

00551

4

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

**Proliferación específica de linfocitos $\gamma\delta^+$ en respuesta
al estímulo con gametocitos y antígenos asexuales de
Plasmodium vivax y *P. falciparum*.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA:

BIOL. CARLA OLBIA CONTRERAS OCHOA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuernavaca, Mor.

Febrero 2002



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.

Mi vida interior ha reconquistado su libertad, ya no se hallará a merced de los acontecimientos y cada minuto de mi existencia tendrá un sentido incontestable y profundo, que podré imprimir a cada una de mis acciones: el sentido del bien.

La felicidad consiste en buscar la verdad y no en encontrarla....

Leon Tolstoi. 1875

AGRADECIMIENTOS

Muy especialmente a los miembros de mi comité tutorial: la Dra. Ivonne Rosenstein Azoulay y al Dr. Fernando Esquivel Guadarrama, no solo por sus valiosos comentarios y sugerencias al trabajo, sino también por su apoyo, preocupación, paciencia y comprensión, mas allá del deber de un tutor.

A la Dra. Ivonne Rosenstein por prestarnos el FACSCAN, y a todo su grupo de colaboradores, por todas las facilidades que siempre me brindaron para trabajar con ellos en el mejor de los ambientes.

Al Dr. Jesús Martínez Barnetche por enseñarme a lidiar con el FACSAN, por su ayuda en el análisis de datos y además por sus valiosas sugerencias.

A mis entrañables amigos, los que están cerca y los que están lejos, quienes han estado conmigo en todo momento, ayudándome a mantener el barco a flote, dándome ánimos para seguir adelante, aguardando tras bambalinas, esperando a que represente el mejor papel, gracias por todo su apoyo.

Esta tesis se realizó bajo el asesoramiento de la Dra. Janine Ramsey Willoquet, en el departamento de Enfermedades Transmitidas por Vectores, del Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública y en el laboratorio de la Dra. Ivonne Rosenstein del Instituto de Biotecnología de la UNAM, financiado en parte por CONACyT.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag 1	Antígeno 1
Ag 2	Antígeno 2
Ag7	Antígeno 7
ABRA	Antígeno ácido básico con unidades repetitivas
AMA-1	Antígeno de membrana apical
EBA-1	Antígeno de unión al eritrocito
EDTA	Acido etilendiamina tetraacético
ERNI	Eritrocitos no infectados
CMC	Células mononucleares circulantes
Con A	Concanavalina A
cpm	cuentas por minuto
GBP	Proteína que une glicoforina
GLURP	Proteína rica en glutamato
ICAM-1	Molécula de adhesión intracelular
IL	Interleucina
IE	Indices de estimulación
IFN γ	Interferon gamma
LSA -1	Antígeno de etapa hepática
LPS	Lipopolisacáridos bacterianos
MHC I	Complejo principal de histocompatibilidad I
MHC II	Complejo principal de histocompatibilidad II
NK	Células asesinas naturales
PfHRPII	Proteína rica en histidinas de <i>P. falciparum</i>
PfHSP70	Proteína de choque térmico de <i>P. falciparum</i>
PfMSP	Proteína de superficie de merozoitos de <i>P. falciparum</i>
PHA	Fitohemaglutinina A
RAP-1	Proteína asociada al roprio
RESA	Proteína de superficie de eritrocitos infectados con anillos
RhopH3	Proteína H3 del complejo del roprio
SERP	Proteína rica en serinas
TNF α	Factor necrosante tumoral alfa
TNF β	Factor necrosante tumoral beta

INDICE

	página
I. RESUMEN	i
1. INTRODUCCION	1
1.1 Epidemiología	1
1.2 Ciclo biológico del <i>Plasmodium spp.</i>	2
1.3 Estrategias de control	5
1.4 Vacunas contra <i>Plasmodium spp.</i>	6
1.5 Aspectos clínicos de la malaria	8
2. ANTECEDENTES	9
2.1 Respuesta inmune inmediata contra <i>Plasmodium spp.</i>	9
2.1.1 Respuesta humoral	9
2.1.2 Respuesta celular	11
2.2 Respuesta inmune adquirida contra <i>Plasmodium spp.</i>	13
2.2.1 Respuesta humoral	13
2.2.2 Respuesta celular	14
A. Respuesta inflamatoria	14
B. Inmunosupresión	16
C. Respuesta proliferativa	17
2.3 Respuesta inmune contra los gametocitos de <i>Plasmodium spp.</i>	19
2.3.1 Respuesta humoral	20
2.3.2 Respuesta celular	23
2.4 Exoantígenos	24
2.5 Linfocitos $\gamma\delta^+$	32
3. JUSTIFICACION	33
4. OBJETIVOS	34
5. METODOLOGIA	34
A. Obtención del material biológico	34
1. Obtención de sangre	35
2. Obtención de células mononucleares circulantes	35

3. Cultivo y aislamiento de parásitos de <i>Plasmodium</i>	35
4. Obtención de antígenos sonicados y de exoantígenos	36
B. Determinación de la capacidad proliferativa de las CMC con proteínas gametocitarias	37
C. Identificación de fenotipos de las CMC que respondan a los antígenos de <i>Plasmodium</i>	38
D. Análisis estadístico	40
6. RESULTADOS	40
1. Capacidad proliferativa	40
1.1 CMC de etapa aguda estimuladas con antígenos sonicados de <i>P. vivax</i>	40
1.2 CMC de infecciones previas estimuladas con antígenos sonicados de <i>P. vivax</i>	45
1.2.1 Respuesta de las CMC de infección primaria previa	45
1.2.2 Respuesta de las CMC de infecciones múltiples previas	46
1.3 CMC de infección primaria previa estimuladas con antígenos sonicados de <i>P. falciparum</i>	51
1.4 CMC de infecciones previas estimuladas con exoantígenos de <i>P. vivax</i>	56
1.4.1 Respuesta de las CMC de infección primaria previa	56
1.4.2 Respuesta de las CMC de infecciones múltiples previas	60
1.5 CMC de infección primaria previa estimuladas con exoantígenos de <i>P. falciparum</i>	61
1.6 Comparación de la capacidad proliferativa en CMC estimuladas con antígenos sonicados o con exoantígenos	67
2. Identificación de fenotipos de las CMC que proliferaron con los antígenos de <i>Plasmodium</i>	69
2.1 CMC de pacientes de infección primaria previa estimuladas con antígenos sonicados de <i>P. vivax</i>	69
2.2 CMC de pacientes con infecciones múltiples previas estimuladas con antígenos sonicados de <i>P. vivax</i>	71
2.3 CMC de pacientes de infección primaria previa estimuladas con antígenos sonicados de <i>P. falciparum</i>	78

2.4 CMC de pacientes de infección primaria previa estimuladas con exoantígenos de <i>P. vivax</i>	81
2.5 CMC de pacientes con infecciones múltiples previas estimuladas con exoantígenos de <i>P. vivax</i>	84
2.6 CMC de pacientes de infección primaria previa estimuladas con exoantígenos de <i>P. falciparum</i>	85
2.7 CMC de un control no palúdico estimulados con antígenos sonicados de <i>P. vivax</i>	89
2.8 CMC de un control no palúdico estimulados con antígenos sonicados de <i>P. falciparum</i>	89
2.9 CMC de un control no palúdico estimuladas con exoantígenos de <i>P. vivax</i>	90
3.0 CMC de un control no palúdico estimuladas con exoantígenos de <i>P. falciparum</i>	90
7. DISCUSION	93
8. CONCLUSIONES	114
9. LITERATURA CITADA	116

INDICE DE TABLAS

	página
Tabla 1. Proteínas específicas de gametocitos de <i>Plasmodium spp.</i>	21
Tabla 2. Exoantígenos de <i>Plasmodium spp.</i> que se originan del parásito o del citoplasma del eritrocito	28
Tabla 3. Exoantígenos de <i>Plasmodium spp.</i> que se originan en el espacio de la vacuola parasitófora.	29
Tabla 4. Exoantígenos de <i>Plasmodium spp.</i> que se originan de merozoitos.	30
Tabla 5. Datos epidemiológicos de los pacientes infectados con <i>P. vivax</i> en etapa aguda.	42
Tabla 6. Índices de estimulación de CMC de pacientes infectados con <i>P. vivax</i> en etapa aguda estimuladas con antígenos sonicados.	44
Tabla 7. Razón de proliferación antígeno-específica en CMC de pacientes infectados con <i>P. vivax</i> en etapa aguda estimuladas con antígenos sonicados.	44
Tabla 8. Datos epidemiológicos de los pacientes que estuvieron infectados con <i>P. vivax</i> .	46
Tabla 9. Índices de estimulación de CMC de pacientes con infecciones previas con <i>P. vivax</i> estimuladas con antígenos sonicados.	49
Tabla 10. Razón de proliferación antígeno-específica en CMC de pacientes con infecciones previas con <i>P. vivax</i> estimuladas con antígenos sonicados.	50
Tabla 11. Datos epidemiológicos de los pacientes que estuvieron infectados con <i>P. falciparum</i>	52
Tabla 12. Índices de estimulación de CMC de pacientes con infección primaria previa con <i>P. falciparum</i> estimuladas con antígenos sonicados.	54
Tabla 13. Razón de proliferación antígeno-específica en CMC de pacientes con infección primaria previa con <i>P. falciparum</i> estimuladas con antígenos sonicados.	55
Tabla 14. Resumen de la estimulación significativa en la proliferación de CMC estimuladas con antígenos sonicados.	56
Tabla 15. Exoantígenos de <i>P. vivax</i> de 50 a 100 kDa.	58
Tabla 16. Índices de estimulación de CMC de pacientes con infecciones previas con <i>P. vivax</i> estimuladas con exoantígenos de 50 a 100 kDa.	60
Tabla 17. Razón de proliferación antígeno-específica en CMC de pacientes con infecciones previas con <i>P. vivax</i> estimuladas con exoantígenos de 50 a 100 kDa.	61

Tabla 18. Exoantígenos de <i>P. falciparum</i> de 50 a 100 kDa.	63
Tabla 19. Índices de estimulación de CMC de pacientes con infección previa con <i>P. falciparum</i> estimuladas con exoantígenos de 50 a 100 kDa.	65
Tabla 20. Razón de proliferación antígeno-específica en CMC de pacientes con infección previa con <i>P. falciparum</i> estimuladas con exoantígenos de 50 a 100 kDa.	66
Tabla 21. Resumen de la estimulación significativa en la proliferación de CMC estimuladas con exoantígenos.	67
Tabla 22. Porcentaje de estimulación asexual-específico y gametocito-específico en CMC de pacientes que estuvieron infectados con <i>P. vivax</i> o <i>P. falciparum</i> estimuladas con antígenos sonicados.	77
Tabla 23. Marcadores expresados en linfocitos que proliferaron de manera significativa en respuesta a la estimulación con antígenos gametocito-específicos sonicados.	81
Tabla 24. Porcentaje de estimulación asexual-específico y gametocito-específico en CMC de pacientes que estuvieron infectados con <i>P. vivax</i> o <i>P. falciparum</i> estimuladas con exoantígenos.	86
Tabla 25. Marcadores expresados en linfocitos que proliferaron de manera significativa en respuesta a la estimulación con exoantígenos específicos de gametocitos.	89

INDICE DE FIGURAS

	página
Figura 1. Ciclo biológico de <i>Plasmodium spp.</i>	4
Figura 2. Exoantígenos de <i>Plasmodium spp.</i>	27
Figura 3. Cronograma de infección con <i>Plasmodium spp.</i>	34
Figura 4. Proliferación de CMC de pacientes infectados con <i>P. vivax</i> en etapa aguda estimuladas con antígenos sonicados.	43
Figura 5. Proliferación de CMC de pacientes de infección primaria previa con <i>P. vivax</i> estimuladas con antígenos sonicados.	47
Figura 6. Proliferación de CMC de pacientes con infecciones múltiples previas con <i>P. vivax</i> estimuladas con antígenos sonicados.	48
Figura 7. Proliferación de CMC de pacientes de infección primaria previa con <i>P. falciparum</i> estimuladas con antígenos sonicados.	53
Figura 8. Proliferación de CMC de pacientes de infecciones previas con <i>P. vivax</i> estimuladas con exoantígenos.	59
Figura 9. Proliferación de CMC de pacientes de infección primaria previa con <i>P. falciparum</i> estimuladas con exoantígenos.	64
Figura 10-A. Expresión del TCR $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ en CMC de un paciente representativo de infección primaria previa con <i>P. vivax</i> estimuladas con antígenos sonicados.	73
Figura 10-B. Expresión del marcador CD25 y CD69 en CMC de un paciente representativo de infección primaria previa con <i>P. vivax</i> estimuladas con antígenos sonicados.	74
Figura 10-C. Expresión de los marcadores CD3, CD4 y CD8 en CMC de un paciente representativo de infección primaria previa con <i>P. vivax</i> estimuladas con antígenos sonicados.	75
Figura 11. Porcentaje de expresión de marcadores en CMC de pacientes que estuvieron infectados con <i>P. vivax</i> estimuladas con antígenos sonicados.	76
Figura 12. Porcentaje de expresión de marcadores en CMC de pacientes de infección primaria previa con <i>P. falciparum</i> estimuladas con antígenos sonicados.	80
Figura 13. Porcentaje de expresión de marcadores en CMC de pacientes que estuvieron infectados con <i>P. vivax</i> estimuladas con exoantígenos de 50 a 100 kDa.	83

- Figura 14. Porcentaje de expresión de marcadores en CMC de pacientes de infección primaria previa con *P. falciparum* estimuladas con exoantígenos de 50 a 100 kDa. 88
- Figura 15. Porcentaje de expresión de marcadores en CMC de controles no palúdicos estimuladas con antígenos sonicados de *P. vivax* o *P. falciparum*. 91
- Figura 16. Porcentaje de expresión de marcadores en CMC de controles no palúdicos estimuladas con exoantígenos de 50 a 100 kDa de *P. vivax* o *P. falciparum*. 92

i. RESUMEN

El conocimiento de la respuesta inmune celular contra las etapas asexuales y sexuales de *Plasmodium* es escaso: etapas asexuales maduras inducen la proliferación de linfocitos T $\gamma\delta^+$, mientras que las etapas inmaduras estimulan a linfocitos $CD4^+$. Utilizando linfocitos de pacientes que tuvieron una o múltiples infecciones previas, se determinó que los gametocitos y las etapas asexuales totales sonicados, así como los exoantígenos producidos por estas etapas, indujeron la activación y la proliferación de linfocitos $\gamma\delta^+$ en pacientes con una o múltiples infecciones con *P. vivax* y con una sola infección con *P. falciparum*. La expansión de linfocitos $\alpha\beta^+$, $CD3^+$ y $CD4^+$ fue mínima. Los gametocitos fueron más inmunogénicos que los antígenos asexuales, induciendo una mayor respuesta proliferativa y un mayor porcentaje de expresión de fenotipos que los últimos. La activación por estos antígenos fue específica para ambos tipos de pacientes, midiéndose por la expresión de los marcadores de activación $CD25$ y $CD69$, indicando un requerimiento de IL-2, y/o de citocinas que actúan a través de este receptor. En infecciones primarias, los linfocitos $\gamma\delta^+$ y $CD8^+$ citotóxicos constituyen la primera línea de defensa contra el parásito, mientras que en infecciones múltiples son los linfocitos $\gamma\delta^+$, independientemente de la frecuencia del reto; además, en este último grupo de pacientes, los linfocitos $\alpha\beta^+$ y $CD4^+$ también contribuyen a la eliminación del parásito. Los antígenos de *Plasmodium* no indujeron la expresión del marcador $CD2$, ni la activación de linfocitos B, medida mediante la expresión del marcador $CD21$. Los antígenos sonicados asexuales y de gametocitos indujeron mayor expresión del marcador $CD25$ en comparación con los exoantígenos homólogos. La respuesta proliferativa contra los antígenos totales y los exoantígenos de gametocitos y de etapas asexuales, respectivamente, fue análoga en ambas especies de *Plasmodium*. Existe una inmunosupresión parcial de los linfocitos procedentes de pacientes palúdicos durante la etapa aguda de la infección, aunque las células mononucleares circulantes (CMC) de estos pacientes agudos de infección primaria o secundaria son capaces de responder de forma específica a los antígenos asexuales y de gametocitos sonicados de *P. vivax*. Los antígenos de *Plasmodium* no indujeron respuestas proliferativas, ni de activación, en CMC de los controles no palúdicos. El conocimiento de la respuesta inmune celular natural contra el parásito permitirá avanzar en el desarrollo de vacunas multivalentes contra las etapas asexuales para prevenir o reducir la infección y contra los gametocitos para bloquear la transmisión de la enfermedad.

1. INTRODUCCION

El paludismo o malaria es uno de los principales problemas de salud pública en países tropicales y subtropicales del mundo. Se estima que cuatro billones de personas en mas de 90 países están en riesgo de contraer la enfermedad. La mitad de la población mundial vive en riesgo de adquirir la enfermedad, mientras que la prevalencia anual de esta es de 500 millones de casos y anualmente mueren de 2 a 3 millones de personas principalmente niños menores de 5 años y un número significativo de mujeres embarazadas (WHO, 2000). En Centroamérica, la transmisión mantiene una endemia sin mayores cambios en los últimos 40 años. Mientras que en México, los casos de paludismo han disminuido en los últimos años, para el año 2000 se reportaron 2818 casos y en el 2001 un total de 1852 casos (Sistema Unico de Información de Vigilancia Epidemiológica, 2001). El resurgimiento de la malaria ocurre debido a que el parásito ha desarrollado resistencia a las drogas antimaláricas, a que el vector ha desarrollado resistencia a los insecticidas y a la falta de mantenimiento de los programas de control.

1.1 EPIDEMIOLOGIA

El agente causal del paludismo es un protozoario del género *Plasmodium*. Hay cuatro especies que pueden infectar al hombre: *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* y *P. falciparum*. Estas dos últimas son las más importantes desde el punto de vista epidemiológico (WHO, 1998). *P. vivax* tiene una amplia distribución geográfica, especialmente en el sur de Asia y en América Central, mientras que *P. falciparum* predomina en Africa, en el sureste de Asia y en América del Sur (Godal *et al*, 1998). El impacto económico que tiene la enfermedad varía entre las distintas poblaciones humanas. En la mayor parte de Africa la enfermedad se extiende a través de todos los grupos de edad y es la principal causa de mortalidad en niños, se ha estimado que solo en este continente mueren 800,000 niños cada año, lo que representa que cada minuto mueren de 3 a 5 niños en áreas endémicas, mientras que los niños sobrevivientes de la malaria cerebral (400,000 al año) sufren graves desordenes neurológicos permanentes incluyendo trastornos conductuales; también es frecuente la muerte fetal debido a la infección. Esta enfermedad es endémica en 101 países, 21 de los cuales están en el continente americano (WHO, 1998).

El costo de la enfermedad en términos de sistemas de salud y de actividad económica perdida es alto (WHO, 1998). Se ha estimado que en regiones endémicas un cuarto de las admisiones hospitalarias son debidas a la malaria y que un solo episodio incapacita a un adulto de

trabajar durante 2 semanas (Mendis y Carter, 1995; WHO, 1996). Aunado a esto, en varias partes del mundo se han registrado cepas resistentes a los medicamentos profilácticos (cloroquina y primaquina) y además se ha detectado resistencia del vector a los insecticidas. Por lo que existe la necesidad de desarrollar herramientas profilácticas y terapéuticas para controlar esta enfermedad (Galinski y Barnwell, 1996; WHO, 1998).

1. 2 CICLO BIOLÓGICO DEL *Plasmodium spp.*

El ciclo de vida de todas las especies de *Plasmodium* comprende una fase sexual exógena o esporogonia que se presenta en mosquitos del género *Anopheles* y una fase asexual endógena o esquizogonia en el huésped vertebrado (Figura 1; Gilles y Warrel, 1993; Galinski y Barnwell, 1996; Kwiatkowski y Marsh, 1997; Lobo y Kumar, 1998).

Al momento de picar al huésped, el mosquito hembra puede adquirir la infección por ingerir las etapas sexuales (gametocitos). El cambio de nivel de oxígeno y la temperatura en el estómago del vector provoca la maduración de los gametocitos y estos se liberan de las membranas eritrocíticas, proceso que se denomina gametocitogénesis. Los gametocitos masculinos (microgametocitos) sufren tres ciclos de división mitótica originando 8 gametos de un solo microgametocito (variable según la especie de *Plasmodium* que se trate), los cuales sufren un proceso de exflagelación; mientras que el gametocito femenino (macrogametocito) sufre un proceso de maduración originando un solo macrogameto. Después de la fecundación se forma el cigoto, el cual se desarrolla hasta la etapa de oocineto, que es móvil y atraviesa las células epiteliales hasta alcanzar la membrana basal del estómago donde adquiere forma esférica rodeado de una membrana constituyendo el oocquiste, el cual sufre múltiples ciclos reproductivos que producen en promedio 10,000 esporozoitos (variable según la especie). Cuando el oocisto maduro está lleno, estalla liberando a los esquizontes que inician la migración por el hemocele hacia las glándulas salivales. Poco después de alcanzar las glándulas salivales los esporozoitos se vuelven infectivos (Gilles y Warrel, 1993; Galinski y Barnwell, 1996; Lobo y Kumar, 1998).

Cuando el mosquito se alimenta, el contenido de las glándulas salivales alcanza los capilares dérmicos. Los esporozoitos introducidos por un mosquito infectado permanecen en la circulación por un período de media hora y luego desaparecen de la circulación; muchos son destruidos por fagocitos y otros entran en las células parenquimatosas del hígado (hepatocitos) directamente o a través de las células de Kupffer donde sufren un proceso de desarrollo y

multiplicación conocido como esquizogonia pre-eritrocítica, dando lugar solamente en las especies de *P. vivax* y *P. ovale* a la formación de hipnozoitos que son parásitos de 3 μ de diámetro. En contraste, en las especies de *P. falciparum* y *P. malariae* los esporozoitos no forman hipnozoitos, se desarrollan directamente a esquizontes pre-eritrocíticos. El proceso de esquizogonia pre-eritrocítica tiene una duración de 6 a 16 días, según la especie, y culmina con la liberación de cientos de merozoitos a la circulación. En las especies de *P. vivax* y *P. ovale* una vez que se ha completado este proceso, hay otro fenómeno conocido como esquizogonia exoeritrocítica secundaria durante el cual los merozoitos liberados en lugar de salir a la circulación reinvaden las células del hígado y repiten el proceso de esquizogonia pre-eritrocítica provocando la liberación de parásitos tiempo después de la infección inicial. En estas especies los hipnozoitos permanecen latentes en el hepatocito como formas uninucleadas de 4 a 5 μ de diámetro por periodos de tiempo prolongados, después de los cuales se activa nuevamente el proceso de esquizogonia pre-eritrocítica con producción de merozoitos que son liberados a circulación. En *P. falciparum* y *P. malariae* no ocurre este fenómeno (Gilles y Warrel, 1993; Galinski y Barnwell, 1996; Kwiatkowski y Marsh, 1997).

El desarrollo de los parásitos dentro del eritrocito se conoce como fase eritrocítica. La primera etapa después de la invasión del merozoito al eritrocito se conoce como anillo, en ella el parásito tiene formas redondeada y el núcleo situado en un polo. Al desarrollarse el parásito aumentan de tamaño y adquieren forma irregular, a esta etapa se les conoce como trofozoitos. Los trofozoitos absorben la hemoglobina del eritrocito liberando un producto de digestión conocido como hemozoina. Después de un período de crecimiento los trofozoitos sufren un proceso de división asexual conocido como esquizogonia. El núcleo del parásito se divide de 3 a 5 veces seguida de una división citoplasmática dando origen así a los esquizontes multinucleados. En los esquizontes maduros ocurre una segmentación del núcleo y el citoplasma produciéndose los merozoitos de forma redondeada. Cuando el proceso de esquizogonia se completa, el eritrocito estalla y los merozoitos son liberados a la circulación, estos invaden a nuevos eritrocitos produciendo una nueva generación de parásitos bajo el mismo proceso. El proceso de esquizogonia se repite varias veces durante el curso de la infección resultando en un incremento progresivo de la parasitemia (Gilles y Warrel, 1993; Galinski y Barnwell, 1996; Kwiatkowski y Marsh, 1997).

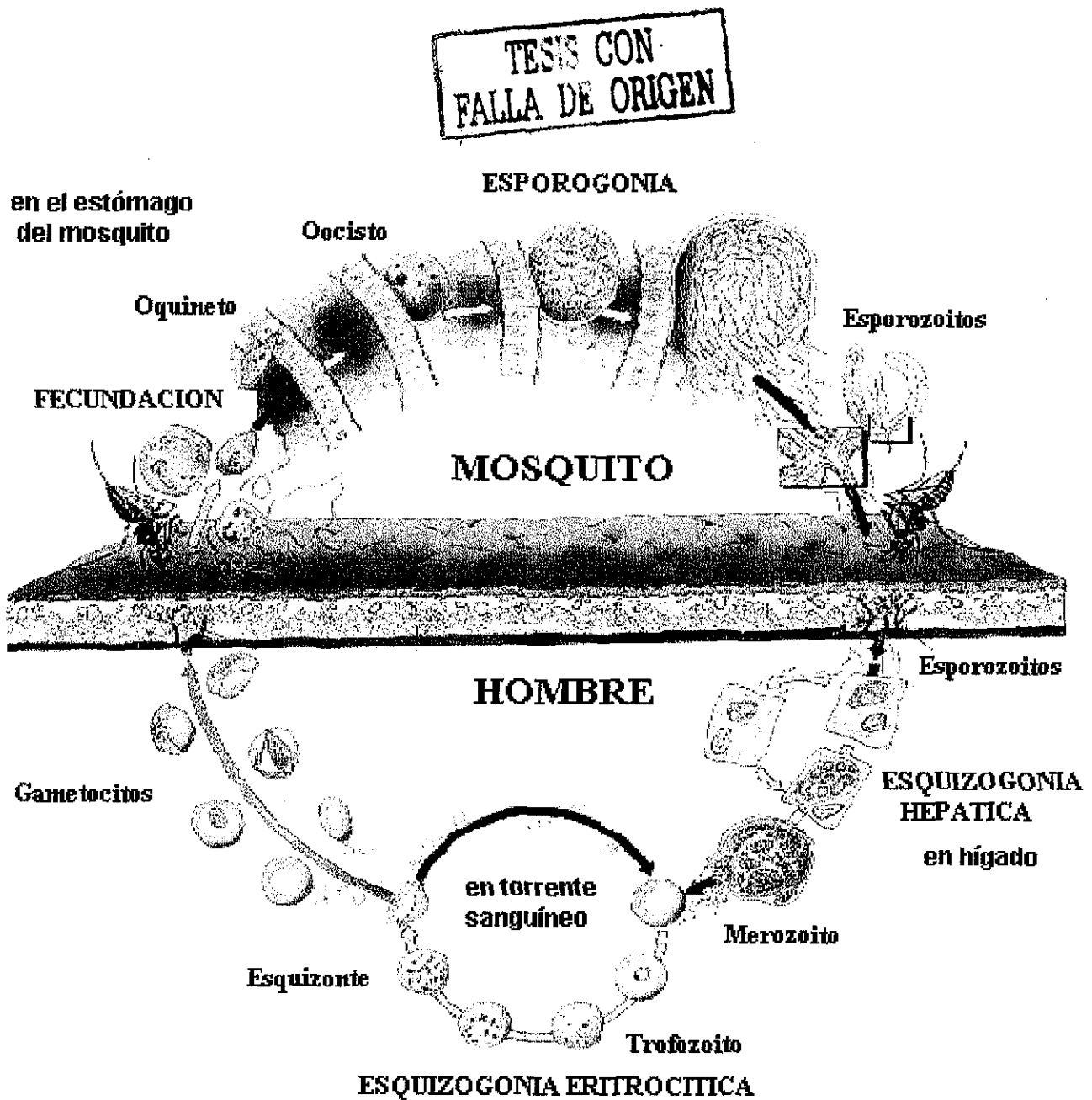


Figura 1. Ciclo biológico de *Plasmodium* spp.

Al avanzar la infección se observan en la sangre los gametocitos, formas del parásito que, al igual que las etapas asexuales son intraeritrocíticos, se desconoce el estímulo o mensaje responsable de su producción a partir de merozoitos, aunque existen varias hipótesis que tratan de explicarlo. La primera hipótesis sugiere que hay dos tipos de esquizontes, unos que producen solamente gametocitos y otros que producen exclusivamente parásitos asexuales. De acuerdo a

esta hipótesis, este proceso se llevaría a cabo durante el crecimiento de un parásito asexual en donde factores ambientales estarían ligados a este proceso, de tal manera que un esquizonte maduro produce merozoitos que ya están comprometidos para desarrollarse como asexuales o gametocitos antes de la invasión al eritrocito (Alano y Carter, 1990; Lobo y Kumar, 1998).

Otra hipótesis sugiere que los merozoitos no están comprometidos al momento de la invasión a los eritrocitos y que durante la primera etapa de desarrollo (etapa de anillo) el parásito es susceptible a factores que lo comprometen a seguir su desarrollo hacia etapas asexuales o sexuales (Alano y Carter, 1990; Lobo y Kumar, 1998).

Además, se ha hipotetizado que hay una señal primaria, la cual podría ser de naturaleza ambiental, que estaría activando a un gen o grupo de genes que estarían determinando cuales parásitos entrarían en el ciclo sexual y se desarrollarían hasta gametocitos o bien cuales permanecerían en el ciclo asexual y se desarrollarían como merozoitos. La expresión de tales genes podría dictar cuales de los parásitos comprometidos a desarrollarse a etapas sexuales se desarrollarían como gametocitos femeninos o masculinos. Sin embargo, muy pocos genes expresados específicamente en las fases sexuales han sido clonados y el papel que juegan sus productos proteícos no se ha determinado todavía (Lobo y Kumar, 1998).

Los macro y microgametocitos pasan por varias etapas de crecimiento y diferenciación durante su maduración en el eritrocito, tardan de 8 a 17 días en madurar a partir de la invasión del merozoito. En el caso de *P. falciparum* este proceso se ha dividido en 5 etapas distinguibles por cambios en la organización celular (Alano y Carter, 1990; Lobo y Kumar, 1998), además de la duplicación del material genético (Janse *et al*, 1987). Los gametocitos maduros tienen formas diferentes según la especie de *Plasmodium*, pero en general hay diferencias morfológicas entre ellos.

1. 3 ESTRATEGIAS DE CONTROL

Las estrategias actuales de control de la malaria consisten en tres métodos principales (WHO, 1998), el primero es el control del vector con insecticidas adulticidas y larvicidas. Anteriormente se empleaba el DDT, pero actualmente se están empleando piretroides sintéticos o carbamatos que pueden ser efectivos en un periodo de 6 a 12 meses. El segundo es la protección del humano, que puede ser directa (ropa, repelentes) o por barrera (mosquitero), y el tercero es el tratamiento profiláctico de la persona infectada con drogas bajo varios esquemas terapéuticos. En

este último caso, se está empleando actualmente un número limitado de drogas entre las que se encuentran la mefloquina, halofantrina, derivados de artemisa y amodiaquina. En el futuro se contempla además el control mediante el uso de vacunas (Gilles y Warrell, 1993; Galinski y Barnwell, 1996; Kwiatkowski y Marsh, 1997; Holder, 1999).

En la última década se ha realizado mucha investigación para el desarrollo de una vacuna contra la malaria. Una vacuna efectiva podría constituir una poderosa herramienta adicional a los programas de control. Mas de una docena de vacunas están actualmente en desarrollo, y se espera que dentro de los próximos 15 años pueda estar disponible alguna de ellas (WHO, 1998).

1.4 VACUNAS CONTRA *Plasmodium spp.*

Las vacunas contra *P. vivax* y *P. falciparum* actualmente en desarrollo se preparan con fines preventivos (etapas pre-eritrocíticas), curativos (etapas eritrocíticas) y para el bloqueo de la transmisión (fases sexuales ó zigóticas en el vector, Galinski y Barnwell, 1996; Kwiatkowski y Marsh, 1997; Holder, 1999; Taylor-Robinson, 2000).

1. Las vacunas de etapas pre-eritrocíticas están dirigidas contra los esporozoitos con el fin de prevenir la infección provocada por el mosquito antes de que los parásitos causen los padecimientos clínicos. Este tipo de vacunas probablemente no proteja completamente contra la infección, pero si lograría reducir el número de parásitos en la circulación, disminuyendo el riesgo de una enfermedad severa (Kwiatkowski y Marsh, 1997; Holder, 1999).

Anticuerpos dirigidos contra antígenos presentes en la superficie de esporozoitos (CSP) podrían neutralizar la infectividad de la mayoría de los esporozoitos en la circulación. A su vez, los esporozoitos que invadan los hepatocitos activarían una respuesta inmune celular dirigida contra péptidos de origen parasitario expresados en la superficie de los hepatocitos. Estas respuestas celulares, asociadas o no con citocinas, y posiblemente con anticuerpos podrían destruir a los hepatocitos infectados o inactivar a los parásitos que se desarrollan en ellos. De este modo, se reduciría el número de parásitos que entran en la circulación, disminuyendo la progresión de la enfermedad (Sinnis *et al*, 1996; Doolan y Hoffman, 1997; Taylor-Robinson, 2000).

2. Las vacunas contra etapas asexuales están desarrolladas para prevenir o reducir la severidad de la infección y la enfermedad, disminuyendo la morbilidad y la mortalidad. Este tipo de vacuna es antiparasítica y puede estar encaminada a inhibir la replicación del parásito

previniendo la entrada del merozoito a los eritrocitos, o bien atacando al parásito una vez que ya esta dentro del eritrocito (Holder, 1999). Se han detectado antígenos en la superficie de merozoitos que serían el blanco de esta vacuna (MSP-1, MSP-2, MSP-3, AMA-1, EBA-175 y RAP-1, Doolan y Hoffman, 1997).

Otro tipo de vacunas antimaláricas son las antitóxicas, que se basan en el hecho de que adultos expuestos frecuentemente a la infección manifiestan síntomas leves de la enfermedad. Esto ocurre debido a la ruptura de los eritrocitos parasitados durante la liberación de merozoitos, o bien de bioproductos dañinos durante la replicación del parásito, estimula la producción de factores celulares en el huésped como el factor necrosante tumoral alfa (TNF α por sus siglas en inglés), que incrementan la patogénesis de la enfermedad. Se sabe que anticuerpos que inhiben estas toxinas reducen los síntomas de la enfermedad (Playfair *et al*, 1990; Bate *et al*, 1992). Mediante la inducción de anticuerpos neutralizantes o inhibiendo la citoadherencia de los eritrocitos parasitados se podría reducir la severidad de la enfermedad (Kwiatkowski y Marsh, 1997; Taylor-Robinson, 2000).

3. La estrategia del bloqueo de transmisión se basa en la inducción de una respuesta humoral en el huésped vertebrado contra las etapas sexuales extracelulares presentes en el vector, el micro y macrogameto, el cigoto y el oocineto (Galinski y Barnwell, 1996; Kaslow, 1997). La ingestión de gametocitos intraeritrocíticos por el mosquito al momento de la toma de sangre desencadenan el proceso de gametogénesis, esto es, la maduración de los gametocitos para convertirse en gametos y su liberación de las membranas eritrocíticas. Los gametos están expuestos a otros componentes que circulan también en la sangre tales como leucocitos, anticuerpos y complemento. Se han detectado anticuerpos dirigidos contra proteínas de la superficie de gametos que interfieren con la fertilización, inhibiendo el reconocimiento celular que además favorecen la destrucción de los gametos mediada por complemento. Ejemplos de estos antígenos son las proteínas que se expresan en etapas de prefertilización (Pfs 230, Pfs 48/45, Pfg 27/25, Pfs16, Kaslow, 1997; Doolan y Hoffman, 1997; Kwiatkowski y Marsh, 1997).

Otra estrategia de bloqueo de la transmisión es mediante anticuerpos dirigidos contra antígenos que se expresan en la etapa postfertilización (Pfs 25, Pfs 28), los cuales bloquean el desarrollo de los oocinetos y pueden interferir en el desarrollo normal de los esporozoitos (Kaslow, 1997, Doolan y Hoffman, 1997; Kwiatkowski y Marsh, 1997; Healer *et al*, 1999).

La estrategia de bloqueo de la transmisión no está dirigida a la protección directa del

receptor, sino que contribuiría a reducir la enfermedad dentro de una comunidad en su conjunto. Debido a que no se interrumpe la transmisión completamente, se ha asumido que este tipo de vacuna podría ser utilizada en áreas de baja incidencia contribuyendo a reducir la transmisión por abajo del umbral crítico requerido para mantener la población de mosquitos infectados, o bien como componente de una vacuna múltiple en combinación con componentes parasitarios de etapas asexuales en áreas de alta transmisión, orientada no solo al control sino a la erradicación de la malaria (Doolan y Hoffman, 1997; Miller y Hoffman, 1998; Taylor-Robinson, 2000).

Sin embargo, a pesar del esfuerzo llevado a cabo por numerosos investigadores en el mundo, todavía no existe una vacuna antimalárica. Esta tarea se ha visto entorpecida debido a la complejidad del ciclo de vida del parásito, a que las distintas etapas del parásito son diferentes morfológicamente y a la diversidad de antígenos, además de la inmunidad etapa específica, aunado a la carencia de conocimientos de la interacción compleja del parásito con el sistema inmune del vertebrado.

1. 5 ASPECTOS CLINICOS DE LA MALARIA

La malaria se caracteriza por paroxismos febriles que ocurren cada 48 o 72 h, según la especie de que se trate, con periodos asintomáticos sin fiebre y una tendencia a la recrudescencia en periodos de meses o años (WHO, 1996).

La severidad de la enfermedad depende de la especie y de la cepa del parásito, así como de la distribución geográfica, edad, estado nutricional y de inmunidad del individuo. Los síntomas de la enfermedad son: fatiga, dolor de cabeza, mareos, escalofríos, dolor de pecho, espalda, abdomen y huesos, anorexia, náusea, vómito, diarrea, anemia debida a la ruptura de los eritrocitos y a la eritofagocitosis y se detecta un aumento de tamaño en el bazo e hígado (Gilles y Warrel, 1993). El enfermo atraviesa por paroxismos febriles que ocurren cuando los esquizontes se rompen de manera simultánea, liberando toxinas que estimulan al huésped a producir citocinas pirógenas tales como el TNF α . Durante estos paroxismos, la temperatura se eleva hasta los 40-41°C, presentándose incluso delirios; la duración total del paroxismo es de 8 a 12 h en promedio. El intervalo del paroxismo febril está determinado por la duración del ciclo eritrocítico asexual, tienen una duración de 48 h en *P. falciparum*, *P. vivax* y *P. ovale*, produciéndose paroxismos en días alternados es decir el día 1 y 3 por lo que se conoce como fiebre terciaria. Para el caso de *P. malariae* los paroxismos se presentan los días 1 y 4 por lo que se conoce como fiebre cuaternaria

(Gilles y Warrel, 1993; Kwiatkowski y Marsh, 1997).

Después del paroxismo, el enfermo experimenta la sensación de frío, seguida de otra etapa de intenso calor. Los casos severos de la enfermedad ocasionados principalmente por *P. falciparum* se caracterizan por los siguientes trastornos: anemia severa, hipoglucemia, fallas renales, disfunción hepática, edema pulmonar, alteraciones de electrolitos en el fluido, colapso circulatorio, hemólisis intravascular intensa, ruptura del bazo y patologías cerebrales con convulsiones y coma que ocasionan la muerte (Gilles y Warrel, 1993; Galinski y Barnwell, 1996; Kwiatkowski y Marsh, 1997; WHO, 1998).

Después de varios años de exposición a la infección se ha desarrollado una inmunidad adquirida contra el parásito. La protección contra la enfermedad nunca es completa, no se sabe por que algunas infecciones son fatales y otras no. Aunque los marcadores de virulencia en el parásito no han sido identificados hay algunas indicaciones de que los parásitos difieren en virulencia. La composición genética del huésped también tiene un papel importante en la defensa contra el parásito, mientras que los mecanismos de inmunidad se desconocen todavía. Una infección con *P. falciparum* induce una variedad de respuestas, humorales y celulares, con respuestas específicas y no específicas, algunas de las cuales son protectoras. Sin embargo, el parásito desarrolla mecanismos contra estas defensas. Hasta el momento ninguna de las vacunas que se están desarrollando ha resultado ser efectiva contra la enfermedad (Leri *et al*, 1997).

2. ANTECEDENTES

Cada etapa del ciclo de vida de *P. falciparum* (esporozoitos, etapas hepáticas, asexuales y gametocitos) interactúa de manera particular con el sistema inmune del huésped. Se han identificado múltiples mecanismos de respuesta inmune tanto humoral como celular dirigidos contra las diferentes etapas del ciclo de vida de *Plasmodium*, tanto de respuesta innata como adquirida (Gilles y Warrel, 1993; Dick *et al*, 1996; Kwiatkowski y Marsh, 1997; Holder, 1999).

2.1 RESPUESTA INMUNE INMEDIATA CONTRA *Plasmodium spp.*

2.1.1 Respuesta humoral

Se han detectado anticuerpos dirigidos contra proteínas presentes en la superficie de esporozoitos en poblaciones humanas de áreas endémicas, particularmente contra la proteína circunsporozoítica que cubre la superficie del parásito esporozoito (CSP, Allsopp y Gilbert,

(Gilles y Warrel, 1993; Kwiatkowski y Marsh, 1997).

Después del paroxismo, el enfermo experimenta la sensación de frío, seguida de otra etapa de intenso calor. Los casos severos de la enfermedad ocasionados principalmente por *P. falciparum* se caracterizan por los siguientes trastornos: anemia severa, hipoglucemia, fallas renales, disfunción hepática, edema pulmonar, alteraciones de electrolitos en el fluido, colapso circulatorio, hemólisis intravascular intensa, ruptura del bazo y patologías cerebrales con convulsiones y coma que ocasionan la muerte (Gilles y Warrel, 1993; Galinski y Barnwell, 1996; Kwiatkowski y Marsh, 1997; WHO, 1998).

Después de varios años de exposición a la infección se ha desarrollado una inmunidad adquirida contra el parásito. La protección contra la enfermedad nunca es completa, no se sabe por que algunas infecciones son fatales y otras no. Aunque los marcadores de virulencia en el parásito no han sido identificados hay algunas indicaciones de que los parásitos difieren en virulencia. La composición genética del huésped también tiene un papel importante en la defensa contra el parásito, mientras que los mecanismos de inmunidad se desconocen todavía. Una infección con *P. falciparum* induce una variedad de respuestas, humorales y celulares, con respuestas específicas y no específicas, algunas de las cuales son protectoras. Sin embargo, el parásito desarrolla mecanismos contra estas defensas. Hasta el momento ninguna de las vacunas que se están desarrollando ha resultado ser efectiva contra la enfermedad (Leri *et al*, 1997).

2. ANTECEDENTES

Cada etapa del ciclo de vida de *P. falciparum* (esporozoitos, etapas hepáticas, asexuales y gametocitos) interactúa de manera particular con el sistema inmune del huésped. Se han identificado múltiples mecanismos de respuesta inmune tanto humoral como celular dirigidos contra las diferentes etapas del ciclo de vida de *Plasmodium*, tanto de respuesta innata como adquirida (Gilles y Warrel, 1993; Dick *et al*, 1996; Kwiatkowski y Marsh, 1997; Holder, 1999).

2.1 RESPUESTA INMUNE INMEDIATA CONTRA *Plasmodium spp.*

2.1.1 Respuesta humoral

Se han detectado anticuerpos dirigidos contra proteínas presentes en la superficie de esporozoitos en poblaciones humanas de áreas endémicas, particularmente contra la proteína circunsporozoítica que cubre la superficie del parásito esporozoito (CSP, Allsopp y Gilbert,

1996; Tine *et al*, 1996; Kwiatkowski y Marhs, 1997) y el antígeno LSA -1 (liver stage antigen por sus siglas en inglés, Kwiatkowski y Marhs, 1997; Doolan y Hoffman, 1997). Los niveles de anticuerpos son bajos en niños pequeños y se incrementan con la edad del individuo. Estos anticuerpos son capaces de bloquear la invasión de los esporozoitos al hepatocito o bien eliminar al esporozoito mediante opsonización o lisis mediada por complemento (Gilles y Warrel, 1993; Kwiatkowski y Marhs, 1997; Doolan y Hoffman, 1997; Holder, 1999).

Anticuerpos dirigidos contra la superficie de merozoitos y proteínas que son externalizadas del complejo apical de los organelos involucrados en el reconocimiento e invasión al eritrocito determinan un papel importante en la inmunidad contra las etapas asexuales. Estos anticuerpos de los subtipos IgG1, IgG3 e IgM pueden inhibir la invasión de los merozoitos a eritrocitos, aglutinar a los eritrocitos infectados, bloquear la maduración intraeritrocítica del parásito o permitir que mecanismos y células efectoras dependientes de la fracción Fc, por ejemplo los macrófagos, puedan eliminar las células infectadas (Jakobsen, 1995; Holder, 1999). Se han identificado por lo menos siete antígenos relevantesb asociadas con la superficie de merozoitos y ocho en el roprio y organelos apicales del micronema. Una de las proteínas mas intensamente estudiadas es la MSP-1 (merozoite surface protein por sus siglas en inglés) que es la más abundante en la superficie de merozoitos; anticuerpos contra esta proteína correlacionan con protección contra episodios clínicos de la enfermedad (Egan *et al*, 1996; Kwiatkowski y Marhs, 1997).

Los merozoitos pueden ser neutralizados por anticuerpos dirigidos contra antígenos de superficie (por ejemplo MSP-1, MSP-2, MSP-3, AMA-1, EBA-175, RAP-1). Algunos merozoitos pueden sobrevivir e invadir eritrocitos; anticuerpos contra algunos antígenos expresados en o sobre la superficie del eritrocito (tales como HRP-1, PfEMP1) pueden eliminar al eritrocito infectado o inhibir la citoadhetencia (Doolan y Hoffman, 1997).

Además, la expresión de proteínas de origen parasitario en la superficie de eritrocitos infectados es un blanco para los anticuerpos. Un ejemplo de esto es la proteína PfEMP-1 (*P. falciparum* erythrocyte membrane protein-1 por sus siglas en inglés) la cual es la principal molécula involucrada en la unión al endotelio vascular. Sin embargo, el parásito ha desarrollado la capacidad de variar antigenicamente esta proteína funcionando posiblemente como mecanismo de evasión inmune (Su *et al*, 1995; Kwiatkowski y Marhs, 1997).

La respuesta humoral contra las etapas asexuales involucra anticuerpos que aglutinan

merozoitos al momento o justo después de la ruptura de los esquizontes maduros, o bien anticuerpos que bloquean la invasión de los merozoitos al eritrocito, así como anticuerpos que eliminan al eritrocito infectado, ya sea directamente o mediante opsonización y fagocitosis subsecuente.

