciparum involucra una gran especificidad con la unión de una lectina en la superficie de la célula. Se ha sugerido que la glicoforina del eritrocito es una molécula complementaria, en la superficie de la célula.^{42.43.}

Perkins et.al. (citado en la Ref. No. 43), reportaron que la glicoforina A en solución bloquea la invasión por P. falciparum y que es dependiente de una concentración dada; también encontró que sucede algo similar con sialoglicoproteínas. Al trabajar con otros azúcares como N-acetilgalactosamina, N-acetil-glucosamina, Glucosa, Fucosa y Galactosa; encontró que los tres primeros inhiben significativamente la invasión de P. falciparum a una concentración de 50nM. Altas concentraciones de algunos azúcares como -- N-Ac-Glu y Fucosa pueden retrasar la maduración de los parásitos. Al acoplar N-Ac-Glu con albúmina bovina, se vió - que fué más permeable y además 100 mil veces más efectivo - que el azúcar libre para impedir la penetración del parási - to en los eritrocitos, ya que dichas moléculas compiten - con las moléculas de unión a la membrana, evitando así la - invasión. 27.43.

Los eritrocitos infectados adquieren la propiedad --- funcional de citoadherencia hacia las células endotelias --- les que el parásito desarrolla en un punto de su estadio --- como trofozoito y son secuestrados por medio de ataques -- específicos de las células endoteliales que revisten las - vénulas y capilares, éstas células maduras parasitadas lle - gan a bloquear el fluido sanguíneo provocando los síntomas clásicos de la malaria neurológica y cerebral.

Se ha visto que la citoadherencia está mediada por -- protusiones ó "knobs" que provocan que los eritrocitos in-
fectados eviten pasar por el bazo para no ser localizados.
33.51.

En la búsqueda de los receptores de los eritrocitos - para el antígeno ó antígenos de P. falciparum se ha identi-
ficado un receptor de ferrotransferrina en la superficie - de las células infectadas, las cuales la introducen y la -
transportan. También se ha visto que P. falciparum requiere de hierro exógeno, en éste caso a la ferrotransferrina, ésto se ha observado en estudios con Monos aotus, pero aún no se ha encontrado al receptor de la transferrina en los-
humanos. 33.26.

5.1.- Antígenos.

Se ha definido un antígeno como aquélla sustancia -- extraña a un organismo, capaz de inducir una respuesta in-
mune. Algunos factores importantes que participan en la - inmunogenicidad de los antígenos son: la composición del -
antígeno, la vía de administración y la dosis del antígeno edad y sexo del receptor, el tamaño y metabolismo del anti-
geno, así como también el uso de adyuvantes y el estado fi-
sico del antígeno.

El uso de sustancias capaces de potenciar la respuesta inmunitaria, es decir el uso de adyuvantes modifica la inmunogenicidad del antígeno. Las emulsiones oleosas y el hidróxido de aluminio, no solo aumentan la inmunogenicidad del antígeno, sino que también confiere ésta característica a sustancias que no la poseen. El adyuvante incompleto de Freud contiene un aceite mineral y un agente emulsificante, y el completo contiene además, Mycobacterium butyricum en suspensión. Los adyuvantes que contienen micobacterias ó Bordetella pertusis estimulan la actividad de los macrófagos y favorecen a la digestión del antígeno con la formación de péptidos activos que contienen epitopes, que a su vez activan a los linfocitos específicos.¹.

La inmunidad a la malaria, es muy compleja debido a la diversidad antigénica del parásito, aunque ha sido muy estudiada llegando a identificarse algunos antígenos, así como la codificación de sus genes y de sus epitopes relevantes.

5.2.- Antígenos naturales.

En la superficie del esporozoito de P. falciparum, y en general de las otras especies que causan el paludismo, se ha reconocido una proteína que se ha denominado prote--

ina cs.^{9.54.32}. La proteína cs (proteína que cubre la superficie del esporozoito) consta de dos regiones cargadas y una parte central. La parte central tiene las características de estar formada en tandas de cuatro aminoácidos que se repiten. Asn-Ala-Asn-Pro y Asn-Val-Asn-Pro, los primeros se repiten un número de veces mayor variando según la especie. La región I y II se conservan en todas las especies que causan el paludismo. Esquema 4.

Los anticuerpos hacia la región I y II, no tiene efectos bloqueadores en la invasión de los esporozoitos a las células del hígado, sin embargo la parte central de la proteína cs si induce la producción de anticuerpos con efectividad biológica correlacionada con una protección, lo que no sucede con las regiones I y II.^{31.25}

En un ensayo con chimpancés en el que se utilizó como antígeno una cepa de P. falciparum, se vió que bloqueaban la invasión de los hepatocitos in vitro, pero in vivo la bloquearon sólo parcialmente, al ser inyectados los chimpancés con los esporozoitos.

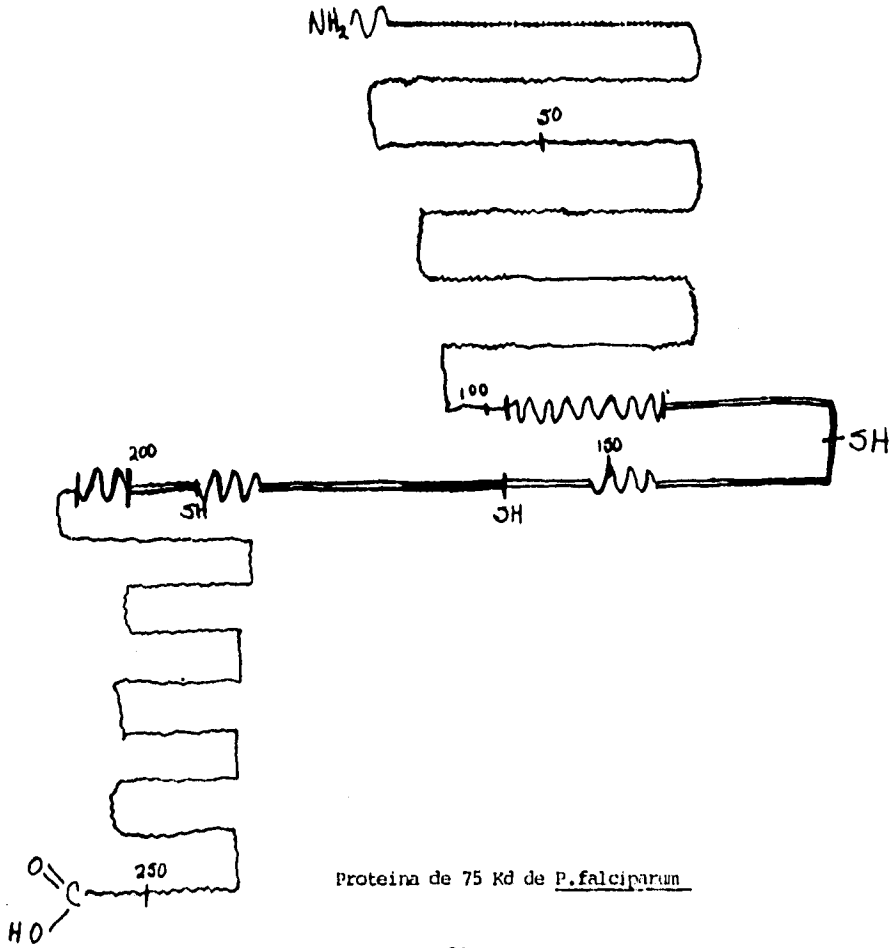
Se ha visto que la proteína cs de P. falciparum, tiene por lo menos 6 proteínas diferentes en la superficie, es decir, que es un bloque de proteínas que juegan un papel muy importante en el proceso de ataque y penetración al glóbulo rojo, por lo que se busca cuál es la parte más antigénica.^{19.36}

Gysin et.al. (mencionado en la Ref. No. 1) demostraron que al conjugar la región repetida de la proteína cs con inmunoglobulina bovina IgG, neutraliza la infectividad del parásito. Buscando un mejor inmúnógeno, se han utilizado además de la región repetida, que es la que induce a una producción de anticuerpos protectores, acarreadores como tiroglobulina, toxoide tetánico y toxoide diftérico que son potenciadores de la respuesta inmune, pero presentan ciertas limitaciones que se tratarán en la parte de Vacunas.^{1.14.}

Se sabe que la mayoría de la respuesta de los anticuerpos están dirigidos directamente hacia los epitopes conformacionales constituidos de residuos que forman una proteína de estructura secundaria o plegadiza con puentes disulfuro, que mantienen la estructura nativa siendo además una estructura de baja energía. Pero el que la selección de péptidos bastante largos adopten una estructura secundaria fuerte con la participación de uniones disulfuro puede contribuir en los epitopes conformacionales en las proteínas.^{45.} Esquema 5.