Los anticuerpos también pueden liberar o neutralizar las toxinas solubles del parásito. Además, se han detectado anticuerpos que evitan que los eritrocitos infectados se adhieran a las células endoteliales (citoadherencia) mediante el bloqueo de la interacción del ligando y del receptor (Doolan y Hofmann, 1997).

Se han identificado proteínas en la superficie de gametocitos, gametos y cigoto que son blanco de anticuerpos que bloquean el desarrollo del parásito (Holder, 1999). En poblaciones humanas infectadas por vía natural se han detectado anticuerpos contra las proteínas de 230 y 48/45 kDa presentes en los gametocitos, la primera esta correlacionada con supresión de la infectividad de los gametocitos a los mosquitos (Duffy y Kaslow, 1997; Kwiatkowski y Marsh, 1997). Además se han identificado anticuerpos dirigidos contra proteínas de la superficie de los gametocitos o los gametos dentro de los eritrocitos infectados, ya sea directamente o a través del complemento, o bien anticuerpos que interfieren con la fertilización, o que inhiben la transformación del cigoto a ooquineto, así como también bloquean la salida del ooquineto del estómago del mosquito (Doolan y Hoffman, 1997).

También se han detectado anticuerpos contra exoantígenos de *P. falciparum* que han sido asociados con protección contra episodios sintomáticos de la enfermedad (Jakobsen *et al*, 1991; Riley *et al*, 1992; Jakobsen, 1995).

2.1.2 Respuesta celular

El parásito una vez dentro del hepatocito es blanco de la inmunidad celular. Se han identificado antígenos específicos en las etapas hepáticas del parásito. Los antígenos de esporozoitos son procesados por las células del huésped y presentados en su superficie en combinación con moléculas del MHC (Complejo Principal de Histocompatibilidad) clase I. Esta presentación permite el reconocimiento por linfocitos T citotóxicos CD8⁺ en colaboración con células asesinas naturales (NK) y macrófagos que producen radicales de oxígeno y nitrógeno lo que permite la eliminación de la célula infectada mediante lisis directa y/o mediante la estimulación de linfocitos T CD4⁺ que producen citocinas tales como IFN γ , IL-2, IL-4 e IL-5 que

contribuyen a la eliminación del parásito intracelular. Potencialmente, cualquier proteína del parásito expresada en la etapa hepática podría estimular al sistema inmune y permitir la eliminación del parásito en esta etapa (Kwiatkowski y Marsh, 1997; Holder, 1999). Péptidos derivados de los antígenos del parásito expresados en la superficie de los hepatocitos en combinación con moléculas del MHC activan respuestas de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺. Estas respuestas de linfocitos T, con o sin asociación con citocinas y posiblemente también con anticuerpos, puede destruir a los hepatocitos infectados, eliminar o inactivar el desarrollo de los parásitos dentro de ellos (Doolan y Hoffman, 1997).

Una vez dentro del eritrocito, y debido a que estas células no expresan moléculas del complejo principal de histocompatibilidad, la eliminación del parásito por linfocitos T citotóxicos no es determinante (Holder, 1999). Se ha observado *in vitro* que esquizontes intraeritrocíticos y merozoitos libres de *P. falciparum* son fagocitados por neutrófilos polimorfonucleares, monocitos y macrófagos (Dick *et al*, 1996). Los eritrocitos infectados con esquizontes son fagocitados de manera más eficiente que aquellos que están infectados con anillos inmaduros, probablemente debido a la expresión de antígenos derivados del parásito en la superficie del eritrocito; pero la fagocitosis contra eritrocitos infectados con gametocitos es mínima (Healer *et al*, 1999).

El bazo también desempeña un papel muy importante en la protección anti-palúdica incrementando la capacidad de filtración y destrucción de los eritrocitos parasitados y mediante la inducción de linfocitos residentes de memoria T y B (Cruz-Cubas *et al*, 1993; Dick *et al*, 1996). Los macrófagos del bazo tienen un papel importante en la defensa inmune contra las etapas asexuales. La eliminación de merozoitos y eritrocitos parasitados se facilita por anticuerpos específicos, producidos bajo el control de linfocitos CD4⁺.

Aunque los gametocitos no se multiplican o causan síntomas en humanos, estos estimulan reacciones inmunes dirigidos contra ellos. Sin embargo, la reacción inmune contra los antígenos de superficie de etapas sexuales es limitada. Las estructuras internas de los gametocitos son altamente inmunogénicas pero normalmente no son alcanzadas por el sistema inmune, excepto cuando hay destrucción por daño citológico o por apoptosis (Vanham y Bisalinkumi, 1995; Doolan y Hoffman, 1997).

2.2 RESPUESTA INMUNE ADQUIRIDA CONTRA *Plasmodium spp.*

La inmunidad a *Plasmodium* requiere exposiciones repetidas al parásito, una razón de esto es la capacidad del parásito de variar los antígenos que estimulan la producción de anticuerpos que confieren protección. La protección mediada por anticuerpos es principalmente del subtipo IgG que activan las funciones citotóxicas y fagocíticas de los neutrófilos y monocitos. También hay una producción elevada de anticuerpos IgE. Sin embargo, los complejos inmunes que contienen IgE son dañinos más que protectores ya que entrecruzan los receptores de IgE (CD23) en los monocitos, originando una sobreproducción local de TNF α , uno de los principales patógenos en esta enfermedad. Los linfocitos T son esenciales para la adquisición y regulación de la inmunidad contra la enfermedad. Las principales células son los linfocitos CD4⁺ Th1 y Th2 y las células T $\gamma\delta^+$. El balance entre las citocinas producidas por los diferentes tipos celulares es crítico para el curso de la infección; el IFN γ tiene un efecto muy importante de protección (Perlmann y Troye-Blomberg, 2000).

2.2.1 Respuesta humoral

La inmunidad humoral contra la infección con *Plasmodium* necesita de una larga y continua exposición al parásito para mantenerse, esta inmunidad contra la enfermedad es específica de la especie y la etapa (Marsh, 1992).

Niños que viven en áreas rurales con la enfermedad endémica y una alta tasa de transmisión sufren varios episodios de la enfermedad en sus primeros años de vida. En áreas endémicas, un grado sustancial de protección es conferido de la madre al hijo durante un breve período, 3 a 6 meses después del nacimiento por transferencia de anticuerpos. Después viene un período de susceptibilidad máxima en infantes (18 meses a 4 años) que es el período de mayor mortalidad. Los niños mayores pueden tener parásitos en su circulación presentando pocos síntomas. Esta protección va declinando a medida que los niños crecen y durante la adolescencia (Snow *et al*, 1998).

No es del todo claro si la resistencia en neonatos es principalmente de origen fisiológico (por ejemplo eritrocitos que contienen hemoglobina fetal que no son aptos para el desarrollo del parásito o bien la leche materna que es deficiente en ácido p-aminobenzoico que es un nutriente esencial para los parásitos) o inmunológico (mediando por anticuerpos transferidos a través de la placenta, Brabin *et al*, 1990). Sin embargo, cuando los mecanismos innatos decaen, los infantes

se vuelven susceptibles a las manifestaciones clínicas de la infección. Después de repetidas exposiciones, se piensa que la inmunidad se adquiere en dos sentidos: primero el niño desarrolla mecanismos para neutralizar los efectos de las toxinas derivadas del parásito, los cuales a su vez median la liberación de pirógenos endógenos y, segundo, el niño desarrolla mecanismos que eliminan los parásitos o inhiben su replicación (Playfair *et al*, 1990). De esta manera los niños tienden a desarrollar resistencia a los efectos clínicos de la infección (inmunidad clínica) antes de que desarrollen mecanismos de control de la densidad de parásitos (inmunidad antiparasitaria, Riley, 1999). Los adultos que viven en áreas endémicas presentan menos parásitos que los niños y rara vez desarrollan los síntomas clínicos de la enfermedad, pero continuamente están infectados, aunque tienen un cierto grado de inmunidad antiparasítica (Kwiatkoski, 1992). Se han detectado anticuerpos antiesporozoitos de los subtipos IgM, IgD e IgG en individuos de poblaciones endémicas, que confieren protección contra la enfermedad (Gilles y Warrel, 1993; Jakobsen, 1995; Riley, 1999).

En las infecciones con *P. vivax* los anticuerpos contra los gametocitos pueden suprimir o aumentar la transmisión, dependiendo de los niveles de estos y la producción de citocinas puede además modular la transmisión haciendo a los gametocitos no infectivos. Las respuestas de anticuerpos contra los gametocitos son más frecuentes en personas que han experimentado uno o pocos ataques de malaria, en contra de los que han sido expuestos más frecuentemente (Karunaweera *et al*, 1992).

Anticuerpos dirigidos contra antígenos solubles pueden inhibir la activación de linfocitos T o bloquear la señal que induce la liberación de TNF α por parte de los macrófagos. Tales anticuerpos podrían neutralizar el efecto de pirógeno estimulado por estos antígenos solubles, y han sido detectados en el suero de pacientes (Jakobsen *et al*, 1991).

2.2.2 Respuesta celular

A) Respuesta inflamatoria

Como se mencionó anteriormente, el paludismo es caracterizado por ataques febriles inducidos por la liberación de pirógenos endógenos tales como el TNF α , IL-4, IL-1 e IL-6 y es acompañada de una disminución temporal y profunda de linfocitos T circulantes. Esta disminución al parecer es debida a la migración de linfocitos T periféricos al bazo e hígado (Dick *et al*, 1996).

Los parásitos inducen directamente la producción de TNF α por parte de los macrófagos, y esto inicia las respuestas pirogénicas características que se presentan durante la infección. A su vez *P. falciparum*, causante de la malaria cerebral, induce un incremento en la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales del cerebro permitiendo el secuestro de eritrocitos infectados con *P. falciparum* y la interferencia con la perfusión cerebral ocasionando el coma (Miller *et al*, 1994). Los eritrocitos infectados con *P. vivax* no se unen al endotelio y esta es la razón por la cual no causan trastornos cerebrales. A pesar de que altas concentraciones de TNF α están involucradas en la patogénesis, a concentraciones fisiológicas esta citocina tiene actividad antiparasítica (Rockett *et al*, 1992). El efecto es probablemente mediado a través de la activación de macrófagos que producen radicales tóxicos incluyendo el óxido nítrico (Anstey *et al*, 1996). De este modo, niveles bajos de TNF α , son benéficos mientras que a concentraciones altas son patogénicos.

Al igual que con el TNF α , los niveles de IFN γ , se han asociado con la resolución de la infección (Herrera *et al*, 1992). El IFN γ se produce después de las primeras 24 h de estimulación *in vitro* y los niveles se incrementan gradualmente hasta los 5 o 7 días de cultivo, esta respuesta es dependiente de IL-12, lo que sugiere que la fuente inicial de producción de esta citocina son las células NK. Es posible que el IFN γ producido por estas células pueda contribuir al control de la primera etapa de parasitemia. A su vez, la activación de las células NK correlaciona de manera positiva con los niveles de producción de IFN γ (Riley, 1999).

Sin embargo, altos niveles de IFN γ se asocian con la patología (Riley *et al*, 1991). La adquisición de inmunidad clínica ha sido asociada con una disminución en la capacidad para producir IFN γ en respuesta a los antígenos del parásito (Chizzoloni *et al*, 1990). De este modo, la resistencia o susceptibilidad a la enfermedad depende en gran medida en la inducción de niveles apropiados de TNF α e IFN γ .

La presencia de otras citocinas durante la infección con *Plasmodium* está bien documentada. En la fase aguda de la enfermedad en pacientes infectados con *P. falciparum* se han detectado niveles altos de TNF α , IL-1, IL-1 α , IL-6, IFN γ , IL-4 e IL-10 (Cruz-Cubas *et al*, 1994; Jakobsen *et al*, 1997). A su vez, se ha encontrado que los exoantígenos estimulan la producción de TNF α , IL-6, IL-2 e IFN γ (Luty *et al*, 1994; Fell *et al*, 1994). En sobrenadantes de cultivo con monocitos, células mononucleares periféricas y parásitos se encontraron altos niveles

de IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-10 y en menor cantidad IL-2, IL-4 e IFN γ (Wahlgren *et al*, 1995).

En infecciones agudas con *P. vivax*, en pacientes no inmunes, se ha observado un nivel elevado de TNF α durante los paroxismos coincidiendo con la ruptura de los esquizontes. Durante estos episodios hay una disminución de la infectividad de los parásitos (gametocitos) a los mosquitos. La pérdida de infectividad durante el paroxismo se debe a que son eliminados los gametocitos intraeritrocíticos circulantes, esto es mediado por el TNF α en conjunto con otros factores del suero no identificados. Estos efectos pueden ser contrarrestados por la adición de un anticuerpo policlonal contra el TNF α . En las infecciones producidas por *Plasmodium spp.* la ruptura de los eritrocitos conteniendo esquizontes durante la esquizogonia permite la liberación de exoantígenos del parásito los cuales estimulan a las células mononucleares para producir TNF α . Los sobrenadantes de esos cultivos tomados después de 48 h de incubación tienen un potente efecto para matar los parásitos y estos efectos se contrarrestan mediante la adición de anticuerpos anti TNF α (Mendis y Carter, 1992).

B) Inmunosupresión

Se han reportado alteraciones en la competencia de la respuesta inmune en pacientes infectados con *Plasmodium* durante la etapa aguda de la enfermedad, provocando una inmunosupresión. Este fenómeno se ha demostrado *in vitro* estimulando a linfocitos de pacientes con antígenos o mitógenos (Mendis y Carter 1995). Durante esta etapa hay una disminución temporal pero profunda en el número de linfocitos circulantes, y se cree que esto es debido a la migración de células de la circulación a órganos tales como el bazo e hígado (Langhorne *et al*, 1992). Riley *et al* (1989) reportaron que los antígenos de *Plasmodium* son los responsables de esta inmunosupresión, ya que extractos de esquizontes disminuyeron la respuesta proliferativa a antígenos no palúdicos y a mitógenos en CMC de pacientes en etapa aguda, sugiriendo una inmunosupresión no específica durante la malaria aguda. Esta inmunosupresión podría ser debida a anticuerpos linfocitotóxicos, o bien a un incremento de linfocitos CD8⁺ supresores y a una activación defectuosa de linfocitos T cooperadores. Se ha sugerido que los macrófagos pueden presentar diferentes alteraciones funcionales durante la fase aguda de la enfermedad, tales como un retraso en la capacidad de movilidad y activación, disminución en la capacidad para presentar antígenos, además de una alteración en la capacidad para producir citocinas, lo que estaría contribuyendo a la inmunosupresión (Riley *et al*, 1989;, Alves *et al*, 1992). La falta de

proliferación de los linfocitos se ha asociado con una producción deficiente de IL-1 por los monocitos. En individuos infectados con *P. falciparum* y *P. vivax* durante la etapa aguda la respuesta proliferativa de los linfocitos en respuesta a la fitohemaglutinina A (PHA) fue mínima en comparación con la respuesta de los controles no infectados (Alves *et al*, 1992). Se ha sugerido que esta falta de respuesta se debe a una producción insuficiente de citocinas estimuladoras tales como IL-1, IL-6 e IFN γ por parte de los monocitos y macrófagos.

C) Respuesta proliferativa

Se han reportado incrementos en el número absoluto y relativo de linfocitos T $\gamma\delta^+$ en infecciones causadas por *P. falciparum* (Ho y Webster, 1990), así como un incremento de estas células durante los paroxismos febriles causados por *P. vivax* (Perera *et al*, 1994; Goodier *et al*, 1995). A su vez se ha observado la expansión de linfocitos $\gamma\delta^+$ en pacientes infectados con *P. falciparum* y *P. vivax* en etapa aguda. Las células que proliferaron principalmente fueron del fenotipo V $\delta 2^+$ seguidas de V $\delta 1^+$. Estas células continuaron expandiéndose por 2 meses después de la infección (Schwartz *et al*, 1996).

Elloso *et al* (1996), empleando CMC estimuladas con antígenos de etapas asexuales de *P. falciparum*, encontraron que la proliferación máxima de linfocitos $\gamma\delta^+$ ocurre después de la proliferación máxima de linfocitos $\alpha\beta^+CD4^+$. Si se eliminan los linfocitos $\alpha\beta$ antes de la estimulación con el antígeno se reduce de manera significativa la proliferación de los $\gamma\delta^+$, lo que sugiere que los linfocitos $CD4^+$ estarían ayudando a los $\gamma\delta^+$ a responder contra el antígeno. Pero si se eliminan los linfocitos $\gamma\delta^+$ no se altera la expansión de los $CD4^+$. Si se agrega IL-2 o IL-5 se restaura la capacidad de los $\gamma\delta^+$ para proliferar en aquellos cultivos depletados de las células $CD4^+$. Además, anticuerpos monoclonales específicos contra las subunidades α y β del receptor de IL-2 inhiben la expansión de linfocitos $\gamma\delta^+$ en cultivos estimulados con antígenos. Lo que sugiere que la proliferación de linfocitos $\gamma\delta^+$ en respuesta al antígeno de paludismo es dependiente de la presencia de células $\alpha\beta^+CD4^+$, pero el requerimiento de estas células es mediante citocinas que usan el receptor de IL-2.

La habilidad de los parásitos causantes del paludismo de inducir proliferación de linfocitos T en personas que nunca han sido expuestas a estos antígenos ha sido ampliamente reportada. Dick *et al* (1996) reportaron que CMC de sujetos no palúdicos proliferaron en

respuesta a un extracto de esquizontes de *P. falciparum* pero no a los ERNI. Las células que respondieron fueron CD3⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺, CD4⁺, CD45RO⁺ y se produjo IFN γ e IL-2R. Waterfall *et al* (1998) observaron que CMC de donadores no expuestos proliferaron en respuesta a extractos de esquizontes de *P. falciparum* y a sobrenadantes de cultivo de éstos, las células que respondieron fueron linfocitos $\alpha\beta$ ⁺ CD4⁺, mientras que con esquizontes vivos respondieron los linfocitos $\gamma\delta$ ⁺. Los esquizontes vivos pero no los extractos indujeron la producción de IL-2 a 5 días de estimulación. Los linfocitos $\gamma\delta$ ⁺ se activaron en presencia de los extractos solo cuando se les agregó IL-2. Estos resultados sugieren que la inducción de IL-2 por los parásitos vivos contribuye a activar a la población de linfocitos $\gamma\delta$ ⁺.

Linfocitos $\gamma\delta$ ⁺ de individuos no palúdicos, específicamente del subtipo V γ 9⁺, respondieron a esquizontes de *P. falciparum* *in vitro*. La respuesta de estas células al antígeno fue inhibida por anticuerpos anti-MHC clase I y II. Sin embargo, la inhibición por anticuerpos anti-MHC Clase II se revierte por la adición de IL-2, mientras que la inhibición por anticuerpos anti-clase I no se revierte. Los linfocitos CD4⁺ también se activan en respuesta a estos antígenos. Considerando lo anterior, se ha sugerido que los linfocitos $\gamma\delta$ ⁺ que por si mismas no reconocen moléculas del MHC clase II, requieren de una respuesta clase II dependiente que estaría dada por las células T CD4⁺. Estas últimas proveerían las citocinas necesarias para la activación, crecimiento y división de las células V γ 9⁺ que reconocen componentes del parásito y moléculas del MHC clase I (Morris-Jones *et al*, 1996). En base a estos datos, se ha sugerido que los linfocitos $\gamma\delta$ ⁺ tienen un papel importante en la respuesta inmune contra *P. falciparum*, funcionando como células citotóxicas no restringidas al MHC dirigidas contra los parásitos intraeritrocíticos. Las citocinas producidas por estos pueden inducir, a su vez, la producción de citocinas inflamatorias tales como TNF α e IL-6 y contribuir a la inmunopatología de la enfermedad (Ho *et al*, 1994), por lo anterior, a los linfocitos $\gamma\delta$ ⁺ se les han atribuido funciones inmunoregulatorias (Rzepczyck *et al*, 1997); además, producen perforina y esterases de serina (Elloso *et al*, 1994). A su vez, se ha reportado que linfocitos $\gamma\delta$ ⁺ inhiben el crecimiento de las etapas asexuales, mientras que los $\alpha\beta$ ⁺ activados no lo hacen, por lo que se ha sugerido que los linfocitos $\gamma\delta$ ⁺ desempeñan un papel importante en la eliminación de parásitos de *Plasmodium* (Troye-Blomberg *et al*, 1999).

2.3 RESPUESTA INMUNE CONTRA LOS GAMETOCITOS DE *Plasmodium spp.*

En contraste con la gran cantidad de información referente a la respuesta del huésped a las etapas asexuales del parásito, muy poco se sabe acerca de la respuesta humoral y celular contra los gametocitos. Antes de alcanzar la madurez, los gametocitos atraviesan por un desarrollo complejo (gametocitogénesis) el cual permanece poco entendido (Sinden, 1996; Lobo y Kumar, 1998). Estos están inmersos en el ambiente circulatorio que por medio de la estimulación provocada por las etapas asexuales es policlonal, con respuestas tipo Th2 y con un incremento de linfocitos $\gamma\delta^+$ y $CD8^+$ (Mendis y Carter, 1995).

Una vez que la célula recibe la señal para el inicio de la gametocitogénesis, se activan nuevas vías de desarrollo que involucran el cese del ciclo asexual y la activación de nuevos patrones de transcripción y síntesis de proteínas y glicolípidos (Day *et al*, 1998). Sinden (1983) reportó la síntesis de al menos 26 proteínas durante la etapa III a V de gametocitos, seis de las cuales son exclusivas de los gametocitos.

El desarrollo de los gametocitos se ha dividido en 5 etapas, cada una de las cuales está acompañada de cambios en la organización celular acompañados del ensamblaje de filamentos de actina y microtúbulos (Alano y Carter, 1990; Lobo y Kumar, 1998). Durante la maduración, las etapas I-IV están secuestradas y la etapa V de gametocitos aparece en circulación después de 8 a 14 días, y requieren de 3 días más para ser infectivos al mosquito y en el caso de *P. falciparum* pueden permanecer en esta etapa durante varias semanas (Day *et al*, 1998). Durante la etapa I de *P. falciparum* los gametocitos tienen forma redonda y son prácticamente indistinguibles de los trofozoitos. En la etapa II A (día 3) el gametocito pierde su forma redondeada y empieza a elongarse; al quinto día tiene forma oval, y ya se pueden distinguir los macrogametocitos de los microgametocitos (etapa III); en la etapa IV son simétricos, tienen forma elongada y delgada, el macrogametocito presenta mayor concentración de ribosomas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y mitocondrias, finalmente en la etapa V adquieren forma de salchicha y el eritrocito ya está completamente deformado (Day *et al*, 1998; Lobo y Kumar, 1998).

Se ha reportado que los eritrocitos infectados con gametocitos inmaduros expresan ligandos de citoadherencia derivados de los parásitos, permitiendo así que los gametocitos puedan refugiarse en los vasos sanguíneos (Rogers *et al*, 1996). Además, se sabe que hay cambios en el perfil de citoadherencia de los gametocitos a medida que estos van madurando. Los

gametocitos inmaduros y las etapas asexuales se unen a la molécula CD36 mientras que los gametocitos de etapas maduras no lo hacen, lo que sugiere que hay pérdida del ligando original de citoadherencia de la superficie de gametocitos de segunda etapa. Sin embargo, *in vivo* los gametocitos de etapa II a IV continúan adhiriéndose por lo que pueden expresar otros ligandos en la superficie de los eritrocitos infectados (Day *et al*, 1998). Estudios *post mortem* en humanos y en modelos animales revelan que el secuestro de gametocitos se da principalmente en el bazo y en médula ósea (Smalley *et al*, 1980). Recientemente se ha encontrado que las moléculas ICAM-1, CD49c, CD166 y CD164 actúan como posibles receptores de células de la médula ósea para la adhesión de los gametocitos (Rogers, 2000).

La Tabla 1 resume las proteínas específicas de gametocitos que han sido identificadas en *P. falciparum* y en *P. vivax* así como su posible función.

2.3.1 Respuesta humoral

Se han detectado anticuerpos contra las proteínas extracelulares de gametocitos de *P. falciparum* que pueden inhibir la infectividad de los gametocitos a los mosquitos. Estos antígenos han sido propuestos como candidatos para incluirse en una vacuna para el bloqueo de la transmisión. Uno de los posibles mecanismos para el bloqueo de la transmisión es mediante la lisis de gametos mediada por complemento y anticuerpos (Healer *et al*, 1997).

Además, se ha detectado que anticuerpos IgG obtenidos de suero hiperinmune de pacientes infectados con *P. falciparum* reconocen la superficie de gametocitos de etapas tempranas (etapa I a II-A) pero no etapas posteriores (Day *et al*, 1998).

En individuos infectados con *P. falciparum* se detectaron anticuerpos contra la proteína Pf 11-1 que participa en el proceso de ruptura de los eritrocitos durante la gametogénesis (Scherf *et al*, 1992). A su vez, empleando sueros de pacientes de áreas endémicas infectados con *P. falciparum* se detectaron anticuerpos contra las proteínas Pfs 230 y Pfs 48/45 kDa que se sintetizan durante la maduración del gametocito en el huésped vertebrado y están expresadas en la superficie del parásito intracelular. Los anticuerpos que median la lisis de los gametos detectados en los sueros fueron IgG1 y/o IgG3 dirigidos contra las proteínas de superficie de los gametos (Healer *et al*, 1997). La proteína de Pfs 230 es el blanco principal de anticuerpos que fijan complemento y esto es importante en el bloqueo de la transmisión mediado por anticuerpos (Alano y Carter, 1990; Riley *et al*, 1995; Roeffen *et al*, 1995; Healer *et al*, 1997).

Tabla 1. Proteínas específicas de gametocitos de *Plasmodium spp.*

Proteína	Especie	Ubicación	Función	Referencias
Pf 11-1	<i>P. falciparum</i>	membrana de la vacuola parasitófora de micro y macrogametocitos	contribuye a la ruptura del eritrocito durante la gametogénesis	Kumar y Carter, 1984 Scherf <i>et al</i> , 1993
Pf 16	<i>P. falciparum</i>	vacuola parasitófora de macrogametos, en zigotos y esporozoitos	bloqueo de la transmisión, candidato a vacuna	Bruce <i>et al</i> , 1994
Pvs 20	<i>P. vivax</i>	gametocitos	desconocida	Premawansa <i>et al</i> , 1994
Pvs 24	<i>P. vivax</i>	gametocitos	desconocida	Premawansa <i>et al</i> , 1994
Pf 25	<i>P. falciparum</i>	citoplásmica, se expresa en la superficie de gametos, zigoto y ooquineto	bloqueo de la transmisión	Targett, 1990 Duffy y Kaslow, 1997
Pvs 25	<i>P. vivax</i>	gametocitos	bloqueo de la transmisión	Hisaeda <i>et al</i> , 2000
Pfg 27	<i>P. falciparum</i>	en gametocitos desde etapas tempranas, abundante en la etapa II	bloqueo de la transmisión	Contreras <i>et al</i> , 1998 Lobo y Kumar, 1998
Pvs 28	<i>P. vivax</i>	gametocitos	bloqueo de la transmisión	Hisaeda <i>et al</i> , 2000
Pfs 32	<i>P. falciparum</i>	citoplasma de micro y macrogametocitos	desconocida	Alano <i>et al</i> , 1991 Lobo <i>et al</i> , 1994
Pfs 40	<i>P. falciparum</i>	membrana del parásito	desconocida	Rawlings <i>et al</i> , 1992
Pv 42/37	<i>P. vivax</i>	citoplasma de macrogametocitos	desconocida	Premawansa <i>et al</i> , 1994
Pf 48/45	<i>P. falciparum</i>	en citoplasma de micro y macrogametocitos, abundante en la etapa III, se expresa en la superficie de gametos	bloqueo de la transmisión	Healer, 1997 Milek <i>et al</i> , 1998 Lobo y Kumar, 1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Alfa tubulina II 50 kDa	<i>P. falciparum</i>	en el axonema de microgametocitos a partir de etapa III	participa en los cambios morfológicos que ocurren durante la exflagelación y en la motilidad del parásito	Rawlings <i>et al</i> , 1992 Silvestrini <i>et al</i> , 2000
Pvs 57	<i>P. vivax</i>	gametocitos	desconocida	Premawansa <i>et al</i> , 1994
Pf 77	<i>P. falciparum</i>	citoplasma de macrogametocitos	desconocida	Baker <i>et al</i> , 1995
Pfs 83	<i>P. falciparum</i>	citoplasma de macrogametocitos	desconocida	Kumar y Carter, 1984
Pf 120	<i>P. falciparum</i>	citoplasma de micro y macrogametocitos	desconocida	Vermeulen <i>et al</i> , 1986
Pf 205	<i>P. falciparum</i>	citoplasma de macrogametocitos	desconocida	Kumar y Carter, 1984
Pf s230	<i>P. falciparum</i>	citoplasma, micro y macrogametocitos, abundante en la etapa III, se expresa la superficie de gametos	bloqueo de la transmisión	Targett, 1990 Healer <i>et al</i> , 1997 Roerffen <i>et al</i> , 1995 Lobo y Kumar, 1998
PfEMP-1	<i>P. falciparum</i>	en la superficie de eritrocitos infectados con trofozoitos y en las primeras etapas de gametocitos	regular la producción de gametocitos, induciendo la maduración de estos	Piper <i>et al</i> , 1999
Pfg 377	<i>P. falciparum</i>	en macrogametocitos maduros	desconocida	Silvestrini <i>et al</i> , 2000

Para el caso de *P. vivax*, se han detectado anticuerpos contra las proteínas recombinantes Pvs 25 y Pvs 28 que son candidatos para el bloqueo de la transmisión (Hisaeda *et al*, 2000). Estas proteínas fueron expresadas en levaduras y secretadas como proteínas recombinantes y ratones vacunados contra estas proteínas desarrollan una fuerte respuesta de anticuerpos. El antisuero contra estas proteínas recombinantes reconocen a estas moléculas en gametocitos cultivados *in vitro* aislados de pacientes infectados con *P. vivax*. El desarrollo del parásito se inhibió completamente cuando estos antisueros fueron ingeridos por los mosquitos en una comida de sangre.

Durante la infección aguda con *P. vivax*, la mayoría de los individuos desarrollan una inmunidad que suprime la infectividad de los gametocitos a los mosquitos. Esta inmunidad es mediada por anticuerpos y esta dirigida contra los parásitos en el intestino del mosquito justo después de la comida de sangre (Mendis et al, 1987; Carter y Mendis, 1991).

Con las proteínas de gametocitos de *P. vivax* se ha detectado un mayor polimorfismo entre los antígenos de superficie de gametos. Infecciones naturales con *P. falciparum* inducen respuestas de anticuerpos contra proteínas presentes en la superficie de los gametocitos y en los gametos que pueden inhibir la infectividad de los gametocitos a los mosquitos, pero esta respuesta puede involucrar la reactividad con una serie de epítopes diferentes, interacciones entre anticuerpos y puede ser secuencial (Targett, 1990).

2.3.2 Respuesta celular

La existencia de una respuesta celular contra las etapas sexuales fue demostrada por primera vez por Harte *et al* (1985) evidenciando una inmunidad bloqueadora de la transmisión del parásito en ratones. Respuestas inmunes de tipo celular tanto específicas como no específicas dirigidas contra los gametocitos de *P. falciparum* y *P. vivax* han sido identificadas en poblaciones humanas infectadas naturalmente (Riley *et al*, 1990; Baird *et al*, 1991). Riley *et al* (1990) estimularon con lisados de gametocitos CMC de pacientes infectados con *P. falciparum*. Estas células respondieron proliferando y produciendo IFN γ , además se detectaron anticuerpos antigametocitos en el suero de estos pacientes. Estas CMC proliferaron además al ser estimuladas con la proteína Pf 48/45 pura. En individuos no palúdicos, la respuesta a los gametocitos fue baja.

En infecciones agudas con *P. vivax*, y durante los paroxismos clínicos, se ha detectado una disminución de la infectividad de gametocitos asociada con un decremento en el número de microgametocitos y no de macrogametocitos, circulando en sangre (Ramsey *et al*, 1996) y ha sido relacionado con niveles elevados de TNF α y de IFN γ en la sangre y con otros factores todavía no identificados presentes en el suero del huésped (Mendis y Carter, 1992; Naonature *et al*, 1991). En preparaciones de linfocitos periféricos de pacientes inmunes estimulados con lisados gametocitarios se han identificado respuestas proliferativas y productivas de IFN γ *in vitro* (Scherf *et al*, 1993) y se ha documentado *in vitro* e *in vivo* que el nitrógeno reactivo disminuye la infectividad de los gametocitos a mosquitos. Niveles elevados de TNF α no parecen tener efecto en ensayos de toxicidad (Motard *et al*, 1993).

Healer *et al* (1999) reportaron que monocitos y macrófagos así como linfocitos polimorfonucleares pueden fagocitar gametos extracelulares *in vitro*. Sin embargo, la fagocitosis de los gametocitos maduros intracelulares es muy ineficiente, lo que apoya la evidencia que muy pocos antígenos específicos del parásito en esta etapa están expresados en la superficie del eritrocito. *In vitro* la fagocitosis se correlacionó de manera positiva con los niveles de anticuerpos IgG1 contra las proteínas Pfs 230 y Pfs 48/4.

Goodier y Targett (1997) empleando CMC de donadores no palúdicos encontraron que los gametocitos de *P. falciparum*, al igual que los trofozoitos inmaduros preferencialmente activan a linfocitos CD4⁺, pero no detectaron activación de $\gamma\delta^+$.

Estos pocos estudios reflejan la falta de conocimientos respecto a la respuesta inmune humoral y celular específica contra los gametocitos y su papel en la regulación de la gametocitogénesis, de los niveles de gametocitos en la circulación y de la infectividad.

2.4 EXOANTIGENOS

Los exoantígenos o antígenos solubles son proteínas liberadas al plasma o al medio de cultivo cuando los eritrocitos infectados se rompen. Alternativamente, estas moléculas pueden ser secretadas del eritrocito infectado durante la maduración del parásito o bien ser liberadas de los merozoitos durante la invasión al eritrocito (Jakobsen, 1995; Hommel, 1997).

Los exoantígenos fueron detectados por primera vez en 1968 en el plasma de pacientes infectados con *P. falciparum* y han sido divididos en grupos de acuerdo a su estabilidad al calor así como a su punto isoeléctrico (Jakobsen, 1995). Se ha sugerido que tienen características comunes con las endotoxinas bacterianas tales como los LPS (Riley *et al*, 1991). Algunos de estos exoantígenos son glicoproteínas (ver Tablas 2 a 4, Jakobsen, 1995) y se ha reportado que algunos contienen fosfolípidos que se pueden unir a la membrana del eritrocito por interacciones hidrofóbicas (Bate *et al*, 1990).

En las Tablas 2 a 4 se resumen los exoantígenos de *P. falciparum* y *P. vivax* reportados hasta el momento, así como sus características principales. A su vez, en la Figura 2 se muestra la localización de algunos exoantígenos de *P. falciparum* antes de su liberación. Hasta el momento, los exoantígenos identificados y reportados en la literatura provienen de etapas asexuales.

Los exoantígenos pueden facilitar la entrada de los merozoitos al eritrocito, y se cree además que se liberan para evadir al sistema inmune. Otros han sido considerados como

productos de desecho y pueden inducir reacciones de protección o dañinas (Jakobsen, 1995) como se verá mas adelante.

Los exoantígenos son capaces de inducir una respuesta humoral. Existen evidencias de que en monos vacunados con sobrenadantes de cultivo de *P. falciparum* se induce una inmunidad protectora contra el cuadro clínico agudo (James, 1989). El potencial de los exoantígenos como herramientas de inmunodiagnóstico ha sido sujeto de numerosos estudios. Algunos exoantígenos de *P. falciparum* han sido propuestos como candidatos para incluirlos en una vacuna tales como el GBP, PfHRPII, PfMSP-1, RESA y SERP (Jakobsen, 1995; Holder, 1999; Taylor-Robinson, 2000). La vacunación con exoantígenos podría proporcionar un medio de protección contra los efectos clínicos de la enfermedad generando una inmunidad anti-enfermedad mediante la reducción en la producción de citocinas. Sin embargo, para tal fin sería necesario que estos exoantígenos tengan la habilidad de estimular linfocitos T y generar memoria (Bate *et al*, 1992, Holder, 1999).

Se han detectado anticuerpos anti RESA del tipo IgG (prevalencia de 42.7%) e IgM (prevalencia de 45%) en niños de Africa infectados con *P. falciparum* en etapa aguda (Chumpitazi *et al*, 1996). A su vez, en pacientes adultos se detectaron anticuerpos del subtipo IgG2 e IgM dirigidos contra exoantígenos de *P. falciparum* en pacientes agudos (Ferreira *et al*, 1994). Los anticuerpos contra los exoantígenos pueden conferir protección mediante la aglutinación de merozoitos, inhibiendo la invasión de los merozoitos a los eritrocitos, o bien bloqueando la maduración del parásito, además de colaborar con las células fagocíticas (Jakobsen, 1995).

Los exoantígenos son capaces de activar a diferentes células del sistema inmune. Exoantígenos activan neutrófilos y monocitos *in vitro* resultando en la producción de radicales libres (Kharazmi *et al*, 1987). Exoantígenos individuales Ag1, Ag 2, Ag7, PfMSP-1, PfHSP70, RESA, GLURP, RAP-1 y SERP activan linfocitos en individuos expuestos (Riley *et al*, 1988; Rzepczyk *et al*, 1989; Jakobsen *et al*, 1990; Jakobsen *et al*, 1991; Jakobsen *et al*, 1993; Jakobsen *et al*, 1994). A su vez, los exoantígenos estimulan la producción de citocinas por parte del huésped tales como TNF α , IFN γ , IL-1 e IL-6 (Taverne *et al*, 1990; Karunaweera *et al*, 1992; Jakobsen *et al*, 1993; Kristensen y Jakobsen, 1996), además de mecanismos que involucran radicales de oxígeno, derivados de óxido nítrico y peróxido (Jakobsen, 1995). Esta respuesta por un lado es benéfica para la eliminación del parásito y por el otro, es responsable de muchas de las

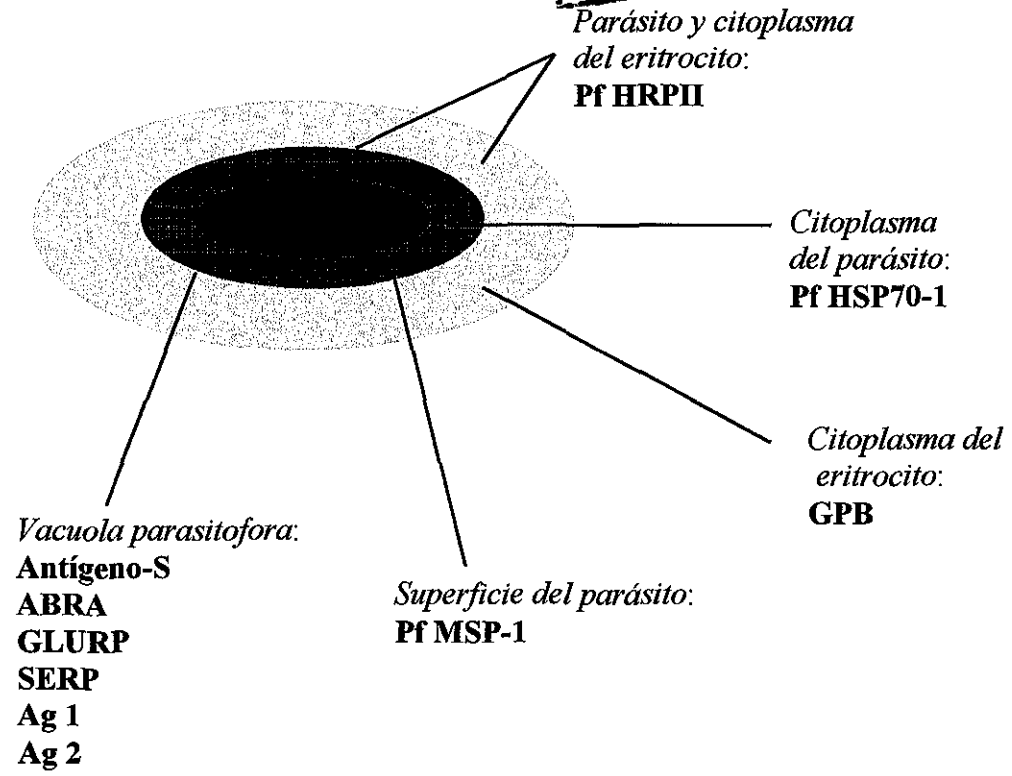
patologías de la enfermedad como lo es la producción de fiebre (Bate *et al*, 1992; Jakobsen *et al*, 1995). Los exoantígenos, a través de un componente de fosfolípidos estimulan a los macrófagos de ratón a secretar TNF α . El componente activo que estimula su producción contiene fosfato unido a inositol. Los exoantígenos de *P. yoelii* destoxificados por defosforilación o digestión con lipasas no inducen la producción de TNF α . Dos diferentes partes de la molécula están involucrados en esta inducción: uno requiere la presencia de fosfato unido a inositol y el otro no (Bate *et al*, 1992).

Exoantígenos obtenidos de eritrocitos parasitados con *P. vivax* estimulan a macrófagos a producir TNF α (Bate *et al*, 1992; Jagadeesan *et al*, 1999). El antisuero obtenido contra estos exoantígenos inhibe su secreción y también inhibe la actividad de los exoantígenos de *P. falciparum* y de *P. yoelii*, lo que estaría indicando que los exoantígenos de diversas especies comparten epítopes comunes (Bate *et al*, 1990; Bate *et al*, 1992). Sin embargo, cuando los exoantígenos son purificados mediante detergentes o a partir de eritrocitos infectados, no se produce TNF α y baja la secreción de IL-6 indicando que se requiere además de otros componentes (Jakobsen *et al*, 1993; Jakobsen *et al*, 1994). Los componentes proteicos y fosfolípidicos de los exoantígenos podrían participar en la inducción de la enfermedad. Las proteínas pueden incrementar la patología de la enfermedad inducida por los fosfolípidos estimulando a los linfocitos T a secretar IFN γ haciendo a los macrófagos más responsivos a la estimulación por los fosfolípidos (Jakobsen, 1995).

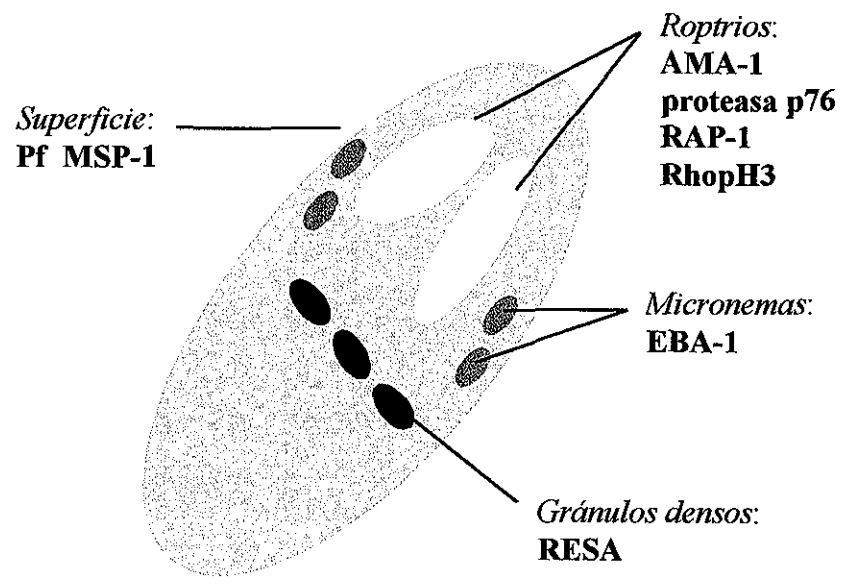
A su vez, se sabe que exoantígenos de *P. falciparum* y *P. berghei* inducen la proliferación de células de bazo y de médula ósea murinas y la producción de IFN γ en cultivos de 5 días *in vitro*, así como la expansión de células CD3⁺. Estos exoantígenos de diferentes especies pueden inducir una proliferación significativa y liberación de citocinas tipo Th1 en células murinas independientemente de la exposición previa (Bordmann *et al*, 1997).

Eritrocito infectado con un trofozoito

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Merozoito



RESA Y RHOP3 están insertados en la membrana del eritrocito después de la invasión del merozoito.

Figura 2. Exoantígenos de *Plasmodium spp.*

Tabla 2. Exoantígenos de *Plasmodium spp.* que se originan del parásito o del citoplasma del eritrocito.

Exoantígeno	Peso molecular (kDa)	Características	Función	Glicosilación	Procesamiento (fragmentos en kDa)	Referencias
PFHSP70-1	75	pertenece a la familia de proteínas de choque térmico (HSP)	selección de proteínas para degradación dentro de la célula	si	no	Bianco <i>et al.</i> , 1986 Kumar <i>et al.</i> , 1990
PFHRPII	60-105	se localiza en el citoplasma de los eritrocitos, se ha detectado en los gametocitos etapas I y II, proteína rica en histidinas	puede unir radicales libres de oxígeno e inhibir la eliminación del parásito mediada por fagocitosis, además facilita el transporte de hemoglobina a la vacuola alimenticia	si	?	Panton <i>et al.</i> , 1989 Hayward <i>et al.</i> , 2000
GBP	105-120	unida a glicoforina en la membrana del eritrocito	probablemente interviene en la invasión del merozoito	no	algunas veces	Perkins, 1988

Tabla 3. Exoantígenos de *Plasmodium spp.* que se originan en el espacio de la vacuola parasitófora.

Exoantígeno	Peso molecular (kDa)	Características	Función	Glicosilación	Procesamiento (fragmentos en kDa)	Referencias
Antígeno-S	90-220	presenta una alta diversidad	desconocida, probablemente en mecanismos de evasión inmune	?	no	Brown <i>et al.</i> , 1987 Bickle y Coppel, 1992
SERP	26-136	proteína rica en serinas	proteínasa activa durante la ruptura de esquizontes o la invasión de merozoitos	?	si (50, 47 y 18)	Debrabant <i>et al.</i> , 1992
GLURP	220	proteína rica en glutamato	desconocida	?	no	Borre <i>et al.</i> , 1991
ABRA	102	proteína ácido-básica repetitiva	probablemente como proteasa	no	?	Weber <i>et al.</i> , 1988
Ag 1	60	se une a lectina, se localiza en la superficie de trofozoitos y esquizontes	desconocida	si	no	Jakobsen <i>et al.</i> , 1990
Ag 2	120-136	sintetizado exclusivamente por esquizontes	desconocida	si	no	Jakobsen <i>et al.</i> , 1991

Tabla 4. Exoantígenos de *Plasmodium spp.* que se originan de merozoitos.

Exoantígeno	Peso molecular (kDa)	Características	Función	Glicosilación	Procesamiento (fragmentos en kDa)	Referencias
PfMSP-1	185-205	se expresa en la superficie de eritrocitos infectados con trofozoitos y etapas tempranas de gametocitos	media la unión inicial de los merozoitos a los eritrocitos en el proceso de invasión, bloqueo de la transmisión	si	si (83, 42 y mas)	Herrera <i>et al</i> , 1993 Holder <i>et al</i> , 1999
PvMSP-1	185	se localiza en la superficie de merozoitos	participa en la invasión del merozoito al eritrocito, candidato a vacuna	si	?	Bamwell <i>et al</i> , 1999
RESA	155	se une a glicoforina y espectrina	desconocida	?	no	Foley <i>et al</i> , 1990 Culvenor <i>et al</i> , 1991
AMA-1	80	proteína altamente conservada en varias especies	desconocida	?	si (62)	Thomas <i>et al</i> , 1990
RAP-1	82		desconocida	no	si (65)	Jakobsen <i>et al</i> , 1993

Rhoph3	110	forma parte de un complejo de proteínas del roptrio, se ha detectado en sobrenadantes libre o como complejo	se une a la superficie del eritrocito, participa en el proceso de invasión del merozoito al eritrocito	no	si (105)	Sam-Yellowe y Perkins, 1990
Proteasa p76	83	serina proteasa	rompe la proteína llamada banda III del eritrocito, puede romper la unión de la banda III al citoesqueleto del eritrocito durante la invasión del merozoito	?	si (76)	Braun-Breton <i>et al</i> , 1992
EBA-1	175	se une a glicoforina A	se une a los eritrocitos y a los merozoitos funcionando como puente entre ellos	no	no	Orlandi <i>et al</i> , 1992
Pv MSP-1	42	con un grupo glicosilfosfatidilinositol	?	si	?	Longacre <i>et al</i> , 1994

2.5 LINFOCITOS T $\gamma\delta^+$

La caracterización de los linfocitos $\gamma\delta^+$ es relativamente reciente y aún es mucho lo que se desconoce sobre ellos. Se sabe que existen en todas las especies que tienen sistema linfoide, encontrándose en sangre y en otros tejidos, sugiriendo que confieren una ventaja evolutiva. En la sangre humana constituyen del 1 al 5% de las CMC y se dividen en dos subtipos principales: V γ 9V δ 2 y V δ 1 (Rzepczyk *et al*, 1997). Secretan citocinas tales como IL-2, IL-3, IL-4 e IL-5, IFN γ , TNF α y β , GM-CSF y TGF β (Moore *et al*, 2000). Los linfocitos $\gamma\delta^+$ tienen un papel centinela, participan en el monitoreo de la integridad celular, detectando y destruyendo células infectadas o transformadas (Worku *et al*, 1997), y desempeñan un papel muy importante en la respuesta a la infección con patógenos intracelulares causantes de listeriosis (Skeen *et al*, 2001), paludismo (Pichyangkul *et al*, 1997), toxoplasmosis y leishmaniasis (Saha *et al*, 1999). Son un componente crítico en la respuesta inflamatoria contra infecciones con micobacterias (Moore *et al*, 2000), y también participan en la respuesta inmune contra diversos virus como VIH, herpes, vaccinia, estomatitis vesicular, influenza, activándose y migrando a los sitios de replicación viral (Sciammas y Bluestone, 1999). Esta protección podría deberse a la citotoxicidad directa sobre los microorganismos seguido del reconocimiento de ligandos específicos del parásito o a través de la citotoxicidad sobre células infectadas o células con estrés como resultado de la expresión de proteínas de estrés. Otros mecanismos de protección pueden involucrar la secreción de citocinas que promuevan la activación de otros mecanismos inmunes como la inmunidad celular (Dieli *et al*, 2000).

Existe una controversia sobre el hecho de que estas células expresan en su superficie correceptores como el CD4 $^+$ o CD8 $^+$. La mayoría de linfocitos $\gamma\delta^+$ humanos y de ratón son CD4 $^-$ CD8 $^-$. Sin embargo, más del 80% de los linfocitos $\gamma\delta^+$ esplénicos de rata expresan una isoforma de CD8 (Straube y Hermann, 2000) y linfocitos $\gamma\delta^+$ CD8 $^+$ constituyen la subpoblación más abundante de linfocitos intra-epiteliales en ratones (Hanninen y Harrison, 2000). Existen reportes que señalan que los linfocitos $\gamma\delta^+$ requieren además de moléculas accesorias como CD2 y LFA-3 (Wang y Malkovsky, 2000). En un linfoma de linfocitos $\gamma\delta^+$ se detectó la expresión de los marcadores CD2, CD3, CD7, CD8 y CD56 pero no expresan el CD4 (Lin *et al*, 1999). Linfocitos $\gamma\delta^+$ de vagina de ratón expresan los marcadores CD44, CD62L, CD45RB, LFA-1, CD2 y CD28 (Rakasz *et al*, 1997). Estos datos sugieren que estas células pueden utilizar moléculas coestimuladoras en conexión con el TCR para inducir la activación y la diferenciación además de

expresar moléculas de adhesión VCAM-1, VLA-4 e ICAM-1 (Leca *et al*, 1995, Behr-Perst *et al*, 1999).

La naturaleza del antígeno reconocido por los linfocitos $\gamma\delta^+$ y el proceso de reconocimiento de este aún no se conoce. Se ha sugerido que reconocen superficies o epítopes de una manera parecida a las inmunoglobulinas (Worku *et al*, 1997). Las células $V\gamma 9V\delta 2^+$ humanas reconocen antígenos no peptídicos de una manera distinta que la vía clásica empleada por las células $\alpha\beta^+$, ya que es sin restricción al MHC. Este procesamiento de antígeno estaría permitiendo respuestas muy rápidas contra los antígenos y las señales generadas por moléculas accesorias, como el CD2, el LFA-3 e IL-2, pueden contribuir de una manera integrada a la regulación de estas células (Wang y Malkovsky, 2000). En infecciones con brucelosis aguda, estas células se activan por pequeñas moléculas no peptídicas que son producidas por el parásito y son liberadas por las células dañadas después de la infección (Ottones *et al*, 2000).

3. JUSTIFICACION

Mientras que algunos estudios han sido enfocados en la respuesta inmune que desencadenan en el huésped vertebrado las moléculas de etapas asexuales, pocos estudios se han enfocado en las respuestas desencadenadas por los gametocitos. Así mismo, existen carencias de conocimientos acerca del papel que desempeña la inmunidad celular en el bloqueo de la transmisión de *Plasmodium* y en especial su función en la modulación de los gametocitos en la circulación. Esta falta de conocimientos ha dado paso a que las estrategias actuales para el desarrollo de vacunas bloqueadoras de la transmisión, no contemplen las etapas sexuales intraeritrocíticas residentes en la circulación del huésped humano, aunque es bien conocido que ocurre un bloqueo en la infección natural.

Con el conocimiento de las interacciones huésped-gametocito y específicamente de la respuesta adquirida, se podría contemplar a largo plazo el desarrollo y el uso de un reactivo inmunoterapéutico y/o una vacuna contra estas etapas, los cuales podrían ser usados en combinación con drogas profilácticas y también como refuerzo a otras medidas de control para bloquear la transmisión del parásito.

expresar moléculas de adhesión VCAM-1, VLA-4 e ICAM-1 (Leca *et al*, 1995, Behr-Perst *et al*, 1999).

La naturaleza del antígeno reconocido por los linfocitos $\gamma\delta^+$ y el proceso de reconocimiento de este aún no se conoce. Se ha sugerido que reconocen superficies o epítopes de una manera parecida a las inmunoglobulinas (Worku *et al*, 1997). Las células $V\gamma 9V\delta 2^+$ humanas reconocen antígenos no peptídicos de una manera distinta que la vía clásica empleada por las células $\alpha\beta^+$, ya que es sin restricción al MHC. Este procesamiento de antígeno estaría permitiendo respuestas muy rápidas contra los antígenos y las señales generadas por moléculas accesorias, como el CD2, el LFA-3 e IL-2, pueden contribuir de una manera integrada a la regulación de estas células (Wang y Malkovsky, 2000). En infecciones con brucelosis aguda, estas células se activan por pequeñas moléculas no peptídicas que son producidas por el parásito y son liberadas por las células dañadas después de la infección (Ottones *et al*, 2000).

3. JUSTIFICACION

Mientras que algunos estudios han sido enfocados en la respuesta inmune que desencadenan en el huésped vertebrado las moléculas de etapas asexuales, pocos estudios se han enfocado en las respuestas desencadenadas por los gametocitos. Así mismo, existen carencias de conocimientos acerca del papel que desempeña la inmunidad celular en el bloqueo de la transmisión de *Plasmodium* y en especial su función en la modulación de los gametocitos en la circulación. Esta falta de conocimientos ha dado paso a que las estrategias actuales para el desarrollo de vacunas bloqueadoras de la transmisión, no contemplen las etapas sexuales intraeritrocíticas residentes en la circulación del huésped humano, aunque es bien conocido que ocurre un bloqueo en la infección natural.

Con el conocimiento de las interacciones huésped-gametocito y específicamente de la respuesta adquirida, se podría contemplar a largo plazo el desarrollo y el uso de un reactivo inmunoterapéutico y/o una vacuna contra estas etapas, los cuales podrían ser usados en combinación con drogas profilácticas y también como refuerzo a otras medidas de control para bloquear la transmisión del parásito.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Caracterizar la respuesta proliferativa de las células mononucleares circulantes (CMC) de pacientes palúdicos o post-palúdicos en respuesta a antígenos de gametocitos de *Plasmodium*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- 1) Determinar la capacidad que presentan los antígenos de gametocitos sonicados y de exoantígenos derivados de estas mismas etapas para estimular una reacción proliferativa en CMC de pacientes palúdicos con diferente memoria inmunológica (infección primaria o secundaria).
- 2) Caracterizar el perfil proliferativo de las CMC en diferentes etapas de infección con *Plasmodium*.

5. METODOLOGIA

A. Obtención de material biológico

Se trabajó en colaboración con el Centro de Investigación de Paludismo en Tapachula, Chiapas y con la Secretaría de Salud del Estado de Oaxaca para la captación de pacientes infectados con *P. vivax* y con la Secretaria de Salud del Estado de Tabasco para la captación de pacientes infectados con *P. falciparum*. Se canalizaron pacientes de infección primaria y secundaria en la etapa aguda de la infección, así como pacientes de infección primaria o secundaria que tuvieron la infección en un período de 2 meses a 15 años previos a la toma de muestra, tal como se indica en la Figura 3, e individuos febriles no palúdicos procedentes de la misma zona como control.

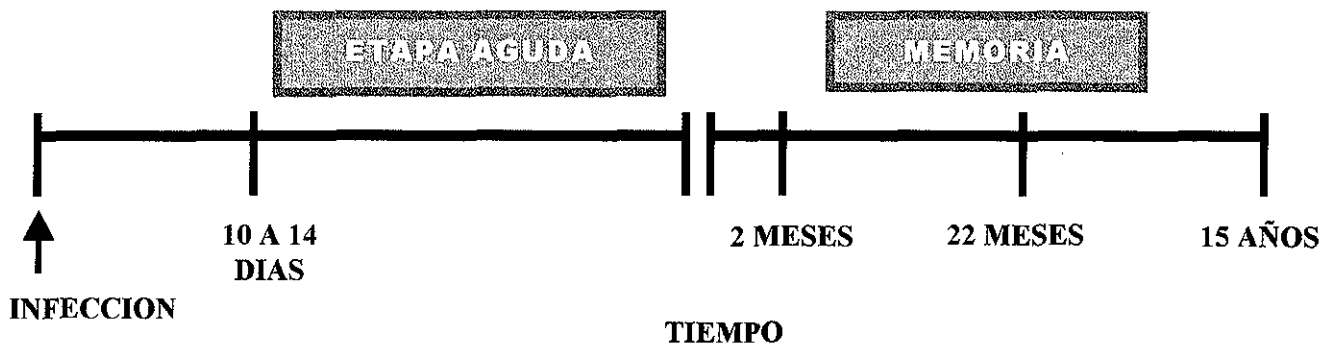


Figura 3. Cronograma de infección con *Plasmodium spp.*

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Caracterizar la respuesta proliferativa de las células mononucleares circulantes (CMC) de pacientes palúdicos o post-palúdicos en respuesta a antígenos de gametocitos de *Plasmodium*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- 1) Determinar la capacidad que presentan los antígenos de gametocitos sonicados y de exoantígenos derivados de estas mismas etapas para estimular una reacción proliferativa en CMC de pacientes palúdicos con diferente memoria inmunológica (infección primaria o secundaria).
- 2) Caracterizar el perfil proliferativo de las CMC en diferentes etapas de infección con *Plasmodium*.

5. METODOLOGIA

A. Obtención de material biológico

Se trabajó en colaboración con el Centro de Investigación de Paludismo en Tapachula, Chiapas y con la Secretaría de Salud del Estado de Oaxaca para la captación de pacientes infectados con *P. vivax* y con la Secretaria de Salud del Estado de Tabasco para la captación de pacientes infectados con *P. falciparum*. Se canalizaron pacientes de infección primaria y secundaria en la etapa aguda de la infección, así como pacientes de infección primaria o secundaria que tuvieron la infección en un período de 2 meses a 15 años previos a la toma de muestra, tal como se indica en la Figura 3, e individuos febriles no palúdicos procedentes de la misma zona como control.

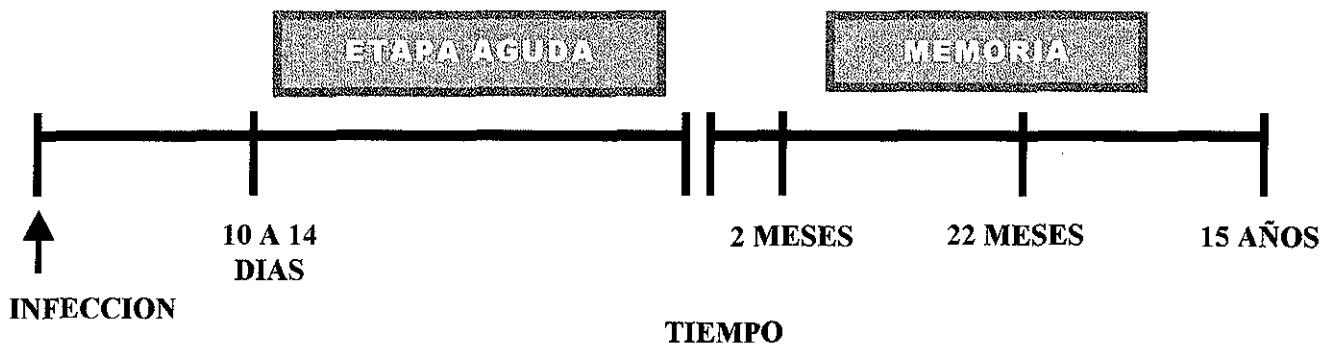


Figura 3. Cronograma de infección con *Plasmodium spp.*

1. *Obtención de sangre:* De cada paciente se extrajeron 20 ml de sangre (previo consentimiento) en vacutainers estériles con anticoagulante (0.081 ml de EDTA al 15%) los cuales se mantuvieron a 4°C. Una vez en el laboratorio, la sangre se procesó bajo condiciones estériles. Se separó el plasma mediante centrifugación a 850xg por 10 min en una centrífuga Hermle.

2. *Obtención de las CMC:* La separación de las CMC de los pacientes y controles se hizo mediante un gradiente de densidad con Lymphoprep (Nycomed) empleando sangre diluida 1:1 con medio RPMI 1640 (GIBCO-BRL 23400-021) con gamicina (4 µg/ml) centrifugando a 850xg durante 15 min. En la interfase se obtuvieron las CMC y después de lavarlas con RPMI se determinó su concentración y viabilidad con Azul tripano al 0.4% en una cámara de Neubauer al microscopio de contraste de fases con el objetivo de 40X (Olympus). Las células (1×10^6 - 1×10^7) se congelaron en criotubos estériles con medio RPMI suplementado con 35% de suero fetal bovino y 10% de glicerol durante 24 h a -70 °C y posteriormente en nitrógeno líquido hasta su uso.

3. *Cultivo y aislamiento de parásitos de Plasmodium:* Se emplearon dos cepas previamente criopreservadas de *P. falciparum*: NF54 (que produce etapas asexuales y sexuales) y 7901 (solo asexuales). Las cepas se mantuvieron en cultivo en frascos de 25 cm² con 6 ml de RPMI 1640 completo conteniendo 10% de plasma O Rh⁺ descomplementado, 2 mM de L-glutamina, 25 mM de hepes, 29 mM de bicarbonato de sodio, 0.25% de hipoxantina, 50 U de penicilina/ml y 4 µg/ml de gamicina con 300 µl de células O Rh⁺ (los eritrocitos se lavaron tres veces con RPMI sin plasma ni hipoxantina y se mantuvieron a 4 °C hasta su uso) a 37 °C en una incubadora (Nuair) con 5% de CO₂, 8% de O₂ y 87% de N₂. El medio de cultivo se reemplazó cada 48 h. Eritrocitos frescos no infectados se cultivaron bajo las mismas condiciones como control.

Después del aislamiento de las CMC, los glóbulos rojos de los pacientes infectados con *P. vivax* se mantuvieron en cultivo durante 48 h en medio RPMI suplementado con 20% de plasma y 5 µg/ml de insulina-tranferrina (GIBCO-BRL). El medio de cultivo se reemplazó diariamente.

Las diferentes etapas de los parásitos tanto de *P. vivax* como de *P. falciparum* fueron aisladas mediante un gradiente de densidad con Percoll (SIGMA) a 4 fases: 35%, 50%, 65% y 80% (modificado de Andrysiak *et al*, 1986; Ihalamulla y Mendis, 1987). En la parte superior se agregó la sangre diluida al 25% con solución salina (0.9% de NaCl), se centrifugó a 850xg por 10

min a 15 °C. Cada una de las interfases se colocó en tubos separados y después se lavaron mediante centrifugación a 1,200xg durante 5 min. El precipitado de cada fase fue resuspendido en 0.5-1 ml de solución salina. Mediante este método en la interfase de 35% de obtuvieron parásitos en etapa de anillos y trofozoitos, en la de 50% trofozoitos y esquizontes, en la de 65% esquizontes y gametocitos y en la de 80% gametocitos principalmente.

Con objeto de obtener gametocitos con un 98% de pureza, los gametocitos aislados a partir del gradiente de Percoll se mantuvieron en cultivo durante 36 a 48 h con 0.1% de pirimetamina para eliminar la contaminación por etapas asexuales.

4. *Obtención de antígenos sonicados y de exoantígenos:* Los parásitos aislados fueron sonicados tres veces por 30 seg cada vez en un sonicador de baño a 4 °C, se transfirieron a tubos eppendorf estériles y se tomo una alícuota de la muestra para determinar la concentración de proteína (Lowry *et al*, 1951). El resto de la muestra se mantuvo en congelación a -80 °C hasta su uso. Para la obtención de exoantígenos (Ramsey *et al*, en prensa) se colectaron sobrenadantes de cultivo sin plasma de 24 h de *P. vivax* y *P. falciparum* sin plasma y se centrifugaron a 6,000xg durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se colectó y se traspasó a tubos eppendorf estériles y se guardaron a - 80°C. Posteriormente los sobrenadantes fueron descongelados y centrifugados a 6,700xg, se dializaron en una membrana de exclusión de colodión con amortiguador de fosfatos (PBS) a 4 °C y se tomó una muestra para determinar la concentración de proteína por el método de Lowry (Lowry *et al*, 1951). Las proteínas fueron fraccionadas en una columna de intercambio iónico Sephacryl S300Hr (Amersham Pharmacia Biotech) usando un amortiguador de 0.1 M Tris-HCl pH 8.6. Se eluyeron aproximadamente 10 ml de 0.7 a 0.9 mg de proteína a 12 ml/h y las fracciones eluidas fueron concentradas en una unidad de filtración Amicon. Las fracciones fueron separadas posteriormente en una columna de DEAE-Sephacell (Amersham Pharmacia Biotech) usando un amortiguador de 0.005 M Tris-HCl pH 8.0. Se eluyeron a 20 ml/h usando un gradiente de NaCl de 0 a 0.5 M.

Las proteínas aisladas de los sobrenadantes de parásitos fueron identificadas por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) al 7.5% o 12.5%, bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa para la inmunodetección empleando suero de pacientes que tenían solamente gametocitos o etapas asexuales circulantes.

Los anticuerpos unidos a estas proteínas se detectaron usando un anticuerpo antihumano unido a peroxidasa de rábano (GIBCO BRL) mediante una reacción colorimétrica de la peroxidasa teniendo como sustrato al cloronaftol.

Para los ensayos de proliferación se empleó una mezcla de proteínas de gametocitos y asexuales con un rango de peso molecular entre 51 y 98 kDa.

B. Determinación de la capacidad proliferativa de CMC con proteínas gametocitarias.

Las CMC se descongelaron en un baño maría a 37 °C (2 a 5 min) y se lavaron con RPMI suplementado con 20% de suero fetal bovino (SFB) mediante centrifugación (140xg durante 5 min.). El sedimento se resuspendió en este mismo medio y se determinó la viabilidad y la concentración celular con azul tripano al 0.4% en una cámara de Neubauer en un microscopio de contraste de fases con el objetivo de 40X. Las CMC se incubaron con RPMI-SFB en placas de 96 pozos de fondo redondo (Nunc) durante 12 h a 37 °C. Transcurrido este tiempo las células se colectaron y se lavaron en RPMI suplementado con 10% de SFB a 140xg por 5 min. Posteriormente, las células se colocaron en un gradiente de suero humano descomplementado al 100% y se centrifugaron a 140xg por 7 min. En la interfase se obtuvo el mayor porcentaje de células muertas, mientras que las células vivas se obtuvieron en el sedimento (leucocitos y macrófagos). La concentración y la viabilidad celular fueron determinados como se indicó anteriormente, el 95% de células vivas fueron usadas en los ensayos de proliferación.

Para los ensayos de proliferación, 2×10^5 células por pozo fueron incubadas por triplicado en 200 μ l de RPMI con 10% de SFB y 5×10^{-5} M de β -mercaptoetanol en placas de 96 pozos. Las CMC fueron estimuladas con 1 μ g/ml de lipopolisacáridos bacterianos (LPS) como antígeno control, con el mitógeno Concanavalina A (Con A) 5 μ g/ml ó diversos tipos de antígeno de *Plasmodium* (sonicados o exoantígenos) durante 120 h a 37 °C en una incubadora con 5% de CO₂. En las últimas 18 h de incubación, se agregó 0.5 μ Ci de Timidina [³H] (Amersham Pharmacia Biotech) por pozo en 10 μ l de RPMI. Al final de la incubación se colectaron las células en un cosechador de células (Skatron Instruments) y se determinó la incorporación de Timidina ³H al DNA con un contador de centelleo β LS-5801 (Beckman). Para cada ensayo se determinaron los índices de estimulación (IE) es decir, el promedio de las cuentas por minuto (cpm) del antígeno ó mitógeno entre las cpm del control (Riley *et al*, 1990 y 1994).

Con el objeto de conocer la respuesta proliferativa específica a los antígenos asexuales o a los gametocitos totales se restó la respuesta del control con ERNI, mediante la razón: gametocitos totales o bien antígenos asexuales/ERNI. Del mismo modo, la respuesta proliferativa específica a los gametocitos se determinó mediante la siguiente razón: gametocitos totales/antígenos asexuales.

C. Identificación de fenotipos de las CMC que responden a los antígenos de *Plasmodium*.

Con objeto de determinar los fenotipos de las poblaciones de linfocitos que proliferaron en respuesta a la estimulación con antígenos de *Plasmodium*, se cultivaron 2×10^5 cels/ml en placas de 96 pozos en presencia o ausencia de antígenos durante 5 días tal como se describió anteriormente. Trascurrido el tiempo de incubación, las células fueron lavadas a 140xg durante 2 min en una centrifuga para placas de 96 pozos RT 6000 D (Sorvall) para eliminar el medio de cultivo, y posteriormente las células fueron resuspendidas en 100 μ l de solución de FACS (solución salina o PBS, 0.02% de NaN_3 y 2% de suero fetal bovino descomplementado). Las CMC fueron incubadas con un anticuerpo fluorescente específico, tal como se indica mas adelante, empleando la cantidad sugerida por el fabricante durante 30 min a 4 °C, protegiéndolas de la luz. Después de la incubación se lavaron con 200 μ l de solución de FACS a 140xg durante 2 min, el precipitado fue resuspendido en 100 μ l de solución de FACS y las células fueron fijadas con 100 μ l de paraformaldehído al 1%.

Anticuerpos específicos empleados:

Marcadores para linfocitos T: anti TCR $\gamma\delta$ -FITC (Endogen), anti TCR $\alpha\beta$ -FITC (Endogen) y anti CD4-FITC/CD8-PE/CD3 PE-Cy5 (Immunotech).

Marcadores de activación para linfocitos T: anti CD2-FITC (Pharmingen), anti CD25-PE (Pharmingen), anti CD69-FITC (Pharmingen)

Marcadores para linfocitos B: anti CD21-FITC (Immunotech).

Controles de isotipo: anti IgG2b-FITC (Immunotech), anti IgG1-FITC (Immunotech) y anti IgG1-FITC/IgG1-PE/IgG1 PE-Cy5 (Immunotech).

El análisis de los fenotipos se hizo en un FACS SCAN empleando el programa Cell Quest (Becton Dickinson). Con este programa se determinó el porcentaje de células positivas, es decir, aquellas que están expresando al marcador en su superficie. Se obtuvieron los histogramas de fluorescencia de las CMC de cada paciente estimuladas con los antígenos de *P. vivax* y de *P.*

falciparum. En estos histogramas, la región marcada como M1 fueron las células negativas al marcador y la región marcada como M2 indica el porcentaje de células positivas.

Tomando como referencia el porcentaje de células positivas en las muestras del control sin antígeno como el nivel basal, se determinó el porcentaje de incremento en la expresión del marcador en las CMC estimuladas con gametocitos, antígenos asexuales o de ERNI como control, esto se hizo para cada uno de los marcadores con cada uno de los pacientes. Una vez obtenido este porcentaje de incremento con cada uno de los marcadores se obtuvo el promedio de todos los pacientes de cada grupo.

Los gametocitos totales de *Plasmodium* están conformados por proteínas específicas a esta etapa y por proteínas que comparten con los parásitos en etapas asexuales. Debido a esto, para conocer la respuesta desencadenada específicamente por las proteínas de origen gametocitario (estimulación gametocito-específica) fue necesario conocer la respuesta desencadenada por los antígenos de etapas asexuales (estimulación asexual-específica). Además, debido a que el desarrollo del parásito de *Plasmodium* en el huésped vertebrado es intraeritrocítico se emplearon ERNI como control para eliminar la estimulación por las proteínas de los eritrocitos.

Se determinó el porcentaje de estimulación y expresión de los diversos marcadores dado por los gametocitos totales de *Plasmodium* (que contienen antígenos específicos de gametocitos y antígenos asexuales) eliminando la respuesta a los ERNI mediante la siguiente razón:

$$\text{Porcentaje de estimulación con gametocitos totales} = \frac{\text{estimulación con gametocitos} - \text{estimulación con ERNI} \times 100}{\text{estimulación con ERNI}}$$

A su vez, se determinó la estimulación específica desencadenada por las etapas asexuales de *Plasmodium* eliminando la respuesta a los ERNI mediante la siguiente razón:

$$\text{Porcentaje de estimulación asexual-específica} = \frac{\text{estimulación con asexuales} - \text{estimulación con ERNI} \times 100}{\text{estimulación con ERNI}}$$

Del mismo modo, se determinó el porcentaje de estimulación y expresión de los diversos marcadores dado por los antígenos específicos de gametocitos de *Plasmodium* eliminando la

respuesta a los antígenos asexuales mediante la siguiente razón:

$$\text{Porcentaje de estimulación gametocito-específica} = \frac{\text{estimulación con gametocitos} - \text{estimulación con asexuales}}{\text{estimulación con asexuales}} \times 100$$

Esto se hizo para cada uno de los marcadores con cada uno de los pacientes. Una vez obtenido este porcentaje de estimulación se obtuvo el promedio de todos los pacientes de cada grupo.

D. Análisis estadístico.

En los ensayos de proliferación se determinó el promedio y la desviación estándar de los triplicados mediante el programa estadístico STATA versión 5. Se empleó la prueba de T de Student para comparar los índices de estimulación y para el análisis de los fenotipos.

6. RESULTADOS

1. CAPACIDAD PROLIFERATIVA

1.1 CMC de etapa aguda estimuladas con antígenos sonicados de *P. vivax*

Se colectaron CMC de 4 pacientes con infección aguda causada por *P. vivax* procedentes de los estados de Chiapas y Oaxaca, dos con infección primaria (REG y 596) y dos con infección secundaria (601 y 642). Estas muestras se tomaron antes del inicio del tratamiento antipalúdico. Los datos epidemiológicos de estos pacientes se muestran en la Tabla 5. Estas CMC fueron estimuladas con 50 µg/ml de antígeno sonificado de *P. vivax* obtenido de etapas asexuales, de gametocitos o de ERNI. Como controles se emplearon CMC de un paciente febril no palúdico procedente de Tapachula, Chiapas, y de un individuo no febril y no palúdico. Además de los antígenos de *Plasmodium*, las CMC se estimularon con Con A y LPS tal como se indica en la metodología.

En las CMC del control febril y del control no palúdico la respuesta proliferativa a los antígenos asexuales y gametocitos no fue significativa ($p < 0.05$, Tabla 6, Figura 4). Tanto en CMC de pacientes de infección primaria como secundaria la respuesta a Con A y a los LPS fue marcadamente menor que en los controles no infectados (Tabla 6), al parecer este fenómeno no es dependiente del tipo de infección (primaria o secundaria). La respuesta a la Con A y LPS de

respuesta a los antígenos asexuales mediante la siguiente razón:

$$\text{Porcentaje de estimulación gametocito-específica} = \frac{\text{estimulación con gametocitos} - \text{estimulación con asexuales}}{\text{estimulación con asexuales}} \times 100$$

Esto se hizo para cada uno de los marcadores con cada uno de los pacientes. Una vez obtenido este porcentaje de estimulación se obtuvo el promedio de todos los pacientes de cada grupo.

D. Análisis estadístico.

En los ensayos de proliferación se determinó el promedio y la desviación estándar de los triplicados mediante el programa estadístico STATA versión 5. Se empleó la prueba de T de Student para comparar los índices de estimulación y para el análisis de los fenotipos.

6. RESULTADOS

1. CAPACIDAD PROLIFERATIVA

1.1 CMC de etapa aguda estimuladas con antígenos sonicados de *P. vivax*

Se colectaron CMC de 4 pacientes con infección aguda causada por *P. vivax* procedentes de los estados de Chiapas y Oaxaca, dos con infección primaria (REG y 596) y dos con infección secundaria (601 y 642). Estas muestras se tomaron antes del inicio del tratamiento antipalúdico. Los datos epidemiológicos de estos pacientes se muestran en la Tabla 5. Estas CMC fueron estimuladas con 50 µg/ml de antígeno sonificado de *P. vivax* obtenido de etapas asexuales, de gametocitos o de ERNI. Como controles se emplearon CMC de un paciente febril no palúdico procedente de Tapachula, Chiapas, y de un individuo no febril y no palúdico. Además de los antígenos de *Plasmodium*, las CMC se estimularon con Con A y LPS tal como se indica en la metodología.

En las CMC del control febril y del control no palúdico la respuesta proliferativa a los antígenos asexuales y gametocitos no fue significativa ($p < 0.05$, Tabla 6, Figura 4). Tanto en CMC de pacientes de infección primaria como secundaria la respuesta a Con A y a los LPS fue marcadamente menor que en los controles no infectados (Tabla 6), al parecer este fenómeno no es dependiente del tipo de infección (primaria o secundaria). La respuesta a la Con A y LPS de

las CMC del control febril fue menor que en el control no febril.

a) antígenos asexuales

La respuesta proliferativa de las CMC de infección primaria al antígeno asexual fue significativa en uno de dos pacientes (596, Tabla 6, Figura 4). La respuesta proliferativa específica de estos dos pacientes al antígeno asexual fue 1.7 veces (rango 1.3 a 2.2) respecto a los ERNI (Tabla 7).

En los dos pacientes con infección secundaria (601 y 642) se observó una respuesta proliferativa específica contra las etapas asexuales comparándola con la respuesta a los ERNI, estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$, Tabla 5, Figura 4). La respuesta proliferativa específica de estos pacientes de infección secundaria en respuesta al antígeno asexual fue 1.8 veces (rango 1.6 a 2.1) respecto a los ERNI (Tabla 7). No se encontraron diferencias en la magnitud de la respuesta proliferativa contra los antígenos asexuales en las CMC de pacientes primarios comparándola con la respuesta de los pacientes secundarios.

b) gametocitos

En los pacientes de infección primaria la respuesta proliferativa gametocito-específica (gametocito/asexual) no fue significativa (1.2 veces respecto a los antígenos asexuales, rango de 1.1 a 1.4, $p < 0.05$). Sin embargo, las CMC de los dos pacientes de infección secundaria proliferaron de manera específica y significativa en respuesta a los gametocitos sonicados de *P. vivax* (Figura 4). La respuesta proliferativa fue 2.0 veces respecto a los antígenos asexuales ($p < 0.05$, Tablas 6 y 7). Esto está sugiriendo una memoria adquirida que no está deprimida por la infección aguda.

Tabla 5. Datos epidemiológicos de los pacientes infectados con *P. vivax* en etapa aguda.

	P A C I E N T E			
	REG	596	601	642
Procedencia	Piedras Negras, Oaxaca	Tapachula, Chiapas	Tapachula, Chiapas	Tapachula, Chiapas
Edad (años)	15	12	37	44
Sexo	M	M	M	M
Tipo de infección	primaria	Primaria	secundaria	secundaria
Número de infecciones previas	0	0	1	1
Tiempo de infección previa	0	0	9 meses	2 años
Parásitos detectados en sangre	asexual y sexual	asexual y sexual	asexual y sexual	asexual y sexual
Parasitemia total	0.25 %	0.2 %	0.46 %	0.3 %
Gametocitemia	15 %	12%	20 %	40 %
Tomó algún medicamento	no tomo	Febrax	Ampicilina	Isogen Plus y Aralen
Días que lleva con malestar	3	no hay dato	6	1
Tiempo desde la última calentura a la toma de muestra	ese mismo día	24 horas	ese mismo día	ese mismo día
Frecuencia del ataque febril	cada tercer día	cada tercer día	cada tercer día	cada tercer día
Padece otras enfermedades	no	no	no	diabetes

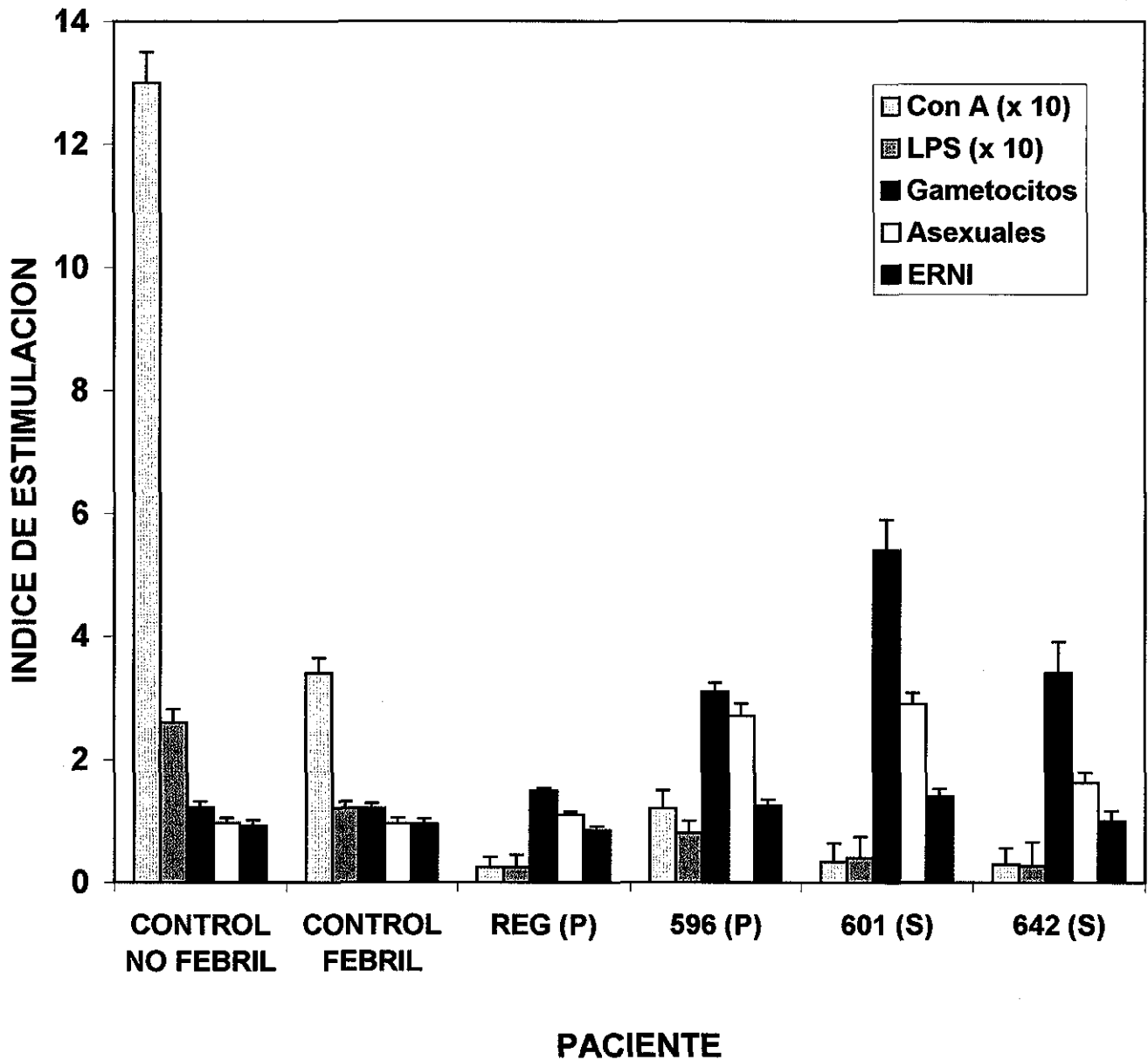


Figura 4. Proliferación de CMC de pacientes infectados con *P. vivax* en etapa aguda estimuladas con antígenos sonicados. Se estimularon las CMC de pacientes en etapa aguda de la infección y controles no palúdicos con antígenos sonicados de etapas asexuales o de gametocitos de *P. vivax* y con LPS o Con A. La proliferación celular se midió mediante incorporación de Timidina [^3H] y se determinaron los índices de estimulación. La P indica pacientes de infección primaria y S pacientes de infección secundaria.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 6. Índices de estimulación de CMC de pacientes infectados con *P. vivax* en etapa aguda estimuladas con antígenos sonicados.

PACIENTE (tipo de infección)	CON A	LPS	GAMETOCITOS	ASEXUALES	ERNI
REG (primaria)	2.5	2.5	1.5	1.1	0.8
596 (primaria)	12	8.2	3.0	2.7	1.3
601 (secundaria)	3.4	4.1	5.4	3.0	1.4
642 (secundaria)	3.0	2.6	3.4	1.6	1.0
Control no febril	130.0	26.0	1.2	0.9	0.9
Control febril	34.0	12.0	1.2	0.9	0.9

Tabla 7. Razón de proliferación antígeno-específica en CMC de pacientes infectados con *P. vivax* en etapa aguda estimuladas con antígenos sonicados.

PACIENTE (tipo de infección)	GAMETOCITO/ERNI	ASEXUAL/ERNI	GAMETOCITO/ASEXUAL
REG (primaria)	1.8 *	1.3 ns	1.4 ns
596 (primaria)	2.4 *	2.2 *	1.1 ns
601 (secundaria)	4.0 *	2.1 *	2.0 *
642 (secundaria)	3.4 *	1.6 *	2.1 *
Control no febril	1.3 ns	1.0 ns	1.2 ns
Control febril	1.3 *	1.0 ns	1.3 ns

ns = no significativo estadísticamente, * = significativo, $p < 0.05$

1.2 CMC de infecciones previas estimuladas con antígenos sonicados de *P. vivax*

1.2.1 Respuesta de las CMC de infección primaria previa

Se emplearon como controles CMC de dos pacientes negativos a *P. vivax*, los pacientes DM y DR y de un paciente no palúdico originarios de Tapachula, Chiapas (Tabla 8). En estos tres controles, no se observó una respuesta proliferativa significativa contra los antígenos asexuales o los gametocitos, pero si respondieron de manera positiva al control con la Con A y a los LPS (Tabla 9, Figura 5).

a) antígenos asexuales

Se estimularon CMC de 5 pacientes de infección primaria que estuvieron infectados con *P. vivax* entre 0.25 y 15 años previos a la toma de muestra procedentes del estado de Chiapas. Los datos epidemiológicos de estos pacientes se muestran en la Tabla 8. Las CMC de todos estos pacientes respondieron de manera positiva al control con Con A y a los LPS (Tabla 9).

La respuesta proliferativa en las CMC de los pacientes CM, CV y TL de 0.25, 4 y 8 años postinfección, respectivamente, a los antígenos asexuales de *P. vivax* fue significativamente mayor que a los ERNI ($p < 0.05$, Tablas 9 y 10, Figura 5). En estos pacientes, la respuesta asexual específica fue 2.3 veces (rango 2 a 2.6) respecto a los ERNI (Tabla 10). Las CMC de dos pacientes que tuvieron infección a 12 (AL) y 15 (JM) años previos no proliferaron específicamente al antígeno de etapas asexuales (Tabla 9 y 10, Figura 5), lo cual podría indicar un límite temporal para la memoria contra el antígeno.

b) gametocitos

Las CMC de los pacientes CM, CV y TL (0.25 a 8 años) proliferaron de manera específica y significativa al ser estimuladas con gametocitos sonicados de *P. vivax* ($p < 0.05$, Tabla 9, Figura 5). La respuesta gametocito-específica fue de 1.8 veces respecto a los antígenos asexuales (rango de 1.3 a 2.2, $p < 0.05$, Tabla 10). Sin embargo, las CMC de los pacientes AL (12 años postinfección) y JM (15 años postinfección) no respondieron al estímulo con estos antígenos (Tablas 9 y 10, Figura 5).

Tabla 8. Datos epidemiológicos de los pacientes que estuvieron infectados con *P. vivax*.

Paciente	Procedencia	Edad	Sexo	Tipo de infección	No. de infecciones previas	Años postinfección
CM	Tapachula, Chiapas	30	M	primaria	0	0.25
CV	Tapachula, Chiapas	42	M	primaria	0	4
TL	Tapachula, Chiapas	40	F	primaria	0	8
AL	Tapachula, Chiapas	38	M	primaria	0	12
JM	Tapachula, Chiapas	47	M	primaria	0	15
JT	Tapachula, Chiapas	34	M	múltiple	3	5
MR	Tapachula, Chiapas	37	F	múltiple	3	6
RR	Tapachula, Chiapas	44	M	múltiple	4	15
LO	Tapachula, Chiapas	37	M	múltiple	5	12

1.2.2 Respuesta de las CMC de infecciones múltiples previas

a) antígenos asexuales

En CMC de dos pacientes con tres infecciones previas debidas a *P. vivax* (JT y MR) ocurridas en un período entre 5 y 6 años postinfección, se observó una respuesta proliferativa específica y significativa contra los antígenos asexuales ($p < 0.05$, Tabla 9, Figura 6).

No se encontraron diferencias significativas en la respuesta a los antígenos asexuales en las CMC de los pacientes RR (4 infecciones/11 años) y LO (5 infecciones/11 años) con respecto a los ERNI ($p < 0.05$). La respuesta proliferativa asexual-específica fue 1.6 veces (rango 0.5 a 3.1) respecto a los ERNI (Tabla 10).

Haciendo una comparación de la respuesta proliferativa contra los parásitos asexuales en pacientes de infección primaria y pacientes de infecciones múltiples, no se observan diferencias marcadas, si bien la tendencia parece sugerir que la respuesta proliferativa fue mayor con pacientes de infección primaria.

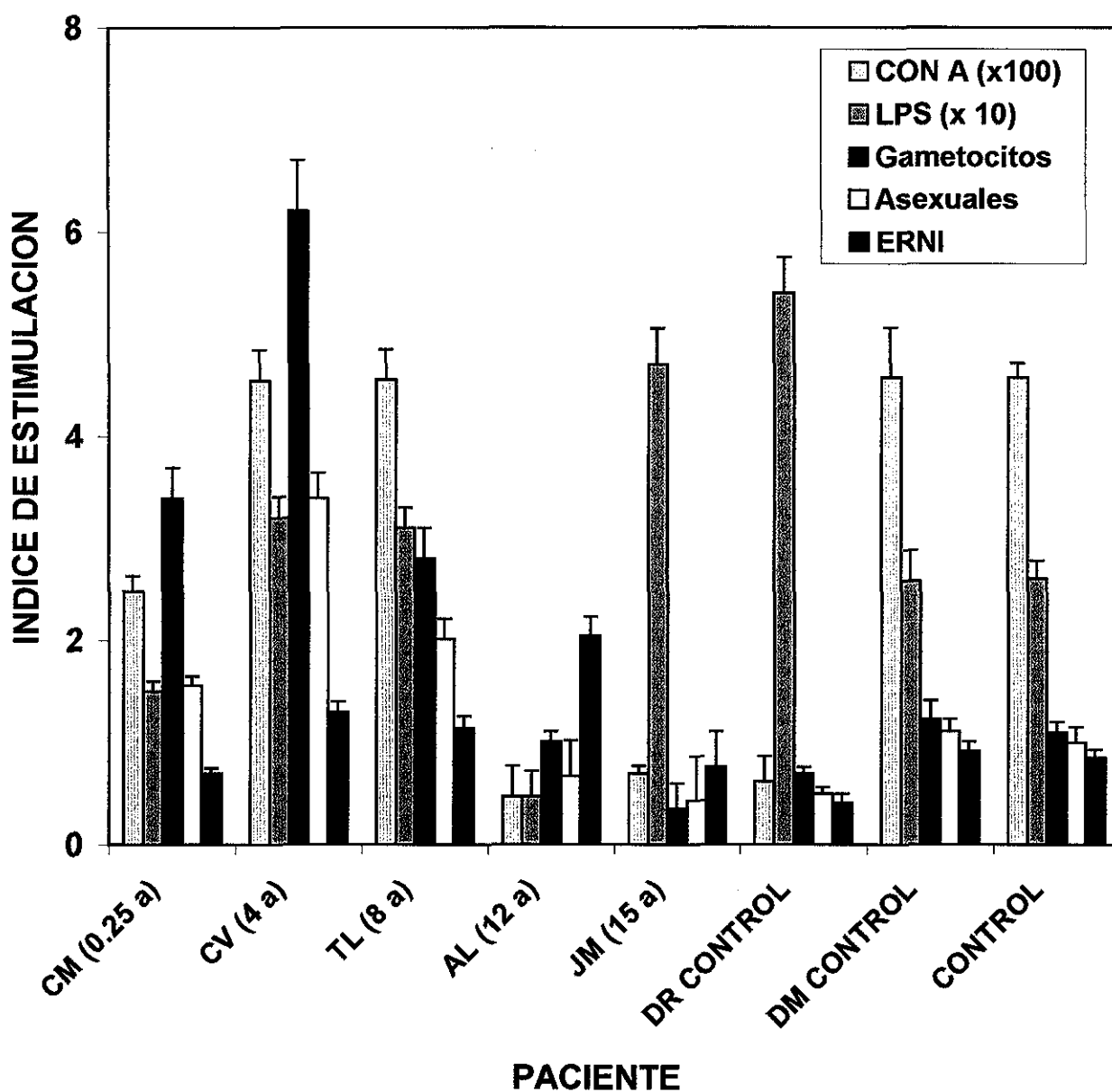


Figura 5. Proliferación de CMC de pacientes de infección primaria previa con *P. vivax* estimuladas con antígenos sonicados. Se estimularon las CMC de pacientes de infección primaria previa y controles no palúdicos con antígenos sonicados de etapas asexuales o de gametocitos de *P. vivax* y con LPS o Con A. La proliferación celular se midió mediante incorporación de Timidina [^3H] y se determinaron los índices de estimulación. Entre paréntesis se indica el tiempo transcurrido post-infección en años.