P. falciparum en todas las etapas que se encuentra en la sangre del hospedero, presenta una proteína de 75 Kd en grandes cantidades, tiene una estructura terciaria que se encuentra estabilizada por puentes disulfuro, pero por alquilación y reducción, se destruye en gran medida -

ESQUEMA 5



Proteína de 75 Kd de P. falciparum

su capacidad para estimular niveles significativos de anticuerpos hacia la estructura nativa.^{36.}

Siddiqui reportó una proteína de PM de 185,000 a -- 200,000 que se encuentra en la superficie del merozoito - con un p.f. 195°C, que fue aislada del complejo de proteí - nas de un organelo al que se le denominó "rhoptry" de -- P.falciparum que se localiza en el final apical del merozoito. Al utilizarla para vacunar a los Monos aotus les - confirió cierta protección. Posteriormente los sueros sim - ples de los monos inmunizados con ésta proteína, se em--- plearon para formar un pool de sueros que se estudiaron - por microscopía electrónica, encontrándose bandas especí - ficas del citoplasma, y de la membrana plasmática, así co - mo también de los poros de la vacuola de esquizontes jóve - nes. También se encontraron partículas doradas con segmen - taciones en el esquizonte brotando en la superficie extra - celular de los merozoitos maduros e inmaduros. En los sue - ros de los monos no inmunizados con ésta proteína, no se - observaron éstas características, excepto a la proteína - dorada. Se cree que la razón por la que éstos polipépti-- dos sean localizados primero en el citoplasma de esquizon - tes inmaduros y distribuidos subsecuentemente en la super - ficie de la membrana del esquizonte del merozoito, es que son las primeras en sintetizarse intracelularmente y lue - go son transportadas a la superficie del parásito al ir -

desarrollándose.³ Sin embargo, las otras proteínas "rho ptry" de 145, 132, y 102 Kd al ser utilizadas para inmunizar a los Monos aotus, no indujeron protección alguna, -- aunque se piensa que ésta proteína invagina en la membrana del hospedero.³

Otra de las proteínas que se encuentran en la superficie de P. falciparum es de 300 Kd y es muy sensible para adherirse en la superficie de la célula que va a infectar, pero pierde tal capacidad al tratar a las células infectadas con tripsina. La proteína de 300 Kd, es antigénicamente diversa en cada aislamiento, pero está como mediadora del ataque a las células, y presenta dos características dominantes: la citoadherencia y una variante dominante que facilita la evasión inmune. Sin embargo, aún no se identifica un epítipo invariante que pueda servir para una vacuna.³³

En la superficie de los gametos y cigotos de P. falciparum y P. gallinaceum se encontró un complejo molecular que consta de una proteína de 48 y 45 Kd, éstas son sintetizadas simultáneamente durante el crecimiento de -- los gametocitos y permanecen asociados. Al parecer ninguno de sus epítopes está repetido.³⁴

Uno de los anticuerpos monoclonales obtenidos, dirigidos hacia alguna de éstas proteínas ha resultado un po-

tente bloqueador de la transmisión de la infección y no se han encontrado variantes para éste epitope. Además se ha visto que los determinantes antigénicos de tales proteínas, son destruidos por reducción, lo que indica que son dependientes de una estructura terciaria, mantenida por puentes disulfuro. Por lo anterior, éste complejo de proteínas resultaría el mejor antígeno para ser utilizado en una vacuna, sino fuera porque presenta un riesgo potencial, ya que los anticuerpos monoclonales obtenidos hacia éstas proteínas y el suero del hospedero que ha sido inmunizado con las mismas, potencia la infección a bajas concentraciones, por lo que se requiere de mayores estudios al respecto.^{16.}

5.3.- Antígenos sintéticos.

En la búsqueda de un buen inmunógeno, se han elaborado péptidos sintéticos, ante la necesidad de una vacuna efectiva, ya que el problema para encontrarla reside en la diversidad antigénica del parásito. La clonación de DNA recombinante ha resultado una herramienta indispensable para la elaboración de péptidos sintéticos.^{29.31.}

Se ha utilizado como modelo para elaborar un péptido sintético a la proteína cs de P. falciparum, ya que es una característica que presentan todas las especies de plasmodios, con sus respectivas variaciones. Se han tomado como base a la parte central de la inducción de anticuerpos. Se les denomina proteínas NANP, y están formadas de aminoácidos repetidos en tandas de cuatro Asn-Ala-Asn-Pro, y ha sido reconocido por los anticuerpos monoclonales contra los esporozoitos de P. falciparum.^{33.15.}

Se probó un polipéptido artificial (NANP)₄₀ constituido por 40 AA, repetidos en grupos de cuatro AA: Asn-Ala-Asn-Pro, 37 veces, y Asn-Val-Asn-Pro, 3 veces empleándose sin acarreador alguno, para detectar anticuerpos específicos hacia los esporozoitos en el suero de individuos que han cursado una infección natural. Encontrando anticuerpos en un 45% de pacientes europeos que sufrieron una malaria aguda por p. falciparum. Se utilizaron concentraciones de 1 ug/ml y 10 ug/ml; la mayor eficacia se obtuvo a una concentración de 1 ug/ml, utilizando la prueba de ELISA para detectar a los anticuerpos. Las placas cubiertas con éste péptido a esa concentración, pueden almacenarse hasta 5 semanas a 4°C obteniéndose resultados reproducibles. Los péptidos más pequeños (NANP)₂₀ y (NANP)₄ son buenos inhibidores de la unión de los anticuerpos

monoclonales hacia el extracto de esporozoitos, pero son menos activos que (NANP)₄₀. Se obtuvieron resultados similares por IFA con (NANP)₄₀.^{22.15.}

Otro péptido sintético elaborado corresponde a Ac-Cis-(NANP)₃ acoplado al toxoide tetánico, absorbido en hidróxido de aluminio, para potenciar la respuesta inmune. Este péptido se utilizó en voluntarios humanos, con el antecedente de que en los ratones, conejos y monos se obtuvo una producción de altos niveles de anticuerpos. El título máximo de anticuerpos obtenidos por Inmunofluorescencia fué de 1280. Se observó que el tipo de anticuerpos inducidos fué de IgG e IgM, con títulos de 4 veces más altos que los niveles preinmunes. Sin embargo en una segunda inyección de ayuda, para estimular a los hospederos no se mejoró la respuesta inmune.^{8.}

Se sintetizó un péptido al que se denominó R32Tet32 que es una fusión de proteínas entre la secuencia repetida de la parte central de la proteína cs, y 32 AA codificados por un gen resistente a la tetraciclina leído fuera del tramo (Tet32). Aunque es capaz de inducir altos niveles de anticuerpos en los ratones, en los humanos voluntarios con una inmunización similar no dió un alto título de anticuerpos como se esperaba. Se han realizado mas experimentos en ratones de diferentes especies, lle

gando a la conclusión de que la respuesta subóptima en los humanos inmunizados con éste péptido se debe a la ca rencia o ausencia de los epitopes que puedan ser reconocidos por las células T de los humanos.²⁰.

Cabe señalar que el parásito que causa el paludismo representa una diversidad antigénica incluyendo la expre sión de diferentes isoenzimas, diferentes sensibilidades hacia los medicamentos antimaláricos, y la expresión de epitopes alternativos en proteínas particulares. En un pool de anticuerpos monoclonales contra un grupo de gli coproteínas de la superficie de los merozoitos de P. fal ciparum, incluyendo clonas de un aislamiento humano. Las bases moleculares para ésta diversidad no han sido defi nidas.

Además de la diversidad antigénica, se han descrito mecanismos potenciales para la generación de nuevos feno tipos antigénicos, donde los parásitos de la malaria han sufrido una mutación por recombinaciones con un gen du rante la meiosis, ó por expresión de formas alternativas de una familia de multigenes.³³.

A través de las variaciones antigénicas el parásito evade la respuesta inmune, facilitando así el estableci miento de infecciones crónicas y repetidas. Las bases mo leculares y genéticas de éstas variaciones no se conocen

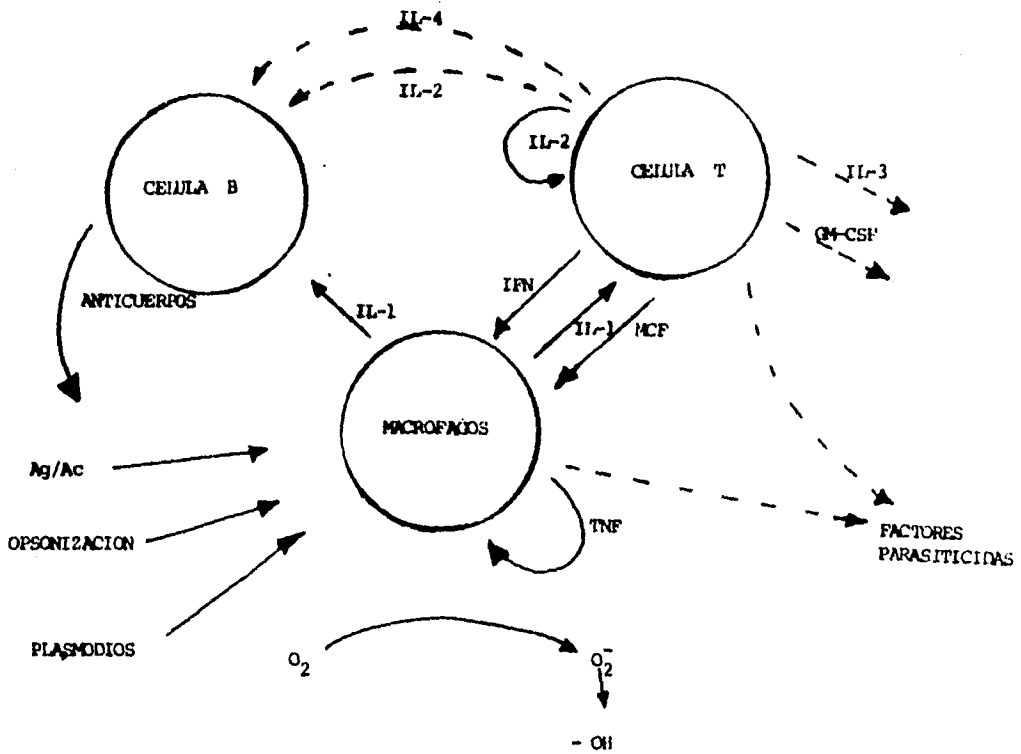
se piensa que existen diferencias estructurales entre -
las formas alternativas en la superficie del antígeno.