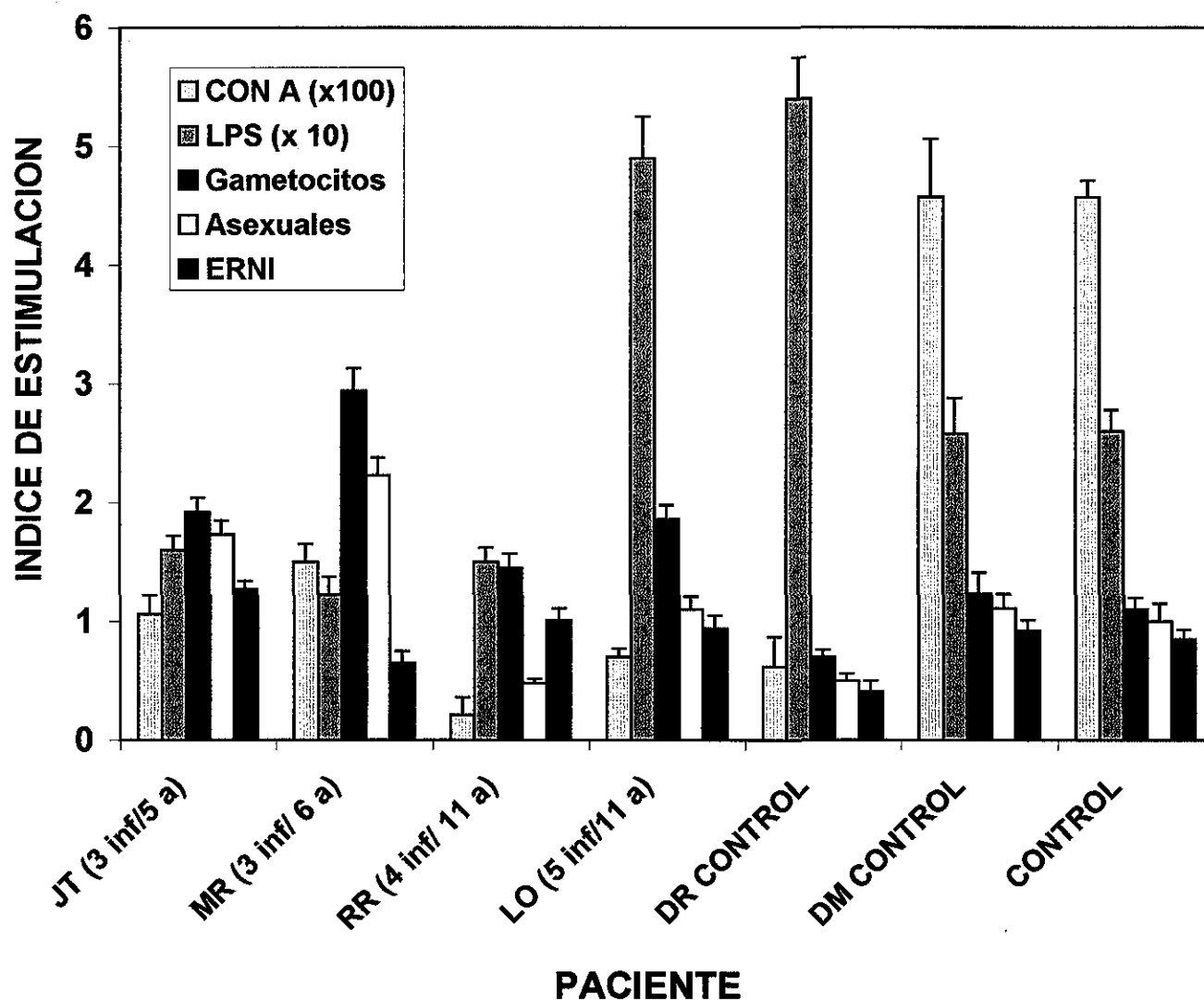


Figura 6. Proliferación de CMC de pacientes con infecciones múltiples previas con *P. vivax* estimuladas con antígenos sonicados. Se estimularon las CMC de pacientes con infecciones secundarias previas y controles no palúdicos con antígenos sonicados de etapas asexuales o de gametocitos de *P. vivax* y con LPS o Con A. La proliferación celular se midió mediante incorporación de Timidina [^3H] y se determinaron los índices de estimulación. Entre paréntesis se indica el número de infecciones previas y el tiempo transcurrido después de la infección en años.

Tabla 9. Índices de estimulación de CMC de pacientes con infecciones previas con *P. vivax* estimuladas con antígenos sonicados.

PACIENTE	CON A	LPS	GAMETOCITOS	ASEXUALES	ERNI
CM (1 in/0.25años) ¹	249.0	15.0	3.4	1.6	0.7
CV (1 in/ 4 años)	454.0	32.0	6.2	3.4	1.3
TL (1 in/8 años)	455.0	31.0	3.0	2.0	1.1
AL (1 in/12 años)	48.0	4.7	1.0	0.6	2.0
JM (1 in/15 años)	70.3	47.0	0.3	0.4	0.8
JT (3 in/5 años)	106.0	16.0	2.0	1.7	1.3
MR (3 in/6 años)	150.0	12.3	3.0	2.2	0.7
RR (4 in/11 años)	21.2	15.0	1.5	0.5	1.1
LO (5 in/11 años)	71.0	49.0	2.0	1.1	0.9
DR Control febril no infectado	62.0	5.4	0.70	0.5	0.4
DM Control febril no infectado	457.0	26.0	1.2	1.1	0.9
Control no febril	457.0	26.0	1.1	1.0	0.8

¹ = número de infecciones previas/ tiempo transcurrido desde la última infección

Tabla 10. Razón de proliferación antígeno-específica en CMC de pacientes con infecciones previas con *P. vivax* estimuladas con antígenos sonicados.

PACIENTE	GAMETOCITO/ERNI	ASEXUAL/ERNI	GAMETOCITO/ASEXUAL
CM (1 in/ 0.25años) ¹	5.0 *	2.3 *	2.2 *
CV (1 in/ 4 años)	5.0 *	2.6 *	2.0 *
TL (1 inf/ 8 años)	2.5 *	2.0 *	1.3 *
AL (1 in/ 12 años)	0.5 ns	0.3 ns	1.5 ns
JM (1 in/ 15 años)	0.5 ns	0.5 ns	0.8 ns
JT (3 in/ 5 años)	1.5 *	1.4 *	1.1 ns
MR (3 in/ 6 años)	4.3 *	3.1 *	1.4 *
RR (4 in/ 11 años)	1.4 *	0.5 ns	3.0 *
LO (5 in/ 11 años)	2.0 *	1.2 ns	2.0 *
DR <i>Control febril no infectado</i>	1.7 ns	1.2 ns	1.4 ns
DM <i>Control febril no infectado</i>	1.3 ns	1.2 ns	1.1 ns
Control no febril	1.3 *	1.2 ns	1.1 ns

¹ = número de infecciones previas/ tiempo transcurrido desde la última infección

ns = no significativo estadísticamente

* = significativo, p<0.05

b) gametocitos

Las CMC de tres pacientes con infecciones múltiples (MR, RR y LO) en contraste al paciente JT, proliferaron de manera específica al ser estimuladas con gametocitos sonicados de *P. vivax* ($p < 0.05$, Tablas 9 y 10, Figura 6), la respuesta proliferativa gametocito-específica fue de 1.7 veces respecto a los antígenos asexuales (rango 1.0 a 2.8). Lo anterior sugiere que los antígenos de gametocitos de *P. vivax*, a diferencia de los de asexuales, son capaces de generar una respuesta proliferativa que se mantiene significativa aún a 11 años postinfección. En comparación, en los pacientes primarios la respuesta a los gametocitos, decrece proporcionalmente al tiempo. Estas observaciones sugieren que en los pacientes con infecciones múltiples se generaron células de memoria circulantes que persisten y responden a estos antígenos (Tabla 10, Figura 6).

1.3 CMC de infección primaria previa estimuladas con antígenos sonicados de *P. falciparum*.

El IE del control no palúdico fue mayor de uno y no se encontraron diferencias significativas entre la respuesta a los antígenos asexuales y a los gametocitos (Tabla 12, Figura 7). CMC de seis pacientes procedentes del estado de Tabasco (Tabla 11) que tuvieron una infección primaria debida a *P. falciparum* en un período comprendido entre 7 y 22 meses previos a la toma de muestra fueron estimuladas con 50 $\mu\text{g/ml}$ de antígenos sonicados de etapas asexuales o de gametocitos de *P. falciparum*, así como de ERNI como control. Hubo una respuesta proliferativa positiva a Con A y a los LPS en las CMC de los seis pacientes y en el control no palúdico (Tabla 12, Figura 7).

a) antígenos asexuales

En la Tabla 12 y la 7 se observa que las CMC de los seis pacientes proliferaron de manera específica al ser estimuladas con los antígenos asexuales de *P. falciparum* pero no a los ERNI ($p < 0.05$). La respuesta proliferativa específica a los antígenos asexuales fue de 5.1 veces (rango 2 a 12) respecto a los ERNI (Tabla 13). No hubo correlación entre el tiempo transcurrido postinfección y la respuesta al antígeno asexual, así como tampoco influyó la edad del paciente en la magnitud de la respuesta.

Tabla 11. Datos epidemiológicos de los pacientes que estuvieron infectados con *P. falciparum*.

PACIENTE	PROCEDENCIA	EDAD	SEXO	TIPO DE INFECCION	MESES POST INFECCION
Pf 1	Huimanguillo, Tabasco	40	M	primaria	22
Pf 2	Huimanguillo, Tabasco	34	F	primaria	22
Pf 3	Huimanguillo, Tabasco	18	M	primaria	22
Pf 4	Tapijulapa, Tabasco	17	F	primaria	21
Pf 5	Tapijulapa, Tabasco	35	F	primaria	21
Pf 6	Tenosique, Tabasco	34	F	primaria	7
Pf 7	Tenosique, Tabasco	33	F	primaria	7
Pf 8	Tenosique, Tabasco	15	F	primaria	15
Pf 9	Tenosique, Tabasco	20	F	primaria	15
Pf 10	Tenosique, Tabasco	13	F	primaria	15
Pf 11	Tenosique, Tabasco	55	M	primaria	14
Pf 12	Tenosique, Tabasco	60	M	primaria	17
Pf 13	Tenosique, Tabasco	8	F	primaria	2

b) gametocitos

Las CMC de cinco de seis pacientes (83%) proliferaron de manera específica y significativa en respuesta a los gametocitos sonicados de *P. falciparum* ($p < 0.001$, Tabla 12, Figura 7). La respuesta proliferativa gametocito-específica fue de 2.3 veces respecto a los antígenos asexuales (rango de 1.1 a 4.5, $p < 0.05$, Tabla 13). Del mismo modo que con los antígenos asexuales, no se encontró correlación entre la respuesta proliferativa a los gametocitos y el tiempo transcurrido postinfección.

En la Tabla 14 se muestra un resumen de las CMC que proliferaron de manera significativa en respuesta al estímulo con antígenos sonicados.

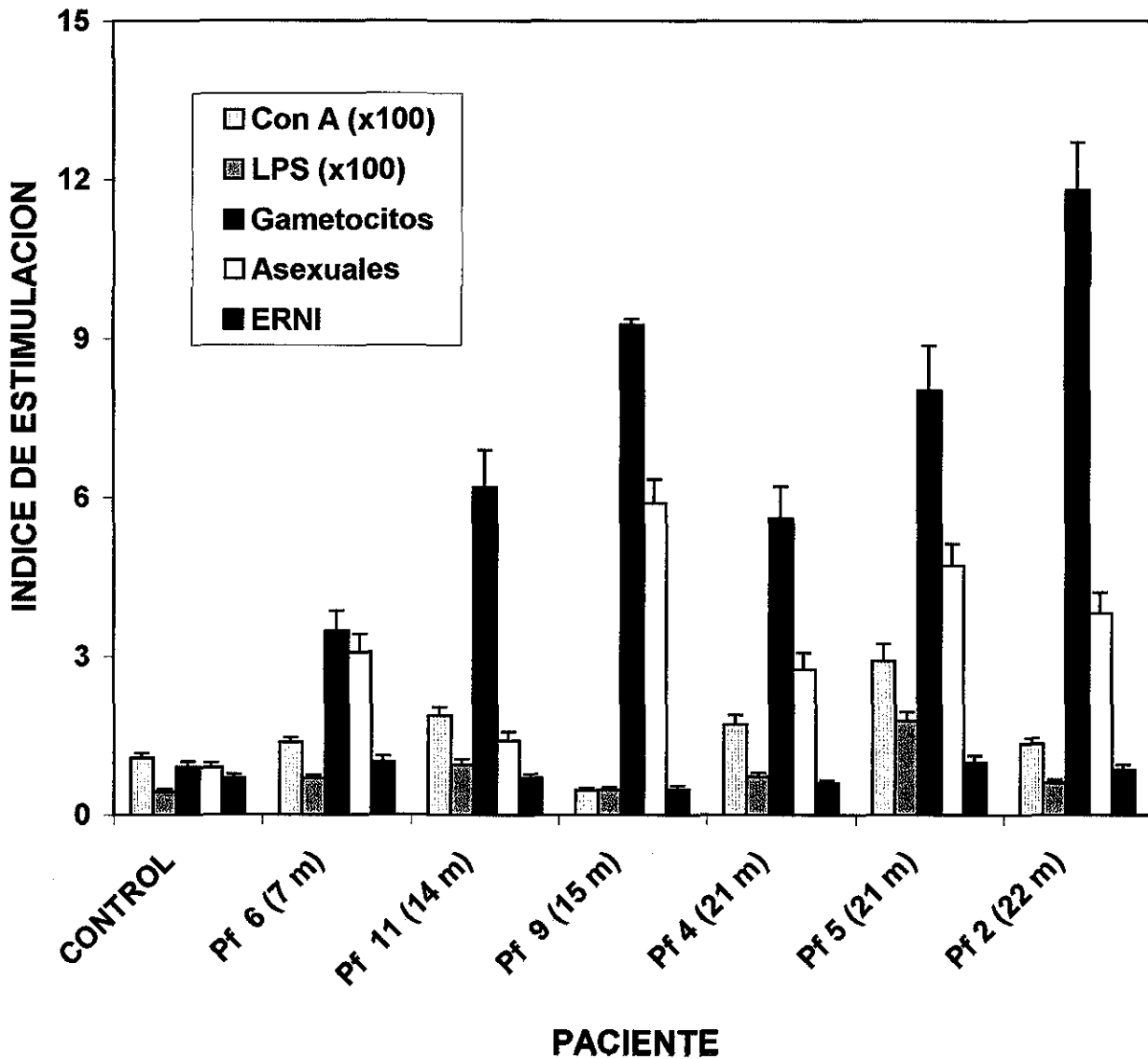


Figura 7. Proliferación de CMC de pacientes de infección primaria previa con *P. falciparum* estimuladas con antígenos sonicados. Se estimularon las CMC de pacientes de infección primaria previa y controles no palúdicos con antígenos sonicados de etapas asexuales o de gametocitos de *P. falciparum* y con LPS o Con A. La proliferación celular se midió mediante incorporación de Timidina [³H] y se determinaron los índices de estimulación. Entre paréntesis se indica el tiempo transcurrido post-infección en meses.

Tabla 12. Índices de estimulación de CMC de pacientes con infección primaria previa con *P. falciparum* estimuladas con antígenos sonicados.

PACIENTE	CON A	LPS	GAMETOCITOS	ASEXUALES	ERNI
Pf 6 (7 meses)¹	137.0	69.0	3.5	3.1	1.0
Pf 11 (14 meses)	188.0	95.0	6.2	1.4	0.7
Pf 9 (15 meses)	46.0	47.0	9.3	6.0	0.5
Pf 4 (21 meses)	171.0	72.0	5.6	2.8	0.6
Pf 5 (21 meses)	290.0	177.0	8.0	4.7	1.0
Pf 2 (22 meses)	135.0	61.0	12.0	4.0	0.8
Control no febril	107.0	44.0	0.9	0.9	0.7

¹ = tiempo transcurrido desde la infección previa

Tabla 13. Razón de proliferación antígeno-específica en CMC de pacientes con infección primaria previas con *P. falciparum* estimuladas con antígenos sonicados.

PACIENTE	GAMETOCITO/ERNI	ASEXUAL/ERNI	GAMETOCITO/ASEXUAL
Pf 6 <i>(7 meses)</i> ¹	3.5 *	3.1 *	1.1 ns
Pf 11 <i>(14 meses)</i>	9.0 *	2.0 *	4.4 *
Pf 9 <i>(15 meses)</i>	18.6 *	12 *	1.6 *
Pf 4 <i>(21 meses)</i>	9.3 *	4.6 *	2.0 *
Pf 5 <i>(21 meses)</i>	8.0 *	4.7 *	1.7 *
Pf 2 <i>(22 meses)</i>	14.0 *	4.4 *	3.2 *
Control no febril	1.3 ns	1.3 ns	1.0 ns

¹ = tiempo transcurrido desde la infección previa

ns = no significativo estadísticamente

* = significativo, p<0.05

Tabla 14. Resumen de la estimulación significativa en la proliferación de CMC estimuladas con antígenos sonicados.

TIPO DE INFECCION		ANTIGENO ASEXUAL	GAMETOCITOS
Infección aguda <i>P. vivax</i>	primaria n= 2	1/2	no significativa
	secundaria n= 2	2/2	2/2
Infección previa <i>P. vivax</i>	primaria n= 5	3/3 8 años 0/2 > 12 años	3/3 8 años 0/2 > 12 años
	múltiple n= 4	2/2 < 6 años 0/2 > 11 años	3/4 < 11 años
Infección previa <i>P. falciparum</i>	primaria n= 6	6/6 < 2 años	5/6 < 2 años

1.4 CMC de infecciones previas estimuladas con exoantígenos de *P. vivax*

Las CMC del control no proliferaron al ser estimuladas con exoantígenos asexuales o de gametocitos (Tabla 16, Figura 8) y tuvieron una respuesta proliferativa alta a la Con A y en menor proporción a los LPS (Tabla 16, Figura 8).

1.4.1 Respuesta de las CMC de infección primaria previa

a) antígenos asexuales

Se purificaron exoantígenos de *P. vivax* a partir de sobrenadantes de cultivo de 24 h de incubación de estos parásitos en etapas asexuales (86% de trofozoitos) así como de ERNI como control. Las proteínas fueron detectadas mediante tinción con azul de Coomassie o bien mediante Western blot empleando suero de un paciente postratamiento tal como se indicó en la metodología. Para los ensayos de proliferación se empleó una mezcla de proteínas con un rango

de peso molecular entre 51 y 98 kDa, tal como se muestra en la Tabla 15. Los antígenos asexuales estuvieron compuestos de nueve proteínas con pesos moleculares de 98, 84, 82, 74, 68, 67, 63, 53 y 51 kDa. De estas nueve proteínas, tres de ellas, con pesos moleculares de 82, 74 y 63 kDa fueron detectadas por Coomassie pero no por Western Blott y dos más con pesos moleculares de 98 y 51 kDa se detectaron exclusivamente mediante la técnica de Western blot. A su vez, las proteínas de 84, 68, 67 y 53 fueron detectadas por ambos métodos. De esta mezcla de proteínas cuatro fueron secretadas exclusivamente por las etapas asexuales y tienen pesos moleculares de 82, 74, 63 y 53 kDa (Tabla 15).

Con esta mezcla de proteínas solubles de etapas asexuales se estimularon CMC de tres pacientes de infección primaria (CM, CV y TL) procedentes de Tapachula, Chiapas que estuvieron infectados con *P. vivax* entre 0.25 y 8 años previos a la toma de muestra. Las CMC de dos de tres pacientes (67%) proliferaron de manera específica contra los exoantígenos asexuales de *P. vivax* pero no a los ERNI ($p < 0.05$, Tabla 16, Figura 8). La respuesta proliferativa asexual específica fue de 2.0 veces (rango 1.1 a 2.7) respecto a los ERNI (Tabla 17). Al parecer el tiempo transcurrido postinfección no influye en la magnitud de la respuesta, ya que en el paciente TL con 8 años postinfección se obtuvo la mayor respuesta a estos antígenos (Tabla 16, Figura 8).

b) gametocitos

Para los ensayos de proliferación se empleó una mezcla de exoantígenos con un rango de peso molecular entre 51 y 98 kDa, tal como se muestra en la Tabla 15. La mezcla de exoantígenos de gametocitos contenía siete proteínas, con pesos moleculares de 94, 84, 68, 67, 62, 55 y 51 kDa. De esta mezcla, las proteínas de 94, 62 y 55 kDa fueron específicas a los gametocitos, es decir no están presentes en las etapas asexuales. Estas proteínas fueron detectadas por Western blot. Las proteínas de 68, 67 y 51 kDa se detectaron por ambos métodos.

Las CMC de dos de tres pacientes de infección primaria (CM y CV) proliferaron de manera específica al ser estimuladas con exoantígenos de gametocitos de *P. vivax* ($p < 0.05$, Tablas 16 y 17, Figura 8). La respuesta proliferativa gametocito-específica fue 1.5 veces (rango 0.7 a 2.4) respecto a los antígenos asexuales (Tabla 17). El paciente que no respondió (TL) tenía ocho años postinfección.

Tabla 15. Exoantígenos de *P. vivax* de 50 a 100 kDa. Proteínas solubles secretadas por *P. vivax* o ERNI al sobrenadante de cultivo. Las proteínas fueron detectadas (+) o no (-) con Azul de Coomassie (CB) o por Western Blot (WB) empleando suero humano antigametocitos o antiasexuales.

Detección de exoantígenos (CB/WB)			
Peso Molecular (kDa)	Eritrocitos no infectados	Asexuales	Gametocitos
98	+/+	-/+	
97			
94			-/+
84	+/+	+/+	+/-
82	+/+	+/-	
78			
74		+/-	
68		+/+	+/+
67		+/+	+/+
63	+/-	+/-	
62			+/+
55			+/-
53	+/+	+/+	
51	+/-	-/+	+/+

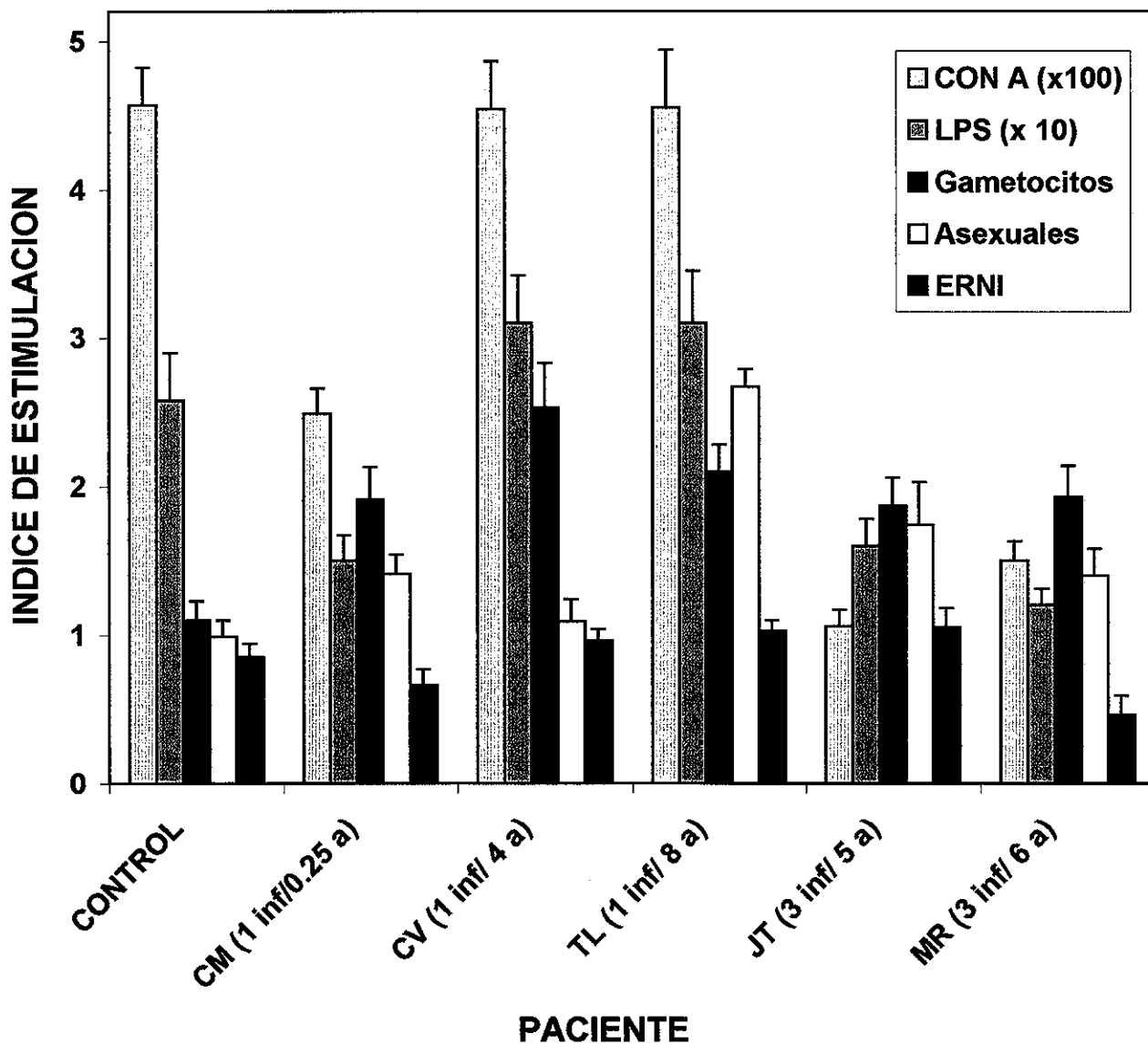


Figura 8. Proliferación de CMC de pacientes de infecciones previas con *P. vivax* estimuladas con *exoantígenos*. Se estimularon las CMC de pacientes de infección primaria y secundaria previas y controles no palúdicos con *exoantígenos* de 50 a 100 kDa de etapas asexuales o de gametocitos de *P. vivax* y con LPS o Con A. La proliferación celular se midió mediante incorporación de Timidina [^3H] y se determinaron los índices de estimulación. Entre paréntesis se indica el número de infecciones previas y el tiempo transcurrido post-infección en años.

Tabla 16. Índices de estimulación de CMC de pacientes con infecciones previas con *P. vivax* estimuladas con exoantígenos de 50 a 100 kDa.

PACIENTE	CON A	LPS	GAMETOCITOS	ASEXUALES	ERNI
CM (1 in/ 0.25 años) ¹	249.0	15.0	2.0	1.4	0.6
CV (1 in/ 4 años)	454.0	31.0	2.5	1.1	0.9
TL (1 in/ 8 años)	455.0	31.0	2.1	2.7	1.0
JT (3 in/ 5 años)	106.0	16.0	2.1	1.7	1.1
MR (3 in/ 6 años)	150.0	12.0	2.0	1.4	0.4
Control no febril	457.0	26.0	1.1	1.0	0.8

¹ = número de infecciones previas/ tiempo transcurrido desde la última infección

1.4.2 Respuesta de las CMC de infecciones múltiples previas

a) antígenos asexuales

Las CMC de dos pacientes con tres infecciones previas causadas por *P. vivax* entre 5 y 6 años previos (JT y MR) proliferaron también de manera específica a los exoantígenos asexuales de *P. vivax* (Tablas 16 y 17, Figura 8). La respuesta proliferativa asexual específica fue de 2.3 veces (rango 1.5 a 3) respecto a los ERNI.

Al comparar la magnitud de la respuesta desencadenada por exoantígenos asexuales en pacientes de infección primaria previa con la de los pacientes de infecciones múltiples, no hubo diferencias significativas (Figura 8).

Tabla 17. Razón de proliferación antígeno-específica en CMC de pacientes con infecciones previas por *P. vivax* estimuladas con exoantígenos de 50 a 100 kDa.

PACIENTE	GAMETOCITO/ERNI	ASEXUAL/ERNI	GAMETOCITO/ASEXUAL
CM (1 in/ 0.25 años)	3.0 *	2.0 *	1.4 *
CV (1 in/ 4 años)	2.6 *	1.1 ns	2.3 *
TL (1 in/ 8 años)	2.1 *	2.7 *	0.7 ns
JT (3 in / 5 años)	2.0 *	1.5 *	1.2 ns
MR (3 in / 6 años)	4.2 *	3.0 *	1.4 *
Control no febril	1.3 ns	1.2 ns	1.1 ns

¹ = número de infecciones previas/ tiempo transcurrido desde la última infección
 ns = no significativo estadísticamente,
 * = significativo, p<0.05

b) gametocitos

Solo en uno de dos pacientes (MR) con tres infecciones previas entre 5 y 6 años postinfección la respuesta proliferativa específica contra los exoantígenos de gametocitos de *P. vivax* fue significativa (p<0.05, Tablas 16 y 17, Figura 8). La respuesta proliferativa gametocito-específica fue de 1.4 veces respecto a los antígenos asexuales (p<0.05). En los pacientes de infección primaria y en los pacientes de infecciones múltiples se observó un perfil muy similar de respuesta a los exoantígenos de gametocitos.

1.5 CMC de infección primaria previa estimuladas con exoantígenos de *P. falciparum*

La respuesta de las CMC de los pacientes fue positiva a la Con A y a los LPS. En dos pacientes Pf 7 y Pf 10 la respuesta a estos controles fue baja, sin embargo, la respuesta a los antígenos de *Plasmodium* fue significativa (p<0.05, Tabla 19, Figura 9). La respuesta de las CMC del control no palúdico a los exoantígenos asexuales o de gametocitos no fue significativa, pero si

respondieron al control con Con A y a los LPS ($p < 0.05$, Tabla 20, Figura 9).

a) antígenos asexuales

Los exoantígenos purificados de *P. falciparum* tenían un rango de peso molecular entre 50 y 104 kDa, tal como se muestra en la Tabla 18. La mezcla de exoantígenos de etapas asexuales consistió en 15 proteínas; de estas proteínas siete fueron detectadas exclusivamente por tinción con Coomassie con pesos moleculares de 91, 74, 68, 67, 64, 57 y 51 kDa. Las proteínas de 96 y 70 kDa se detectaron por Western blot pero no por Coomassie y cinco proteínas fueron detectadas por ambos métodos, con pesos moleculares de 86, 82, 55, 54 y 50 kDa. De esta mezcla de proteínas dos fueron específicas para las etapas asexuales las de 104 y 50 kDa (Tabla 18).

Con esta mezcla de proteínas solubles de etapas asexuales se estimularon CMC de once pacientes de infección primaria procedentes del estado de Tabasco, que estuvieron infectados con *P. falciparum* entre 2 y 22 meses previos a la toma de muestra. Los datos epidemiológicos de estos pacientes se muestran en la Tabla 11.

Las CMC de diez de once pacientes (91%) proliferaron en respuesta a los exoantígenos asexuales de *P. falciparum* pero no a los ERNI ($p < 0.05$, Tabla 19, Figura 9). La respuesta proliferativa asexual-específica fue 2.3 veces respecto a los ERNI (rango 1.3 a 5.6, Tabla 20). Al parecer esta respuesta no es dependiente del tiempo transcurrido después de la infección, ya que no hubo correlación entre el periodo postinfección y los índices de estimulación (Figura 9).

b) gametocitos

La mezcla de exoantígenos obtenidos de gametocitos consistió en diecinueve proteínas con un rango de peso molecular entre 51 y 96 kDa. De estas proteínas ocho se detectaron solamente por Coomassie: 91, 74, 68, 67, 64, 61, 57 y 51 kDa. Tres proteínas se detectaron exclusivamente por Western blot con pesos moleculares de 96, 82 y 70 kDa y cuatro más fueron detectadas por ambas técnicas: 86, 62, 55 y 54 kDa (Tabla 18). De las proteínas totales cinco de ellas fueron específicas de los gametocitos, estas tienen pesos moleculares de 85, 65, 62, 59 y 52 kDa (Tabla 18).

Las CMC de nueve de once pacientes (82%) proliferaron de manera específica y significativa en respuesta a los exoantígenos de gametocitos de *P. falciparum* ($p < 0.05$, Tabla 19, Figura 9). La respuesta proliferativa gametocito-específica fue 2.0 veces respecto a los antígenos

asexuales (rango 1.3 a 3.2, Tabla 20). Esta respuesta no es dependiente del tiempo transcurrido postinfección. Lo anterior indica que los exoantígenos de gametocitos de *P. falciparum* fueron capaces de inducir una respuesta proliferativa en pacientes de infección primaria hasta 22 meses después de la infección. En la Tabla 21 se muestra un resumen de las CMC que proliferaron de manera significativa en respuesta al estímulo con exoantígenos

Tabla 18. Exoantígenos de *P. falciparum* de 50 a 100 kDa. Proteínas solubles secretadas al sobrenadante de cultivo por las cepas 7901 (asexual), NF54 (asexual y sexual) o ERNI. Las proteínas fueron detectadas (+) o no (-) con Azul de Coomassie (CB) o por Western Blot (WB) empleando suero humano antigametocitos o antiasexuales.

Peso molecular (kDa)	Detección de exoantígenos (CB/WB)		
	Eritrocitos no infectados	Asexuales	Gametocitos
104	+/-	+/-	
96		-/+	-/+
91		+/-	+/-
86		+/+	+/+
85			+/-
82	+/+	+/+	-/+
74		+/-	+/-
70	-/+	-/+	-/+
68		+/-	+/-
67		+/-	+/-
65			+/-
64	+/-	+/-	+/-
62			+/+
61	+/-		+/-
59			+/-
57	+/-	+/-	+/-
55		+/+	+/+
54	+/+	+/+	+/+
52			-/+
51	+/-	+/-	+/-
50		+/+	

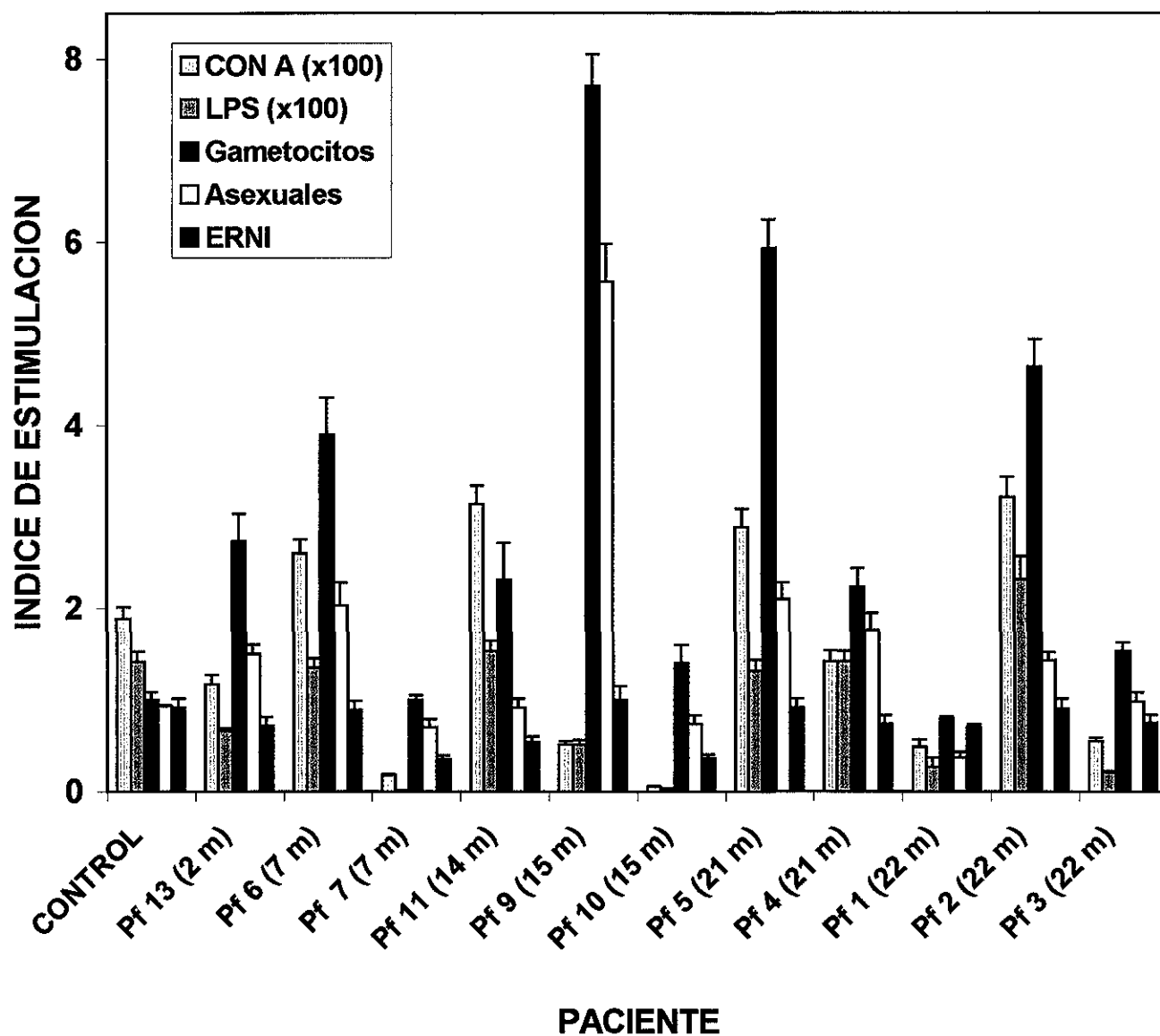


Figura 9. Proliferación de CMC de pacientes de infección primaria previa con *P. falciparum* estimuladas con exoantígenos. Se estimularon las CMC de pacientes de infección primaria previa y controles no palúdicos con exoantígenos de 50 a 100 kDa de etapas asexuales o de gametocitos de *P. falciparum* y con LPS o Con A. La proliferación celular se midió mediante incorporación de Timidina [^3H] y se determinaron los índices de estimulación. Entre paréntesis se indica el tiempo transcurrido post-infección en meses.

Tabla 19. Índices de estimulación de CMC de pacientes con infección primaria previa con *P. falciparum* estimuladas con exoantígenos de 50 a 100 kDa.

PACIENTE	CON A	LPS	GAMETOCITOS	ASEXUALES	ERNI
Pf 13 (2 meses) ¹	117.0	66.0	2.7	1.5	0.7
Pf 6 (7 meses)	260.0	135.0	4.0	2.0	0.9
Pf 7 (7 meses)	18.0	1.3	1.0	0.7	0.3
Pf 11 (14 meses)	314.0	153.0	2.3	0.9	0.5
Pf 9 (15 meses)	51.0	51.0	7.7	5.6	1.0
Pf 10 (15 meses)	5.3	3.3	1.4	0.7	0.3
Pf 4 (21 meses)	142.0	142.0	2.2	1.8	0.7
Pf 5 (21 meses)	289.0	132.0	6.0	2.1	0.9
Pf 1 (22 meses)	49.0	27.0	0.8	0.3	0.7
Pf 2 (22 meses)	321.0	232.0	4.6	1.4	0.9
Pf 3 (22 meses)	55.0	21.0	1.5	0.9	0.7
CONTROL	189.0	141.0	1.0	0.9	0.9

¹ = tiempo transcurrido desde la infección previa

Tabla 20. Razón de proliferación antígeno-específica en CMC de pacientes con infección primaria previa con *P. falciparum* estimuladas con exoantígenos de 50 a 100 kDa.

PACIENTE	GAMETOCITO/ERNI	ASEXUAL/ERNI	GAMETOCITO/ASEXUAL
Pf 13 (2 meses) ¹	4.0 *	2.1 *	2.0 *
Pf 6 (7 meses)	4.3 *	2.2 *	2.0 *
Pf 7 (7 meses)	2.8 *	2.0 *	1.4 ns
Pf 11 (14 meses)	4.3 *	1.7 *	2.5 *
Pf 9 (15 meses)	7.7 *	5.6 *	1.4 *
Pf 10 (15 meses)	4.0 *	2.1 *	2.0 *
Pf 4 (21 meses)	3.0 *	2.4 *	1.2 ns
Pf 5 (21 meses)	6.5 *	2.3 *	3.0 *
Pf 1 (22 meses)	1.1 ns	0.5 ns	2.2 *
Pf 2 (22 meses)	5.1 *	1.6 *	3.3 *
Pf 3 (22 meses)	2.0 *	1.3 *	1.5 *
Control no febril	1.1 ns	1.0 ns	1.1 ns

¹ = tiempo transcurrido desde la infección previa

ns = no significativo estadísticamente

* = significativo, p<0.05

Tabla 21. Resumen de la estimulación significativa en la proliferación de CMC estimuladas con exoantígenos.

TIPO DE INFECCION		ANTIGENO ASEXUAL	GAMETOCITOS
Infección previa <i>P. vivax</i>	primaria n= 3	2/3 8 años	2/3 < 8 años
	múltiple n= 2	2/2 < 6 años	1/2 < 6 años
Infección previa <i>P. falciparum</i>	primaria n= 11	10/11 < 2 años	9/11 < 2 años

1.6 Comparación de la capacidad proliferativa en CMC estimuladas con antígenos sonicados o con exoantígenos.

Las CMC de los controles no palúdicos no respondieron a ninguno de los antígenos sonicados o exoantígenos ya sea de etapas asexuales o de gametocitos tanto de *P. vivax* o *P. falciparum*. Sin embargo, si manifestaron respuestas proliferativas positivas al ser estimuladas con Con A o los LPS (Figuras 5 a 9).

Comparando la respuesta de las CMC en tres pacientes primarios (CM, CV y TL) que estuvieron infectados con *P. vivax* y fueron estimuladas tanto con antígenos asexuales sonicados como con exoantígenos derivados de las mismas etapas, no se encontraron diferencias en la respuesta proliferativa asexual-específica con ambos tipos de antígeno (Tabla 10 y Tabla 17). A su vez, en las CMC de dos pacientes que tuvieron infecciones múltiples causadas por *P. vivax* (JT y MR) tampoco se encontraron diferencias en la respuesta desencadenada por ambos tipos de antígeno (Tabla 10 y Tabla 17).

Sin embargo, en las CMC de seis pacientes de infección primaria debida a *P. falciparum* (Pf 6, Pf 11, Pf 9, Pf 4, Pf 5 y Pf 2) que fueron estimuladas con antígenos asexuales sonicados o con exoantígenos de las mismas etapas, se encontró que en cinco de estos pacientes (83.3% con excepción de Pf 9) la respuesta proliferativa asexual-específica fue superior de manera significativa con los antígenos sonicados (Tabla 13 y Tabla 20).

Por otro lado, al comparar la respuesta de las CMC en tres pacientes primarios (CM, CV y TL) que estuvieron infectados con *P. vivax* y fueron estimuladas con gametocitos sonicados o con exoantígenos de gametocitos, se encontró que la respuesta proliferativa gametocito-específica fue significativamente mayor con antígenos sonicados en dos de tres pacientes (66.7%, CM y TL).

En las CMC de dos pacientes (JT y MR) que tuvieron infecciones múltiples causadas por *P. vivax* y que fueron estimulados con gametocitos sonicados o exoantígenos de gametocitos no se encontraron diferencias en la respuesta desencadenada por ambos tipos de antígeno (Tabla 10 y Tabla 17). La respuesta proliferativa gametocito-específica fue igual con ambos tipos de antígenos.

No obstante, en las CMC de seis pacientes de infección primaria debida a *P. falciparum* (Pf 6, Pf 11, Pf 9, Pf 4, Pf 5 y Pf 2) que fueron estimuladas con gametocitos sonicados o con exoantígenos homólogos se encontró que la respuesta proliferativa gametocito-específica fue superior con antígenos sonicados en dos pacientes (Pf 4 y Pf 11), o bien fue mayor con exoantígenos en otros dos pacientes (Pf 6 y Pf 5) y en dos mas de ellos (Pf 9 y Pf 2) no se encontraron diferencias con ambos tipos de antígenos (Tablas 13 y 20).

Comparando la respuesta de las CMC de pacientes de infección primaria que estuvieron infectados con *P. vivax* (n=3) o con *P. falciparum* (n=6) respectivamente y que fueron estimuladas con antígenos sonicados, se encontró que los antígenos de etapas asexuales de *P. falciparum* indujeron de manera significativa una mayor respuesta proliferativa comparándola con la respuesta de los antígenos homólogos de *P. vivax*; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la respuesta proliferativa gametocito-específica entre ambas especies de parásito (Tabla 10 y 13).

Por otro lado, al comparar la respuesta de las CMC de estos pacientes primarios que estuvieron infectados con *P. vivax* (n=3) o con *P. falciparum* (n=10) y que fueron estimuladas con exoantígenos de etapas asexuales y de gametocitos, no se encontraron diferencias significativas en la respuesta proliferativa asexual-específica ni en la gametocito-específica (Tabla 17 y 20).

2. IDENTIFICACION DE FENOTIPOS DE LAS CMC QUE PROLIFERARON CON LOS ANTIGENOS DE *Plasmodium*.

2.1 CMC de pacientes de infección primaria previa estimuladas con antígenos sonicados de *P. vivax*

Se determinaron los fenotipos de las CMC de tres pacientes (CM, CV y TL) de infección primaria que proliferaron al ser estimulados con antígenos sonicados de gametocitos o con antígenos de etapas asexuales de *P. vivax*. Los datos epidemiológicos de estos pacientes se presentan en la Tabla 8 y los perfiles de proliferación en la Tabla 9. Los histogramas de fluorescencia de un paciente representativo (CM) se presentan en la Figura 10 A-C.

Los linfocitos que proliferaron en respuesta a los antígenos sonicados de *P. vivax* fueron principalmente los T $\gamma\delta^+$ (Tabla 22, Figura 11). El porcentaje de estimulación con antígenos asexuales (estimulación asexual-específica) fue de $36.7\% \pm 33.2$ (rango de 9.1 a 73.6), mientras que el porcentaje de estimulación con antígenos específicos de gametocitos (estimulación gametocito-específica) fue de $32.5\% \pm 24$ (rango de 18.0 a 60.1). Los antígenos de gametocitos indujeron una proliferación de linfocitos T $\gamma\delta^+$ significativamente mayor que los antígenos asexuales ($p < 0.05$, Figura 11).

Los linfocitos T $\alpha\beta^+$ proliferaron en una mínima proporción, y no se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de estimulación asexual-específico ($2.6\% \pm 1.4$, rango de 1 a 3.6) y el gametocito-específico ($2.3\% \pm 2.2$, rango de 0.5 a 4.8, $p > 0.05$, Tabla 22, Figura 11). La expansión de los linfocitos que expresaron el marcador CD3 fue mínima, la estimulación asexual específica fue de $2.5\% \pm 1.2$ (rango de 1.1 a 3.3) y la estimulación gametocito-específica fue de $2.2\% \pm 0.4$ (rango de 1.8 a 2.6, Tabla 22). Sin embargo, aun con esta estimulación baja, los antígenos de gametocitos indujeron una estimulación significativamente mayor en estas células que los antígenos asexuales ($p < 0.05$, Figura 11).

La población de linfocitos CD8⁺ fue la que se expandió mayoritariamente en respuesta a los antígenos sonicados de *P. vivax*, la estimulación asexual-específica fue de $9.1\% \pm 6.6$ (rango de 3.5 a 16.4) y la estimulación gametocito-específica fue de $9.3\% \pm 2.4$ (rango de 6.7 a 11.5, Tabla 22). Los antígenos de gametocitos indujeron un mayor porcentaje de expansión de estas células que los antígenos asexuales ($p < 0.05$, Figura 11). La expansión de los linfocitos CD4⁺ con

antígenos asexuales fue baja, $4.0\% \pm 0.6$ (rango de 3.3 a 4.4) y con gametocitos fue de $1.8\% \pm 1.5$ (rango de 0.3 a 3.2, Tabla 22). No hubo diferencias significativas entre el porcentaje de estimulación inducido por ambos antígenos. La proporción de linfocitos $CD4^+/CD8^+$ no se vio alterada al estimular las CMC con antígenos sonicados de ambos tipos. En las células control sin antígeno, la proporción de linfocitos $CD4^+/CD8^+$ fue de 2.4 a 1.0, mientras que en las CMC estimuladas con antígenos asexuales fue de 2.2 a 1.0 y con antígenos de gametocitos fue de 2.7 a 1.0.

Las CMC de estos pacientes expresaron en su superficie los marcadores de activación CD25, CD69 y en menor proporción el CD2 en respuesta a los antígenos sonicados de *P. vivax* (Figura 11). Los antígenos asexuales y de gametocitos estimularon de manera importante la expresión del marcador CD69, un incremento de $20.1\% \pm 19.4$ (rango de 0.73 a 39.5) y $23.3\% \pm 15.4$ (rango de 8.8 a 39.5), respectivamente. El incremento en la expresión de este marcador de activación fue significativamente mayor con los antígenos de gametocitos en comparación con los antígenos asexuales ($p < 0.05$, Figura 11). Del mismo modo, los antígenos asexuales y los antígenos gametocito-específicos estimularon de manera significativa la expresión del marcador CD25 ($31.7\% \pm 11.3$, rango de 23.2 a 44.5 y $25.4\% \pm 9.4$, rango de 14.5 a 31.4, respectivamente, Tabla 22). La expresión de este marcador fue significativamente mayor con los antígenos de gametocitos que con los antígenos asexuales ($p < 0.05$, Figura 11). La expresión del marcador CD2 fue mínima y no se encontraron diferencias en el porcentaje de estimulación asexual-específico ($1.0\% \pm 0.8$, rango de 0 a 1.6) y el gametocito-específico ($1.5\% \pm 1.2$, rango de 0.16 a 2.2, Tabla 22, Figura 11).

Hubo una falta de expresión del marcador CD21 en todas las poblaciones estimuladas.

En la Tabla 23 se muestra un resumen de los marcadores que se expresaron de manera significativa en los linfocitos estimulados con antígenos gametocito-específicos. Los antígenos de gametocitos estimularon principalmente la proliferación de los linfocitos T $\gamma\delta^+$, $CD3^+$, $CD8^+$ y la expresión de los marcadores de activación CD25 y CD69; no se encontraron diferencias en la expansión de linfocitos T $\alpha\beta^+$, $CD4^+$ y $CD2^+$ entre gametocitos y antígenos asexuales.

2.2 CMC de pacientes con infecciones múltiples previas estimuladas con antígenos sonicados de *P. vivax*

Se determinaron los fenotipos de las CMC de 3 pacientes (MR, RR y LO) con infecciones múltiples previas que se estimularon con antígenos sonicados de gametocitos o antígenos asexuales de *P. vivax* (Tabla 9). Los linfocitos que proliferaron mayoritariamente fueron los T $\gamma\delta^+$ (Figura 11). La estimulación asexual-específica para este fenotipo fue de $29.0\% \pm 36.5$ (rango de 0 a 70.0), mientras que la estimulación gametocito-específica fue de $22.0\% \pm 5.1$ (rango de 22.4 a 27.0, Tabla 22). Los antígenos de gametocitos indujeron una proliferación de los linfocitos T $\gamma\delta^+$ significativamente mayor que los antígenos asexuales ($p < 0.05$, Figura 11). La proliferación de linfocitos T $\alpha\beta^+$ fue mínima. El porcentaje de estimulación con antígenos asexuales fue de $4.7\% \pm 4.1$ (rango de 0 a 7.6) y con los antígenos específicos de gametocitos fue de $2.4\% \pm 0.81$ (rango de 1.5 a 3.0). A pesar de que la respuesta es cualitativamente baja en porcentaje, los linfocitos $\alpha\beta^+$ proliferaron significativamente en respuesta a los antígenos de gametocitos que a los de etapas asexuales ($p < 0.05$, Figura 11).

La expansión de los linfocitos $CD3^+$ no fue significativa, no se encontraron diferencias entre el porcentaje de estimulación asexual-específico ($1.3\% \pm 0.7$, rango de 0.9 a 2.0) y el gametocito-específico ($1.1\% \pm 0.8$, rango de 0.2 a 1.8 respectivamente, $p > 0.05$, Tabla 22, Figura 11). El porcentaje de expansión de los linfocitos $CD4^+$ con antígenos asexuales fue de $1.7\% \pm 1.6$ (rango de 0 a 3.3) y con antígenos gametocito-específicos fue de $3.0\% \pm 0.5$ (rango de 2.5 a 3.5, Tabla 3). Los antígenos de gametocitos indujeron un mayor porcentaje de expansión de esta población celular en comparación con los antígenos asexuales ($p < 0.05$, Figura 11).

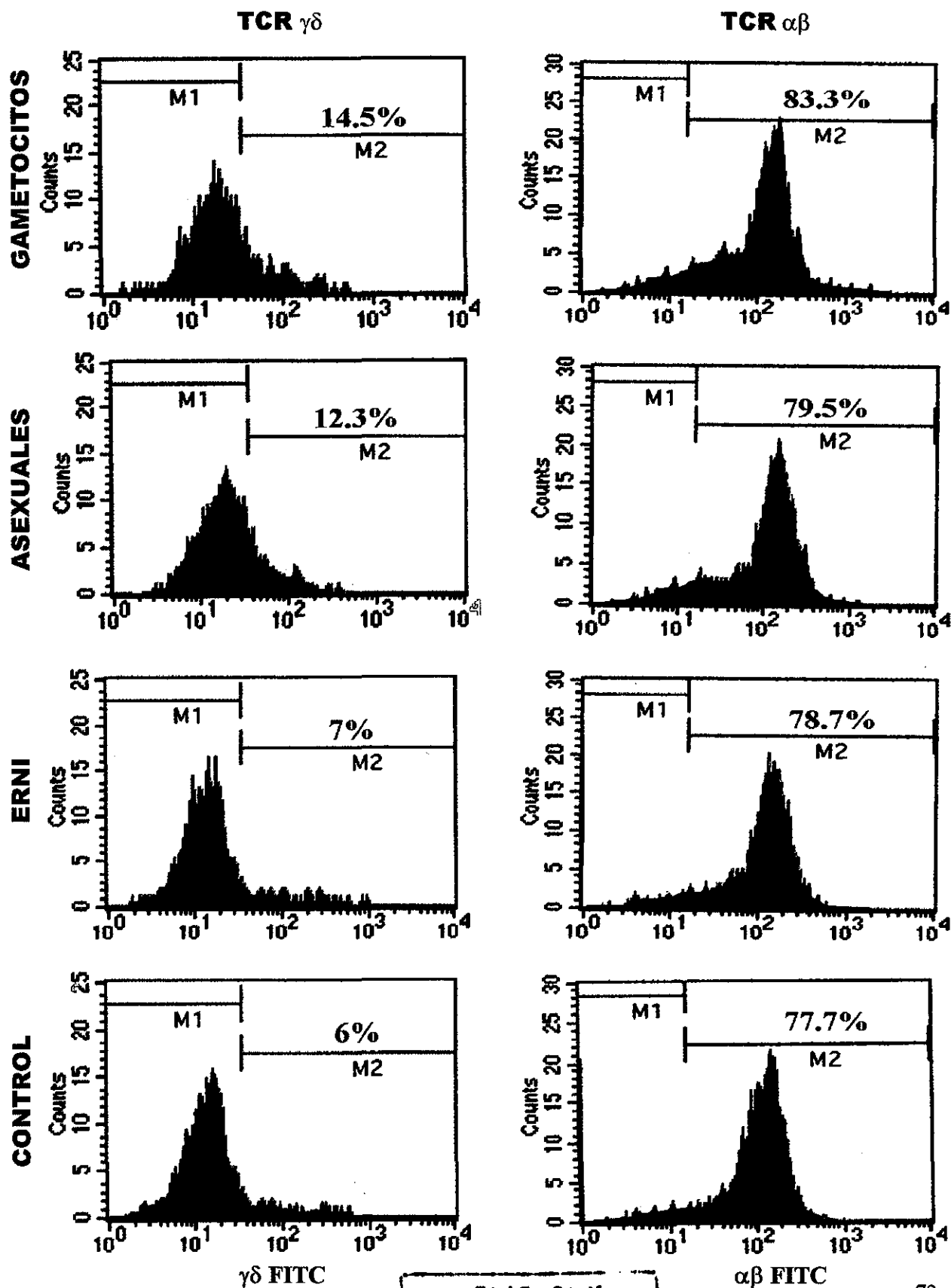
La población de linfocitos $CD8^+$ fue la que se expandió mayoritariamente en respuesta a los antígenos asexuales ($7.0\% \pm 6.1$, rango de 0 a 11.7) y a los antígenos gametocito-específicos ($5.0\% \pm 1.2$, rango de 3.7 a 6.0, Tabla 22) aunque no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de expresión de este marcador entre los dos tipos de antígenos ($p > 0.05$, Figura 11). La proporción de linfocitos $CD4^+/CD8^+$ en estos pacientes de infección secundaria fue de 2.7 a 1.0 en las CMC del control sin antígeno y en las CMC estimuladas con antígenos asexuales y con gametocitos fue de 2.5 a 1.0, por lo que no se alteró esta proporción en respuesta al estímulo con ninguno de los dos tipos de antígenos sonicados.

Los antígenos de *P. vivax* indujeron una expresión importante de los marcadores de activación CD25 y CD69 en esos linfocitos de infección secundaria (Figura 11). Con el marcador CD25 el porcentaje de estimulación asexual-específico fue de $16.0\% \pm 16.0$ (rango de 4.3 a 34.3) y el gametocito-específico fue de $14.4\% \pm 8.4$ (rango de 5.4 a 22.0, $p < 0.05$, Tabla 22). Los antígenos de gametocitos indujeron significativamente un mayor porcentaje de expresión del marcador CD25 que los antígenos asexuales ($p < 0.05$, Figura 11).

El porcentaje de expresión del marcador CD69 con antígenos asexuales fue de $15.6\% \pm 23.0$, (rango de 0 a 42.0) y con antígenos gametocito-específicos fue de $12.5\% \pm 5.8$ (rango de 6.5 a 18.2, Tabla 22). El porcentaje de expresión de este marcador fue significativamente mayor con los antígenos de gametocitos que con antígenos asexuales ($p < 0.05$, Figura 11). La expresión del marcador CD2 fue mínima y no se encontraron diferencias entre el porcentaje de expresión entre antígenos asexuales y con antígenos gametocito-específicos ($2.3\% \pm 1.7$, rango de 0.4 a 3.5 y $0.88\% \pm 1.4$, rango de 0 a 2.5, respectivamente). No se encontró expresión del marcador CD21 en las CMC estimuladas con ninguno de los antígenos.

En la Tabla 23 se muestra un resumen de los marcadores que se expresaron de manera significativa en los linfocitos estimulados con antígenos gametocito-específicos. Los antígenos de gametocitos estimularon una proliferación significativamente mayor que los antígenos asexuales de los linfocitos T $\gamma\delta^+$, $\alpha\beta^+$, $CD4^+$, $CD25^+$ y $CD69^+$; ambos antígenos indujeron proliferación similar de linfocitos con marcadores CD3, CD8 y CD2.

Figura 10-A. Expresión del TCR $\gamma\delta$ y $\alpha\beta$ en CMC de un paciente representativo de infección primaria previa con *P. vivax* estimuladas con antígenos sonicados.



SE PUEDE
FALLA DE ORIGEN

Figura 10-B. Expresión de los marcadores CD25 y CD69 en CMC de un paciente representativo de infección primaria previa con *P. vivax* estimuladas con antígenos sonicados.

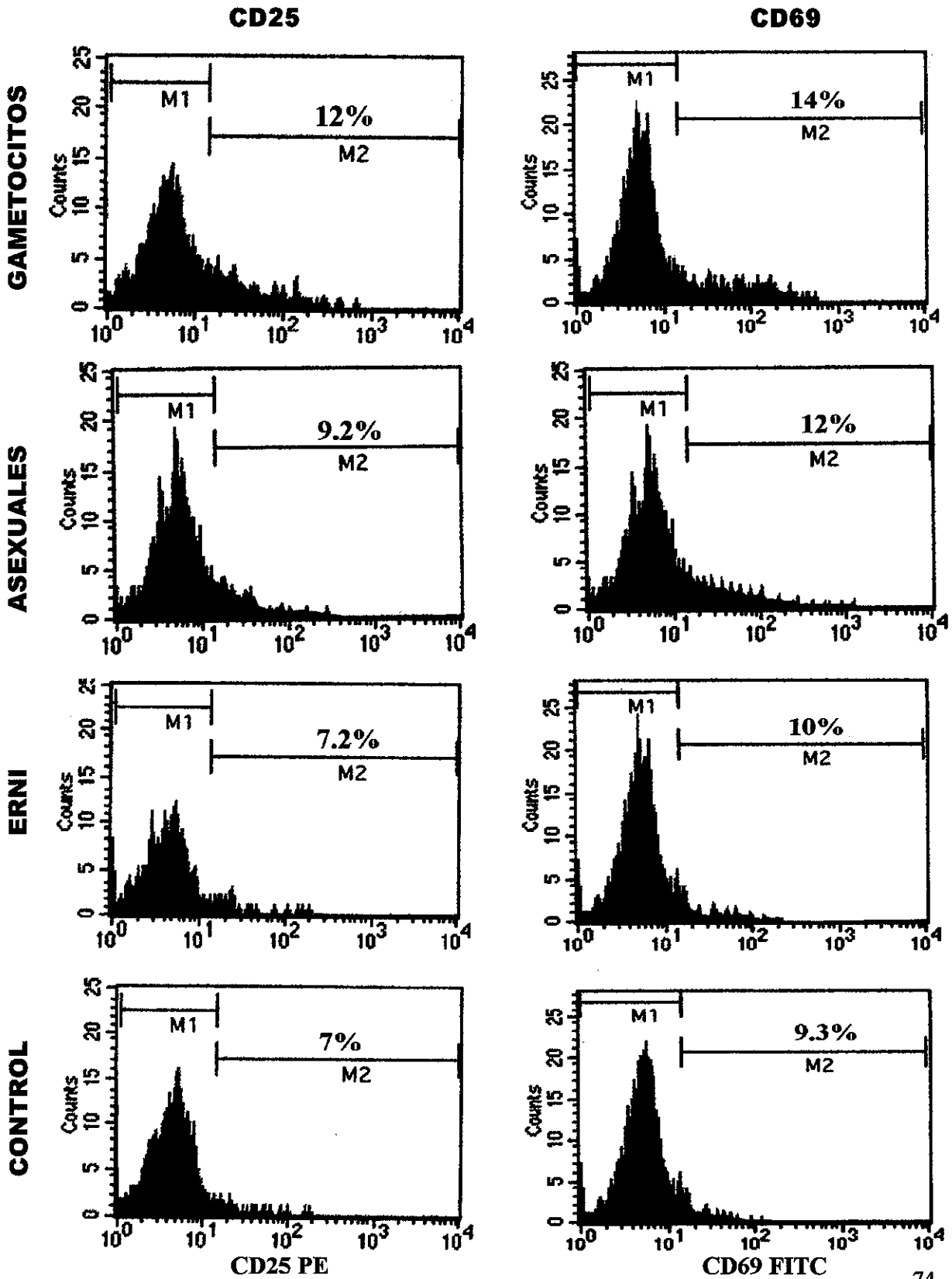
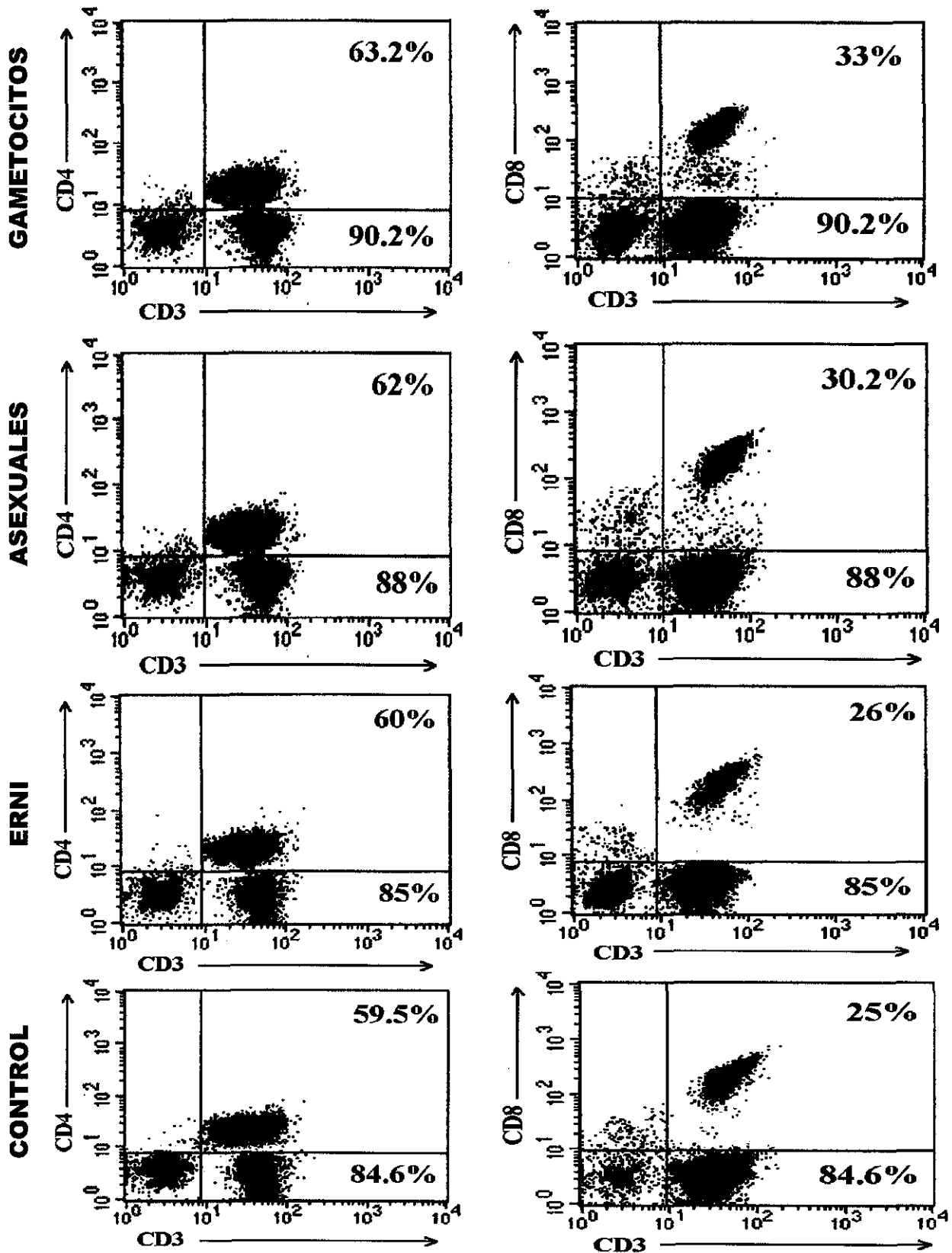
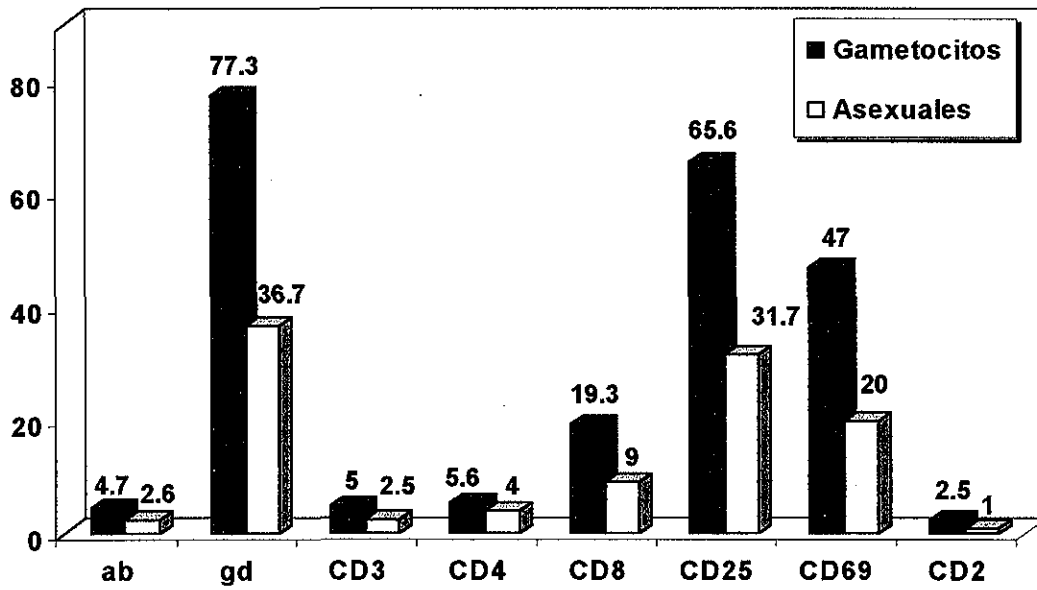


Figura 10-C. Expresión de los marcadores CD3, CD4 y CD8 en CMC de un paciente representativo de infección primaria previa con *P. vivax* estimuladas con antígenos sonicados.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PACIENTES DE INFECCION PRIMARIA



PACIENTES DE INFECCIONES MÚLTIPLES

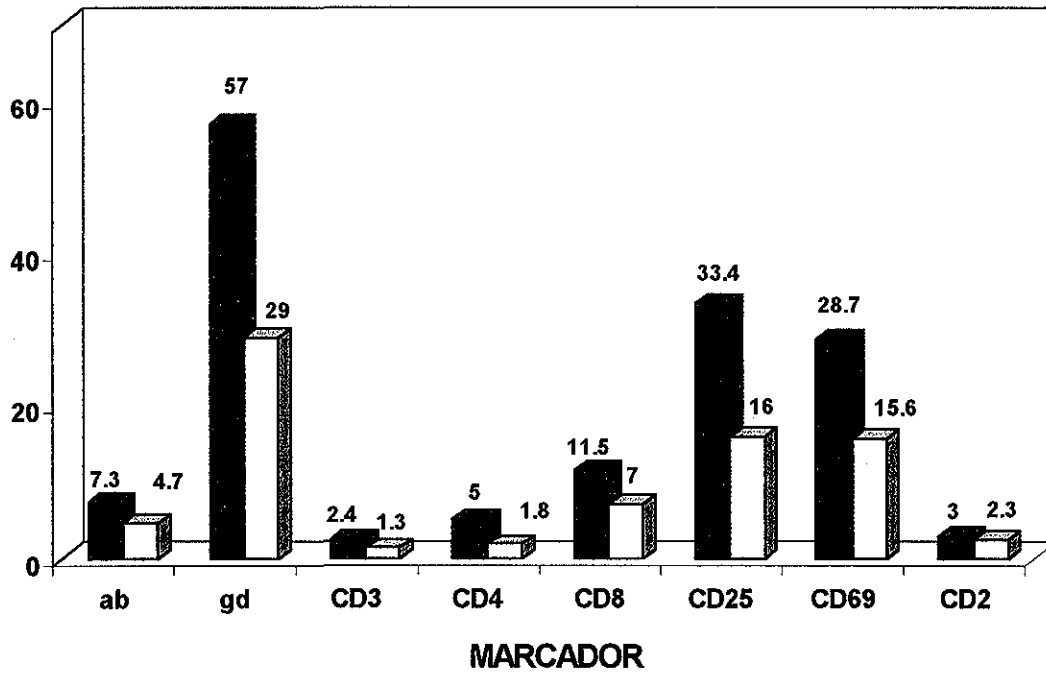


Figura 11. Porcentaje de expresión de marcadores en CMC de pacientes que estuvieron infectados con *P. vivax* estimuladas con antígenos sonicados. Se representa el promedio del porcentaje de CMC positivas para cada marcador.

Tabla 22. Porcentaje de estimulación asexual-específico y gametocito-específico en CMC de pacientes que estuvieron infectados con *P. vivax* o *P. falciparum* estimuladas con antígenos sonicados (porcentaje \pm desviación estándar).

PACIENTE	ANTIGENO	$\alpha\beta$	$\gamma\delta$	CD 3	CD 4	CD 8	CD 2	CD 25	CD 69
<i>P. vivax</i> Infección primaria n=3	Gametocito- específico	2.3 \pm 2.2	32.5 \pm 24	2.2 \pm 0.4	1.8 \pm 1.5	9.3 \pm 2.4	1.5 \pm 1.2	25.4 \pm 9.4	23.3 \pm 15.4
	Asexual- específico	2.6 \pm 1.4	36.7 \pm 33.2	2.5 \pm 1.2	4.0 \pm 0.6	9.1 \pm 6.6	1.0 \pm 0.8	31.7 \pm 11.3	20.1 \pm 19.4
<i>P. vivax</i> Infecciones múltiples n=3	Gametocito- específico	2.4 \pm 0.81	22.0 \pm 5.1	1.1 \pm 0.8	3.0 \pm 0.51	5.0 \pm 1.2	0.88 \pm 1.4	14.4 \pm 8.37	12.5 \pm 5.8
	Asexual- específico	4.7 \pm 4.1	29.0 \pm 36.5	1.3 \pm 0.7	1.7 \pm 1.6	7.0 \pm 6.1	2.3 \pm 1.7	16.0 \pm 16.0	15.6 \pm 23
<i>P. falciparum</i> Infección primaria n=5	Gametocito- específico	2.2 \pm 1.2	50.4 \pm 19.5	4.0 \pm 2.7	4.0 \pm 1.0	9.0 \pm 4.3	1.1 \pm 1.1	42.0 \pm 23.8	20.0 \pm 8.1
	Asexual- específico	2.7 \pm 1.7	45.0 \pm 11.7	3.0 \pm 2.1	5.3 \pm 2.2	11.0 \pm 2.8	3.3 \pm 4.3	43.0 \pm 23.8	54.0 \pm 49.5

2.3 CMC de pacientes de infección primaria previa estimuladas con antígenos sonicados de *P. falciparum*.

Se determinaron los fenotipos de las CMC de cinco pacientes (Pf 6, Pf 9, Pf 4, Pf 5 y Pf 2) que proliferaron al ser estimulados con antígenos sonicados de gametocitos o de etapas asexuales de *P. falciparum*. Los datos epidemiológicos de cada uno de ellos se muestran en la Tabla 11 y de proliferación en la Tabla 12.

Los linfocitos que proliferaron en respuesta a los antígenos sonicados de *P. falciparum* fueron principalmente los T $\gamma\delta^+$ (Figura 12). El porcentaje de estimulación con antígenos asexuales fue de $45\% \pm 11.7$ (rango de 21.6 a 60.1) y con los antígenos gametocito-específicos fue de $50.4\% \pm 19.5$ (rango de 35.4 a 78.7, Tabla 22). La proliferación de linfocitos T $\gamma\delta^+$ fue significativamente mayor con antígenos de gametocitos que con antígenos asexuales ($p < 0.05$, Figura 12).

Los linfocitos T $\alpha\beta^+$ proliferaron en una proporción mínima, el porcentaje de estimulación asexual-específico fue de $2.7\% \pm 1.7$ (rango de 0 a 4.2) y la estimulación gametocito-específica de $2.2\% \pm 1.2$ (rango de 0.4 a 5.1). Los antígenos de gametocitos estimularon de manera significativa una proliferación mayor de estos linfocitos $\alpha\beta^+$ con respecto a los antígenos asexuales ($p < 0.05$, Figura 12). El porcentaje de estimulación de linfocitos CD3⁺ con antígenos asexuales y con antígenos gametocito-específicos fue mínimo ($3.0\% \pm 2.1$, rango de 0.8 a 5.3 y $4.0\% \pm 2.7$, rango de 1.1 a 7.2, respectivamente, Tabla 22). A pesar de lo anterior, los antígenos de gametocitos estimularon una proliferación significativamente mayor de este marcador ($p < 0.05$, Figura 12).

La población de linfocitos CD8⁺ se expandió en respuesta a los antígenos asexuales ($11.0\% \pm 2.8$, rango de 8.0 a 27.5) y a los antígenos gametocito-específicos ($9.0\% \pm 4.3$, rango de 6.0 a 15.5, Tabla 22). Los gametocitos estimularon de manera significativa una expansión mayor de los linfocitos CD8⁺ que los antígenos asexuales ($p < 0.05$, Figura 12). La expansión de los linfocitos CD4⁺ con los antígenos asexuales fue de $5.3\% \pm 2.2$ (rango de 2.8 a 11.7) y con antígenos específicos de gametocitos fue de $4.0\% \pm 1.0$ (rango de 5.6 a 22.0, Tabla 22). La proliferación de estos linfocitos fue significativamente mayor con antígenos de gametocitos que con antígenos asexuales ($p < 0.05$, Figura 12). La proporción de linfocitos CD4⁺/CD8⁺ no se modificó por estimulación con ninguno de los dos tipos de antígeno. En las células control sin

antígeno, la proporción de linfocitos CD4⁺/CD8⁺ fue de 2.0 a 1.0, mientras que en las CMC estimuladas con antígenos asexuales y con gametocitos fue de 1.8 a 1.0.

Los antígenos sonicados de *P. falciparum* indujeron una expresión importante de los marcadores de activación CD25 y CD69 (Figura 12). El porcentaje de expresión del marcador CD25 con antígenos asexuales fue de 43.0% ± 23.8 (rango de 19.2 a 67.6) y con antígenos gametocito-específicos fue de 42.0% ± 23.8 (rango de 12.1 a 64.2). Los gametocitos indujeron una expresión significativamente mayor de este marcador en comparación con los antígenos asexuales (p<0.05, Figura 12). Del mismo modo, el porcentaje de expresión del marcador CD69 con antígenos asexuales fue de 54.0% ± 49.5 (rango de 10.3 a 109.3) y con antígenos gametocito-específicos fue de 20.0% ± 8.1 (rango de 12.1 a 29.8, Tabla 22). La expresión del marcador CD69 también fue significativamente mayor con los antígenos de gametocitos (p<0.05, Figura 12). La expresión del marcador CD2 fue mínima y no se encontraron diferencias entre el porcentaje de estimulación con antígenos asexuales y con antígenos gametocito-específicos (3.3% ± 4.3, rango de 0 a 9.6 y 1.1% ± 1.1, rango de 0 a 2.5, respectivamente, Tabla 22). En la Tabla 23 se presenta un resumen de los marcadores que se expresaron de manera significativa en los linfocitos estimulados con antígenos específicos de gametocitos.

En resumen, en las CMC de pacientes primarios que estuvieron infectados con *P. falciparum*, los antígenos de gametocitos estimularon de manera significativa la proliferación de los linfocitos T $\gamma\delta^+$, $\alpha\beta^+$, CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD25⁺ y CD69⁺ en comparación a los antígenos asexuales.

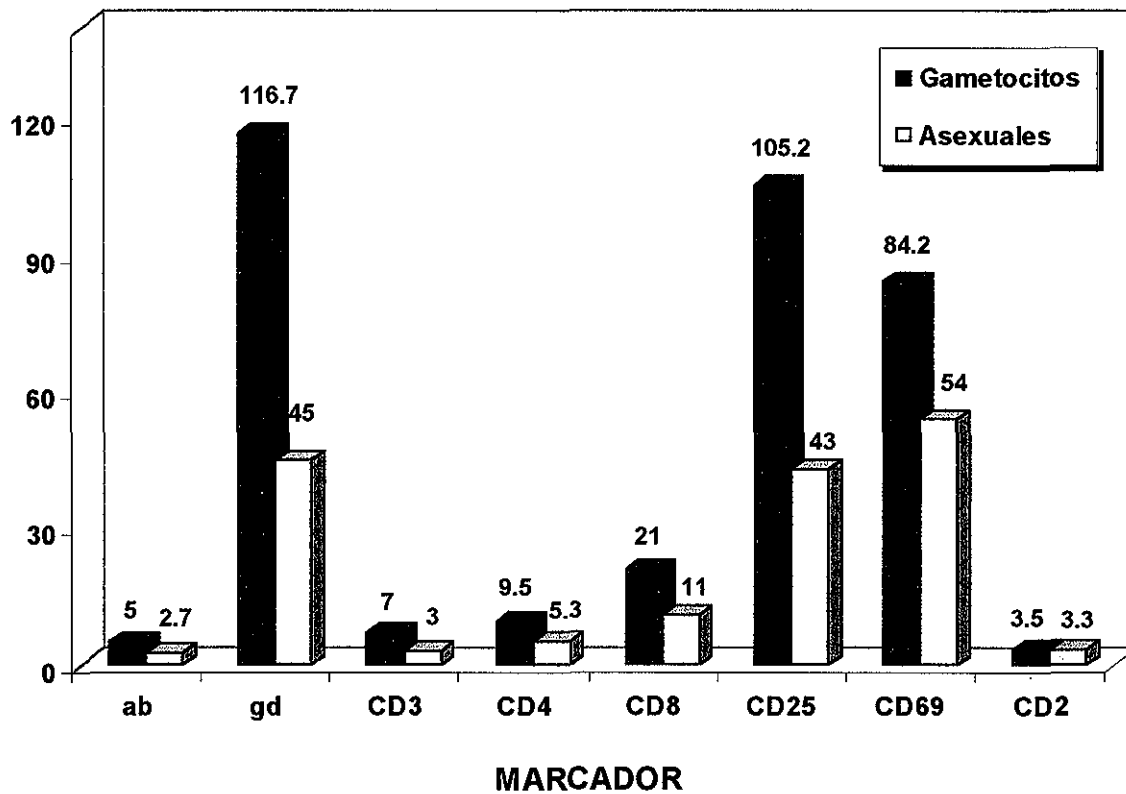


Figura 12. *Porcentaje de expresión de marcadores en CMC de pacientes de infección primaria previa con P. falciparum estimuladas con antígenos sonicados. Se representa el promedio del porcentaje de CMC positivas para cada marcador.*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 23. Marcadores expresados en linfocitos que proliferaron de manera significativa en respuesta a la estimulación con antígenos gametocito-específicos sonificados.

PACIENTE	$\alpha\beta$	$\gamma\delta$	CD 3	CD 4	CD 8	CD 2	CD 25	CD 69
<i>P. vivax</i> Infección primaria	-	+	+	-	+	-	+	+
<i>P. vivax</i> Infecciones múltiples	+	+	-	+	-	-	+	+
<i>P. falciparum</i> Infección primaria	+	+	+	+	+	-	+	+

2.4 CMC de pacientes de infección primaria previa estimuladas con exoantígenos de *P. vivax*.

Se determinaron los fenotipos de las CMC de los pacientes CM, CV y TL que proliferaron al ser estimulados con exoantígenos de gametocitos o de etapas asexuales de *P. vivax*. Los datos epidemiológicos de los pacientes se presentan en la Tabla 5 y los perfiles de proliferación en la Tabla 16.

Los linfocitos T $\gamma\delta^+$ proliferaron en respuesta a los exoantígenos de *P. vivax* (Figura 13), aunque esta estimulación no fue gametocito-específica. El porcentaje de estimulación con antígenos asexuales fue de $46.0\% \pm 14.6$ (rango de 31.0 a 60.0), en comparación con los exoantígenos de gametocitos $12.3\% \pm 13.5$ (rango de 0 a 26.8, $p < 0.05$, Tabla 24, Figura 13).

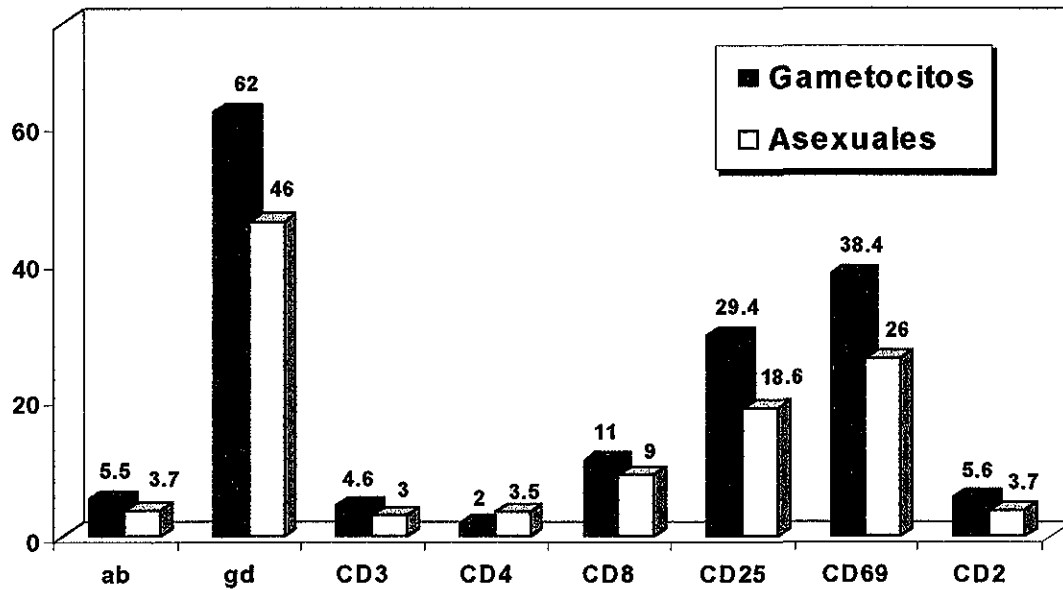
La estimulación de los linfocitos T $\alpha\beta^+$ fue baja y no se encontraron diferencias significativas entre la respuesta a los exoantígenos asexuales y a los gametocitos ($3.7\% \pm 0.8$, rango de 3.0 a 4.5 y $2.0\% \pm 1.7$, rango de 0 a 3.6, respectivamente, Figura 13). A su vez, tampoco hubo diferencias significativas entre el porcentaje de expansión de los linfocitos CD3⁺ en las CMC estimuladas con exoantígenos asexuales ($3.0\% \pm 1.0$, rango de 2.0 a 4.0) y con los exoantígenos de gametocitos ($2.0\% \pm 1.7$, rango de 0 a 3.4, Tabla 24, Figura 13).

La población de linfocitos CD8⁺ fue la que se expandió mayoritariamente en respuesta a los exoantígenos asexuales y de gametocitos, la estimulación asexual-específica fue de 9.0% ± 0.6 (rango de 8.2 a 9.4) y la estimulación gametocito-específica fue de 3.5% ± 3.1 (rango de 0 a 6.0, Tabla 24). No hubo diferencias significativas en la proliferación estimulada por ambos antígenos (Figura 13). La expansión de los linfocitos CD4⁺ fue mínima en las CMC estimuladas con exoantígenos de etapas asexuales (3.5% ± 0.7, rango de 2.8 a 4.2) y con exoantígenos gametocito-específicos (2.3% ± 2.2, rango de 0 a 4.3), y tampoco hubo diferencias significativas entre la respuesta proliferativa a ambos antígenos (Tabla 24, Figura 13). La proporción de linfocitos CD4⁺/CD8⁺ en estos pacientes de infección primaria fue de 2.4 a 1.0 en las CMC del control sin antígeno y de 2.3 a 1.0 en las CMC estimuladas con antígenos asexuales, y con gametocitos fue de 2.2 a 1.0, por lo que no se alteró esta proporción en respuesta al estímulo con los exoantígenos.

Sin embargo, las CMC de estos pacientes expresaron en su superficie los marcadores de activación CD25, CD69 y en menor proporción el CD2 al ser estimuladas con exoantígenos de *P. vivax* (Figura 13). No se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de expresión del marcador CD25 con exoantígenos asexuales y con los gametocito-específicos (18.6% ± 1.6, rango de 17.4 a 20.4 y 12.2% ± 10.6, rango de 0 a 18.5, respectivamente, Tabla 24). Del mismo modo, tampoco hubo diferencias significativas en la expresión del marcador CD69, la estimulación asexual-específica fue de 26.0% ± 3.7 (rango de 22.3 a 29.7) y la gametocito-específica fue de (13.4% ± 13.4, rango de 0 a 26.7, Tabla 24). La expresión del marcador CD2 fue mínima y no se encontraron diferencias en el porcentaje de estimulación asexual-específico y gametocito-específico (3.7% ± 4.6, rango de 0.2 a 9.0 y 1.7 ± 2.0, rango de 0 a 3.8 respectivamente, Tabla 24). No se detectó expresión del marcador CD21 en las poblaciones estimuladas.

En la Tabla 25 se presenta un resumen de los marcadores que se expresaron de manera significativa en los linfocitos estimulados con exoantígenos específicos de gametocitos. En las CMC de pacientes de infección primaria previa con *P. vivax* los exoantígenos de gametocitos y de etapas asexuales indujeron el mismo índice de proliferación de linfocitos T $\alpha\beta^+$, CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD25⁺, CD69⁺ y CD2⁺. Mientras que los antígenos de etapas asexuales estimularon de igual forma y principalmente, la proliferación de linfocitos T $\gamma\delta^+$.

PACIENTES DE INFECCION PRIMARIA



PACIENTES DE INFECCIONES MÚLTIPLES

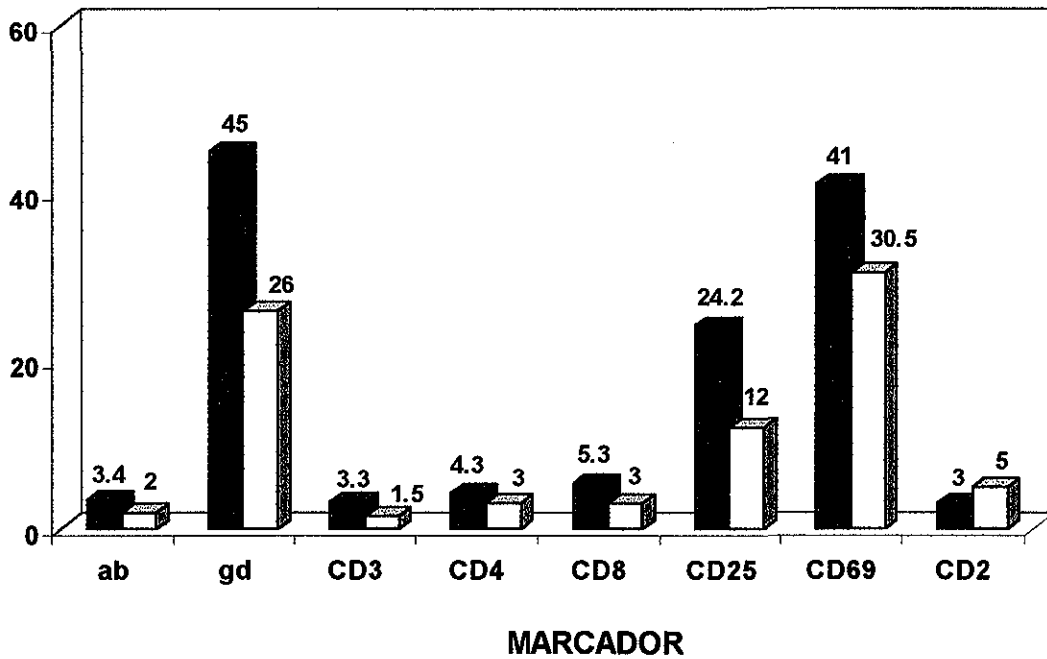


Figura 13. Porcentaje de expresión de marcadores en CMC de pacientes que estuvieron infectados con *P. vivax* estimuladas con exoantígenos de 50 a 100 kDa. Se representa el promedio del porcentaje de CMC positivas para cada marcador.