5.4.- Respuesta inmune.

Aún cuando se ha encontrado que P. falciparum tie-
ne por lo menos 6 proteínas diferentes en su superficie,
las que intervienen en el proceso de ataque y penetra-
ción en el glóbulo rojo, la proteína cs, es sin duda la
más estudiada, encontrándose que es en la parte central-
de ésta proteína, en donde se encuentra el epitope de re-
petición, y que es éste, el que ha dado mejores resulta-
dos en la producción de anticuerpos. Es importante ha-
cer notar que al tratar con suero hiperinmune a personas
infectadas con el parásito de la malaria, es de gran ayu-
da, incluso llega a curar, pero al pasar cierto tiempo -
de la transferencia pasiva de anticuerpos, éstos son de-
gradados y se vuelve a ser susceptible a la infección.³⁶

La respuesta inmune es un mecanismo muy complejo, -
que se presenta cuándo penetra al organismo una sustan-
cia extraña. Se ha dividido en respuesta inmune humoral,
que es la que va mediada por anticuerpos producidos por-
los linfocitos B; y en respuesta inmune celular, en la -

ESQUEMA 6



MECANISMOS DE LA RESPUESTA INMUNE EN EL PALUDISMO.

que intervienen los linfocitos T y sus productos. La --- respuesta inmune celular, participa en la protección hacia microparasitosis intracelulares, fundamentalmente a través de la activación de macrófagos, los cuales son -- atraídos, inmovilizados y activados por medio de linfocinas.^{41.}

La inmunidad al paludismo, reúne aquéllos procesos en el hospedero que previenen de la infección, y que ayudan a la destrucción de los parásitos. En la inmunidad palúdica, los elementos celulares y humorales están estrechamente interrelacionados. La base celular de la inmunidad es principalmente la fagocitosis. Los macrófagos dan cuenta del gran número de parásitos, glóbulo rojos parasitados y pigmento palúdico.^{33.34.}

5.5.- Respuesta inmune celular.

En lo que se refiere a la respuesta inmune celular, vemos que los hospederos tienen un incremento rápido en la sangre de monocitos y acumulación de macrófagos en el hígado y el bazo. La circulación de monocitos y macrófagos en éstos órganos, despliega cambios marcados en la -

superficie del fenotipo y en la actividad secretora, que va mediada por linfocinas tales como IFN, factor quimio-táctico del macrófago y secreción de IL-3, en donde las células T juegan un papel muy importante en dicho proceso.^{34.}

Se ha visto que el parásito que causa el paludismo activa a las células T tanto in vitro como in vivo. Las manifestaciones de inmunidad de las células T dependientes en la malaria, incluyen esplenomegalia, producción de linfotoxinas, activación de macrófagos y producción de monocitos en la sangre.^{34.}

Los macrófagos a su vez producen durante la infección, IL-1 y factor de necrosis de tumor (TNF) que actúan reduciendo la parasitemia. Lo anterior se basa en estudios realizados con el bazo de ratas y ratones infectados, observándose que liberan al cultivo IL-1 al ser cultivadas con P. yoelii, al tiempo que iban recuperándose, desaparecían los parásitos en la sangre. En otros estudios se ha encontrado que el suero de necrosis de tumor (TNS) puede suprimir el crecimiento de los parásitos.^{5.32.}

Las células T al ser sensibilizadas, en respuesta a la estimulación del antígeno ó de homologos, liberan linfotoxinas como IFN e IL-2. El IFN liberado por células T, inhibe el desarrollo de las formas eritrocíticas

(EEF) del parásito, aunque a concentraciones muy bajas.- A su vez las células T producen otros mecanismos inmunes que no actúan en si contra el esporozoito, pero si contra el desarrollo de los estadios parasitarios en el hígado.^{51.}

Las células T, también participan en la regulación de la respuesta inmune del hospedero ayudando a las células B (que son las responsables de la producción de los anticuerpos ó inmunoglobulinas), específicamente las células T helper, ayudando a la síntesis de variantes específicas de anticuerpos protectores.^{6.}

Se piensa que en el paludismo, la respuesta inmune perturbada, se debe a una alteración en la función inmunoreguladora de las células T. En 1975, Clark et.al., propusieron que algunos parásitos intraeritrocíticos como Babesia microti y ciertas especies de plasmodios son susceptibles a un mediador soluble liberado por las células de los hospederos en el curso de la infección. Tal mediador es capaz de penetrar en el eritrocito y alterar su metabolismo inhibiendo la replicación del parásito, ó causándole la muerte directamente. En este proceso los linfocitos T son necesarios para liberar este mediador de inmunidad. El IFN aunque es un mediador, no tuvo efecto directo en los eritrocitos infectados.^{21.41.}

Recientemente algunos grupos han reportado el desarrollo de células T, en clonas específicas para P. falciparum en el estadio en la sangre, y en clonas de gametos.

Tales clonas no responden en eritrocitos que no están infectados con P. falciparum, la mayoría de éstas -- clonas de gametos reconocen epitopes comunes en las fases sexuales a través de la clona que es específica para el gameto. Las clonas en los humanos con leucocitos restringidos para el antígeno HLA están generalmente en el fenotipo de ayuda inducida, y en algunos casos se ha visto que secretan IL-2 ó IFN en respuesta a la estimulación antigénica.⁵³.

5.6.- Respuesta inmune humoral.

En una infección natural, la parasitemia de los esporozoitos en el flujo sanguíneo, es corta después de la picadura del mosquito, y se observa una leve aparición de anticuerpos que llega a un pico máximo a los 10 días, que disminuye posteriormente. Para desarrollar un título alto de anticuerpos se requiere de inoculaciones frecuentes de los esporozoitos, ésto se vé apoyado en estudios que indican que la presencia de anticuerpos en zonas en-

démicas, aumenta con la edad hasta un 65% en los adultos mayores de 45 años que han estado expuestos un número de veces mayor, de otra manera el nivel de anticuerpos producido es bajo.^{22.}

Se ha visto que los anticuerpos parecen no proteger, su función puede modificar la severidad de la infección al reducir el número de esporozoitos que invaden sucesivamente a las células libres.

Cada cepa de plasmodio, es un complejo inmunológicamente diferente. La inmunidad antiparasitaria es generalmente diferente y es específica en cada cepa, pero la tolerancia algunas veces tiene una influencia más amplia que puede incluir varias cepas ó hasta más de una especie sólo que se requieren de 15 a 30 años de exposición para establecer un equilibrio entre el hospedero y el parásito.^{54.}

Las clases de moléculas de inmunoglobulinas responsables de una inmunidad pasiva para la mayoría de los isotipos son la IgG_1 y la IgG_2 que son dependientes de las células t.

La IgM confiere cierta protección contra el paludismo, sin embargo ciertos anticuerpos IgM son dependientes de las células T, por lo que la inmunidad al paludismo, depende en gran parte de las células T.^{33.}

El papel de los isotipos de los anticuerpos dependientes de las células T, pueden emplearse en la transferencia pasiva de anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales contra los estadios eritrocíticos han sido probados por su capacidad para inhibir la reinvasión de los merozoitos in vitro, ó de retardar el desarrollo en el eritrocito, sólo que en algunos casos los anticuerpos monoclonales han mostrado que transfieren inmunidad pasiva in vivo. Tales anticuerpos tienen generalmente isotipos dependientes de las células T, las que constituyen la clave en este tipo de estudios, es decir la IgG₁ y la IgG₂.³³.

Cohen et.al., (mencionado en la Ref. No. 33), reportaron que con la administración de inmunoglobulina de adultos, a niños gamboyanos con malaria severa, se logró curar de la enfermedad y reducir la parasitemia a niveles muy bajos. Hallazgos similares se han reportado en otros modelos, incluyendo ratas y ratones. En roedores con malaria, se administraron dosis de suero hiperinmune aún así, en muchas ocasiones la transferencia de anticuerpos falló en suprimir completamente la parasitemia, lo que se atribuye a una probable insuficiencia de variantes específicos en los anticuerpos para suprimir la parasitemia, en una exposición ó bien a la ausencia de mecanismos de resistencia necesarios para expresar inmunidad.³³.

Al efectuar la inmunización de ratones con suero -- que contiene anticuerpos contra los gametocitos de P. -- yoelii, se encontró que la inmunidad persiste hasta 12 - meses, éstos resultados ocasionaron que se diera mayor - importancia al estudio de los gametocitos.

El papel de las células mediadoras de la inmunidad- en la protección contra los gametocitos, es poco certera pero se ha visto que los anticuerpos específicos antigametos, pueden bloquear la transmisión de los parásitos - en la malaria. Lo anterior parece indicar que el blo--- queo de la transmisión de los parásitos, puede ser inducido a través de la vacunación con microgametos, obser-- vándose que la inmunidad persiste por periodos largos de tiempo.³³.

La transferencia adoptada de células T inmunes, pro mueve una reducción muy significativa en la transmisión- de los parásitos en una infección posterior. Mientras -- que el suero de donadores inmunes tiene una efectividad- mínima. Al llevar a cabo la transferencia simultánea de- células T inmunes y de suero de donadores inmunes, se ob tiene una mayor protección, la que posiblemente esté da da por un efecto sinérgico.³³.

5.7.- Influencia inmunológica hacia otros antígenos.

La estimulación masiva con el antígeno de la malaria, puede servir para activar inmunológicamente a las células T-4 infectadas con el virus de la Inmunodeficiencia Humana VIH.³³.

También se ha visto que las personas infectadas con P. falciparum muestran una depresión en la respuesta hacia la vacuna meningocócica, hacia el antígeno de Salmonella thypi, y hacia el toxoide tetánico. Debido a ésto, los pacientes con infección del plasmodio, están más propensos a infecciones con salmonelas, así como también a infecciones respiratorias más severas.³³.

Se ha reportado que los pacientes con malaria aguda ocasionadas por P. falciparum, fallan en prevenir a los linfocitos B infectados con el virus de Epstein Barr, dando una proliferación anormal. Este encuentro se ha atribuido al descenso de las células T-4, lo que indica que existe una relación entre el linfoma de Burkitt y la malaria.³³.

6.- VACUNAS

Dada la diversidad antigénica de P. falciparum, las vacunas se están desarrollando contra cada fase del ciclo de vida del parásito que causa la malaria.

En la actualidad las tendencias más importantes para la fabricación de éste tipo de vacunas son:

- a).- La inducción de inmunidad utilizando esporozoitos inactivados con luz UV, formol ó por acción mecánica.
- b).- El uso de merozoitos congelados.
- c).- El uso de microgametocitos.
- d).- El uso de células T en las vacunas.
- e).- El uso de glicoproteínas acopladas a suero de albúmina bovina.

Una vacuna se considera efectiva cuando induce al sistema inmune a matar a los esporozoitos inyectados por el mosquito. Sin embargo las inmunizaciones con esporozoitos irradiados, no han resultado eficaces en la protección de humanos y animales.

La proteína que cubre la superficie del esporozoito es sin duda, una de las proteínas más estudiadas (proteína cs), debido a que se encuentra en las diversas especies que infectan tanto a los animales como al hombre, las que además muestran pocas variaciones. Se ha llegado a clonar el gen de la proteína cs, controlado bajo condiciones de temperatura, y utilizando una enzima que corta preferentemente en los extremos de los fragmentos 5' y 3' del DNA. Tales fragmentos contienen los genes que son clonados dentro de la expresión "vector gt 11", es decir que la transcripción se hace de un promotor que viene del promotor lac.

La proteína cs de P. falciparum y P. knowlesi tiene PM similares, de 44,426 y 36,792 respectivamente, también tienen regiones análogas que siguen una secuencia señalada, con regiones cargadas, una región de péptidos en medio y una secuencia anclada. Se usaron anticuerpos monoclonales para el reconocimiento de la proteína que se sintetizó en E. coli, que tenía el gen clonado de tal

proteína. Se encontró que los anticuerpos monoclonales - hacia la proteína es producidos por la bacteria, confie ren protección in vitro.⁹.

Se han elaborado péptidos sintéticos para la identi ficación de los epitopes conformacionales.

En ensayos inmunoradiométricos, se ha encontrado - que la mayoría de los anticuerpos policlonales y monoclo nales reaccionan con los esporozoitos, reconociendo una- región restringida de la proteína del circumsporozoito.

Cuando no hay una cepa específica para ésta proteí- na, ya que la presentan todas las especies, y llega in- cluso a haber reacciones cruzadas, se han elaborado pép- tidos sintéticos basados en la región repetida que se en cuentran en la porción de en medio de la proteína es.

La región I de P. knowlesi y P. falciparum es muy - similar y pueden representar un blanco invariante para - la inmunidad. Desafortunadamente, se ha visto que no = proporciona niveles altos de anticuerpos como los que -- proporciona la parte central que es la parte repetida de la poteína es donde se ha desarrollado la clonación de - la parte central de la proteína se le ha denominado pro- teína (NANP).^{9.22}.

Se sintetizó un péptido NANP)₄₀ en el cuál existen- grupos repetidos de 4 AA (Asn-Ala-Asn-Pro) 37 veces y -- (Asn-Val-Asn-Pro) 3 veces.²².

Se desarrolló una vacuna a través de una técnica de DNA recombinante que contiene una fusión en proteínas de E. coli con NANP repetido 32 veces, y proteínas similares con repeticiones de los AA 16 y 48 veces. Al inyectar ratones con éstos productos, se inducen altos títulos de anticuerpos, los que reaccionan con la proteína cs y bloquean la invasión de los esporozoitos a las células del hepatoma in vitro. Al probarse ésta vacuna en humanos, los anticuerpos inducidos redujeron el número de parásitos desarrollados en el hígado, pero no los abastieron completamente.^{33.49.}

Un péptido sintético de 12 AA (NANP)₃ que abarca el epítopo inmunodominante del circumsporozoito de P. falciparum, al ser conjugado con toxoide tetánico TT y con hidróxido de aluminio como adyuvante y administrado intramuscularmente en 3 dosis, una cada mes, no produjo reacciones adversas después de la inyección en sitio donde se aplicó. Tal vacuna disminuyó el número de esporozoitos en la circulación. La respuesta serológica en ratones inmunizados con una vacuna similar en la que se incorpora un adyuvante de Freund's, conteniendo el epítopo repetido de P. berghei de la proteína cs, ha sido más prominente.

Se observa que entre más potente sea el adyuvante,-

puede marcar mejor la respuesta del anticuerpo y posible
mente también incrementa la estimulación de las células-
T.²³.

También se ha usado como acarreador tiroglobulina y
toxoides diftérico. El uso de péptido-acarreador, aunque
produce una buena respuesta, tiene ciertas limitaciones:

- Sensibilización del huésped muy rápida para una
dosis de antígeno.
- Supresión específica del epítoto.

Subsecuentes inmunizaciones con un acarreador dife-
rente con el mismo epítoto, suprime la respuesta hacia -
el epítoto. Esta supresión hacia el epítoto específico, -
se ha visto con péptidos de la proteína M Streptocócica
y péptidos de difteria conjunta al toxoide tetánico.

Por lo que las vacunas péptido-toxoide, pudieran no
ser inmunogénicas en individuos previamente inmunizados-
con toxoide tetánico. Ya que al haber tenido una exposi-
ción previa al toxoide, puede sensibilizar al huésped ha-
cia el toxoide tetánico, al utilizarlo como acarreador -
en una vacuna contra la malaria, ocasionando una baja to-
lerancia a dicha vacuna. Por lo que sólo las personas -
que no han sido expuestas previamente a dicho toxoide, -
tienen más probabilidades de tener buenos resultados.

Si el péptido está unido a acarreadores no usados - comúnmente en humanos, requerirá intervalos frecuentes - de inmunización para presentar problemas similares.^{1.}

En otra investigación que incluyó a 11 voluntarios-gamboyanos, se les inyectó una vacuna contra la malaria, que consistía en un péptido Ac-Cis(NANP)₃ acoplado al -- toxoide tetánico TT y adsorbido a hidróxido de aluminio. La especificidad de los anticuerpos fué variable entre - los voluntarios. Este mismo conjugado indujo la produc-- ción de altos niveles de anticuerpos anti-(NANP)₃ y anti- cuerpos antiesporozoitos en ratones, conejos y monos. La vacuna induce anticuerpos IgM y anticuerpos IgG con títu los 4 veces más altos que los niveles preinmunes. Dichos anticuerpos se detectaron por fluorescencia, con títulos de 20 a 1280.^{28.}

A través de múltiples inmunizaciones los niveles de anticuerpos anti-esporozoitos tienden a incrementarse, - en donde predomina como respuesta secundaria la produc-- ción de anticuerpos de tipo IgG. Además la misma vacuna anti-TT es excelente, si consideramos que la mayoría de- los individuos que no fueron inmunizados con TT, no pro- dujeron notables niveles de anticuerpos.^{23.14.}

Se han elaborado vacunas que contienen epitopes de-

células T. Estas vacunas dan gran ventaja, ya que inducen la respuesta de anticuerpos, así como las reacciones que desencadenan las células T que han sido sensibilizadas ó presentadas con el antígeno, como son la producción de linfocinas, activación de macrófagos y liberación de IFN producido por células T helper y por células T supresoras citotóxicas con un potente efecto inhibitor también los macrófagos producen IL-1 y factor de necrosis de tumor TNF.³³.

Sin embargo la capacidad de un individuo para responder al epítipo de las células T está determinado por los genes de respuesta inmune, éstos genes han sido mejor estudiados en los ratones. Por lo que las células T de algunos humanos, pueden entonces fallar en reconocer algunos epítopes de la proteína cs, ó de otros antígenos del plasmodio. Lo que hace pensar que la presencia de epítopes múltiples de células T en las vacunas serán de gran ayuda.²⁰.

Se ha observado una proliferación de las células del bazo en los ratones inmunes y no inmunes al exponerlos eritrocitos parásitos con P. yoelii. Además de proliferar en una respuesta a la estimulación con antígenos específicos, las células T ayudan a la función de las células B en la producción de anticuerpos.³³.

Se ha llevado a cabo la transferencia de células T-enriquecidas del bazo de ratones inmunes al plasmodio, - observándose una producción en los hospederos que no habían sufrido una exposición con el plasmodio, no siendo así con la transferencia adoptiva ó pasiva para ver los mecanismos humorales y celulares en la que los ratones - empleados recibieron IgG purificada ó linfocitos T esplénicos de donadores inmunes, y por otra parte una combinación de células T y de IgG. Los ratones que recibieron - solamente IgG ó linfocitos T, tuvieron una protección -- parcial mientras que los ratones que recibieron ambas, - mostraron una protección mayor de un 60%.⁴¹.

También se han utilizado líneas de células T de ratas inmunizadas con P. berghei, con un coadyuvante de -- Freund's mostrando que reducen la parasitemia y la mortalidad.