2.5 CMC de pacientes con infecciones múltiples previas estimuladas con exoantígenos de *P. vivax*.

Se determinaron los fenotipos de las CMC de los pacientes MR y JT estimuladas con exoantígenos de *P. vivax* (Tabla 8). Los índices de proliferación se presentan en la Tabla 16. Los linfocitos T $\gamma\delta^+$ proliferaron principalmente en respuesta a los exoantígenos asexuales ($26.0\% \pm 25$, rango de 8.5 a 43.7) y a los exoantígenos de gametocitos ($15.0\% \pm 0.1$, Tabla 24, Figura 13). Los exoantígenos de gametocitos indujeron una proliferación de linfocitos T $\gamma\delta^+$ significativamente mayor que los antígenos asexuales ($p < 0.05$).

Los exoantígenos de etapas asexuales ($2.0\% \pm 2$, rango de 0.4 a 3.4) y de gametocitos ($1.5\% \pm 0$) estimularon en una mínima proporción la proliferación de linfocitos T $\alpha\beta^+$ y no se encontraron diferencias significativas entre ambos antígenos (Tabla 24, Figura 13). La expansión de linfocitos $CD3^+$ también fue mínima, la estimulación asexual-específica fue de $1.5\% \pm 1.7$ (rango de 0.3 a 2.8) y la estimulación gametocito-específica fue de $1.8\% \pm 0.14$ (rango de 1.7 a 2). Los exoantígenos de gametocitos indujeron un porcentaje de estimulación significativamente mayor de estas células que los exoantígenos asexuales ($p < 0.05$, Tabla 24, Figura 13).

No se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de estimulación de los linfocitos $CD4^+$ con exoantígenos asexuales ($3.0\% \pm 0.7$, rango de 2.3 a 3.4) y el obtenido con los gametocitos ($1.4\% \pm 1.5$, rango de 0.4 a 2.5, Tabla 24, Figura 13). Del mismo modo, en la población de linfocitos $CD8^+$ no se encontraron diferencias entre el porcentaje de estimulación asexual-específico y el gametocito-específico ($3.0\% \pm 0.84$, rango de 2.4 a 3.6 y $2.2\% \pm 1.5$, rango de 1 a 3.3 respectivamente, Tabla 24, Figura 13). La proporción de linfocitos $CD4^+/CD8^+$ fue de 2.1 a 1.0 en las CMC del control sin antígeno y en las estimuladas con exoantígenos de etapas asexuales y de gametocitos.

Los exoantígenos asexuales y de gametocitos indujeron la expresión del marcador $CD25$ ($12.2\% \pm 4.4$, rango de 9.0 a 15.3 y $10.4\% \pm 13.0$, rango de 1.2 a 19.6, respectivamente), aunque no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de expresión de este marcador con ambos tipos de exoantígenos (Tabla 24, Figura 13). El porcentaje de expresión del marcador $CD69$ con antígenos asexuales fue de $30.5\% \pm 14.6$ (rango de 20.0 a 40.8) y el porcentaje de

expresión con gametocitos fue de $7.8\% \pm 5.7$ (rango de 3.7 a 11.8, Tabla 24, Figura 13) y tampoco se encontraron diferencias significativas entre ambos. La expresión del marcador CD2 con exoantígenos asexuales y de gametocitos fue mínima ($5.0\% \pm 5.6$, rango de 1.0 a 1.8 y $1.6\% \pm 1.3$, rango de 0.7 a 2.6, respectivamente) y no se encontraron diferencias significativas entre ambos antígenos (Tabla 24, Figura 13). No se detectó una expresión significativa del marcador CD21 en ninguna de las poblaciones estudiadas.

En la Tabla 25 se presenta un resumen de los marcadores que se expresaron de manera significativa en los linfocitos estimulados con exoantígenos gametocito-específicos. En las CMC de pacientes de infecciones secundarias por *P. vivax*, los exoantígenos de gametocitos estimularon una proliferación significativamente mayor a la de etapas asexuales de linfocitos T $\gamma\delta^+$ y $CD3^+$; ambos antígenos indujeron proliferación similar de linfocitos T $\alpha\beta^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD25^+$, $CD69^+$ y $CD2^+$.

2.6 CMC de pacientes de infección primaria previa estimuladas con exoantígenos de *P. falciparum*.

Se determinaron los fenotipos de las CMC de cuatro pacientes (Pf 6, Pf 9, Pf 5 y Pf 2) que proliferaron al ser estimuladas con exoantígenos de gametocitos o de etapas asexuales de *P. falciparum*. Los datos epidemiológicos de estos pacientes se muestran en la Tabla 11 y los perfiles de proliferación en la Tabla 19.

Los linfocitos T $\gamma\delta^+$ proliferaron de forma importante en respuesta a los exoantígenos de *P. falciparum*. El porcentaje de estimulación con exoantígenos asexuales fue de $27.5\% \pm 22.0$, (rango de 2.2 a 52.7) y el porcentaje de estimulación con exoantígenos de gametocitos fue de $41.0\% \pm 20.5$ (rango de 28.2 a 71.5). Los exoantígenos de gametocitos indujeron una proliferación significativamente mayor de linfocitos $\gamma\delta^+$ que los exoantígenos asexuales ($p < 0.05$, Tabla 24, Figura 14).

La proliferación de linfocitos T $\alpha\beta^+$ fue mínima y no se encontraron diferencias significativas entre ambos antígenos ($6.0\% \pm 3.2$, rango de 2.7 a 9.1 y $3.0\% \pm 3.5$, rango de 0 a 8, respectivamente, Tabla 24, Figura 14). El porcentaje de estimulación de linfocitos $CD3^+$ con exoantígenos asexuales fue de $5.5\% \pm 3.7$ (rango de 1.7 a 10.3) y con gametocitos fue de $1.2\% \pm 0.8$ (rango de 0.8 a 2.0, Tabla 24). Los exoantígenos de gametocitos estimularon una proliferación significativamente mayor ($p < 0.05$, Figura 14).

Tabla 24. Porcentaje de estimulación asexual-específico y gametocito-específico en CMC de pacientes que estuvieron infectados con *P. vivax* o *P. falciparum* estimuladas con exoantígenos (porcentaje \pm desviación estándar).

PACIENTE	ANTIGENO	$\alpha\beta$	$\gamma\delta$	CD 3	CD 4	CD 8	CD 2	CD 25	CD 69
<i>P. vivax</i> Infección primaria n=3	Gametocito- específico	1.8 \pm 1.7	12.3 \pm 13.5	2.0 \pm 1.7	2.3 \pm 2.2	3.5 \pm 3.1	1.7 \pm 1.9	12.2 \pm 10.6	13.4 \pm 13.4
	Asexual- específico	3.7 \pm 0.8	46.0 \pm 14.6	3.0 \pm 1.0	3.5 \pm 0.7	9.0 \pm 0.6	3.7 \pm 4.6	18.6 \pm 1.6	26.1 \pm 3.7
<i>P. vivax</i> Infecciones múltiples n=2	Gametocito- específico	2.4 \pm 0.81	22.1 \pm 5.1	1.1 \pm 0.8	3.0 \pm 0.51	5.0 \pm 1.2	0.88 \pm 1.4	14.4 \pm 8.37	12.5 \pm 5.8
	Asexual- específico	4.7 \pm 4.1	29.0 \pm 36.5	1.3 \pm 0.7	1.7 \pm 1.6	7.0 \pm 6.1	2.3 \pm 1.7	16.0 \pm 16.0	15.6 \pm 23
<i>P. falciparum</i> Infección primaria n=4	Gametocito- específico	3.0 \pm 3.5	41.0 \pm 20.5	1.2 \pm 0.8	5.0 \pm 4.6	8.3 \pm 2.0	0.7 \pm 0.6	48.1 \pm 29	18.6 \pm 11
	Asexual- específico	9.0 \pm 3.2	27.5 \pm 22	5.5 \pm 3.7	8.1 \pm 4.5	7.6 \pm 3.6	5.0 \pm 4.7	14.8 \pm 9.1	58.6 \pm 52.8

La expansión de linfocitos CD4⁺ con los exoantígenos de etapas asexuales fue de 8.0% ± 4.5 (rango de 5.0 a 14.7) y con exoantígenos de gametocitos fue de 5.0% ± 4.6 (rango de 1.4 a 11.7), no se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de estimulación con ambos tipos de antígenos (Tabla 24, Figura 14). Los linfocitos CD8⁺ se expandieron de manera importante en respuesta a los exoantígenos asexuales (7.6% ± 3.6, rango de 3.6 a 11.5) y a los exoantígenos de gametocitos (8.3% ± 2.0, rango de 5.7 a 10.6). Los exoantígenos de gametocitos estimularon de manera significativa, mayor proliferación de estos linfocitos CD8⁺, que los exoantígenos asexuales (p<0.05, Tabla 24, Figura 14). La proporción de linfocitos CD4⁺/CD8⁺ no cambió significativamente en las CMC estimuladas con estos exoantígenos, en las CMC del control sin antígeno fue de 2.1 a 1.0 y en CMC estimuladas con exoantígenos asexuales y de gametocitos fue de 2.0 a 1.0.

Los exoantígenos asexuales y los de gametocitos indujeron una expresión importante del marcador CD25 (15.0% ± 9.1, rango de 7.8 a 27 y 48.1% ± 29, rango de 14.7 a 75.8, respectivamente). Los exoantígenos de gametocitos indujeron una expresión significativamente mayor de este marcador que los antígenos asexuales (p<0.05, Tabla 24, Figura 14). De igual manera, el porcentaje de expresión del marcador CD69 con exoantígenos asexuales fue de 58.6% ± 52.8 (rango de 9.0 a 133.0) y con exoantígenos de gametocitos fue de 18.6% ± 11 (rango de 7.3 a 31). La expresión de este marcador CD69 también fue significativamente mayor con los exoantígenos de gametocitos (p<0.05, Tabla 5, Figura 14). La expresión del marcador CD2 en las CMC estimuladas con exoantígenos asexuales y con exoantígenos gametocito-específicos fue mínima y no se encontraron diferencias significativas entre ellos (5.0% ± 4.7, rango de 0.2 a 11.2 y 0.7 ± 0.6, rango de 0 a 1.1, Figura 14). Los exoantígenos de *P. falciparum* no indujeron la expresión del marcador CD21.

En la Tabla 25 se presenta un resumen de los marcadores que se expresaron de manera significativa en los linfocitos estimulados con exoantígenos específicos de gametocitos. En las CMC de pacientes primarios que estuvieron infectados con *P. falciparum* los exoantígenos de gametocitos estimularon de manera significativa una mayor proliferación de linfocitos T $\gamma\delta^+$, CD3⁺, CD8⁺, CD25⁺ y CD69⁺. Los exoantígenos asexuales y los de gametocitos indujeron una expresión similar de los marcadores de linfocitos $\alpha\beta$, CD4 y CD2.

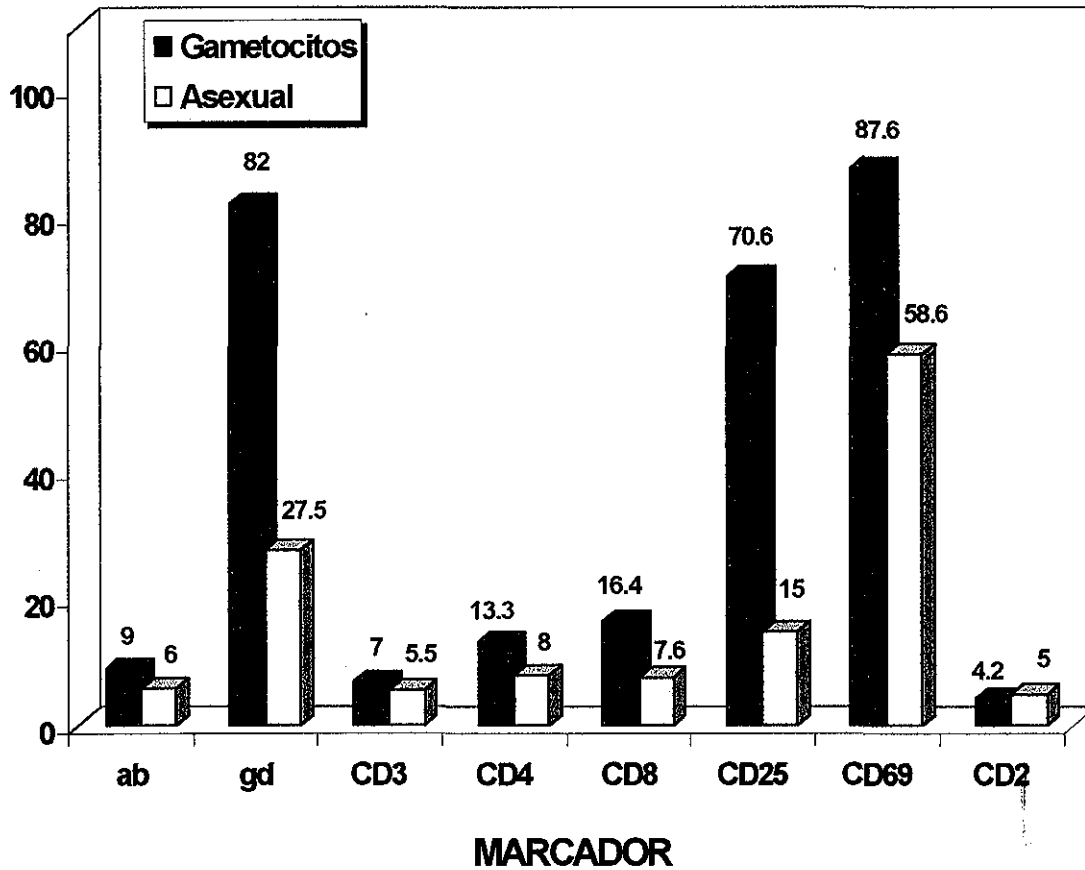


Figura 14. *Porcentaje de expresión de marcadores en CMC de pacientes de infección primaria previa con P. falciparum estimuladas con exoantígenos de 50 a 100 kDa. Se representa el promedio del porcentaje de CMC positivas para cada marcador.*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 25. Marcadores expresados en linfocitos que proliferaron de manera significativa en respuesta a la estimulación con exoantígenos específicos de gametocitos.

PACIENTE	$\alpha\beta$	$\gamma\delta$	CD 3	CD 4	CD 8	CD 2	CD 25	CD 69
<i>P. vivax</i> Infección primaria	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. vivax</i> Infecciones múltiples	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>P. falciparum</i> Infección primaria	-	+	+	-	+	-	+	+

2.7 CMC de un control no palúdico estimulados con antígenos sonicados de *P. vivax*

Se determinaron los fenotipos de las CMC de un individuo no febril y no palúdico (CD) que fueron estimuladas con antígenos sonicados de gametocitos o de etapas asexuales de *P. vivax*. La estimulación fue mínima y no significativa, sin embargo, se observó que los antígenos de gametocitos estimularon principalmente la proliferación de linfocitos T $\gamma\delta^+$, $CD8^+$, $CD25^+$, $CD69^+$ y $CD2^+$. Los antígenos de gametocitos y los antígenos asexuales indujeron el mismo porcentaje de proliferación de linfocitos $\alpha\beta^+$, $CD3^+$ y $CD4^+$ (Figura 15). La proporción de linfocitos $CD4^+/CD8^+$ no cambió en las células estimuladas con estos antígenos, fue de 2.1 a 1.0 en las células control sin antígeno, en las células estimuladas con antígenos asexuales y con gametocitos.

2.8 CMC de un control no palúdico estimulados con antígenos sonicados de *P. falciparum*

Las CMC del control (DR) que fueron estimuladas con antígenos sonicados de gametocitos totales o de etapas asexuales de *P. falciparum* proliferaron en una mínima proporción en respuesta a estos antígenos y de forma no significativa. Los antígenos de gametocitos indujeron una mayor proliferación de linfocitos $CD8^+$ y $CD25^+$ en comparación con

los antígenos asexuales. Ambos tipos de antígenos estimularon de igual manera la proliferación de linfocitos T $\alpha\beta^+$, $\gamma\delta^+$, $CD3^+$, $CD4^+$, $CD69^+$ y $CD2^+$ (Figura 15). No hubo cambios en la proporción de linfocitos $CD4^+/CD8^+$, fue de 1.9 a 1.0 en las células control sin antígeno y las estimuladas con antígenos asexuales y de 1.8 a 1.0 en respuesta a los gametocitos.

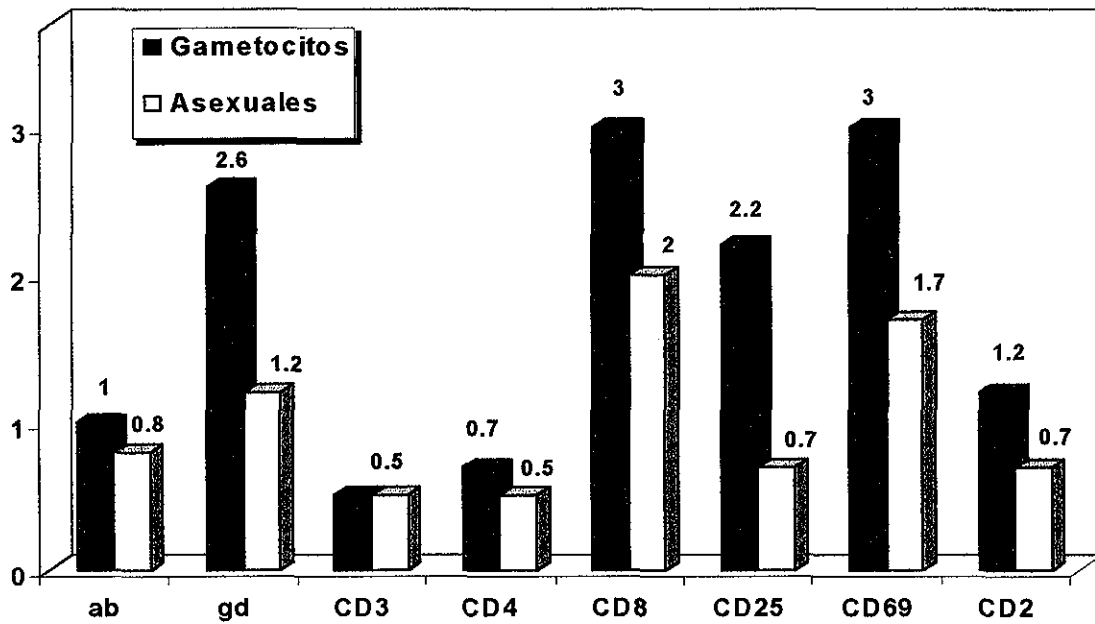
2.9 CMC de un control no palúdico estimuladas con exoantígenos de *P. vivax*

Las CMC del control no palúdico (VH) proliferaron en una mínima proporción al ser estimuladas con exoantígenos de gametocitos o de etapas asexuales de *P. vivax* y de forma no significativa. Los exoantígenos de gametocitos indujeron un mayor porcentaje de expresión de los linfocitos T $\alpha\beta^+$, $\gamma\delta^+$, $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ y $CD69^+$, mientras que los antígenos asexuales estimularon principalmente la expresión de los marcadores $CD25$ y $CD2$ (Figura 16). La proporción de linfocitos $CD4^+/CD8^+$ no cambió en las células estimuladas con exoantígenos, fue de 1.9 a 1.0 en las células control sin antígeno y en las células estimuladas con ambos tipos de antígenos.

3. CMC de un control no palúdico estimuladas con exoantígenos de *P. falciparum*

Se estimularon las CMC del control (DM) con exoantígenos de gametocitos o de etapas asexuales de *P. falciparum*. Los exoantígenos de gametocitos indujeron un mayor porcentaje de proliferación, aunque no significativo, de linfocitos T $\alpha\beta^+$, $\gamma\delta^+$, $CD3^+$, $CD4^+$, $CD25^+$, $CD69^+$ y $CD2^+$. Los gametocitos y los exoantígenos asexuales indujeron el mismo porcentaje de proliferación en los linfocitos $CD8^+$ (Figura 16). La proporción de linfocitos $CD4^+/CD8^+$ no varió en respuesta a estos exoantígenos, fue de 2.0 a 1.0 en las células control y en las estimuladas con ambos antígenos.

P. vivax



P. falciparum

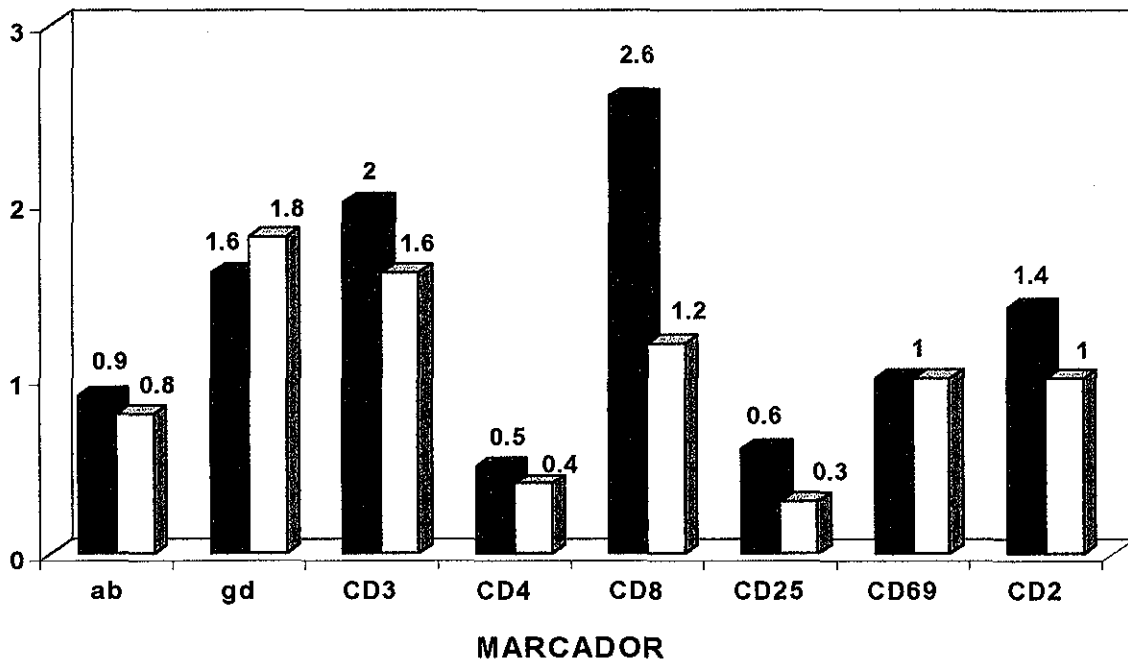
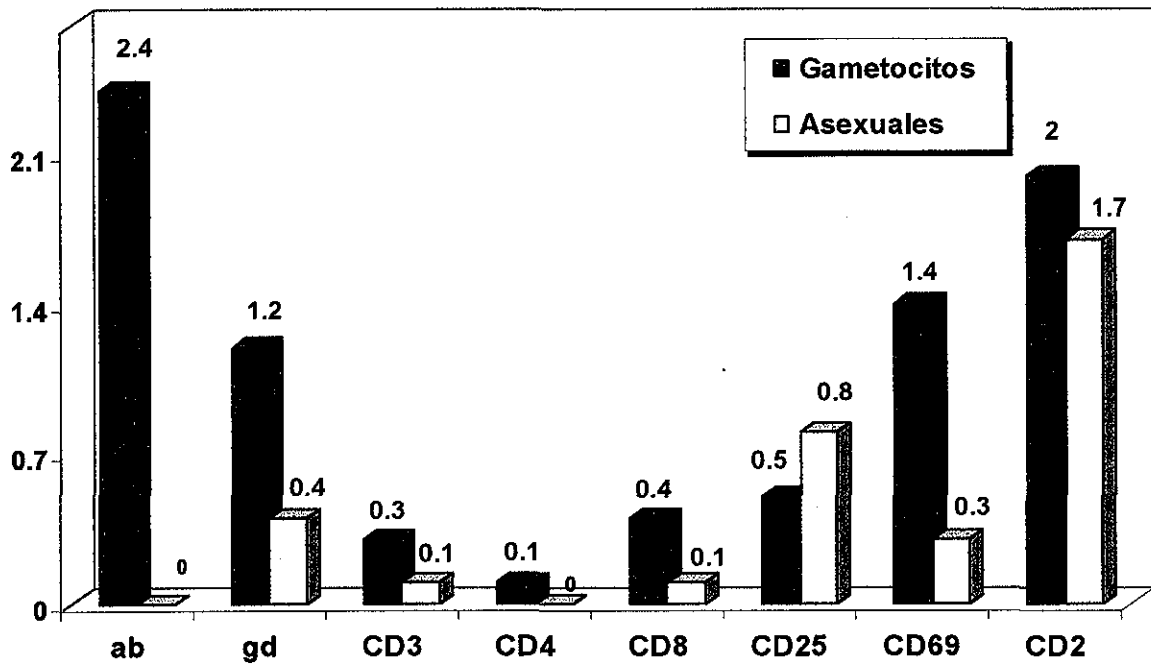


Figura 15. Porcentaje de expresión de marcadores en CMC de controles no palúdicos estimuladas con antígenos sonicados de *P. vivax* o *P. falciparum*. En cada caso se representa el porcentaje de CMC positivas para cada marcador en un solo paciente.

P. vivax



P. falciparum

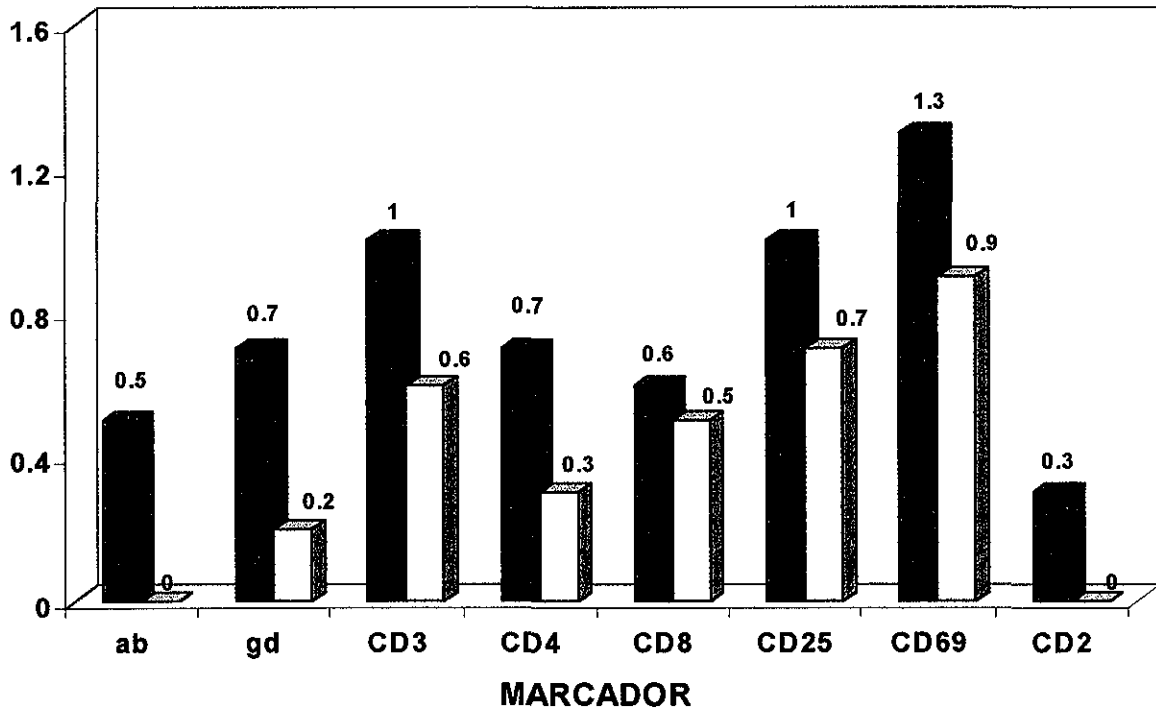


Figura 16. Porcentaje de expresión de marcadores en CMC de controles no palúdicos estimuladas con exoantígenos de 50 a 100 kDa de *P. vivax* o *P. falciparum*. En cada caso se representa el porcentaje de CMC positivas para cada marcador en un solo paciente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7. DISCUSION

Cada una de las etapas del ciclo de vida de *Plasmodium* interactúa de manera particular y específica con el sistema inmune del huésped vertebrado. Debido a esto, el estudio de la respuesta inmune se vuelve complejo. En términos generales, el conocimiento de la respuesta inmune celular contra las etapas asexuales intraeritrocíticas y sexuales de *Plasmodium* es escaso, y la mayoría de los estudios se han realizado en donadores no palúdicos; hay poca información sobre la respuesta celular en pacientes en etapa aguda o que han cursado una infección previa. Se sabe que los merozoitos y los esquizontes inducen la proliferación de linfocitos $\gamma\delta^+$ (Waterfall *et al*, 1998), mientras que las etapas asexuales más inmaduras (anillos y trofozoitos) inducen la proliferación de linfocitos $CD4^+$ (Goodier *et al*, 1995). Los gametocitos de *P. falciparum* activan linfocitos $CD4^+$ en donadores no palúdicos (Goodier y Targett, 1997), y se han detectado respuestas proliferativas contra estos en pacientes infectados (Riley *et al*, 1990). Del mismo modo, se tienen antecedentes que exoantígenos de etapas asexuales inducen la proliferación de linfocitos $\gamma\delta^+$ en donadores no palúdicos (Pichyangkul *et al*, 1997). Antes del presente estudio no se conocía el papel de los linfocitos $\gamma\delta^+$ en la respuesta a los gametocitos de *Plasmodium*, tampoco se habían identificado exoantígenos secretados específicamente por estas etapas y no existían reportes de la activación de linfocitos $\gamma\delta^+$ en respuesta a exoantígenos asexuales y de gametocitos en pacientes de infección previa. El conocimiento de esta respuesta inmune celular contra el parásito, en combinación con la respuesta humoral, permitirá avanzar en el desarrollo de vacunas multivalentes contra las etapas asexuales destinadas a prevenir o reducir la gravedad de la infección, y contra los gametocitos para bloquear la transmisión.

La respuesta de memoria a los antígenos asexuales.

La mayoría de los estudios sobre la respuesta inmune contra las etapas asexuales intraeritrocíticas de *Plasmodium* se han llevado a cabo empleando extractos de parásitos lisados, y CMC de donadores no palúdicos. Muchos de estos estudios han reportado resultados contradictorios entre ellos. En el presente trabajo, empleamos células de donadores después de una sola infección o de múltiples infecciones, por lo menos tres meses previos, con *P. vivax* o con *P. falciparum*. Los linfocitos fueron estimulados *in vitro* con antígenos sonicados o con exoantígenos de etapas asexuales.

En donadores no palúdicos, Goodier *et al* (1995) demostraron una proliferación específica

de linfocitos $\gamma\delta^+$ del subtipo $V\gamma 9^+$, en respuesta al estímulo con merozoitos, con preparaciones de esquizontes, o con sobrenadantes obtenidos durante la ruptura de estos. Según esos autores las etapas tempranas del parásito (anillos y trofozoitos), o lisados de eritrocitos parasitados, inducen principalmente la proliferación de linfocitos $CD4^+$. En el presente estudio, los antígenos sonicados no estimularon respuesta alguna en los controles no-palúdicos. Sin embargo, los antígenos asexuales sonicados indujeron respuestas proliferativas específicas en CMC de pacientes de infección primaria previa o de infecciones múltiples con *P. vivax*, y en CMC de infección primaria previa con *P. falciparum*. Linfocitos de pacientes que tuvieron una sola infección previa, hasta 8 años postinfección, proliferaron de manera significativa al estímulo con antígenos asexuales sonicados, mientras que los que tuvieron la infección con más de 12 años previos, no proliferaron al ser estimulados con estos antígenos. De forma similar, las CMC de pacientes que tuvieron múltiples infecciones previas, también proliferaron de manera específica contra los antígenos asexuales, aunque los linfocitos de pacientes con infecciones múltiples en los 11 años previos no respondieron a los antígenos. Los datos sugieren que en ambos casos, existe un límite temporal para la memoria contra estos antígenos asexuales de *P. vivax*, independientemente de la frecuencia del reto. En ambos tipos de pacientes, los linfocitos T $\gamma\delta^+$ fueron los que proliferaron mayoritariamente en respuesta a los antígenos asexuales sonicados; de forma secundaria se expandieron los linfocitos $CD8^+$. En el presente estudio, la expansión de las poblaciones de linfocitos $\alpha\beta^+$, $CD3^+$ y $CD4^+$ fue mínima, en contraste con lo que se ha reportado anteriormente. Hubo además, una expresión significativa de los marcadores $CD25$ y $CD69$ indicando activación en presencia del antígeno específico y la dependencia de la respuesta a la presencia de IL-2. La intensidad de la respuesta proliferativa asexual-específica y el perfil de expresión de fenotipos, fueron similares después de una o múltiples infecciones. Sin embargo, en los pacientes que tuvieron una sola infección, la proliferación de linfocitos $CD4^+$ y $CD25^+$ fue mayor en comparación con los pacientes con infecciones múltiples. En estos últimos, la proliferación de linfocitos que expresaron el receptor $\alpha\beta^+$ fue superior.

Waterfall *et al* (1998) reportaron que componentes de esquizontes lisados activan a linfocitos $CD4^+$, mientras que los linfocitos $\gamma\delta^+$ son activados por componentes de esquizontes vivos, respuesta que es dependiente de IL-2. Este último estudio sugiere que *in vivo* los productos del parásito inducen la activación de linfocitos $\gamma\delta^+$ y la producción de IL-2, conclusión que apoya la presente investigación. El estudio anterior subraya la importancia de la calidad del antígeno

utilizado en ensayos *in vitro*, y apoya la hipótesis inicial del presente estudio de que el antígeno sonicado preserva epitopes claves, tal como en la infección natural. La proliferación de linfocitos que tuvieron una sola exposición previa a *P. falciparum*, fue independiente del tiempo transcurrido después de la infección, ya que no se encontró correlación entre el tiempo transcurrido postinfección y la respuesta al antígeno, así como tampoco influyó la edad del paciente en la magnitud de la respuesta. Los linfocitos $\gamma\delta^+$ proliferaron principalmente en respuesta a estos antígenos, seguidos de la expansión de linfocitos $CD8^+$. La expansión de linfocitos $\alpha\beta^+$ fue mínima, aunque se detectó una expresión importante de los marcadores de activación CD25 y CD69. Los antígenos asexuales sonicados indujeron un patrón de proliferación similar en los pacientes primarios con *P. vivax* y con *P. falciparum*, con excepción del marcador CD69, que se expresó proporcionalmente más en respuesta a los antígenos de *P. falciparum*.

Las diferencias en las preparaciones de los parásitos, o en los procedimientos en los ensayos, podrían ser responsables de las discrepancias en la respuesta reportadas por los diversos laboratorios. Dick *et al* (1996) encontraron que en CMC de donadores no palúdicos estimulados con esquizontes lisados por congelación, las células que proliferaron fueron principalmente $\alpha\beta^+CD4^+$, $CD45RO^+$ y en menor proporción los linfocitos $\alpha\beta^+CD8^+$ junto con los linfocitos $\gamma\delta^+CD4^-CD8^-$. Las células activadas con estos antígenos produjeron IL-2r soluble e IFN γ . Sin embargo, al igual que en el presente trabajo, se reportó que en donadores de áreas endémicas en Africa, se detecta la expansión de linfocitos $V\gamma9V\delta2^+$ en respuesta a antígenos de esquizontes lisados de *P. falciparum* (Goodier *et al*, 1993). Al parecer, la respuesta a antígenos únicos es diferente: linfocitos $CD4^+$ de donadores inmunes restringidas a HLA-DR y DQ, y una mínima proporción de linfocitos $CD8^+$ responden a fragmentos clonados de la proteína PfMSP-1 de *P. falciparum* (Riley *et al*, 1992). La proteína purificada Pf155/RESA y péptidos sintéticos de esta proteína inducen respuestas proliferativas y la producción de IL-2, IL-4 e IFN γ en donadores de áreas endémicas, de tal forma que epítopes de esta proteína son capaces de activar la proliferación de linfocitos T (Riley *et al*, 1995). La respuesta a antígenos individuales representa sin duda una mínima parte de la respuesta completa contra los múltiples antígenos presentes en el parásito.

Las etapas asexuales producen y secretan exoantígenos, muchos de los cuales tienen grupos de glicofosfatidilinositol y son responsables de respuestas endotóxicas importantes, que

involucran la secreción de TNF α (Taverne *et al*, 1990). Los exoantígenos se secretan del eritrocito infectado durante la maduración del parásito o bien son liberados de los merozoitos durante la invasión al eritrocito (Jakobsen, 1995; Hommel, 1997). Exoantígenos obtenidos de eritrocitos parasitados con *P. vivax* estimulan la producción de TNF α por parte de los macrófagos (Bate *et al*, 1992; Jagadeesan *et al*, 1999), estableciendo que estas moléculas tienen la capacidad de estimular una respuesta inflamatoria. En el presente estudio, los exoantígenos de etapas asexuales indujeron respuestas proliferativas en pacientes de infección primaria previa o de infecciones múltiples previas con *P. vivax*, y en pacientes de infección primaria previa con *P. falciparum*. La respuesta proliferativa contra los exoantígenos asexuales de *P. vivax* fue significativa en la mayoría de los pacientes después de una infección primaria, y sin correlación con el tiempo transcurrido después de la infección, por lo menos dentro de los 8 años postinfección. Las CMC de pacientes de infecciones múltiples con *P. vivax*, también proliferaron de manera significativa contra estos exoantígenos. En ambos tipos de pacientes los linfocitos $\gamma\delta^+$ fueron los que proliferaron específicamente en respuesta a los exoantígenos de etapas asexuales, mientras que la expansión de linfocitos $\alpha\beta^+$, CD3 $^+$, CD4 $^+$ y CD8 $^+$ fue mínima. La expresión de los marcadores CD25 y CD69 fue significativa. La respuesta proliferativa asexual-específica y el perfil de expresión de fenotipos fue similar en ambos tipos de pacientes, con excepción de los linfocitos $\gamma\delta^+$ y CD8 $^+$ que se expandieron proporcionalmente más y de manera significativa en los pacientes que tuvieron una sola infección previa.

Los presentes resultados coinciden en parte con lo reportado por Pichyangkul *et al* (1997) quienes encontraron que sobrenadantes de cultivo de esquizontes de *P. falciparum* inducen la proliferación de linfocitos $\gamma\delta^+$ en CMC de pacientes no palúdicos. Exoantígenos de etapas asexuales también activan linfocitos en individuos expuestos (Riley *et al*, 1988; Jakobsen *et al*, 1994). Una mezcla de antígenos solubles de *P. falciparum* y de exoantígenos Ag1 y Ag7 purificados induce la producción de IFN γ en CMC de individuos que estuvieron infectados con *P. falciparum* (Hviid *et al*, 1990). Las CMC de casi todos los pacientes de infección primaria previa con *P. falciparum* proliferaron de manera significativa en respuesta a los exoantígenos. Los linfocitos $\gamma\delta^+$ fueron la población de respuesta principal a estos exoantígenos y de manera secundaria los CD8 $^+$. La expansión de linfocitos $\alpha\beta^+$ y CD4 $^+$ fue mínima, aunque hubo una expresión importante del marcador CD69, y en menor proporción del CD25. En el presente estudio, los exoantígenos de etapas asexuales de *P. vivax* y *P. falciparum* indujeron respuestas

proliferativas análogas. Por lo menos en el caso de uno de los exoantígenos (30 kDa de *P. vivax* y 31 kDa de *P. falciparum*), se ha comprobado la existencia de epítopes homólogos que enlazan anticuerpos naturales (Ramsey *et al*, en prensa). Aunque no se encontraron diferencias significativas en la magnitud de la respuesta proliferativa asexual-específica con ambas especies de *Plasmodium*, si hubo diferencias cualitativas en esa respuesta. Si bien no existen reportes comparando la respuesta a antígenos de *P. vivax* y *P. falciparum*, se ha encontrado que exoantígenos de *P. falciparum* y *P. berghei* inducen la proliferación de células de bazo y de médula ósea murinas y la producción de IFN γ en cultivos de 5 días *in vitro*, así como la expansión de células CD3⁺. Los exoantígenos de diferentes especies inducen una proliferación significativa y la liberación de citocinas tipo Th1 en células murinas independientemente de la exposición previa y sin especificidad de especie (Bordmann *et al*, 1997). Estos datos apoyan la hipótesis de que hay epítopes comunes conservados entre las diversas especies de *Plasmodium* a nivel de estas moléculas.

Los antígenos asexuales sonicados y los exoantígenos asexuales homólogos de *P. vivax* indujeron una respuesta proliferativa análoga en los pacientes que tuvieron una sola o múltiples infecciones previas. En los pacientes con una infección, el perfil de expresión de fenotipos fue similar con ambos tipos de antígeno, aunque los antígenos sonicados indujeron una mayor expresión del marcador CD25. En los pacientes con infecciones múltiples, los antígenos asexuales sonicados indujeron una mayor proliferación de linfocitos $\alpha\beta^+$ y CD8⁺ que los exoantígenos, mientras que los exoantígenos indujeron una mayor proporción de la expresión del marcador CD69. En pacientes de infección primaria previa con *P. falciparum*, la respuesta proliferativa asexual-específica fue mayor con antígenos sonicados que con exoantígenos y el análisis de fenotipos de las CMC que proliferaron a estos antígenos reveló que los antígenos totales indujeron una mayor proliferación de linfocitos $\gamma\delta^+$ y CD25⁺ que los exoantígenos, mientras que los exoantígenos homólogos indujeron una mayor proliferación de linfocitos $\alpha\beta^+$. Estos datos están indicando una posible asociación entre la expresión del marcador CD25 y el estímulo con antígenos asexuales sonicados en pacientes de infección primaria tanto de *P. vivax* y *P. falciparum*, así como una asociación positiva entre la expresión del marcador CD69 y el estímulo con exoantígenos en pacientes primarios y secundarios de *P. vivax*. Estas diferencias podrían deberse a la cantidad y la calidad de las proteínas que conforman los dos tipos de antígeno. Los antígenos sonicados constituyen una mezcla de las proteínas totales del parásito,

proteínas constitutivas y estructurales, mientras que los exoantígenos derivados de estas etapas comprenden una mezcla de nueve proteínas de *P. vivax* y quince de *P. falciparum* y son proteínas solubles, secretadas al medio, lo que estaría implicando probablemente, tal como se discutirá mas adelante, la participación de mecanismos diferentes de procesamiento y presentación entre ellos.

En pacientes de *P. vivax*, tanto como en los de *P. falciparum*, los antígenos sonicados principalmente, pero también los exoantígenos, indujeron la expresión del marcador de activación CD25 (IL-2 α). Este es un marcador de activación innata de linfocitos T, ya que se expresa principalmente en pacientes con infecciones primarias. Su participación indica que la respuesta a los antígenos asexuales sonicados requiere de IL-2. Elloso *et al* (1996) reportaron que más del 95% de los linfocitos $\gamma\delta^+$ después de 7 días en cultivo expresaron el receptor de IL-2 (CD25) y que anticuerpos monoclonales contra este inhiben la proliferación de linfocitos $\gamma\delta^+$ estimuladas con antígenos asexuales de *P. falciparum*. Los datos presentes apoyan la hipótesis que los linfocitos requieren de dos señales para activarse, la primera dada por el reconocimiento del antígeno, y la segunda por citocinas que actúan a través del receptor de IL-2. Al parecer, la expresión del marcador CD69 es más importante en la respuesta a los exoantígenos, ya que se expresó principalmente en pacientes primarios de *P. falciparum* y en pacientes secundarios de *P. vivax* estimuladas con ese tipo de antígeno. El marcador CD69 esta presente en linfocitos T activados y en células NK, y es un marcador de activación primaria. Se expresa a las pocas horas de estimulación con mitógeno, participa en la transducción de señales para la activación y proliferación celular, y en la iniciación de las funciones citotóxicas de los linfocitos $\gamma\delta^+$ (Cranston *et al*, 1997).

La respuesta de memoria a los gametocitos

Los gametocitos y las etapas asexuales comparten proteínas constitutivas y metabólicas, aunque los gametocitos expresan proteínas que no están presentes en las etapas asexuales. En el presente estudio, se ha utilizado la etapa asexual eritrocítica como control para los gametocitos, dado que previamente fueron caracterizadas las proteínas que tienen en común, y las que tienen solamente los gametocitos (Ramsey *et al*, en prensa). Good *et al* (1987) reportaron que clones de linfocitos T que reaccionan contra los gametos de *P. falciparum* también reaccionaron con esquizontes, pero no con eritrocitos no infectados en CMC de donadores no palúdicos. Del mismo modo, Goodier y Targett (1997) reportaron que tanto los gametocitos como los trofozoitos

inmaduros de *P. falciparum* activan principalmente a los linfocitos CD4⁺ en la misma proporción en CMC de donadores no palúdicos, lo que estaría apoyando la idea de que ambas etapas del parásito tienen antígenos comunes. La respuesta proliferativa a los gametocitos en este estudio siempre fue significativamente mayor a la de los antígenos asexuales.

El conocimiento sobre la respuesta inmune contra los gametocitos de *Plasmodium* es escaso en comparación con lo que se sabe acerca de la respuesta a las etapas asexuales del parásito. Debido a la carencia de conocimientos acerca del papel que desempeña la inmunidad celular en el bloqueo de la transmisión de *Plasmodium*, y a que se desconoce además cual es el mecanismo de modulación de los gametocitos en la circulación, aunado a las dificultades técnicas y metodológicas para la obtención de gametocitos puros, ha dado paso a que las estrategias actuales para el desarrollo de vacunas bloqueadoras de la transmisión no contemplen las etapas sexuales intraeritrocíticas residentes en la circulación del huésped humano.

En este trabajo, los gametocitos sonicados estimularon de forma etapa-específica la proliferación de linfocitos en pacientes de infección primaria previa y de infecciones múltiples con *P. vivax*, y de infección primaria previa con *P. falciparum*. En los pacientes con una sola infección previa con *P. vivax*, los linfocitos que tenían menos de 8 años postinfección proliferaron específicamente contra los gametocitos sonicados. De igual manera, los linfocitos de la mayoría de los pacientes con infecciones múltiples proliferaron de manera específica al ser estimuladas con gametocitos sonicados, hasta después de 11 años postinfección, a diferencia de los antígenos asexuales. Los linfocitos $\gamma\delta^+$ proliferaron principalmente en respuesta a los gametocitos sonicados, tanto en pacientes con una sola como con múltiples infecciones previas. En ambos grupos de pacientes, hubo una expresión importante de ambos marcadores de activación, CD25 y CD69. Además de los linfocitos $\gamma\delta^+$, las CMC de infección primaria que proliferaron específicamente fueron CD3⁺ y CD8⁺. Sin embargo, después de múltiples infecciones los linfocitos $\alpha\beta^+$ y CD4⁺ proliferaron de manera secundaria. Esta diferencia puede estar indicando que después de una sola infección, los linfocitos $\gamma\delta^+$ y CD8⁺ citotóxicos constituyen la primera línea de defensa contra el parásito, mientras que los linfocitos $\gamma\delta^+$ y en menor grado los linfocitos $\alpha\beta^+$ y CD4⁺ de memoria, estarían contribuyendo a la eliminación de los gametocitos después de múltiples infecciones. A su vez, las CMC de la mayoría de los pacientes de infección primaria previa debida a *P. falciparum*, proliferaron de manera específica en respuesta a los gametocitos sonicados. La población de linfocitos $\gamma\delta^+$, de nuevo, fue la que

proliferó principalmente. Además fue significativa la expansión de linfocitos $\alpha\beta^+$, $CD8^+$, $CD4^+$ y $CD3^+$. Las respuestas proliferativas estimuladas por los gametocitos sonicados de *P. vivax* y *P. falciparum* fueron análogas: con ambas especies, la proliferación de linfocitos $\gamma\delta^+$, $CD3^+$, $CD8^+$, y de los marcadores de activación $CD25$ y $CD69$ fue similar. Los gametocitos de *P. falciparum* indujeron mayor proliferación proporcionalmente de los linfocitos $\alpha\beta^+$ y $CD4^+$ que sus homólogos de *P. vivax*.