Al aislar células T del bazo de ratones inmunes, y mantenerlas por estimulación alterna con IL-2 ó antígeno del extracto del plasmodio, el cultivo mantiene predominantemente el fenotipo que induce ayuda. Los ratones recibieron células T por vía intravenosa, y 4 horas después recibieron eritrocitos parasitados con P. adami. Solo 1 ratón de 5 que se emplearon, falló en combatir la -

infección. Se vió que dicha clona de células T, produce INF y también IL-2 en respuesta a antígenos específicos y antígenos sinérgicos presentes en la célula, aunque no está aún muy claro como contribuye a resolver la infección.³³.

En otro experimento se investigaron los epitopes del plasmodio que son reconocidos por los linfocitos T. Probablemente un buen candidato para una vacuna, es el epitope de la proteína cs de P. falciparum, ya que se encuentra presente en todas las cepas de plasmodios, que se caracteriza por tener (NANP)_n AA de repetición; esta porción del gen ha sido clonada dentro de una bacteria recombinante y expresada como una proteína unida a 32 AA del gen de resistencia a la tetraciclina leída fuera del tramo. Se mostró que proporciona una buena respuesta humoral en los ratones C57BL/6. En donde los anticuerpos así inducidos son capaces de prevenir las formas infectantes de los esporozoitos in vitro. Aunque en otra fase del estudio en la que se trabajó con humanos voluntarios a los que se inmunizó en forma similar, no se obtuvieron títulos altos de anticuerpos como se esperaba. Desde entonces se han hecho otros estudios en ratones de diferentes especies.³³.

Recientemente algunos grupos han reportado el desarrollo de clonas de células T específicas para P. falci-

parum en su estadio en sangre ó gametos como antígenos.- Estas clonas de células T no responden a los eritrocitos no infectados. La mayoría de éstas clonas de células T no responden a los eritrocitos y reconocen epitopes comunes en las fases asexuales a través de una clona específica para los gametos.³³.

Se ha visto que los anticuerpos específicos anti-gametos pueden bloquear la transmisión de los parásitos -- que causan el paludismo. El bloqueo de dicha transmisión, es inducida por la vacunación de los ratones con microgametos de P. yoelii y se ha mostrado que persiste por largos periodos de tiempo, específicamente por 12 meses después de la inmunización a través del suero con anticuerpos hacia los gametocitos.¹⁶.

El desarrollo de vacunas de transmisión bloqueadora de los parásitos, pueden crear oportunidades para el control y prevención de la infección, también para detener la extensión de parásitos mutantes. Un riesgo potencial de las vacunas de transmisión bloqueadora, es que dicha transmisión puede potenciar la infección.³³.

Los anticuerpos transmisores del bloqueo, son efectivos contra dos estadios del parásito: los gametos (y por lo tanto la fertilización) y los cigotos y oquinetos.

Al investigar las proteínas de la superficie de los gametos y cigotos de P. gallinaceum y de P. falciparum, - se encontró un complejo molecular, que consiste en una -- proteína de 230 Kd y 2 glicoproteínas de 48 y 45 Kd, ta-- les componentes son sintetizados simultáneamente durante el crecimiento de los gametocitos.

Se han identificado sus epitopes y ninguno está repe-- tido, además se ha visto que son destruidos por reducción lo que nos indica que son dependientes de una estructura terciaria, mantenida por puentes disulfuro.^{33.36.}

Las interacciones carbohidratos-proteínas, son muy - importantes en la invasión de los eritrocitos y pueden se-- leccionar incluso inhibir la invasión por el parásito.

Dentro de algunos carbohidratos, se encontró que la N-acetil-glucosamina bloqueó completamente la invasión - del parásito hacia el eritrocito, el bloqueo fue particu-- larmente efectivo cuando se acopló el azúcar con suero de albúmina bovina.

Se probaron diferentes concentraciones de algunos -- carbohidratos en solución, dentro de los liposomas y acom-- pañados de glicoforina. Al añadir 2.8 mg/ml bloqueó la - invasión de los eritrocitos. A una concentración de 1 mg/ ml, la inhibición fué solamente del 45%.

La interacción entre los eritrocitos y los merozoítos de P. falciparum, envuelve una alta especificidad con la célula. Se ha sugerido que la glicoforina del eritrocito, es una molécula complementaria en la superficie de la célula. 42.44.

Perkins et.al. (mencionados en la Ref. No. 42), reportaron que la glicoforina A en solución bloquea la invasión por P. falciparum, que depende de la concentración -- también encontró que algo similar sucede con sialoglicoproteínas.

Al trabajar con otros azúcares como N-acetil-galactosamina (N-Ac-Gal), N-acetil-glucosamina (N-Ac-Glu), N-acetil-Neu, Glucosa, Fucosa, y Galactosa, encontrando que las tres primeras inhiben significativamente la invasión a -- 50mM. 42.43.

Weiss et.al. (mencionados en la Ref. No. 42), obtuvieron resultados similares con los mismos azúcares para bloquear la invasión de los merozoítos.

Otros investigadores indican que éstas concentraciones de azúcares, son tóxicas a los cultivos de los parásitos, porque los estadios maduros son selectivamente permeables a muchos tipos de moléculas pequeñas, incluyendo N-acetil-glucosamina. 43.

Se encontró también que algunos azúcares como N-Ac-Glu

y fucosa, retrasan la maduración de los parásitos a altas -
concentraciones.

Se acopló a N-Ac-Glu albúmina bovina, que es más per--
meable y 100,000 veces más efectivo, que el azúcar libre pa
ra impedir la penetración del parásito en los eritrocitos,-
ya que las moléculas de azúcar a una concentración especí-
fica, compiten con las moléculas de unión a la membrana del
eritrocito, evitando así la invasión. 24.43.

7.- COMPUESTOS QUIMICOS

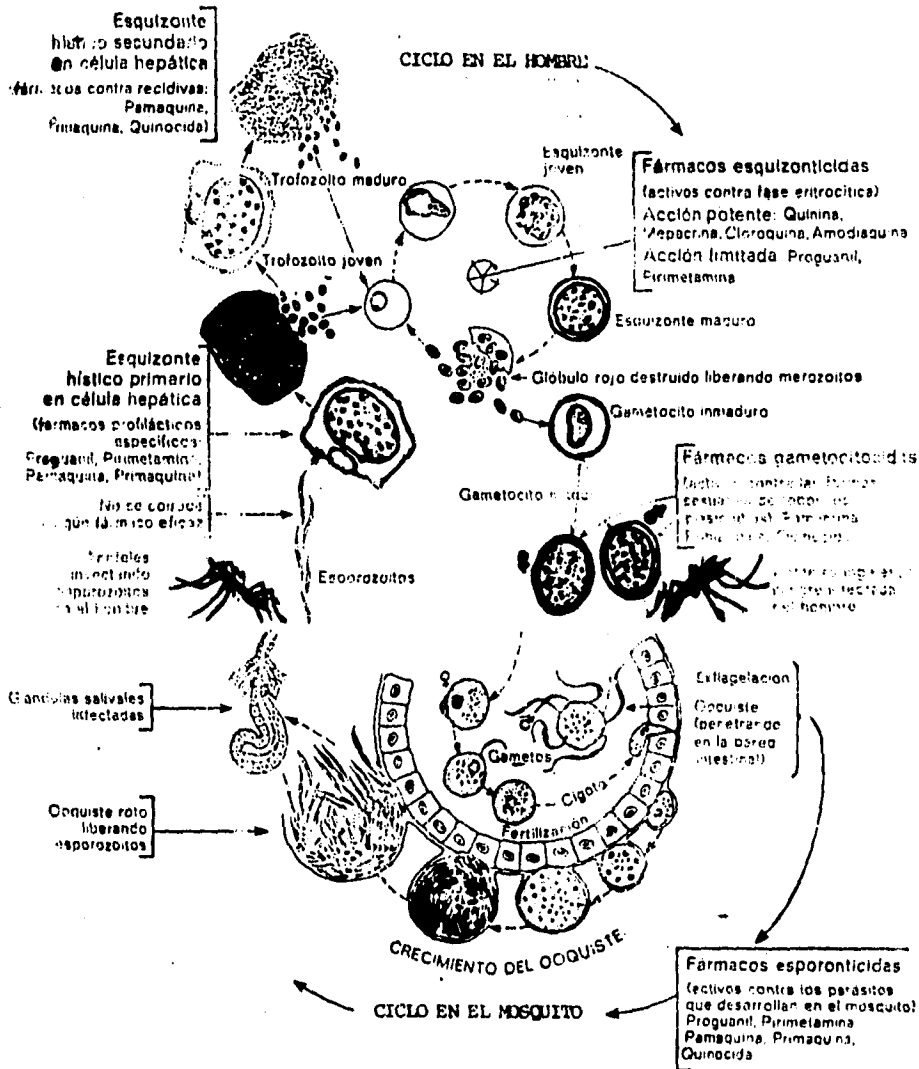
El tratamiento etiológico del paludismo se inició con el descubrimiento de la actividad de la corteza de la quina. Posteriormente la quinina. Perkins, inició la síntesis de los colorantes, curiosamente reintroducidos en la terapia del paludismo por Ehrlich al tratar de colorear parásitos tisulares. El primer medicamento antipalúdico utilizado fue la pamaquina, pero el primero universalmente empleado fue la mepacrina. Esquema 7

En general existen fármacos supresivos, que son aquellos que actúan sobre las formas eritrocíticas y suprimen el cuadro clínico, los más importantes de este grupo comprenden a la quinina, cloroquina, hidrocloquina, la amodiaquina, la quinacrina, cloroguanida, primetamina, sulfonamida y las sulfonas.

Las formas exoeritrocíticas responden bien al tratamiento con primetamina, primaquina y cloroguanida. De éstos la primaquina, es el gametocida más efectivo.

En el tratamiento radical del paludismo los medica-

ESQUEMA 7



Clasificación de fármacos antipalúdicos en relación a los diferentes estadios del ciclo vital del parásito.

FALLA DE ORIGEN

mentos más utilizados, son aquéllos que actúan sobre el ciclo exoeritrocítico: primaquina, primetamina y cloro--guanida.

Hasta la fecha no hay ningún medicamento antipalúdi--co que destruya efectivamente los plasmodios de todas -- las especies y en todas sus fases que produzca una cura-- radical. Por lo que se dan dos ó tres drogas simultánea-- mente para el tratamiento.

Sin embargo la terapéutica del paludismo es compli--cada por varias razones. Existen cuatro especies de ⁴ plasmodios, y no hay dos que respondan igualmente al mis--mo tratamiento. Las fases eritrocítica, preeritrocíti--ca y la gametocítica, difieren una de otra, en la sucep--tibilidad a las drogas antipalúdicas. Una droga que su--prima un ataque agudo, puede no evitar recaídas. Facto--res tales como la cantidad de esporozoitos en el inoculo y el estado de la resistencia del hospedero, influyen en el tratamiento antipalúdico. Además se presenta cada -- vez en mayor grado, la resistencia a éstas drogas.

Respecto a la profilaxis de la malaria, los medica--mentos más utilizados son: la cloroquina, amodiaquina, - la primetamina y el proguanil. Los tres primeros tienen la ventaja de utilizarse en dosis semanales.

La profilaxis debe iniciarse el día de la llegada a la zona endémica y terminar 4 semanas después de la salida de ésta.⁵⁰.

La administración del alcaloide debe hacerse con absoluta regularidad.⁵⁰.

7.1.- Quinina.

La quinina, alcaloide de la chinchona, fué la droga suprema en la terapéutica del paludismo durante 300 años, pero ahora ha sido suplantada por antipalúdicos sintéticos.

Sin embargo en los casos de recaídas del paludismo ocasionado por P. vivax, la quinina és todavía la droga útil especialmente cuando se usa combinada con la 8-aminoquinolina. En algunas zonas, en donde la quinina y la mezcla normalizada de alcaloides de chinchona se conoce como totaquina, se prepara localmente y puede ser recomendada en la terapéutica palúdica, simplemente porque es más económica y no necesita importarse.³⁸.

El nombre químico de la quinina es 6-metoxi-alfa-(5-vinil-2-quinucidil)-4-quinolina metanol.

La quinina sólo se localiza en los tejidos y es rápidamente metabolizada, de modo que después de 24 horas - de su ingestión, la droga pierde el 90% de su concentración en el plasma. La quinina interrumpe efectivamente el ciclo esquizogónico, no obstante las recaídas son comunes 1 semana después del tratamiento.^{38.50.}

La dosis terapéutica causa, por lo general el cinco-nismo, que se manifiesta con signos y síntomas tales como zumbidos, vertigos, sordera parcial, trastornos visuales, dolor de cabeza, nauseas y urticaria.

Hay muchas sales de quinina, pero el sulfato y el diclorato son las más comunes. Con el diclorato la dosis -- ideal es de 2 grs. al día durante 7 días. En casos de e--mergencia, es posible administrar la quinina por vía rec--tal. Se mezcla 1 ó 2 grs. de sulfato de quinina con pasta de almidón lo suficientemente delgada para pasar a través de una cánula rectal y se hace pasar por el recto por gra--vedad. La quinina es absorbida rápidamente, y una ó dos - dosis no causarían por lo regular irritación local seria.

7.2.- Cloroquina.

La cloroquina es químicamente una 4-aminoquinolina, - cuya fórmula es 7-cloro-4-(4-dietilamino-1-metilbutilami-

no)-quinolina. Es el primer compuesto químico utilizado contra el paludismo y aunque ha sido el mejor profiláctico para el tratamiento, ha resultado ser cada vez menos eficaz, debido a la resistencia que presenta el parásito.

La droga no afecta directamente a los gametocitos, pero es sumamente efectiva contra las etapas eritrocíticas de todas las especies y cepas de plasmodios que infectan a los humanos, por lo que se emplea como droga terapéutica y como supresiva, aun cuando no tiene efecto contra formas exoeritrocíticas persistentes, ni contra los esporozoitos y las formas preeritrocíticas.

La cloroquina se localiza en el hígado, bazo, riñones pulmones y glóbulos blancos. La degradación y excreción de ésta droga es lenta bajando los niveles de concentración en el plasma a 60% en una semana, después de su última dosis.

Se han hecho estudios sobre la cloroquina encontrándose que se acumula en la "vacuola acidica" de los parásitos intraeritrócíticos. Además a niveles terapéuticos, -- causa menores cambios en el pH de la vacuola, mientras -- que a altas concentraciones se observó una alta alcalinización. Por lo que un cambio en el pH, provoca un cambio en la suceptibilidad de los parásitos a la cloroquina.³⁸

Se ha propuesto que la acumulación de la cloroquina resulta de su unión a un receptor dentro del parásito, --

que es ferroprotoporfirina IX (FeP), con la formación de un agente lítico a la membrana. En el caso de altas concentraciones de cloroquina, en la que se causa alcalinización, interfiere con los procesos celulares vitales. - La vacuola del parásito de la malaria, tiene un comportamiento ácido que es mantenido por el pH que brinda el metabolismo, por acumulación de la cloroquina en virtud de tener propiedades de base débil siguiendo un gradiente de protones (+) a través ó sobre la membrana.³⁸.

En un estudio de la hibridización del DNA sintético PERI-AP conjugado a una fosfatasa alcalina, para controlar la parasitemia por P. falciparum, se realizó un examen in vitro de la susceptibilidad hacia la cloroquina. - Se colectaron muestras por duplicado de 6 niños durante 14 días en Rwanda. Los resultados se analizaron por microscopía con tinción de Giemsa y con un híbrido de DNA-sintético.

Ambas técnicas examinaron una infección con parásitos sensibles a la cloroquina, mostraron varios niveles de resistencia al tratamiento. Cada paciente tuvo una evolución temporal y la cuenta de parásitos por microscopía fue paralela a los signos de híbrido de DNA a través de los niveles de cambios rápidos de parasitemia, que ocurrieron en el curso del estudio. Por lo que se piensa

que el híbrido de DNA PERI-AP, detecta parásitos de P. falciparum específicos y con buena sensibilidad.

P. falciparum contiene 21 secuencias de AA repetidos en su genoma, los cuales son buen blanco específico para el diagnóstico de la malaria por P. falciparum con pruebas de hibridización de DNA.^{1.9.12.31.}

Se observó una correlación lineal entre el logaritmo y la cantidad de DNA del parásito ó la cantidad de parásitos y el logaritmo de hibridización. Esto último es medido por desintegraciones por minuto, por densitometría revisando áreas teñidas. Presenta algunas limitaciones cuando se usan especímenes, en donde se prolonga la retención de DNA en el eritrocito después de la lisis del parásito, ó diferencias en la replicación del DNA repetitivo durante el desarrollo del parásito. Por lo que con la hibridización del DNA pueden darse diagnósticos falsos de infecciones activas, en pacientes que ya la padecieron.^{31.}

7.3 Cloroguanida.

La cloroguanida, también llamada paludrina, proguanil, palusil, guanatol drinupal, bigumal, diguanyl, ha dado buenos resultados contra las etapas fijas preeritro

cíticas de los tejidos. La cloroguanida es un buen su-
presivo contra el paludismo causado por P. vivax, pero no
es tan efectivo en una acción protectora contra algunas-
cepas de P. falciparum. Por desgracia los plasmodios pue-
den volverse resistentes a la cloroguanida en dosifica-
ciones bajas.

La cloroguanida se acumula en el hígado, riñones, -
glóbulos rojos y blancos. La droga desaparece rápidamen-
te del plasma sanguíneo, pero al parecer sufre una degra-
dación dando metabolitos activos, por lo que la duración
de su efectividad no es tan corta.

7.4.- 8-Aminoquinolinas.

Hay varias 8-Aminoquinolinas que han sido usadas en
la terapéutica del paludismo, la más antigua, y la más -
tóxica es la pamaquina (plasmoquina, gamefar, quipenil).
Químicamente se llama 6-metoxi-8-(4-dietilamino-1-metil-
butilamino)-quinolina.

Las 8-Aminoquinolinas, son relativamente tóxicas, -
pero en combinación con la quinina, todas tienen un efec-
to definido en las fases tisulares fijas, que parecen --
ser las que causan las recaídas en la infección por P. -
vivax. Pueden producir metahemoglobinemia, cianosis, fie

bre, calambres abdominales y hasta hemólisis intravascular aguda.

Las 8-Aminoquinolinas no se recomiendan, sino en -- casos especiales, y bajo vigilancia cuidadosa, para el - tratamiento de recaídas del paludismo por P. vivax. Las combinaciones con quinacrina ó sulfonamidas pueden cau-- sar efectos muy tóxicos.^{38.}

7.5.- Quinacrina.

Los sinónimos de la quinacrina más conocidos son el clorhidrato de mepacrina, atebrina, y atebrin. La quina crina tiene pocos ó ningún efecto contra los esporozoi-- tos o fases preeritrocíticas, la droga no afecta los ga-- metocitos. Pero es altamente efectiva contra las etapas-- eritrocíticas de todas las especies y cepas de plasmoo--- dios humanos. Mientras que el paludismo causado por P. vivax y P. malariae puede tener recaídas después del tra-- tamiento, el paludismo causado por P. falciparum se cura generalmente por completo.