Estos resultados coinciden con lo reportado por Riley *et al* (1990) en donde CMC de pacientes de infección previa con *P. falciparum* proliferaron en respuesta a gametocitos lisados, además de producir $IFN\gamma$. Estos autores detectaron anticuerpos circulantes contra los antígenos de gametocitos, pero no encontraron una asociación entre las respuestas serológicas, la proliferación y la producción de $IFN\gamma$. En el presente estudio no hubo expansión de linfocitos $CD21^+$, evidenciando la falta de correlación entre el anticuerpo presente y las poblaciones estimuladas específicamente con antígenos totales de gametocitos. Sin embargo, y en contraste con el presente estudio, se detectó la expansión de linfocitos $CD4^+$ con CMC aislados de donadores no palúdicos estimulados con gametocitos enteros de *P. falciparum* (Goodier y Targett, 1997). Esa proliferación de linfocitos naive podría ser el resultado de la calidad del antígeno utilizado (lisado por métodos que no sea sonicación resulta muy distinto), o de una incompatibilidad del sistema presentador.

Como se ha señalado previamente, los exoantígenos pertenecen a la única clase de proteínas secretadas por el parásito intraeritrocítico. Muchas de estas proteínas han sido identificadas como moléculas clave, involucradas en procesos metabólicos y en la estimulación de la respuesta humoral y celular contra el parásito (Jakobsen, 1995). Estudios usando exoantígenos asexuales en pacientes inmunes han demostrado su capacidad de inducir proliferación de linfocitos y producción de $IFN\gamma$ (Jakobsen *et al*, 1991; Riley *et al*, 1991) y la inducción de $TNF\alpha$ por los macrófagos (Luty *et al*, 1994; Kristensen y Jakobsen, 1996). Antes de este trabajo no existían reportes de la presencia de exoantígenos específicos de gametocitos (Ramsey *et al*, en prensa), ni de la respuesta inmune contra estos en pacientes ya expuestos a la infección. Los exoantígenos de entre 50 y 100 kDa, específicos de gametocitos, estimularon respuestas proliferativas etapa-específicas en CMC de pacientes con una sola y también con múltiples infecciones previas de *P. vivax* y *P. falciparum*. Las CMC de la mayoría de los pacientes que tuvieron una sola infección previa con *P. vivax* proliferaron de manera específica a

estos antígenos, siendo el límite de esa memoria cerca de ocho años. Solo se ha investigado dos pacientes con infecciones múltiples con 5 y 6 años previos, y los linfocitos de solo uno de ellos proliferó de manera significativa. La respuesta proliferativa de pacientes con múltiples retos no fue diferente respecto a los pacientes con una sola infección. Sin embargo, el número de pacientes con infecciones múltiples fue demasiado reducido para concluir sobre la regulación de estas poblaciones celulares. La memoria contra los exoantígenos de *P. vivax* debe desarrollarse durante la infección primaria, pero esta memoria es dependiente de la rapidez del diagnóstico del paciente (tiempo del desarrollo de gametocitogénesis) y del tratamiento terapéutico (tiempo de presencia de los gametocitos en la circulación), es decir el reto total, inclusive en infecciones múltiples. El análisis de fenotipos de los linfocitos procedentes de esos pacientes reveló que los linfocitos $\gamma\delta^+$ proliferaron mayoritariamente en respuesta a esos antígenos. Hubo mayor proliferación de estas células en los pacientes con infecciones múltiples, lo que estaría indicando la expansión de linfocitos $\gamma\delta^+$ de memoria con mayor reto parasitario. En ambos grupos de pacientes, hubo una expresión importante de los marcadores de activación CD25 y CD69. En los pacientes primarios no hubo expansión significativa de linfocitos en respuesta a estos antígenos, mientras que en pacientes de infecciones múltiples hubo una proliferación significativa de linfocitos CD3⁺.

La mayoría de pacientes de infección primaria por *P. falciparum* proliferaron de manera significativa en respuesta a los exoantígenos de 50 a 100 kDa de gametocitos. Del mismo modo que los pacientes con *P. vivax*, los linfocitos $\gamma\delta^+$ proliferaron mayoritariamente al estímulo con exoantígenos con una expansión significativa también de células CD3⁺ CD8⁺, y una expresión importante de los marcadores CD25 y CD69. Los exoantígenos de gametocitos estimularon una respuesta proliferativa análoga en pacientes con una sola infección previa con *P. vivax* o con *P. falciparum*, y el análisis de fenotipos reveló que los exoantígenos de *P. falciparum* indujeron una mayor proliferación de linfocitos $\gamma\delta^+$, CD3⁺, CD8⁺, CD25⁺ y CD69⁺ con respecto a sus homólogos de *P. vivax*. Los exoantígenos representan la única fuente estimuladora natural de gametocitos para células presentadoras, debido a que el parásito no expresa otros antígenos del gametocito en la membrana externa del eritrocito. Es notable que la respuesta contra estos antígenos en ambas especies fue casi completamente de linfocitos $\gamma\delta^+$ con una respuesta mínima de linfocitos CD4⁺.

Estimulando con proteínas de gametocitos, el perfil de expresión de fenotipos varió dependiendo de la naturaleza de presentación del antígeno (sonicado o exoantígenos). Las CMC de pacientes primarios estimuladas con gametocitos sonicados de *P. vivax* indujeron una mayor proliferación de linfocitos $\gamma\delta^+$, $CD3^+$, $CD8^+$, $CD25^+$ y $CD69^+$, en comparación con los exoantígenos homólogos. Sin embargo, en los pacientes de múltiples infecciones, los gametocitos sonicados indujeron mayor expansión de linfocitos $\alpha\beta^+$, $CD4^+$, $CD25^+$ y $CD69^+$ en comparación con los exoantígenos. La proliferación de linfocitos $\gamma\delta^+$ fue similar en los dos grupos de pacientes. De forma similar, en las CMC de pacientes de infección primaria con *P. falciparum*, los gametocitos sonicados estimularon una mayor proliferación de linfocitos $\alpha\beta^+$ y $CD4^+$ en comparación con los exoantígenos homólogos. El hecho de que los linfocitos $\gamma\delta^+$ y los $CD8^+$ se expanden principalmente en pacientes de una sola infección estaría indicando de nuevo que estas células constituyen la primera línea de defensa contra los gametocitos, mientras que los linfocitos $\alpha\beta^+$ y $CD4^+$ que se expanden de manera significativa, aunque secundaria, en pacientes que tuvieron múltiples infecciones, estarían contribuyendo de manera adicional a la defensa contra el parásito. Las diferencias en el perfil de expresión de fenotipos en respuesta a los gametocitos sonicados y a los exoantígenos podrían deberse a la cantidad y a las características particulares de los dos tipos de antígenos. Los gametocitos sonicados resultaron ser más inmunogénicos, pero hay que considerar que estos constituyen una mezcla de las proteínas totales del parásito, mientras que los exoantígenos solo son una mezcla de siete proteínas para el caso de *P. vivax* y de diecinueve para *P. falciparum*; aunado a esto, y tal como se discutirá más adelante, la naturaleza misma de los dos tipos de antígenos, por un lado proteínas constitutivas y por el otro proteínas solubles, involucran mecanismos de procesamiento y presentación diferentes, lo que estaría permitiendo la activación diferencial de las poblaciones de linfocitos que responden a estos antígenos.

En el presente trabajo las proporciones de las diferentes poblaciones linfocíticas basales ($\alpha\beta^+$, $\gamma\delta^+$, $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$) antes del estímulo con el antígeno, fueron iguales entre los pacientes palúdicos y los controles no infectados, tanto en pacientes de infección primaria con *P. vivax* o *P. falciparum* como de infecciones múltiples con *P. vivax*. Esto puede ser debido al tiempo transcurrido después de la infección, los pacientes que estuvieron infectados con *P. falciparum* tuvieron la infección entre 7 y 22 meses previos, mientras que los de una sola infección previa con *P. vivax* entre 0.25 y 8 años previos y los de infecciones múltiples entre 5 a

6 años previos. Además es importante mencionar que en uno de los pacientes de infección primaria con *P. vivax* que tenía solamente tres meses postinfección hubo proporcionalmente mas linfocitos $\gamma\delta^+$ y $CD4^+$ así como un mayor porcentaje de expresión de los marcadores de activación $CD25^+$ y $CD69^+$ en comparación con los otros pacientes que tenían un mayor tiempo postinfección. Lo anterior estaría indicando que a tres meses de la infección aguda aún hay altos niveles de estas poblaciones celulares en la circulación que aun están activados por los antígenos de *Plasmodium* y que a medida que transcurre el tiempo postinfección van regresando a los niveles basales. A este respecto se ha reportado que durante por lo menos en la fase aguda de la infección hay expansión de linfocitos $\gamma\delta^+$ en pacientes infectados con *P. falciparum* o con *P. vivax* y que estas células continúan expandiéndose durante los dos meses posteriores a la infección (Schwartz *et al*, 1996, Hensmann y Kwiatkowski, 2001).

Antígenos sonicados vs. exoantígenos para la respuesta celular

La respuesta principal contra los antígenos totales y secretados de las etapas asexuales y los gametocitos fue la expansión de poblaciones de linfocitos $\gamma\delta^+$ y esta fue independiente de la frecuencia del reto (una o múltiples infecciones previas). Un resumen de la duración de esta memoria y de las poblaciones celulares secundarias que responden de manera predominante a estos antígenos se encuentra en la siguiente tabla:

		Etapas asexuales		Gametocitos	
Especie	Antígeno	1 infección	>1 infección	1 infección	>1 infección
<i>P. vivax</i>	sonicado	8 <12 años CD8, CD4	11 años CD8, $\alpha\beta$	> 8 años CD8, CD3	< 11 años CD4, $\alpha\beta$
	exoantígenos	8 años CD8	6 años	< 8 años	6 años CD3
<i>P. falciparum</i>	sonicado	< 2 años CD8		< 2 años CD8, CD4, CD3, $\alpha\beta$	
	exoantígenos	< 2 años CD8		< 2 años CD8, CD3	

Es preciso señalar que las diferencias principales en las respuestas accesorias al estímulo con gametocitos o con antígenos asexuales se dan entre pacientes con una o múltiples infecciones. Los gametocitos sonicados inducen la expansión de linfocitos CD8⁺ y CD3⁺ en pacientes de infección primaria mientras que en infecciones múltiples predomina una respuesta de linfocitos CD4⁺ y $\alpha\beta$ ⁺. Mientras que los antígenos asexuales inducen una expansión importante de linfocitos CD8⁺ en ambos grupos de pacientes, sin embargo, en pacientes primarios también se activan los CD4⁺ y con infecciones múltiples los linfocitos $\alpha\beta$ ⁺.

Es notable que los exoantígenos asexuales inducen la proliferación de los linfocitos CD8⁺ en infecciones primarias, mientras que en infecciones múltiples no esta asociada otra población además de las $\gamma\delta$ ⁺. De igual manera los exoantígenos de gametocitos no activan a otras poblaciones celulares en pacientes de una sola infección, mientras que en infecciones múltiples hay activación de células CD3⁺. La duración de la respuesta de memoria contra los exoantígenos de gametocitos o asexuales fue menor que con los antígenos totales, sin embargo la memoria contra los antígenos asexuales prevalece por mayor tiempo que la de los gametocitos, esto podría deberse a que durante la infección los parásitos asexuales están más tiempo en contacto con el sistema inmune del huésped. La población de linfocitos CD8⁺ fue la que se expandió principalmente al estímulo con antígenos asexuales totales y secretados de *P. falciparum*. Mientras que con gametocitos, además de los CD8⁺, también se expandieron células CD3⁺, los gametocitos sonicados, a diferencia de los exoantígenos, indujeron además la expansión de linfocitos $\alpha\beta$ ⁺ y CD4⁺.

Para entender las diferencias en la respuesta proliferativa entre los antígenos totales y los exoantígenos, de etapas asexuales o de gametocitos, es necesario considerar la naturaleza de los dos tipos de antígeno. Por un lado, los antígenos sonicados son proteínas estructurales y constitutivas en vías de traducción y formación de estructura terciaria, mientras que los exoantígenos son proteínas secretadas y de forma conformacional final al medio extracelular. La vía clásica de presentación de antígenos de origen extracelular involucra la asociación con moléculas del MCH clase II (Weenink y Gautam, 1997; Mukherjee *et al*, 2001). Sin embargo, se ha reportado que proteínas extracelulares solubles pueden ser presentadas en asociación con el MHC clase I desencadenando una respuesta de linfocitos CD8⁺. Estas proteínas pueden entrar a la célula mediante macropinocitosis, llegando al citosol para asociarse con la vía de

procesamiento convencional de antígenos endógenos en asociación con moléculas del MHC clase I, induciendo una respuesta citotóxica contra proteínas de patógenos y células tumorales (Norbury *et al*, 1995; Harding, 1996; Nakanishi *et al*, 2000). Se ha sugerido que esta es una vía de procesamiento no convencional, diferente a la vía clásica, y que es utilizada por algunos microorganismos (Harding, 1996). No obstante, existen divergencias encontradas en distintos sistemas, sugiriendo que puede existir más de un mecanismo de procesamiento y presentación, que no son dependientes de los compartimentos, las proteínas o los mecanismos que son necesarios en la vía clásica, incluyendo el retículo endoplásmico, los transportadores (TAP) y los proteosomas. Se ha reportado que los macrófagos, y en menor proporción las células dendríticas, presentan estos mecanismos alternos de procesamiento, pero no se descarta que otros tipos celulares también los tengan (Harding, 1996). Sin duda, el procesamiento del antígeno y otras respuestas del sistema inmune son activadas o inhibidas por los componentes de los microorganismos en beneficio del patógeno (Ramachandra *et al*, 1999). Se han descrito linfocitos $\gamma\delta^+$ que son estimulados con péptidos restringidos al MHC- I en humanos y en ratones (Kuhnlein *et al*, 1994; Holt, 1995), o al MHC- II (Kaufmann, 1996; Zanni *et al*, 1997; Lindberg *et al*, 1999). Anticuerpos monoclonales anti-TCR inhiben la activación y proliferación de linfocitos $\gamma\delta^+$ indicando que hay interacciones específicas entre el TCR y la célula blanco (Dielii *et al*, 2000). Sin embargo, hay también evidencia creciente que indica que estas células pueden activarse independientemente del mecanismo de procesamiento y presentación del antígeno, sin restricción al MHC (Salerno y Dieli, 1998; Guehler *et al*, 1999; Wang y Malkovsky, 2000; Cady *et al*, 2000). En el presente trabajo, los antígenos totales sonicados, tanto de etapas asexuales como de gametocitos, indujeron una mayor respuesta proliferativa y un mayor porcentaje de expresión de fenotipos que los exoantígenos homólogos. Si bien debe influir el hecho de que los antígenos totales contenían un mayor número de proteínas que los exoantígenos, también se puede especular que los antígenos totales y los exoantígenos estarían siendo procesados y presentados por vías diferentes. Esta diferencia hubiera favorecido la activación de distintas poblaciones celulares o de la misma población pero en diferente proporción. En este trabajo, no existen evidencias que permitan determinar si los linfocitos $\gamma\delta^+$ están o no restringidos al MHC.

Como ya se ha hecho mención anteriormente, bajo las condiciones experimentales empleadas en el presente estudio las CMC de los controles no palúdicos, procedentes de la misma área geográfica que los pacientes que estuvieron infectados, no proliferaron al ser estimuladas

con los antígenos tanto sonicados como exoantígenos de etapas asexuales o de gametocitos de *P. vivax* o de *P. falciparum*. Esto es contradictorio a lo que se ha reportado previamente empleando parásitos lisados de etapas asexuales (Goodier *et al*, 1995; Dick *et al*, 1996) o sobrenadantes de cultivo de estos (Pichyangkul *et al*, 1997) o bien con gametocitos (Goodier y Targett, 1997). Estas diferencias pueden deberse a la cepa del parásito empleada, a la naturaleza del antígeno o a las diferentes condiciones experimentales.

Respuesta proliferativa en etapa aguda de la infección.

La respuesta proliferativa de las CMC de pacientes en etapa aguda de la infección primaria y secundaria con *P. vivax* a mitógenos como Con A y LPS fue menor que en los controles no infectados. Estos resultados confirman otros datos previos que señalan una inmunosupresión en pacientes palúdicos durante la etapa aguda de la infección. Al parecer, este fenómeno no es dependiente de la respuesta innata o adquirida. Asimismo, la respuesta a la Con A y LPS en CMC provenientes de pacientes febriles no palúdicos es menor que en el control no febril. Alves *et al* (1992) reportaron una baja capacidad de proliferación de linfocitos provenientes de pacientes infectados con *P. vivax* y *P. falciparum* en etapa aguda en respuesta a la estimulación con Fitohemaglutinina A (PHA) comparándola con los controles no infectados. Sugieren que esta baja respuesta está asociada con una producción deficiente de IL-1 por parte de los monocitos y macrófagos, ya que si se agrega IL-1 recombinante a los cultivos de linfocitos se restaura parcialmente la capacidad de proliferación de estas células. Sin embargo, el hecho de no poder recobrar esta capacidad al 100% sugiere que otros factores también están participando en la activación de estas células.

En el presente trabajo, se decidió emplear dos controles positivos de proliferación celular, en primer lugar la Con A que es un mitógeno de linfocitos T (Onah *et al*, 2000; De Luna *et al*, 1999), y con la que se obtuvieron unos índices muy altos a las pocas horas de estimulación. No detectamos respuestas proliferativas positivas a la PHA, otro mitógeno de linfocitos T comúnmente empleado en ensayos de proliferación celular con células de humano, a pesar de que se probaron diversas concentraciones (0.5 a 20 µg/ml) y tiempos de incubación (12 a 120 h, Saito *et al*, 2001; Godot *et al*, 2000; Wolday *et al*, 2000). Se decidió emplear además, los LPS, que son activadores policlonales de linfocitos B y macrófagos (Alving, 1993; Tough *et al*, 1997, Ogata *et al*, 2000), los cuales indujeron una respuesta proliferativa positiva, indicando que las

CMC que se emplearon contenían la maquinaria celular requerida para responder adecuadamente a la presentación de los antígenos.

A pesar de los bajos índices de estimulación en respuesta al mitógeno y a los LPS, se encontró que las CMC de pacientes en etapa aguda fueron capaces de responder a los antígenos sonicados de *P. vivax* de forma específica. La respuesta proliferativa de las CMC de infección primaria al antígeno asexual fue significativa solo en uno de dos pacientes. La diferencia entre ambos pacientes primarios fue el lugar de procedencia, ya que los dos pertenecen al mismo género y grupo de edad y tenían un porcentaje similar de parasitemia y gametocitemia al momento de la toma de muestra. En los dos pacientes con infección secundaria, la respuesta proliferativa contra los antígenos asexuales fue específica y significativa. Ya que se cuenta con la confirmación de que los linfocitos en etapa aguda no son anérgicos, y para tener información sobre la respuesta a los antígenos asexuales sería necesario contar con mayor número de pacientes tanto de infección primaria y de múltiples infecciones previas.

La respuesta proliferativa gametocito-específica de linfocitos procedentes de todos los pacientes en etapa aguda primaria con *P. vivax* o *P. falciparum* no fue significativa. Esto era de esperarse, debido a que durante la infección primaria la gametocitogénesis se inicia tarde, y los linfocitos no han tenido el reto suficiente para establecer una respuesta a las mismas. Sin embargo, una vez establecida la respuesta a los antígenos específicos del gametocito, como en el caso de pacientes con múltiples infecciones previas con *P. vivax*, los linfocitos proliferan de forma significativa y específica a esta etapa. A pesar de las bajas respuestas de estas células a los controles con Con A y LPS, tienen la capacidad de responder de forma específica al antígeno de *P. vivax*, aunque en mínima proporción. Esta capacidad de respuesta se acentúa principalmente en las CMC de múltiples infecciones estimuladas con gametocitos, lo que estaría sugiriendo un potencial de respuesta a una memoria adquirida contra los antígenos de gametocitos que no está deprimido por la infección aguda. Estudios previos han reportado que en infecciones agudas causadas por *P. falciparum* y *P. vivax* las CMC son anérgicas al mitógeno y a antígenos asexuales (Riley *et al*, 1989; Ho *et al*, 1994; Rzepzyck *et al*, 1996). El presente es el primer estudio que demuestra que esta inmunosupresión no es generalizada y que puede ser dependiente de la memoria y del reto antigénico. Aunque no se conoce el mecanismo exacto de esta inmunosupresión, se ha sugerido la participación de anticuerpos linfocitotóxicos (Riley *et al*, 1990), así como un incremento en las poblaciones de linfocitos T CD8⁺ y la activación

defectuosa de linfocitos T cooperadores (Ho *et al*, 1990). En la presente investigación, no determinamos el perfil de fenotipos de las CMC de etapa aguda que proliferaron en respuesta a los antígenos de *P. vivax*, debido a que no contamos con la cantidad de células requeridas para estos experimentos. En otros estudios, la falta de proliferación de CMC de *P. falciparum* durante la etapa aguda ha sido asociado con un defecto en la producción de IL-2 (Ho *et al*, 1988; Lucas *et al*, 1996). Hay evidencia de la activación de linfocitos T durante la etapa aguda (Ho *et al*, 1990; Jakobsen *et al*, 1994), que correlaciona con niveles elevados de TNF α , IL-1 e IL-6 *in vivo* (Kwiatkowski *et al*, 1989; Shaffer *et al*, 1991). A pesar de la falta de proliferación de las CMC en etapa aguda, se ha reportado que los linfocitos se activan y producen IFN γ e IL-10, mientras que en la etapa de convalecencia hay proliferación y producción de IL-2 e IL-4 (Rzpczyk *et al*, 1996), evidencia congruente con la alta respuesta proliferativa de las CMC a 4 semanas después de la infección primaria observada en el presente estudio. Considerando lo anterior, se ha sugerido que las respuestas tipo Th2 están subreguladas durante la infección aguda (Ho *et al*, 1994) y que parte de la inmunosupresión es debida a la apoptosis de ciertos tipos celulares (linfocitos T, macrófagos y linfocitos B) que ocurre en el bazo durante este periodo de la infección (Helmby *et al*, 2000).

Los linfocitos T $\gamma\delta^+$ en la respuesta anti-*Plasmodium*.

En el presente trabajo, la población de linfocitos $\gamma\delta^+$ fue la que proliferó principalmente en respuesta contra los antígenos de *Plasmodium*. Si bien ya existían reportes de la participación de estas células en respuesta a antígenos asexuales de *Plasmodium*, no se conocía el papel de estas en respuesta a los gametocitos y a los exoantígenos derivados de los mismos. El trabajo de Goodier y Targett (1997) demostró que los gametocitos de *P. falciparum* activan a linfocitos CD4 $^+$, pero no a linfocitos $\gamma\delta^+$ en CMC de donadores no palúdicos. Cabe recordar que en el presente estudio, los linfocitos de ninguno de los controles no-palúdicos proliferaron en respuesta a estos antígenos.

No pudimos identificar si las poblaciones de linfocitos $\gamma\delta^+$ que responden a los antígenos de *Plasmodium* expresan el correceptor CD4 o CD8, para ello sería necesario hacer estudios posteriores. Hubo un alto porcentaje de expresión de los marcadores de activación CD25 (IL-2r) y CD69 (marcador primario de activación), lo que sugiere que los linfocitos $\gamma\delta^+$ expresan ambos marcadores en respuesta al parásito y a las proteínas secretadas por este (exoantígenos). Hay

reportes de poblaciones linfoides CD8⁺CD69⁺ y CD4⁺CD25⁺ (Albernethy *et al*, 2000). En nuestro sistema de estudio, es probable que los linfocitos CD8⁺ y CD4⁺ también estén expresando estos marcadores, pero debido a la mínima proliferación de estas poblaciones celulares en respuesta a los antígenos de *Plasmodium*, en comparación con los linfocitos $\gamma\delta^+$, nos lleva a pensar que estos últimos están expresando principalmente los marcadores de activación. Existen reportes de que los linfocitos $\gamma\delta^+$ humanos expresan el marcador CD69 y el CD25 al ser estimuladas con antígenos de *Mycobacteria* (Wesh *et al*, 1997), y se sabe que CMC de pacientes en etapa aguda de la infección con *P. falciparum* expresan el marcador CD25 (Worku *et al*, 1997) lo que apoya nuestros resultados.

La expresión del marcador CD25 en respuesta a los antígenos de *Plasmodium* estaría indicando la dependencia de IL-2 en este proceso. A este respecto, se ha reportado que en CMC de donadores no palúdicos, los linfocitos $\gamma\delta^+$ que se expanden en respuesta a lisados de *P. falciparum* requieren de IL-2 y de IL-15, ambas citocinas se unen a IL-2r β e IL-2r γ . Estas dos citocinas incrementan la capacidad de los linfocitos $\gamma\delta^+$ para inhibir la replicación del parásito (Elloso *et al*, 1998). Waterfall *et al* (1998) encontraron que la proliferación *in vitro* de linfocitos $\gamma\delta^+$ en respuesta a esquizontes y sobrenadantes de cultivo de estos, se incrementa si se agrega IL-2, y la activación de linfocitos $\gamma\delta^+$ en ratones infectados con *P. yoelii* es también dependiente de IL-2 (Haque *et al*, 2001). Los linfocitos $\gamma\delta^+$ que proliferan en respuesta a *Mycobacteria* requieren de IL-2 e IL-15 y en menor proporción de IL-4, IL-7 e IL-12, y además es preciso que linfocitos CD4⁺ estén activados con componentes no peptídicos fosforilados (Wesh *et al*, 1997). Estos resultados sugieren que los linfocitos $\gamma\delta^+$ que responden a los antígenos de *Plasmodium*, requieren de dos señales para activarse, la primera dada por el reconocimiento al antígeno y la segunda por citocinas que actúan a través del IL-2r y que los linfocitos CD4⁺ podrían estar proviendo en parte, las citocinas necesarias para la activación.

Existen reportes que señalan que los linfocitos $\gamma\delta^+$ requieren de moléculas accesorias como el CD2 y LFA-3 para activarse (Rakasz *et al*, 1997; Lin *et al*, 1999; Wang y Malkovsky, 2000) y que expresan moléculas de adhesión VCAM-1, VLA-4 e ICAM-1 (Leca *et al*, 1995; Behr-Perst *et al*, 1999). En el presente trabajo no hay evidencia de que los antígenos de *Plasmodium* induzcan la expresión o la activación de linfocitos $\gamma\delta^+$ a través del marcador CD2 (receptor de LFA-3). Este marcador está presente en timocitos y linfocitos T maduros y participa en la transducción de señales que conllevan a la activación de linfocitos T, además de que

participa en la adhesión celular (Wang *et al*, 1999; Tangye *et al*, 2000). Sin embargo, encontramos que ni los antígenos sonicados ni los exoantígenos de ambas especies de *Plasmodium* inducen su expresión. Del mismo modo, estos antígenos tampoco inducen la expresión del marcador CD21, que es el receptor de la molécula C3 del complemento, y se expresa en linfocitos B activados, participando en la activación de estos, junto con las proteínas CD19/CD81 que forman un complejo de activación co-accesoria con el receptor de linfocitos B. Esta secuencia permite que bajas concentraciones de antígeno induzcan una máxima activación de estas células (Zabel y Weis, 2001). La falta de expresión de este marcador para ambos tipos de antígeno estaría indicando la falta de respuesta humoral a los antígenos asexuales y gametocitos tanto sonicados como exoantígenos de *Plasmodium* que se emplearon bajo las condiciones de estimulación en este trabajo.

El procesamiento y la presentación de antígenos de *Plasmodium* por parte de los linfocitos $\gamma\delta^+$ no se conocen todavía. Se ha reportado que los linfocitos $\gamma\delta^+$ que responden a los antígenos de *Plasmodium* son restringidas al MHC-II, debido a que anticuerpos contra esta molécula inhiben la proliferación de linfocitos $\gamma\delta^+$ (Goodier *et al*, 1992). Por el contrario, Jones *et al* (1996) reportaron que la proliferación de linfocitos $V\gamma 9^+$ en CMC de donadores no palúdicos estimuladas con sobrenadantes de cultivo de esquizontes se inhibe por anticuerpos anti MHC clase I y clase II. La inhibición por anticuerpos anti MHC-II se revierte con IL-2 exógena, mientras que la inhibición por anticuerpos anti MHC-I no. Estas células por si mismas no reconocen las moléculas del MHC clase I, pero requieren de linfocitos $CD4^+$ que provean las citocinas necesarias para su activación. Se ha reportado que un antígeno fosforilado presente en esquizontes, resistente a proteasas (como los exoantígenos), estimula directamente a los linfocitos $\gamma\delta^+$, lo que apoya la hipótesis del reconocimiento de moléculas no peptídicas de una manera parecida a las inmunoglobulinas (Pichyangkul *et al*, 1997).

Los mecanismos de acción para los linfocitos $\gamma\delta^+$ que se conocen hasta el momento en donadores no palúdicos implican la activación de estas células con mitógenos o con antígenos de *P. falciparum*, además inhiben el crecimiento de las etapas asexuales del parásito *in vitro*; los linfocitos $\alpha\beta^+$ activados no lo hacen. Los linfocitos $\alpha\beta^+$ y $\gamma\delta^+$ producen $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ y $TNF\beta/LT$ y expresan moléculas citolíticas tales como perforina, granzima A y B, ligando de Fas y CD95L, lo que implica que ambas tienen la maquinaria necesaria para eliminar células infectadas, pero solo lo hacen las $\gamma\delta^+$. La activación de los linfocitos $\gamma\delta^+$ precede a las $\alpha\beta^+$ por varias horas o días,

lo que estaría sugiriendo que los linfocitos $\gamma\delta^+$ desempeñan un papel determinante en la eliminación de los parásitos y en la regulación de las respuestas tempranas contra la infección con *Plasmodium* (Troye-Blomberg *et al*, 1999). *In vitro*, se han encontrado interacciones entre linfocitos $\alpha\beta^+$ y $\gamma\delta^+$ en respuesta al parásito en donadores de 9 meses postinfección con *P. falciparum*, los linfocitos que proliferaron fueron $V\gamma 9^+$. A tiempos largos de cultivo, solo proliferan estas células si se cultivan además con linfocitos $\alpha\beta^+$ que se retan previamente con antígenos de *Plasmodium* (Roussilhon *et al*, 1994). Se ha reportado que la máxima proliferación de linfocitos $\gamma\delta^+$ ocurre después de la máxima proliferación de linfocitos $\alpha\beta^+$. Si se eliminan los linfocitos $CD4^+$ antes de la estimulación con el antígeno se reduce la proliferación de linfocitos $\gamma\delta^+$. En cultivos depletados de linfocitos $CD4^+$, los linfocitos $\gamma\delta^+$ solo proliferan en presencia de IL-2, IL-4 o IL-15, y anticuerpos contra las subunidades α y β del receptor de IL-2 inhiben la proliferación de estos. Estos datos sugieren que la proliferación de linfocitos $\gamma\delta^+$ depende de la presencia de linfocitos $\alpha\beta^+CD4^+$, además de citocinas que actúan a través del IL-2r (Elloso *et al*, 1996). Hensmann y Kwiatkowski (2001) reportaron que durante la fase aguda de la infección con *P. vivax* y *P. falciparum* las poblaciones de linfocitos $\gamma\delta^+$, particularmente las $V\gamma 9^+$, se expanden en sangre periférica, siendo estas la principal fuente de producción de $TNF\alpha$ e $IFN\gamma$ en las primeras etapas. Después de una semana, cuando ya hay desechos derivados de la lisis de parásitos, se activa también la población de linfocitos $\alpha\beta^+$. Sugieren además que las interacciones célula-célula son esenciales para la activación y que los eritrocitos enteros parasitados son mejores inductores de esta respuesta que los antígenos lisados.

En el presente estudio a pesar de las diferencias cuantitativas entre la respuesta a los gametocitos y los antígenos de etapas asexuales de *Plasmodium*, ambos tipos de antígenos totales, al igual que los exoantígenos derivados de estos, activaron principalmente a los linfocitos $\gamma\delta^+$. Esta activación ocurrió en linfocitos después de infecciones únicas y múltiples. Estas células que tienen funciones citotóxicas, podrían estar produciendo citocinas inflamatorias contribuyendo a la eliminación del parásito además de la patología de la enfermedad. Estos linfocitos $\gamma\delta^+$ expresan los marcadores de activación $CD25$ y $CD69$ lo que indica que requieren de IL-2 y/o de citocinas que actúan a través de este receptor. No detectamos activación significativa de linfocitos $CD4^+$ contra antígenos asexuales o gametocitos tal como se ha reportado previamente. La activación de CMC en este estudio fue con un sistema homólogo contra antígenos peptídicos

de *Plasmodium*, tanto sonicados como exoantígenos, sugiriendo que se activan con el reconocimiento directo al antígeno. Después de una sola infección, los linfocitos $\gamma\delta^+$ y linfocitos $CD8^+$ citotóxicos constituyen la primera línea de defensa contra el parásito, mientras que linfocitos $\alpha\beta^+$ y $CD4^+$ de memoria, además de los linfocitos $\gamma\delta^+$, estarían contribuyendo a la eliminación del parásito en el sistema de infecciones múltiples, con calidad de respuesta adquirida.

Los exoantígenos de *P. vivax* y *P. falciparum* estimulan a los linfocitos $\gamma\delta^+$ en pacientes después de una o múltiples infecciones, tal como lo hacen los antígenos lisados. No solo son producidos por las etapas asexuales, como ya se ha reportado previamente (Jakobsen, 1995), sino otras moléculas secretadas están producidas únicamente por los gametocitos (Ramsey *et al*, en prensa). En esta investigación no fueron estudiados los mecanismos anti-parasitarios o de ayuda y por lo tanto se desconoce si son los mismos en los pacientes después de una infección, comparándolos con los de infecciones múltiples. Los exoantígenos secretados por las etapas asexuales que son liberados por los merozoitos o al momento de la ruptura de los esquizontes inducen respuestas humorales (Holder, 1999; Taylor-Robinson, 2000), y se sabe que activan a macrófagos y monocitos (Kharazmi *et al*, 1987), así como también que estimulan la producción de citocinas inflamatorias (Jakobsen, 1995). Participan en la invasión del parásito al eritrocito, además se les ha conferido un papel importante como mecanismos de evasión inmune, evitando la eliminación del parásito mediada por fagocitosis. Algunos otros exoantígenos participan en la secreción de proteasas. Antes de este trabajo, no se tenían antecedentes de que estas proteínas solubles activaran a linfocitos $\gamma\delta^+$ en pacientes de infecciones previas. El hecho que estas proteínas estimulen respuestas proliferativas análogas en ambas especies de *Plasmodium*, habla de que podrían estar conservados entre las diversas especies de *Plasmodium* y compartiendo epítopes comunes. Si bien se tuvo un escaso número de pacientes de múltiples infecciones, se encontró que en estos pacientes hubo una mayor respuesta proliferativa de linfocitos $\gamma\delta^+$ que en los pacientes de una sola infección. Esto indica que la respuesta de memoria contra estos exoantígenos aumenta con la experiencia. La memoria contra los exoantígenos debe desarrollarse durante la infección primaria, pero es dependiente del tiempo postinfección, inclusive en infecciones múltiples. Para tener información concluyente al respecto, es preciso estudiar un mayor número de pacientes. El hecho de que los exoantígenos, tanto de etapas asexuales como de gametocitos, sean capaces de activar a linfocitos T permite contemplar la posibilidad de

utilizarlos como candidatos a vacunas. La vacunación con exoantígenos podría proporcionar un medio de protección contra los efectos clínicos de la enfermedad generando una inmunidad anti-enfermedad mediante la reducción en la producción de citocinas inflamatorias. Sin embargo, para tal fin sería necesario que estos exoantígenos tengan la habilidad de generar memoria, tal como nuestros resultados lo sugieren, y que no generen una respuesta inflamatoria patológica. Sería necesario hacer una caracterización de estas proteínas y seleccionar aquellas que resultan más inmunogénicas, determinando además si son capaces de generar memoria inmune.

La respuesta de los linfocitos $\gamma\delta^+$ contra las etapas asexuales de *Plasmodium* y contra los exoantígenos derivados de estas, permite contemplar la posibilidad de desarrollar una vacuna multivalente, por un lado dirigida contra etapas asexuales, básicamente con funciones antiparasitarias, que permita inhibir la replicación del parásito previniendo por un lado la entrada del merozoito a los eritrocitos o bien eliminando al parásito dentro del eritrocito. Además, la respuesta inmune contra proteínas gametocitarias y contra los exoantígenos derivados de estas etapas, sugiere la posibilidad de desarrollar estrategias que permitan la eliminación o la regulación de los gametocitos directamente en la circulación del huésped, disminuyendo con esto la carga gametocitaria al momento de que el mosquito ingiere la comida de sangre, bloqueando así la transmisión del parásito. La inmunidad contra *Plasmodium* se desarrolla como resultado de una exposición prolongada al parásito y depende de la memoria inmunológica. Mecanismos humorales y celulares contribuyen a esta inmunidad. Las células clave en el reconocimiento y regulación de las respuestas inmunes son los linfocitos T. La inmunidad se adquiere cuando estos linfocitos reconocen antígenos relevantes del parásito y regulan la actividad de los macrófagos y linfocitos B, pero también actúan directamente como células citotóxicas en las células infectadas a través de la producción de citocinas. Hay muchos mecanismos efectores contra el parásito, y la protección puede ser mediada por diversos mecanismos de acuerdo al grado de exposición al parásito y el patrón de transmisión de la enfermedad. Linfocitos $\alpha\beta^+CD4^+$ y $CD8^+$ controlan las etapas intraeritrocíticas, mientras que linfocitos $\gamma\delta^+$ estarían inhibiendo la replicación del parásito, aunque el papel preciso de estas no se conoce todavía.

A su vez, el parásito interfiere contra esa inmunidad: la inducción de una respuesta inmune a macromoléculas se evita ya que el parásito vive dentro del eritrocito la mayor parte del ciclo y la reacción hacia otras moléculas se evita mimetizando moléculas del huésped. Se evade la respuesta inmune mediante los exoantígenos, el reconocimiento inmune es obstaculizado por lá

diversidad antigénica de la población de parásitos. La regulación inmune es además obstaculizada por la supresión inmune caracterizada por una disminución profunda, mecanismos inmunes efectores en hígado y bazo se evitan mediante el secuestro de parásitos maduros al endotelio vascular. La relación entre el sistema inmune y el parásito gobierna la sintomatología, la patología, y el desarrollo de la inmunidad a la enfermedad (Theander, 1992).

8. CONCLUSIONES

Este estudio confirma que las proteínas de gametocitos de *P. falciparum* pueden estimular la activación y la proliferación de linfocitos, y por primera vez demuestra que las de *P. vivax* pueden realizar esta acción. También se demostró que los gametocitos totales de las dos principales especies del paludismo, *P. falciparum* y *P. vivax*, estimulan la activación y proliferación de linfocitos T $\gamma\delta^+$, de forma específica e independiente de la frecuencia del reto (con una o múltiples infecciones previas). A su vez, de manera secundaria, los gametocitos de ambas especies estimulan la proliferación de linfocitos $CD8^+$ y $CD3^+$ en pacientes de una sola infección. Igualmente por primera vez se demuestra que los exoantígenos secretados específicamente por los gametocitos de ambas especies de *Plasmodium* estimulan principalmente la proliferación de linfocitos $\gamma\delta^+$ en pacientes con una o múltiples infecciones previas.

En relación a las etapas asexuales de *P. vivax*, se demostró que la respuesta inmune a las proteínas totales o a los exoantígenos es análoga a la de *P. falciparum*, aunque de menor amplitud. Las proteínas totales y los exoantígenos de las etapas eritrocíticas del parásito estimulan una respuesta primaria de linfocitos $\gamma\delta^+$, seguida de la expansión de linfocitos $CD8^+$. Los antígenos asexuales totales inducen en pacientes de infección primaria previa una leve respuesta de linfocitos $CD4^+$, mientras que en infecciones múltiples se añade una respuesta de linfocitos $\alpha\beta^+$.

En este trabajo se demostró que durante la etapa aguda de la infección con *P. vivax*, hay una inmunosupresión de los linfocitos, demostrado por la falta de proliferación con Con A y con LPS de manera similar a lo que ocurre con *P. falciparum*. Sin embargo, las CMC de pacientes con una primera o una segunda infección son capaces de activarse y proliferar de manera específica a los antígenos asexuales y a los gametocitos sonicados, demostrando una falta de anergia.

Bajo las condiciones de incubación de las CMC en este estudio y en contraste a lo

diversidad antigénica de la población de parásitos. La regulación inmune es además obstaculizada por la supresión inmune caracterizada por una disminución profunda, mecanismos inmunes efectores en hígado y bazo se evitan mediante el secuestro de parásitos maduros al endotelio vascular. La relación entre el sistema inmune y el parásito gobierna la sintomatología, la patología, y el desarrollo de la inmunidad a la enfermedad (Theander, 1992).

8. CONCLUSIONES

Este estudio confirma que las proteínas de gametocitos de *P. falciparum* pueden estimular la activación y la proliferación de linfocitos, y por primera vez demuestra que las de *P. vivax* pueden realizar esta acción. También se demostró que los gametocitos totales de las dos principales especies del paludismo, *P. falciparum* y *P. vivax*, estimulan la activación y proliferación de linfocitos T $\gamma\delta^+$, de forma específica e independiente de la frecuencia del reto (con una o múltiples infecciones previas). A su vez, de manera secundaria, los gametocitos de ambas especies estimulan la proliferación de linfocitos $CD8^+$ y $CD3^+$ en pacientes de una sola infección. Igualmente por primera vez se demuestra que los exoantígenos secretados específicamente por los gametocitos de ambas especies de *Plasmodium* estimulan principalmente la proliferación de linfocitos $\gamma\delta^+$ en pacientes con una o múltiples infecciones previas.

En relación a las etapas asexuales de *P. vivax*, se demostró que la respuesta inmune a las proteínas totales o a los exoantígenos es análoga a la de *P. falciparum*, aunque de menor amplitud. Las proteínas totales y los exoantígenos de las etapas eritrocíticas del parásito estimulan una respuesta primaria de linfocitos $\gamma\delta^+$, seguida de la expansión de linfocitos $CD8^+$. Los antígenos asexuales totales inducen en pacientes de infección primaria previa una leve respuesta de linfocitos $CD4^+$, mientras que en infecciones múltiples se añade una respuesta de linfocitos $\alpha\beta^+$.

En este trabajo se demostró que durante la etapa aguda de la infección con *P. vivax*, hay una inmunosupresión de los linfocitos, demostrado por la falta de proliferación con Con A y con LPS de manera similar a lo que ocurre con *P. falciparum*. Sin embargo, las CMC de pacientes con una primera o una segunda infección son capaces de activarse y proliferar de manera específica a los antígenos asexuales y a los gametocitos sonicados, demostrando una falta de anergia.

Bajo las condiciones de incubación de las CMC en este estudio y en contraste a lo

reportado, los antígenos totales y exoantígenos de ambas especies de *Plasmodium*, no indujeron la activación y proliferación de linfocitos en CMC de los controles no palúdicos. Además no se detectó la activación de linfocitos B en respuesta a ninguno de los antígenos de *Plasmodium* tanto en CMC de los controles como de los pacientes infectados. De igual forma, los antígenos de *Plasmodium* no indujeron la expresión del marcador CD2, indicando que esta molécula no es co-accesoria en la activación inducida por estos antígenos. De manera importante, las CMC fueron activadas en respuesta a proteínas sonicadas y a exoantígenos de *Plasmodium* con la expresión de los marcadores de activación CD25 y CD69. La expresión del primer marcador se induce principalmente con las proteínas sonicadas.

Los linfocitos $\gamma\delta^+$ podrían estar contribuyendo a la eliminación del parásito, y a la patología de la enfermedad, por medio de mecanismos citotóxicos y/o a la producción de citocinas inflamatorias. La activación con las proteínas de *Plasmodium* parece requerir de IL-2 y/o de otras citocinas que actúan a través de este receptor. Las proteínas totales y los exoantígenos indujeron respuestas análogas en ambas especies de *Plasmodium*, sugiriendo que los antígenos dominantes podrían tener epítopes conservados que son comunes entre especies.

9. LITERATURA CITADA

Alan, P., Premawansa, S., Bruce, M.C., Carter R. 1991. A stage specific gene expressed at the onset of gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. **46**: 81-88.

Alano, P., Carter, R.C. 1990. Sexual differentiation in malaria parasites. *Annu Rev Microbiol*. **44**: 429-449.

Alano P, Premawansa S, Bruce MC, Carter R. 1991. A stage specific gene expressed at the onset of gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. **46**: 81-88.

Abernethy, N., Hagan, C., Tan, P., Watson, J. 2000. Dysregulated expression of CD69 and IL-2 receptor alpha and beta chains on CD8⁺ T lymphocytes in flaky skin mice. *Immunol Cell Biol*. **78**: 596-602.

Allsopp, C., Gilbert, S. 1996. Comparison of numerous delivery systems for the induction of cytotoxic T lymphocytes by immunization. *Eur J Immunol*. **26**: 1951-1959.

Alves, F., Santos-Nieto, L., Junqueira, M., Costa, E. 1992. Cytokines and dysregulation of the response in human malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **87**: 331-336.

Alving, C. R. 1993. Lipopolysaccharide, lipid A, and liposomes containing lipid A as immunologic adjuvants. *Immunobiol*. **187**: 430-446.

Andrysiak, P.M., Collins, W.E., Campbell, G.H. 1986. Concentration of *Plasmodium ovale*-and *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes from nonhuman primate blood using Percoll gradients. *Am J Trop Med Hyg*. **35**: 251-254.