La quinacrina se localiza principalmente en hígado-- bazo, pulmones, corazón y glóbulos blancos. Se elimina - lentamente de modo que las concentraciones en el plasma-- bajan sólo un 50% por semana, después de administrar la-- última dosis. Aunque generalmente la quinacrina no pre--

senta efectos tóxicos, llegan a presentarse náuseas, vómitos, anorexia, diarrea y algunas veces estimulación cortical con trastornos mentales temporales, hasta lesiones graves de la piel. La quinacrina mancha la piel de amarillo y aunque éste no es tóxico ni permanente, suele causar desconcierto.

La quinacrina, químicamente es un colorante de acridina, llamado 6-cloro-2-metoxi-9-(4-dietilamino-1metilbutilamino)acridina.

Aunque el porcentaje con respecto a una resistencia de P. falciparum por varias drogas no es muy alto, al relacionarla con la cloroquina, es evidente que si hay una resistencia a las drogas usadas contra la malaria.

Se piensa que se viene dando una aberración genética para la resistencia hacia la cloroquina, que puede elevar ó regular expresiones de resistencia a otros compuestos relacionados. Esto se basa en un estudio que se hizo utilizando cloroquina, mefloquina, amodiaquina y quinina, en 100 cepas de P. falciparum aisladas de 100 casos confirmados en un hospital de Filipinas.

Al utilizar solamente cloroquina, se encontró una resistencia de un 86%. Al utilizar cloroquina y quinina se tuvo un 2% de resistencia. Al utilizar cloroquina y amodiaquina un 6% de resistencia. Cloroquina y mefloquina 6% de resistencia. Cloroquina, quinina y amodiaquina,

un 2%. Cloroquina, quinina y mefloquina un 2% de resistencia.⁴⁷.

Se utilizó la microtécnica de Rieckman et.al.(mencionados en la Ref. No. 47) para detectar la resistencia del parásito, mostrando que fue resistente no sólo a la cloroquina, sino también a la amodiaquina, quinina y mefloquina, y nos indica la resistencia in vitro en 48 horas dando así una base para la sensibilidad de la cepa.

Se realizó un estudio de la actividad antimalárica de un análogo de riboflavina contra P. falciparum in vitro, y contra P. vinckei in vivo. El análogo de riboflavina contra P. falciparum es 10-(4-clorofenil)-3-metilflavina. Se observa que inhibe la glutatión reductasa de los eritrocitos de los ratones utilizados, en una dosis dependiente. Además se encontraron documentados los efectos antimaláricos de una deficiencia crónica de riboflavina en animales y en humanos.⁴⁷.

Recientemente un número de análogos de riboflavina mostraron tener una actividad potencial contra la malaria in vitro. Los inhibidores del metabolismo de riboflavina se están comportando en sus investigaciones como una droga potencial contra la malaria. El análogo de riboflavina curó á ratones en dosis de 35 mg/Kg. Los animales a los que se dieron dosis de 50 a 75 mg/kg curaron en un 85%. En otro grupo de ratones, se les administró-

100 mg/Kg y de 20 ratones sólo 3 murieron. Se probaron dosis más pequeñas, 5 mg/Kg cada 24 horas y curaron en 4 días 4 de 8 ratones. A 10 mg/Kg cada 24 horas, curaron 6 de cada 10 ratones. A una dosis de 15 mg/Kg curaron 6 de 8 ratones.

A través de un número de casos examinados, se encontró una relación inversa entre una gran cantidad de parásitos y riboflavina, por lo que se procedió a estudiar los efectos de varios grados de deficiencia de riboflavina crónica inducida en infecciones con P. berghei en ratas, encontrando que se suprimían las parasitemias cuando hay una mayor deficiencia de riboflavina. Se encontró una baja en la eritropoyesis, causado por dichas deficiencias, así como también bajos niveles de la glutathion reductasa GCH (que actúa como un antioxidante en los procesos celulares) en las células eritrocíticas. Al reducirse los niveles de GCH en los glóbulos rojos, se da una baja en la actividad de flavina dependiente de la enzima GCH. Sin embargo las bajas concentraciones de GCH en los glóbulos rojos pueden deteriorar tanto al hospedero (en la membrana de las células) como en el parásito, por su papel de antioxidante celular. Por lo que se piensa que un alza en los niveles de oxígeno, pudiera actuar sinérgicamente con bajos niveles de GCH en la inhibición del crecimiento del parásito, aunque esto no se probó.

Hay diversas flavoenzimas que pueden inhibirse con las flavinas. La succinato deshidrogenasa, puede ser inhibida por tenotri-fluoroacetato (TFF), bloqueando el crecimiento de P. falciparum in vitro.^{8.}

Otra flavoenzima potencial es la dihidroorotatodeshidrogenasa, que interviene en la biosíntesis de la pirimidina y se acopla con el uso de oxígeno en el plasmodio.

Los experimentos demostraron que la inhibición directa de la enzima, actúa contra la malaria. Se encontró que un número de flavinas (incluyendo diversas 3-metilflavinas) pueden ser mediadores de reacciones de deshidrogenación en los grupos carbonilo, reduciendo las flavinas. El oxígeno derivado de los radicales libres producidos en tales procesos, pueden actuar también en la actividad antimalárica. Lo que pudiera explicar la inactividad de la flavina en su estado reducido.

En otros estudios, se han usado agentes que generan radicales libres de oxígeno que incluyen aloxano y también hidroperóxido de t-butilo, suprimiendo la parasitemia cuando se inyectaron en ratones infectados, al examinar la sangre de estos ratones se observó una degeneración de los parásitos.^{33.}

El H_2O_2 es tóxico a una variedad de especies de plasmodios intraeritrocíticos tanto in vivo, como in vitro. Siendo los parásitos en los normocitos, los más sensibles.^{8.}

Los macrófagos son activados por células efectoras - no específicas, por liberación de intermediarios reactivos de oxígeno durante la respiración. Durante la infección con P. yoelii se realza la capacidad oxidativa de los macrófagos del bazo ó hígado.³³.

8.- CONCLUSIONES

Los mecanismos que impiden la penetración del esporozoito en el glóbulo rojo son principalmente de tipo inmunológico, como la reacción antígeno anticuerpo, la activación de macrófagos, la fagocitosis y la activación de las células T con la liberación de IFN e interleucinas.

Existen diversas proteínas de P. falciparum que se han utilizado para seleccionar un buen inmunógeno.

Uno de ellas es la parte central de la proteína del circumsporozoito, denominada NANP, que consta de grupos de 4 AA, Asn-Ala-Asn-Pro y Asn-Val-Asn-Pro repetidas un número específico de veces. (NANP)₄₀ y (NANP)₃.

El Ac-Cis-(NANP)₃ acoplado a toxoide tetánico y adherido a hidróxido de aluminio.

R32 Tet 32 es una fusión de proteínas entre la secuencia repetida de la parte central de la proteína cs y 32 AA-codificados por un gen resistente a la tetraciclina, leída fuera del tramo tet 32.

Aunque éstas proteínas han tenido una buena respuesta, no ha sido 100% eficaz, dada la diversidad antigénica del parásito, que evade la respuesta inmune, facilitando el establecimiento de infecciones crónicas y repetidas, y sólo--

mente resultan eficaces por un corto periodo de tiempo, -
siendo el máximo tiempo de 1 año al utilizar el Ac-Cis--
(NANP)₃ acoplado al toxoide tetánico, pero tiene contra-
indicaciones.

El mejor hallazgo en éste estudio, fué el azúcar --
N-Ac-glucosamina, que inhibe la penetración del esporo-
zoito en el glóbulo rojo, ya que la molécula del azúcar-
compite con las moléculas de unión del parásito, evitado
así la invasión hacia el eritrocito.

Se recomienda por tanto, que se lleven a cabo mayo-
res estudios con N-Ac-glucosamina, acoplada a albúmina -
bovina que promete ser el más adecuado para inhibir la -
penetración del esporozoito en el glóbulo rojo.

Mientras tanto, es necesario correlacionar la res-
puesta inmune, con el uso de sustancias químicas, así co
mo también un control en las zonas de mayor riesgo y una
educación sanitaria constante.

REFERENCIAS

- 1.- Adelson, J., Miller, P., Immunogenicity of synthetic peptides from circumsporozoite protein of P. falciparum. *Science* 228: 996-999; 1985.
- 2.- Arnold K. et. al. A randomized comparative study of artemisinin suppositories and oral quinine in acute falciparum malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84 (1): 499-502; 1990.
- 3.- Atkinson, C., Alkawa, M., Siddiqui, W., Ultrastructural localization Of protective and nonprotective P. falciparum proteins using serum samples from vaccinated Aotus monkeys. *Journal Parasitology.* 73 (3): 1235-1240; 1987.
- 4.- Ballou, W., Sherwood, J., Neva, F., Gordon, D., Wirtz, R. Safety and efficacy of a recombinant DNA P. falciparum sporozoite vaccine. *The Lancet.* Jun: 1277-1281; 1987.
- 5.- Butcher, G.A. et.al. The inhibition of P. falciparum growth in vitro by sera from mice infected with malaria or treated with TNF. *Parasitology.* 101 (3): 321-326; 1990 .
- 6.- Chen, D., Tigelaar, R., Weinbaum, F., Immunity to sporozoite induced malaria infection in mice. *The journal of Immunology.* 118 (4): 1322-1327; 1977.
- 7.- Collins, W. E., et. al Immunization of owl monkeys with the ring infected erythrocyte surface antigen of P. falciparum. 44 (1): 34-41. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1991.
- 8.- Cowden, W., Butcher, G., Hunt, N., Clarck, J., Antimalarial activity of a riboflavine analog against P. vinckei in vivo and P. falciparum in vitro. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37 (3): 495-500; 1987.
- 9.- Dame., B., Williams, J., Mc Cutchan, T., Structure of The gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria. *Science.* 225: 593-599; 1984.

- 10.- Davis, T. M. et. al. Changes in the peripheral blood eosinophil count in falciparum malaria. Acta Trop. (Basel) 48 (3): 243-246; 1991.
- 11.- Do Rosario, V.E. et.al. Analysis of the sporogonic development of P. falciparum and P. berghei in anopheline mosquitoes. 31 (1): 101-111; Parasitologia. 1989.
- 12.- Dubois, P., Dedet, J., Fandeur, T., Roussillon, C., Jendoubi, M., Protective immunization of the squirrel monkey against asexual blood stages of P. falciparum by use of the parasite protein fractions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 229-233; 1984.
- 13.- Dziegel M. et.al. Recombinant P. falciparum a glutamate rich protein; purification induced in enzyme linked immunosorbent assay. Am. J. Trop. Med. Hgy. 44 (3): 306-313; 1991.
- 14.- Esposito F. et.al. Intraerythrocyte administration of a synthetic plasmodium antigen response in mice without carrier molecules or adjuvants. Int. J. Parasitol. 20 (8): 1109-11; 1990.
- 15.- Etlinger, H., Felix, A., Guilleisen, D., Heimer, E., Assessment in humans of a synthetic peptide based vaccine against the sporozoite stage of a human malaria parasite P. falciparum. The Journal of Immunology. 140: 626-633; 1988.
- 16.- Fries et.al. Safety immunogenicity and efficacy of P. falciparum vaccine comprising a circumsporozoite protein repeat region peptide conjugated to Pseudomonas aeruginosa form Infected Immun. 10 (15): 1834-1839; 1992.
- 17.- Fr  th. E. et. al. Human antibody response to the merozoite surface antigen of P. falciparum in strain specific and short lived. Infected Immun. 59 (4): 1319-1324; 1991.
- 18.- Golberg. D. E. et. al. Hemoglobin degradation in the human malaria pathogen P. falciparum metabolic pathway initiated by specific aspartic protease. 1: 173 (4): 161-169; 1990.

- 19.- Golenda C.F. et.al. Immunoenzimatic labeling of multiple plasmodial salivary gland sporozoites in a single test. *Am. J. Trop. Med. Hgy.* 46 (3): 314-319; 1990.
- 20.- Good, F., Berzofsky, A., Maloy, L., Hayashi, Y., Miller, L., Genetic control of the immune response in mice to P. falciparum sporozoite vaccine. *Journal of Exp. Med.*-164: 655-660; 1986.
- 21.- Good, M. F., et. al Peptide analysis of the T cell response to malaria circumsporozite (CS) proteins *Immunol. Lett.* 25 (1-3): 135-138; 1990.
- 22.- Guiseppe Del Giudice, S., Verdini, A., Pinori, M., Detection of human antibodies against P. falciparum sporozoite using synthetic peptides. *Journal of Clinical Microbiology*, 25: 91-96; 1987.
- 23.- Herrington, D., Clyde, D., Losonsky, G., Cortesia, M., Safety and Immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against P. falciparum sporozoite. *Science.* 328: 257-260; 1987.
- 24.- Hsiao. LL. et.al Modification of host cell membrane lipid composition by the intraerythrocytic human malaria parasite P. falciparum. *J. Biochem.* 15; 274 (pt) 121-132; 1991.
- 25.- Hugher, A. L. et.al. Circumsporozoite protein genes of malaria parasites (*Plasmodium* sp) evidence for positive selection on immunogenic regions. *Genetics.* 127 (2): 345-353; 1991.
- 26.- Inerburg, J. et.al. Protective immunity induced in aotus monkeys by recombinant sera proteins of P. falciparum. 59 (4): 1247-1250; 1991.
- 27.- Jendoubi. M., Dubois, P., Pereira Da Silva, L., Characterization of one polypeptide antigen potentially related to protective immunity against the blood infection by P. falciparum in the squirrel monkey. *Journal of Immunology.* 134 (3): 1941-1945; 1985.
- 28.- Lege-Oguntoye L. et.al. Chloroquine resistant P. falciparum reduced sensitivity in vitro to mefloquine and

quinine in Zaria, Northern. Nigeria. *J. Trop. Med. Hgy.* 94 (2): 73-75; 1991.

29.- Lundeberg, J. et.al. Rapid colorimetric quantification of PCR amplified DNA. *Biotechniques.* 10 (1): 68-75; 1991

30.- Mansor S.M. The safety and kinetics of Intramuscular quinine in Malwain children with moderaty severe falciparum malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hgy.* 84 (1): 482-487; 1990.

31.- Mc. Cuthchan, T., Hansen, J., Dame, J. Mullins, J., DNA cloning of P. falciparum circumsporozoite gene; Aminoacids sequence of repetitive epitope. *Science.* 225: 628-630; 1984.

32.- Mc Laughlin, G , Deloron, P., Huong, A., Sezibera, C., and Campbell, C., DNA hybridization for assesment of response of P. falciparum to chloroquine therapy. *J. of Clinical Microbiology.* 26 (9): 1704-1707; 1988.

33.- Miller, L., Russell, J., Howard, C., Good, R., Nussenzweig. Research toward malaria vaccines. *Articles.* 234:1349-1355; 1986.

34.- Ortiz Librado. *Inmunologia.* Editorial Interamericana.1987.

35.- Ozaki, S., Gwadz, W., and Nigel, G.S. *Journal Parasitology.* Simple centrifugation method for rapid separation of esporozoites from mosquitoes. 70 (5): 831-833; 1984.

36.- Richman, J.S., Vedvick, T.S., and Reese, T., Peptide mapping of conformational epitopes in a human malarial parasite heat shock protein. *The Journal Immunology.* 143: 285-292; 1989.

37.- Rosenthal, P.J. et.al. Isolation and characterization of P. falciparum. *Mol. Biochem. Parasitology.* 51 (1): 143-152; 1992.

38.- Russell, Paludismo. Compendio de Principios Básicos. Editorial La Prensa Médica Mexicana. Traducido por Luis Vargas de la 1a. edición. 1953.

- 39.- Sacci, J. B., et.al. Mouse model for exoerythrocyte stages of P. falciparum malaria parasite. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1: 89 (9): 3701-3705; 1992.
- 40.- Saol, A. et.al. Refraction ness of erythrocytes infected with Plasmodim gametocytes to lysis of sorbitol. Int. J. Parasitol. 20 (8): 1095-1097; 1990.
- 41.- Schofield, L., Villaquirán, J., Ferreira, A., Schellekens, H. Interferon CDS⁺ T cells and antibodies required for immunity to malaria esporozoites. Nature. 330: 664-666; 1987.
- 42.- Schulman, S., Lee, Y.C., Vanderberg, J.P. Effects of Neoglycoproteins on penetration of P. falciparum merozoites into erythrocytes in vitro. Journal Parasitology 70 (2): 213-216; 1984.
- 43.- Schulman, S., Oppenheim, J., and Vanderberg, J., Assay of erythrocyte components as inhibitors of P. falciparum merozoite invasion of erythrocytes. Journal Am. trop. Med. Hgy. 32 (4): 666-670; 1983.
- 44.- Sighinolfi. L. et.al. Treatment of cerebral malaria by erithrocytes exchange. Recet. Prog. Med. 81 (12): 804-805; 1990.
- 45.- Sim B.K. Localization of the 175 kd. erythrocyte binding antigen in micronemes of P. falciparum merozoites. Mol Biochem. Parasitology. 51 (1): 157-159; 1992.
- 46.- Sirawaraporn W. et.al. Heterologous expresion of active thymidilate synthase-dihydrofolate reductasa from P. falciparum. Biochemistry. 4; 29 (48):10779-85; 1990.
- 47.- Smrkovski, LL., Buck, Alcántara, A., Rodriguez, C., and Ulyangco, V.C., Studies to resistance to chloroquine, quinine amodiaquine, and mefloquine among Philippine strains of P. falciparum. Trans. R. Soc. Med. Hgy. 79: 37-41; 1985
- 48.- Sthael, D., Druilhe, P., Gentilini, M., Antagonism of chloroquine with other antimalarials. Trans Soc Trop. Med. Hgy. 82: 221; 1988.

49.- Symtne. J.A. et.al. Structural diversity in the *P. falciparum* merozoite surface antigen 2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1; 88 (5): 1751-1755; 1991.

50.- Tay Lara, Velasco Gutiérrez. Parasitología Médica. Editorial Francisco Méndez Cervantes. 4a. ed. 1990.

51.-Trager, W., Terhakovec, M., Lyandvert, L., Stanley, H., Lanners, N. Clones of the malaria parasite *P. falciparum* obtained by microscopic selection: Their characterization with regard to knobs, chloroquine sensitivity and formation of gametocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 25: 91-96; 1981.

52.- Tumor necrosis factor and malaria. Editorial Lancet. -23; 37-(8743): 708. 1991.

53.- Vidal, F., De la Cruz. W., Lee Maloy. Mc., Cutchan. T., Miller, H.L. Lack of cross reactivity between variant T cell determinants from malaria circumsporozoite protein. The Journal of Immunology. 141: 2456-2460; 1988.

54.- Waters A.P. et.al *P. falciparum* appears to have arisen as a result of lateral transfer between a man and human host. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88(8): 3140 -3144; 1991.