Anstey, N., Weinberg, J., Hassanali, M., 1996. Nitric oxide in Tanzanian children with malaria: inverse relationship between malaria severity and nitric oxide production/nitric oxide synthase type 2 expression. *J Exp Med*. **184**: 557-567.

Baker, D.A., Thompson, J., Daramola, O., Carlton, J.M. Targett, G. 1995. Sexual stage specific RNA expression of a new *Plasmodium falciparum* gene detected by in situ hybridization. *Mol Biochem Parasitol*. **72**: 193-201.

Baird, J.K., Jones, T.R. Danudirgo, E.W., Annis, B.A., Bangs, M.J., Basri, H., Purnomo, A., Masbar, S. 1991. Age-dependent acquired protection against *Plasmodium falciparum* in people having two years exposure to hyperendemic malaria. *Am J Trop Med Hyg*. **45**: 65-76.

Barnwell, J., Galinski, M., DeSimone, S., Perler, F., Ingravallo, P. 1999. *Plasmodium vivax*, *P. cynomolgi* and *P. knowlesi*: identification of homologue proteins associated with the surface of merozoites. *Exp Parasitol*. Mar; **91**: 238- 249.

Bate, C.A., Taverne, A., Dave, J., Playfair, L. 1990. Malaria exoantigens induce T-independent

antibody that blocks their ability to induce TNF. *Immunology*. **70**: 315- 320.

Bate, C.A., Taverne, J., Bootsma, H., Mason, R., Skalko, N., Gregoriadis, G., 1992. Antibodies against phosphatidylinositol and inositol monophosphate specifically inhibit tumour necrosis factor induction by malaria exoantigens. *Immunology*. **76**: 35- 41.

Behr-Perst, S., Munk, M., Schaberg, T., Ulrichs, T., Schulz, R., Kaufmann, S. 1999. Phenotypically activated gamma delta T lymphocytes in the peripheral blood of patients with tuberculosis. *J Infect Dis*. **180**: 141-149.

Bianco, A.E., Favaloro, J.M., Burkot, T.R., Culvenor, J.G., Crewther, P.E., Brown, G.V., Anders, R.F., Coppel R.L., Kemp, D.J. 1986. A repetitive antigen of *Plasmodium falciparum* that is homologous to heat shock protein 70 of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **83**: 8713-8717.

Bickle, Q., Coppel, R.L. 1992. A fourth family of the *Plasmodium falciparum* S-antigen. *Mol Biochem Parasitol*. **56**: 141-150.

Bordmann, G., Favre, N. Rudin, W. 1997. Malaria toxins: effects on murine spleen and bone marrow cell proliferation and cytokine production *in vitro*. *Parasitology*. **115**: 475-483.

Borre, M., Dziegiel, M., Petersen, E., Hogh, B., Rienick, K., Riley, E., Meis, J.F., Aikawa, M., Nakamura, K., Harada, M., Wind, A., Jakobsen, P.H., Cowland, J., Jepsen, S., Axelsen, N., Vuust, J. 1991. Primary structure and localization of a conserved immunogenic *Plasmodium falciparum* glutamate rich protein (GLURP) expressed in both the preerythrocytic and erythrocytic stages of the vertebrate life cycle. *Mol Biochem Parasitol*. **49**: 119-132.

Brabin, B., Ginny, M., Sapau, J., Galme, K., Paino, J. 1990. Consequences of maternal anaemia on outcome of pregnancy in a malaria endemic area in Papua New Guinea. *Ann Trop Med Parasitol*. **84**: 11- 24.

Braun-Breton, C., Blisnick, T., Jouin, H., Barale, J., Rabilloud, T., Langsley, G., Pereira da Silva, L. 1992. *Plasmodium chabaudi* p68 serine protease activity required for merozoite entry into mouse erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89**: 9647-9651.

Brown, H., Kemp, D.J., Barzaga, N., Brown, V., Anders, R., Coppel, R. 1987. Sequence variation in S-antigen genes of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Med*. **4**: 365-376.

Bruce, M.C, Carter, R., Nakamura, K., Aikawa, M., Carter, R. 1994. Cellular location and temporal expression of the *Plasmodium* sexual stage antigen Pfs16. *Mol Biochem Parasitol*. **65**: 11-22.

Cady, C., Lahn, M., Vollmer, M., Tsuji, M., Seo, S., Reardon, C., O'Brien, R., Born, W. 2000. Response of murine gamma delta T cells to the synthetic polypeptide poly-Glu50 Tyr50. *J Immunol*. **165**: 1790-1798.

Carter, R. Mendis, K. 1991. Immune responses against sexual stages of *Plasmodium vivax* during

human malarial infections in Sri Lanka. *Parassitologia*. **33**: 67-70.

Chizzolini, C., Grau, G., Geinoz, A., Schrijvers, D. 1990. T lymphocyte interferon-gamma production induced by *Plasmodium falciparum* antigen is high in recently infected non-immune and low in immune subjects. *Clin Exp Immunol*. **79**: 95-99.

Chumpitazi, B.F., Lepers, J.P., Simon, J., Deloron, P. 1996. IgG1 and IgG2 antibody responses to *Plasmodium falciparum* exoantigens correlate inversely and positively, respectively, to the number of malaria attacks. *FEMS Immunol Med Microbiol*. **14**: 151-158.

Contreras, C., Ploton, I., Siliciano, R., Karp, C., Viscidi, R., Kumar, N. 1998. Mapping of specific and promiscuous HLA-DR-restricted T-cell epitopes on the *Plasmodium falciparum* 27-kilodalton sexual stage-specific antigen. *Infect Immun*. **66**: 3579-3590.

Craston, R., Koh, M., Mc Dermott, A., Ray, N., Prentice, H., Lowdell, M. 1997. Temporal dynamics of CD69 expression on lymphoid cells. *J Immunol Methods*. **209**: 37-45.

Cruz-Cubas, A.B., Gentilini, M., Danis, M., Monjour, L. 1993. Soluble antigens of intra-erythrocyte stages of *Plasmodium falciparum*: diagnostic and vaccinal value. *Pathol Biol*. **41**: 495-499.

Cruz-Cubas, A., Gentilini, M., Monjour, L. 1994. Cytokines and T-cell response in malaria. *Biomed Pharmacother*; **48**: 27-33.

Culvenor, J.G., Day, K., Anders, R. 1991. *Plasmodium falciparum* ring-infected erythrocyte surface antigen is released from merozoite dense granules after erythrocyte invasion. *Infect Immun*. **59**: 1183-1187.

Day, K., Hayward, R., Smith, D., Culvenor, J. 1998. CD36 dependent adhesion and knob expression of the transmission stages of *Plasmodium falciparum* is stage specific. *Mol Biochem Parasitol*. **93**: 166-177.

Debrabant, A.P., Maes, P., Delplace, J., Dubremetz, A., Tartarand, O., Camus, C. 1992. Intramolecular mapping of *Plasmodium falciparum* P126 proteolytic fragments by N-terminal amino acid sequencing. *Mol Biochem Parasitol*. **53**: 89-96.

De Luna, R., Vuotto, M., Ielpo, M., Ambrosio, R., Piantedosi, D., Moscatiello, V., Ciaramella, P., Scalone, A., Gradoni, L., Mancino, D. 1999. Early suppression of lymphoproliferative response in dogs with natural infection by *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol*. **70**: 95-103.

Dick, S., Waterfall, M., Currie, J., Maddy, A., Riley, E. 1996. Naive human $\alpha\beta$ T cells respond to membrane associated components of malaria-infected erythrocytes by proliferation and production of IFN γ . *Immunology*. **88**: 412-420.

Dieli F, Troye-Blomberg, M., Ivanyi, J., Fournie, J., Bonneville, M., Peyrat, M.A., Sireci, G.,

Salerno, A. 2000. V γ 9/V δ 2 T lymphocytes reduce the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Immunol.* **30**: 1512-1519.

Doolan, D., Hoffman, S. 1997. Multi-gene vaccination against malaria: a multistage, multi-immune response approach. *Parasitol Today.* **13**: 171-178.

Duffy, P.E., Kaslow, D.C. 1997. A novel malaria protein, Pfs28, and Pfs25 are genetically linked and synergistic as falciparum malaria transmission-blocking vaccines. *Infect Immun.* **65**: 1109-1113.

Egan, A., Morris, J., Barnish, G., Caspers, P., Heppener, G. 1996. Clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria is associated with serum antibodies to the 19 kDa C-terminal fragment of the merozoite surface antigen, PfMSP-1. *J Infect Dis.* **173**: 765-769.

Elloso, M., van der Heyde, H., vande Waa, J, Manning, D., Weidanz, W. 1994. Inhibition of *Plasmodium falciparum* *in vitro* by human $\gamma\delta$ T cells. *J Immunol.* **153**: 1187-1194.

Elloso, M., van der Heyde, H., Troutt, A., Manning, D., Weidanz, W. 1996. Human $\gamma\delta$ T cell subset-proliferative response to malarial antigen *in vitro* depends on CD4⁺ T cells or cytokines that signal through components of the IL-2R. *J Immunol.* **157**: 2096-2102.

Elloso MM, Wallace M, Manning DD, Weidanz WP. 1998. The effects of interleukin-15 on human gammadelta T cell responses to *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *Immunol Lett.* **64**:125-132.

Fell, A.H., Currier, J., Good, M.F. 1994. Inhibition of *Plasmodium falciparum* growth *in vitro* by CD4⁺ and CD8⁺ T cells from non-exposed donors. *Parasite Immunol.* **16**: 579-586.

Ferreira, M.U., Kimura, E.S., Camargo, L.M., Alexandre, C.O., da Silva, L.H., Katzin, A.M. 1994. Antibody response against *Plasmodium falciparum* exoantigens and somatic antigens: a longitudinal survey in a rural community in Rondonia, western Brazilian Amazon. *Acta Trop.* **57**: 35-46.

Foley, M., Murray, L., Anders, R. 1990. The ring-infected erythrocyte surface antigen protein of *Plasmodium falciparum* is phosphorylated upon association with the host cell membrane. *Mol Biochem Parasitol.* **38**: 69-76.

Galinski, M.R., Barnwell, J.W. 1996. *Plasmodium vivax*: merozoites, invasion of reticulocytes and considerations for malaria vaccine development. *Parasitol Today.* **12**: 20-29.

Gilles, H. Warrel, D.A. 1993. Bruce-Chwatt's essential malariology. Tercera edición. Edit. Edward Arnold, Boston MA.

Godal, T., Goodman, H.C., Lucas, A. 1998. Research and training in tropical diseases. *World Health Forum.* **19**: 377-381.

Godot, V., Harraga, S., Beurton, I., Deschaseaux, M., Sarciron, E., Gottstein, B., Vuitton, D. 2000. Resistance/susceptibility to *Echinococcus multilocularis* infection and cytokine profile in humans. I. Comparison of patients with progressive and abortive lesions. *Clin Exp Immunol.* **121**: 484-490

Good, M., Quakyi, A., Berzofsky, R., Carter, R., Miller, L. 1987. Human cell clones reactive to the sexual stages of *Plasmodium falciparum* malaria: high frequency of gamete-reactive T cells in peripheral blood from nonexposed donors. *J Immunol.* **138**: 306-311.

Goodier, M., Fey, P., Eichmann, K., Langhorne, J. 1992. Human peripheral blood gamma delta T cells respond to antigens of *Plasmodium falciparum*. *Int Immunol.* **4**: 33-41.

Goodier M, Krause-Jauer M, Sanni A, Massougbdji A, Sadeler BC, Mitchell GH, Modolell M, Eichmann K, Langhorne J. 1993. Gamma delta T cells in the peripheral blood of individuals from an area of holoendemic *Plasmodium falciparum* transmission. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **87**: 692-696.

Goodier, M., Lundqvist, C., Hammarstrom, M., Troye-Blomberg, M., Langhorne, J. 1995. Cytokine profiles for human V γ 9⁺ T cells stimulated by *Plasmodium falciparum*. *Parasite Immunol.* **17**: 413-423.

Goodier, M., Targett, G. 1997. Polyclonal T-cell responses to *Plasmodium falciparum* gametocytes in malaria nonexposed donor. *Parasite Immunol.* **19**: 419-425.

Guehler, S., Bluestones, J., Barrett, T. 1999. Activation and peripheral expansion of murine T-cell receptor gamma delta intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology.* **116**: 327-334.

Hanninen, A, Harrison, L.C. 2000. Gamma delta T cells as mediators of mucosal tolerance: the autoimmune diabetes model. *Immunol Rev.* **173**: 109-119.

Haque, A., Echchannaoui, H., Seguin, R., Schwartzman, J., Kasper, L., Haque S. 2001. Cerebral malaria in mice: interleukin-2 treatment induces accumulation of gammadelta T cells in the brain and alters resistant mice to susceptible-like phenotype. *Am J Pathol.* **158**: 163-172.

Harding, C. 1996. Class I MHC presentation of exogenous antigens. *J Clin Immunol.* **16**: 90-96.

Harte, P.G., Rogers, N., Targett, G. 1985. Role of T cells in preventing transmission of rodent malaria. *Immunology.* **56**: 1-7.

Hayward, R.E., Sullivan, D.J., Day, K.P. 2000. *Plasmodium falciparum*: histidine-rich protein II is expressed during gametocyte development. *Exp Parasitol.* **96**: 139-146.

Healer, J.D., McGuinness, P., Hopcroft, S., Haley, R., Carter, C., Riley, E. 1997. Complement-mediated lysis of *Plasmodium falciparum* gametes by malaria-immune human sera is associated with antibodies to the gamete surface antigen Pfs230. *Infect Immun.* **65**: 3017-3023.

- Healer, J., Graszynski, A., Riley, E. 1999. Phagocytosis does not play a mayor role in naturally acquired transmission-blocking immunity to *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun.* **67**: 2334-2339.
- Helmby, H., Jonsson, G., Troye-Blomberg, M. 2000. Cellular changes and apoptosis in the spleens and peripheral blood of mice infected with blood-stage *Plasmodium chabaudi chabaudi*. *Infect Immun.* **68**: 1485-1490.
- Hensmann, M., Kwiatkowski, D. 2001. Cellular basis of early cytokine response to *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun.* **69**: 2364-2371.
- Herrera, M.A., Rosero, F., Herrera, S., Caspers, P., Rotmann, D., Sinigaglia, F., Certa, U. 1992. Protection against malaria in *Aotus* monkeys immunized with a recombinant blood-stage antigen fused to a universal T-cell epitope: correlation of serum gamma interferon levels with protection. *Infect Immun.* **60**: 154-158.
- Herrera, S., Rudin, W., Herrera, M., Clavijo, P., Mancilla, L., de Plata, C., Matile, H., Certa, U. 1993. A conserved region of the MSP-1 surface protein of *Plasmodium falciparum* contains a recognition sequence for erythrocyte spectrin. *EMBO J.* **12**: 1607-1614.
- Hisaeda, H., Stowers, A., Tsuboi, T., Collins, W., Sattabongkot, J., Suwanabun, N., Torii, M., Kaslow, D. 2000. Antibodies to malaria vaccine candidates Pvs25 and Pvs28 completely block the ability of *Plasmodium vivax* to infect mosquitoes. *Infect Immun.* **68**: 6618-6623.
- Ho, M., Webster, H.K., Green, B., Loareesuwan, S., Kongchareon, S., White, N.J. 1988. Defective production of and response to interleukin 2 in acute human falciparum malaria. *J Immunol.* **141**: 2755-2759.
- Ho, M., Webster, H.K., 1990. T cell responses in acute falciparum malaria. *Immunol Lett.* **25**: 135-138.
- Ho, M., Tongtawe, P., Kriangkum, J., Wimonwattrawatee, T., Pattanapanyasat, K., Bryant, L., Shafiq, J., Suntharsamai, P., Looareesuwan, S., Webster, H. And Elliot, J. 1994. Polyclonal expansion of peripheral $\gamma\delta$ T cells in human *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun.* **62**: 855-862.
- Holder, A. 1999. Malaria vaccines. *Proc Natl Acad Sci USA.* **96**: 1167-1169.
- Holt, P.G. 1995. Immune tolerance and protection against allergic sensitization. *Allergy*; **50**:34-36.
- Hommel, M. 1997. Modulation of host cell receptors: a mechanism for the survival of malaria parasites. *Parasitology.* **115**: S45-S54.
- Hviid, L, Sorensen, A.L., Kharazmi, A., Theander, T.G. 1990. Functional and phenotypic changes in human lymphocytes after coincubation with *Leishmania donovani* in vitro. *Infect Immun.* **8**: 3163-3167.

Hviid, L., Akanmori, B.D., Loizon, S., Kurtzhals, J.A., Ricke, C.H., Lim, A., Koram, K.A., Nkrumah, F.K., Mercereau-Puijalon, O., Behr, C. 2000. High frequency of circulating gamma delta T cells with dominance of the V(delta)1 subset in a healthy population. *Int Immunol.* **12**: 797-805.

Ihalamulla, R.L., Mendis, K.N. 1987. *Plasmodium vivax*: isolation of mature asexual stages and gametocytes from infected human blood by colloidal silica (Percoll) gradient centrifugation. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **81**: 25-28.

Jagadeesan, K., Korath, M.P., Seethalakshmi, S., Elankumaran, S. 1999. Cell mediated immunity to *Plasmodium vivax* infection: in vitro inhibition of parasite growth by monocyte derived macrophages. *Assoc Physicians India.* **47**: 955-957.

Jakobsen, P.H., Jepsen, S., Riley, E., Theanders, T., Grellier, P., Lihme, A., Hviid, L., Dziegiel, M., Schrevel, J. 1990. Biochemical characterization, localization and immunostimulating properties of a soluble glycoprotein, Ag1, isolated from in vitro cultures of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Res.* **76**: 657-661.

Jakobsen, P.H., Grellier, P., T. G. Theander, N. Behrendt, M. Torri, M. Aikawa, J., S. Jepsen. 1991. Identification and localization of a soluble antigen, Ag2, of 136 kDa from *Plasmodium falciparum* in vitro cultures. *APMIS.* **99**: 155-162.

Jakobsen, P.H., Hviid, L., Theander, T., Afare, E., Ridley, R., Heegaard, P., Stuber, S., Dalsgaard, K., Nkrumah, F. 1993. Specific T-cell recognition of the merozoite proteins, rhoptry associated protein-1 and erythrocyte binding antigen-1 of *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun.* **61**: 268-273.

Jakobsen, P.H., Morris-Jones, S., Theander, T.G., Hviid, L., Hansen, M.B., Bendtzen, K., Ridley, R.G., Greenwood, B.M. 1994. Increased plasma levels of soluble IL-2R are associated with severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Exp Immunol*; **96**: 98-103.

Jakobsen, P.H. 1995. *Plasmodium falciparum* malaria parasite exoantigens: their role in disease and in immunity. *Dan Med Bull.* **42**: 22-39.

Jakobsen, P.H., Bate, C., Taverne, J., Playfair, J.H. 1995. Malaria: toxins, cytokines and disease. *Parasite Immunol.* **17**: 223-231.

Jakobsen, P.H., Kurtzhals, J., Riley, E., Hviid, L., Theander, T., Morris-Jones, S., Jensen, B., Bayoumi, R., Ridley, R., Greenwood, B. 1997. Antibody responses to rhoptry-associated protein 1(RAP-1) of *Plasmodium falciparum* parasites in humans from areas of different malaria endemicity. *Parasite Immunol.* **19**: 387-393.

James, M.A. 1989. Application of exoantigens of *Babesia* and *Plasmodium* in vaccine development. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **83 Suppl**: 67-72.

Janse, C.J. van Vianen, P.H., Tanke, H.J., Mons, B., Ponnudurai, T. Overdulve, J.P. 1987.

Plasmodium species: flow cytometry and microfluorometry assessments of DNA content and synthesis. *Exp Parasitol.* **64**: 88-94.

Jones, S., Goodier, M., Langhorne, J, 1996. The response of gamma delta T cells to *Plasmodium falciparum* is dependent on activated CD4⁺ T cells and the recognition of MHC class I molecules. *Immunology.* **89**: 405-412.

Karunaweera, N., Carter, R., Grau, G., Kniatkowski, D., Del Giudice, G., Mendis, K. 1992. Tumour necrosis factor-dependent parasite-killing effects during paroxysm in non-immune *Plasmodium vivax* malarial patients. *Clin Exp Immunol.* **88**: 499-505.

Kaslow, D.C. 1997. Transmission-blocking vaccines: uses and current status of development. *Int J Parasitol.* **27**: 183-189.

Kaufmann, S. 1996. gamma delta and other unconventional T lymphocytes: What do they see and what do they do?. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93**: 2272-2279.

Kharazmi, A., Jepsen, S., Andersen, A. 1987. Generation of reactive oxygen radicals by human phagocytic cells activated by *Plasmodium falciparum*. *Scand J Immunol.* **25**: 335-341.

Kristensen, G., Jakobsen, P.H. 1996. *Plasmodium falciparum*: characterization of toxin-associated proteins and identification of a hemoglobin containing parasite cytokine stimulator. *Exp Parasitol.* **82**: 147-154.

Kuhnlein, P., Park, J., Herrmann, T., Elbe, A., Hunig, T. 1994. Identification and characterization of rat gamma/delta T lymphocytes in peripheral lymphoid organs, small intestine, and skin with a monoclonal antibody to a constant determinant of the gamma/delta T cell receptor. *J Immunol.* **153**: 979-986.

Kumar, N., Carter, R. 1984. Biosynthesis of the target antigens of antibodies blocking transmission of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* **13**: 333-342.

Kumar, N., Zhao, Y., Graves, P., Folgar, J., Maloy, L., Zheng, H. 1990. Human immune responses directed against *Plasmodium falciparum* heat shock-related proteins. *Infect Immun.* **58**: 1408-1414.

Kwiatkowski, D., Cannon, J.G., Manogue, K.R., Cerami, A., Dinarello, C.A., Greenwood, B.M. 1989. Tumour necrosis factor production in *Falciparum* malaria and its association with schizont rupture. *Clin Exp Immunol.* **77**: 361- 66.

Kwiatkowski, D., 1992. Malaria: becoming more specific about non-specific immunity. *Curr Opin Immunol.* **4**: 425-431.

Kwiatkowski, D.K, Marsh, K. 1997. Development of a malaria vaccine. *Lancet.* **350**: 1696-1701.

Langhorne, J., Goodier, M., Berh, C., Dubois, P. 1992. Is there a role for $\gamma\delta$ T cells in malaria?. *Immunol Today.* **13**: 298-300.

- Langhorne, J., Morris-Jones, S., Casabo, L., Goodier, M. 1994. The response of $\gamma\delta$ T cells in malaria infections: an hypothesis. *Res Immunol.* **145**: 429-436.
- Leca, G., Mansur, S.E., Bensussan, A. 1995. Expression of VCAM-1 (CD106) by a subset of TCR gamma delta-bearing lymphocyte clones. Involvement of a metalloprotease in the specific hydrolytic release of the soluble isoform. *J Immunol.* **154**: 1069-1077.
- Leri, O., Perinelli, P., Losi, T., Mastropasqua, M., Peri, C., Tubili, S. 1997. Malaria: recent immunological acquisitions and therapeutic prospects. *Clin Ter.* **148**: 655-665.
- Lin, W.C., Moore, J.O., Mann, K.P., Traweek, S.T., Smith, C. 1999. Post transplant CD8⁺ gamma delta T cell- lymphoma associated with human herpes virus-6 infection. *Leuk Lymphoma.* **33**: 377-384.
- Lindberg, R., Johansen, M., Nilsson, C., Nansen, P. 1999. An immunohistological study of phenotypic characteristics of cells of the inflammatory response in the intestine of *Schistosoma bovis*-infected goats. *Parasitology.* **118 (Pt 1)**: 91-99.
- Lobo, C.A., Kumar, N. 1998. Sexual differentiation and development in the malaria parasite. *Parasitol Today.* **14**: 146-150.
- Longacre, S., Mendis, K.N., David, P.H. 1994. *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 C-terminal recombinant proteins in baculovirus. *Mol Biochem Parasitol.* **64**: 191-205.
- Lobo, C.A., Konings, R., Kumar, N. 1994. Expression of early gametocyte-stage antigens Pfg27 and Pfs16 in synchronized gametocyte and non-gametocyte producing clones of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* **68**: 151-154.
- Lobo, C.A., Kumar, N. 1998. Sexual differentiation and development in the malaria parasite. *Parasitol Today.* **14**: 146-150.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem.* **193**: 265-275.
- Lucas, B., Kasper, L.H., Smith, K., Haque, A. 1996. In vivo treatment with interleukin-2 reduces parasitemia and restores IFN-gamma gene expression and T-cell proliferation during acute murine malaria. *CR Acad Sci III.* **319**: 705-710.
- Luty, A.J., Mayombo, J., Lekoulou, F., Mshana, R. 1994. Immunologic responses to soluble exoantigens of *Plasmodium falciparum* in Gabonese children exposed to continuous intense infection. *Am J Trop Med Hyg.* **51**: 720-729.
- Marhs, K. 1992. Malaria, a neglected disease?. *Parasitol.* **104 Suppl**: S53-S69.
- Mendis K., Munesinnghe, Y., de Silva, Y., Keragalla, I., Carter, R. 1987. Malaria transmission-

blocking immunity induced by natural infections of *Plasmodium vivax* in humans. *Infect Immun.* **55**: 369-372.

Mendis, K. Carter, R. 1992. The role of cytokines in *Plasmodium vivax* malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **87**: 51-55.

Mendis, K.N. Carter, R. 1995. Clinical disease and pathogenesis in malaria. *Parasitol Today.* **(5)**: 1-16.

Miller, L., Good, M., Milon, G., 1994. Malaria pathogenesis. *Science.* **264**: 1878-1883.

Miller, L.H., Hoffman, S.L. 1998. Research toward vaccines against malaria. *Nat Med.* **4 Suppl**: 520-524.

Milek, R.L., Roeffen, W.F., Kocken, C.H., Jansen, J., Kaan, A.M., Eling, W.M., Sauerwein, R.W., Konings, R.N. 1998. Immunological properties of recombinant proteins of the transmission blocking vaccine candidate, Pfs48/45, of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* procured in *Escherichia coli*. *Parasite Immunol.* **20**: 377-385.

Moore, T.A., Moore, B.B., Newstead, M.W., Standiford, T.J. 2000. Gamma delta-T cells are critical for survival and early proinflammatory cytokine gene expression during murine *Klebsiella pneumoniae*. *J Immunol.* **165**: 2643-2650.

Morris-Jones, S., Goodier, M.R., Langhorne, J. 1996. The response of $\gamma\delta$ T cells to *Plasmodium falciparum* is dependent on activated CD4⁺ T cells and the recognition of MHC class I molecules. *Immunology.* **89**: 405-412.

Motard, A., I. Landau, A. Nussler, G. Grau, D. Baccam, D. Mazier, A. Targett, G. 1993. The role of reactive nitrogen intermediates in modulation of gametocyte infectivity of rodent malaria parasites. *Parasite Immunol.* **15**: 21-26.

Mukherjee, P., Dani, A., Bhatia, S., Singh, N., Rudensky, A., George, A., Bal, V., Mayor, S., Rath, S. 2001. Efficient presentation of both cytosolic and endogenous transmembrane protein antigens on MHC class II is dependent on cytoplasmic proteolysis. *J Immunol.* **167**: 2632-2641.

Nakanishi, T., Hayashi, A., Kunisawa, J., Tsutsumi, Y., Tanaka, K., Yashiro-Ohtani, Y., Nakanishi, M., Fujiwara, H., Hamaoka, T., Mayumi, T. 2000. Fusogenic liposomes efficiently deliver exogenous antigen through the cytoplasm into the MHC class I processing pathway. *Eur J Immunol*; **30**: 1740-1747.

Naonattune, T., Karunaweera, N.D., Del Giudice, G., Kularatne, M.U., Grau, G.E., Carter, R., Mendis, K. 1991. Cytokines kill malaria parasites during infection crisis: extracellular complementary factors are essential. *J Exp Med.* **173**: 523-531.

Norbury, C., Hewlett, L., Prescott, A., Shastri, N., Watts, C. 1995. Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages. *Immunity.* **3**:783-791.

- Ogata, H., Su, I., Miyake, K., Nagai, Y., Akashi, S., Mecklenbrauker, I., Rajewsky, K., Kimoto, M., Tarakhovskiy, A. 2000. The toll-like receptor protein RP105 regulates lipopolysaccharide signaling in B cells. *J Exp Med.* **192**: 23-29
- Onah, D., Hopkins, J., Luckins, A. 2000. Effects of the depletion of CD8⁺ T cells and monocytes on the proliferative responses of peripheral blood leucocytes from *Trypanosoma evansi*-infected sheep. *Vet Parasitol.* **92**: 25-35.
- Orlandi, P.A., Klotz, F., Haynes, J. 1992. A malaria invasion receptor, the 175-kilodalton erythrocyte binding antigen of *Plasmodium falciparum* recognizes the terminal Neu5Ac (alpha2-3) Gal-sequences of glycophorin A. *J Cell Biol.* **116**: 901-909.
- Ottonnes, F., Liautard, J., Gross, A., Rabenoelina, F., Liautard, J.P., Favero, J. 2000. Activation of human Vγ9Vδ2 T cells by a *Brucella suis* non-peptidic fraction impairs bacterial intracellular multiplication in monocytic infected cells. *Immunology.* **100**: 252-258.
- Panton, L.J., McPhie, P., Maloy, W., Wellems, T.E., Taylor, D., Howard, R. 1989. Purification and partial characterization of an unusual protein of *Plasmodium falciparum*: histidine rich protein II. *Mol Biochem Parasitol.* **35**: 149-160.
- Perera, K., Carter, R., Goonewardene, R., Mendis, K. 1994. Transient increase in circulating γδ T cells during *Plasmodium vivax* malaria paroxysms. *J Exp Med.* **179**: 311-315.
- Perkins, M. 1988. Stage-dependent processing and localization of a *Plasmodium falciparum* protein of 130,000 molecular weight. *Exp Parasitol.* **65**: 61-68.
- Perlmann, P., Troye-Blomberg, M. 2000. Malaria blood-stage infection and its control by the immune system. *Folia Biol (Krakow).* **46**: 210-218.
- Pinchyangkul, S., Saengkrai, P., Yongvanitchit, K., Stewart, A., Heppner, D. 1997. Activation of gd T cells in malaria: interaction of cytokines and a schizont-associated *Plasmodium falciparum* antigen. *J Infect Dis.* **176**: 233-241.
- Piper, K., Hayward, R., Cox, M., Day, K. 1999. Malaria transmission and naturally acquired immunity to PfEMP-1. *Infect Immun.* **67**: 6369-74.
- Playfair, J., Taverne, J., Bate, C., Souza, J. 1990. The malaria vaccine: anti-parasite or anti-disease?. *Immunol Today.* **11**: 25-27.
- Premawansa, S., Gamage-Mendis, A., Perera, L., Begarnie, S., Mendis, K., Carter, R. 1994. *Plasmodium falciparum* malaria transmission-blocking immunity under conditions of low endemicity as in Sri Lanka. *Parasite Immunol.* **16**: 35-42.
- Ramachandra, L., Chu, R., Askew, D., Noss, E., Canaday, D., Potter, N., Johnsen, A., Krieg, A., Nedrud, J., Boom, W., Harding, C. 1999. Phagocytic antigen processing and effects of microbial

products on antigen processing and T-cell responses. *Immunol Rev.* **168**: 217-239.

Ramsey, J.M., Salinas, E., Rodriguez, M.H. 1996. Acquired transmission-blocking immunity to *Plasmodium vivax* in a human population of southern coastal Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* **54**: 458-563.

Ramsey, J.M. Tello, A., Contreras, C., Ordoñez, R., Chirino, N., Rojo, J., García, F. 2002. *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* gametocyte-specific exoantigens stimulate proliferation of TCR $\gamma\delta^+$ lymphocytes. *J Parasitol.* En prensa.

Rawlins, D.J., Fujioka, H., Fried, M., Keister, D.B., Aikawa, M., Kaslow, D.C. 1992. Alpha-tubulin II is a male-specific protein in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* **56**: 239-250.

Riley, E., Andersson, G., Otoo, L.N., Jepsen, S., Greenwood, B.M., 1988. Cellular immune responses to *Plasmodium falciparum* antigens in Gambian children during and after an acute attack of falciparum malaria. *Clin Exp Immunol.* **73**: 17-22.

Riley, E., Jobe, O., Blackman, M., Whittle, H., Greenwood, B. 1989. *Plasmodium falciparum* schizont extracts suppress lymphoproliferative responses to mitogens and antigens in malaria-immune adults. *Infection and Immun.* **57**: 3181-3188.

Riley, E., Ong, C., Olerup, O., Eida, S., Allen, S., Bennett, S., Andersson, G., Targett, G. 1990. Cellular and humoral immune responses to *Plasmodium falciparum* gametocyte in malaria-immune individuals. *J Immunol.* **144**: 4810-4816.

Riley, E., Jakobsen, P.H., Allen, S.J., Wheeler, J.G., Bennett, S., Jepsen, S., Greenwood, B.M., 1991. Immune response to soluble exo-antigens of *Plasmodium falciparum* may contribute to both pathogenesis and protection in clinical malaria: evidence from a longitudinal, prospective study of semi-immune children. *Eur J Immunol.* **21**: 1019-1025.

Riley, E., Allen, S.J., Wheeler, J., Blackman, M., Bennett, S., Takacs, B., Schonfeld, J., Holder, A., and Greenwood, B. 1992. Naturally acquired cellular and humoral responses to the major merozoite surface antigen (PfMSP1) of *Plasmodium falciparum* are associated with reduced malaria morbidity. *Parasite Immunol.* **14**: 321-337.

Riley, E., Morris-Jones, S., Taylor-Robinson, A., Holder, A. 1993. Lymphoproliferative responses to a merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum*: preliminary evidence for seasonal activation of CD8⁺/HLA-DQ-restricted suppressor cells. *Clin Exp Immunol.* **94**: 64-67.

Riley, E., Morris-Jones, S., Blackman, M.J., Greenwood, B.M., Holder, A. 1993 A longitudinal study of naturally acquired cellular and humoral immune responses to a merozoite surface protein (MSP1) of *Plasmodium falciparum* in an area of seasonal malaria transmission. *Parasite Immunol.* **15**: 513-524.

Riley, E., Bennett, S., Jepson, A., Hassan-King, M., Whittle, H., Olerup, O., Carter, R. 1994. Human antibody responses to Pfs 230, a sexual stage-specific surface antigen of *Plasmodium*

falciparum: non-responsiveness is a stable phenotype but does not appear to be genetically regulated. *Parasite Immunol.* **16**: 55-62.

Riley, E., Williamson, K.C., Greenwood, B.M., Kaslow, D.C. 1995. Human immune recognition of recombinant proteins representing discrete domains of the *Plasmodium falciparum* gamete surface protein, Pfs230. *Parasite Immunol.* **17**: 11-19.

Riley, E., 1999. Is T-cell priming required for initiation of pathology in malaria infections. *Immunol Today.* **20**: 228-233.

Rockett, K.A., Awburn, M., Aggarwal, B.B., Cowden, W.B., Clark, I.A. 1992. In vivo induction of nitrite and nitrate by tumor necrosis factor, lymphotoxin, and interleukin-1: possible roles in malaria. *Infect Immun.* **60**: 3725-3730.

Roeffen, W., Beckers, P.J., Teelen, K., Lensen, T., Sauerwein, R.W., Meuwissen, J.H., Eling, W. 1995. *Plasmodium falciparum*: a comparison of the activity of Pfs230-specific antibodies in an assay of transmission-blocking immunity and specific competition ELISAs. *Exp Parasitol.* **80**: 15-26.

Rogers, N., Daramola, O., Targett, G., Hall, B. 1996. CD36 and intercellular adhesion molecule 1 mediate adhesion of developing *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Infect Immun.* **64**:1480-1483.

Rogers, N., Hall, B., Obiero, J., Targett, G. & Sutherland, C. 2000. A model for sequestration of the transmission stages of *Plasmodium falciparum*: adhesion of gametocyte-infected erythrocytes to human bone marrow cells. *Infect Immun.* **68**: 3455-3472.

Roussillon C, Agrapart M, Guglielmi P, Bensussan A, Brasseur P, Ballet JJ.1994. Human TcR gamma delta⁺ lymphocyte response on primary exposure to *Plasmodium falciparum*. *Clin Exp Immunol.* **95**: 91-97.

Rzepczyk, C.M., Ramasamy, R., Mutch, D., Ho, P., Battistutta, D., Anderson, K., Parkinson, D., Doran, T., Honeyman, F. 1989. Analysis of the human T cell response to two *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigens. *Eur J Immunol.* **19**: 1797-1802.

Rzepczyk, C., Stamatiou, S., Anderson, K., Stowers, A., Cheng, Q., Saul, A., Allwoth, A., McCormack, J., Whitby, M., Olive, C., Lawrence, G. 1996. Experimental human *Plasmodium falciparum* infections: longitudinal analysis of lymphocyte responses with particular reference to gamma delta T cells. *Scand J Immunol.* **43**: 219-227.

Rzepczyk, C., Anderson, K., Stamatiou, S., Townsend, E., Allwoth, A., McCormack, J., Whitby, M. 1997. $\gamma\delta$ T cells: Their immunobiology and role in malaria infections. *Int J Parasitol.* **27**: 191-200.

Saha, A., Chakrabarti, G., Sen, S., Bandyopadhyay, S. 1999. *Leishmania donovani* parasites interact with $\gamma\delta$ human peripheral blood T cells and induce susceptibility to NK cell-mediated lysis. *Scand J Immunol.* **50**: 588-595.

- Saito, T., Otsuka, A., Kurashima, A., Watanabe, M., Aoki, S., Harada, A. 2001. Study of lymphocyte and NK cell activity during mild hypothermia therapy. *No Shinkei Geka*; **29**: 633-639.
- Salerno, A., Dieli, F. 1998. Role of gamma delta T lymphocytes in immune response in humans and mice. *Crit Rev Immunol*. **18**: 327-357.
- Sam-Yellowe, T., Perkins, J. 1990. Binding of *Plasmodium falciparum* rhoptry proteins to mouse erythrocytes and their possible role in invasion. *Mol Biochem Parasitol*. **39**: 91-100.
- Sciammas, R., Bluestone, J.A. 1999. TCR $\gamma\delta$ cells and viruses. *Microbes Infect*. **1**: 203-212.
- Shaffer, N., Grau, G.E., Hedberg, K. 1991. Tumor necrosis factor and severe malaria. *J Infect Dis*. **163**: 96-101.
- Smalley, M.E., Abdalla, S., Brown, J. 1980. The distribution of *Plasmodium falciparum* in the peripheral blood and bone marrow of Gambian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. **75**: 103-105.
- Scherf, A., Carter R., Petersen C., Alano P., Nelson R., Aikawa M., Mattei D., Pereira da Silva L., Leech J. 1992. Gene activation of Pf11-1 of *Plasmodium falciparum* by chromosome breakage and healing: identification of gametocyte-specific protein with a potential role in gametogenesis. *EMBO J*. **11**: 2293-2301.
- Scherf A, Behr C, Sarthou JL, Pla M, Rogier C, Trape JF, da Silva LP, Dubois P.1993. Immune response in mouse and malaria-exposed humans to peptides derived from Pf11-1, a highly repetitive megadalton protein of *Plasmodium falciparum*. *Eur J Immunol*. **23**: 1574-1581.
- Schwartz, E., Shapiro, R., Shina, S., Bank, I. 1996. Delayed expansion of V δ 2⁺ and V δ 2⁺ gamma delta T cells after acute *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria. *J Allergy Clin Immunol*. **97**: 1387-1392.
- Silvestrini, F, Alano, P, Williams, J.L. 2000. Commitment to the production of male and female gametocytes in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Parasitol*. **5**: 465-471.
- Skeen, M., Rix, E., Freeman, M., Ziegler, H. 2001. Exaggerated proinflammatory and Th1 responses in the absence of gamma/delta T cells after infection with *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*. **69**: 7213-7123.
- Sinden, R.E. 1983. Sexual development of malarial parasites. *Adv Parasitol*. **22**: 153-216.
- Sinden, R.E., Butcher, G.A., Billker, O., Fleck, S.L. 1996. Regulation of infectivity of *Plasmodium* to the mosquito vector. *Adv Parasitol*. **38**: 53-117.

Sinnis, P., Willnow, T.E., Briones, M.R., Herz, J., Nussenzweig, V. 1996. Remnant lipoproteins inhibit malaria sporozoite invasion of hepatocytes. *J Exp Med.* 1996. **184**: 945-954.

Sistema Unico de Referencia Epidemiológica. 2001. Vigilancia epidemiológica Semana 24. Secretaria de Salud. México.

Snow, R., Nahlen, B., Palmer, A., Donely, C., Gupta, S., Marhs, K. 1998. Risk of severe malaria among African infants: direct evidence of clinical protection during early infancy. *J Infect Dis.* **177**: 819-822.

Straube, F., Herrmann, T. 2000. Expression of functional CD8 alpha beta heterodimer on rat gamma delta T cells does not correlate with the CDR3 length of the TCR delta chain predicted for MHC class I-restricted antigen recognition. *Eur J Immunol.* **30**: 3562- 3568.

Su, X.Z., Heatwole, V.M., Wertheimer, S.P., Hackett, F. 1995. The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell.* **82**: 89-100.

Tangye, S., Phillips, J., Lanier, L. 2000. The CD2-subset of the Ig superfamily of cell surface molecules: receptor-ligand pairs expressed by NK cells and other immune cells. *Semin Immunol.* **12**: 149-157.

Targett, G., 1990. Immunity to sexual stages of human malaria parasites: immune modulation during natural infection, antigenic determinants, and the induction of transmission-blocking immunity. *Scand J Infect Dis. Suppl.* **76**: 79-88.

Taverne, J., Bate, C.A, Kniatkowski, D., Jakobsen, P.H., Playfair, H.L. 1990. Two soluble antigens of *Plasmodium falciparum* induce tumor necrosis factor release from macrophages. *Infect Immun.* **58**: 2923-2928.

Taylor-Robinson, A. 2000. Vaccination against malaria: targets, strategies and potentiation of immunity to blood stage parasites. *Front Biosci.* **5**: 16-29.

Theander, T.G. 1992. Defence mechanisms and immune evasion in the interplay between the humane immune system and *Plasmodium falciparum*. *Dan Med Bull.* **39**: 49-63.

Thomas, A.W., Waters, A., Carr, D. 1990. Analysis of variation in Pf83, an erythrocytic merozoite vaccine candidate antigen of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* **42**: 285-288.

Tine, J.A., Lanar, D.E., Smith, D.M. 1996. NYVAC-Pf7: a poxvirus-vectored, multiantigen, multistage vaccine candidate for *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun.* **64**: 3833-3844.

Tough, D.F., Sun, S., Sprent, J. 1997. T cell stimulation in vivo by lipopolysaccharide (LPS). *J Exp Med.* **185**: 2089-2094.

Troye-Blomberg, M. Worku, S., Tangteerawatana, P., Jamshaid, R., Soderstrom, K., Elghazali,

G., Moretta, L., Hammastrom, M., Mincheva-Nilsson, L. 1999. Human gamma delta T cells that inhibit the in vitro grown of the asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* parasite express cytolytic and proinflammatory molecules. *Scand J Immunol.* **50**: 642-650.

Vanham, G., Bisalinkumi, E. 1995. Immunology of human *Plasmodium falciparum* malaria. *Ann Soc Belg Med Trop.* **75**:159-178.

Vermeulen, A.N., Ponnudurai, T., Beckers, P.J., Verhave, J.P., Smits, M.A., Meuwissen, J.H. 1986. Sequential expression of antigens on sexual stages of *Plasmodium falciparum* accessible to transmission-blocking antibodies in the mosquito. *J Exp Med.* **162**: 1460-1476.

Wang, J., Smolyar, A., Tan, K., Kim, M., Sun, Z., Wagner, G., Reinherz, E. 1999. Structure of a heterophilic adhesion complex between the human CD2 and CD58 (LFA-3) counterreceptors. *Cell.* **97**: 791-803.

Wang, P., Malkovsky, M. 2000. Different roles of the CD2 and LFA-1 T-cell co-receptors for regulating cytotoxic, proliferative, and cytokine responses of human V γ 9/V δ 2 T cells. *Mol Med.* **6**: 196-207.

Waterfall, M., Black, A. And Riley, E. 1998. $\gamma\delta^+$ T cells preferentially respond to live rather than killed malaria parasites. *Infection and Immunity.* *Infect Immun.* **66**: 2393-2398.

Wahlgren, M., Abrams, J., Fernández, V., Bejarano, M., Azuma, M., Torii, M., Aikawa, M., Howrd, R. 1995. Adhesión of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to human cells and secretion of cytokines (IL-1- β , IL-1RA, IL-6, IL-8, IL-10, TGF β , TNF α , G-CSF, GM-CSF). *Scand J Immunol.* **42**: 626-636.

Weber, J.L., Lyon, J.A, Wolff, R.H., Hall, T., Lowell, G.H., Chulay, J. 1988. Primary structure of a *Plasmodium falciparum* malaria antigen located at the merozoite surface and within the parasitophorous vacuole. *J Biol Chem.* **263**: 11421-11425.

Weenink, S. Gautam, A. 1997. Antigen presentation by MHC class II molecules. *Immunol Cell Biol.* **75**: 69-81.

Wesch, D., Marx, S., Kabelitz, D. 1997. Comparative analysis of alpha beta and gamma delta T cell activation by *Mycobacterium tuberculosis* and isopentenyl pyrophosphate. *Eur J Immunol.* **27**: 952-956.

Wolday, D., Berhe, N., Britton, S., Akuffo, H. 2000. HIV-1 alters T helper cytokines, interleukin-12 and interleukin-18 responses to the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *AIDS.* **14**: 921-929.

World Health Report 1996. World Health Organization. Geneva. p 30-75.

World Health Report 2000. World Health Organization. Geneva, p. 45-60.

Worku, S., Bjorkmann, A., Troye-Blomberg, M., Jemaneh, L., Farnert, A. 1997. Lymphocyte activation and subset redistribution in the peripheral blood in acute malaria illness: distinct $\gamma\delta^+$ T cell patterns in *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infection. *Clin Exp Immunol.* **108**: 34-41.

Zabel, M., Weis, J. 2001. Cell-specific regulation of the CD21 gene. *Int Immunopharmacol.* **1**: 483-493.

Zanni, M., Mauri-Hellweg, D., Brander, C., Wendland, T., Schnyder, B., Frei, E., von Greyerz, S., Bircher, A., Pichler, W.J. 1997. Characterization of lidocaine-specific T cells. *J Immunol.* **158**: 1139-1148.