

03062

15
2oj



**Universidad Nacional
Autónoma de México**

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**Instituto de
Investigaciones Biomédicas**

**CARACTERIZACION ANTIGENICA DE
Plasmodium vivax EN SUS ESTADIOS
INTRAERITROCITICOS**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

T E S I S

**Que para optar al grado de
MAESTRIA EN INVESTIGACION BIOMEDICA
BASICA. (INMUNOLOGIA)**

Presenta

María Reyna Sánchez Robles

México, D. F.

1992



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

I N D I C E

CONTENIDO	PAGINA
RESUMEN.	1
INTRODUCCION.	3
ANEXO # 1. DIFERENTES ASPECTOS DE LA MALARIA.	5
I) Antecedentes.	5
II) Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> .	7
III) Descripción ultraestructural y antigénica de los diferentes estadios de <i>Plasmodium</i> .	11
IV) Inmunología del Paludismo.	20
DISEÑO EXPERIMENTAL.	33
MATERIAL Y METODOS.	35
I) Obtención del antígeno.	35
II) Determinación de proteínas.	38
III) Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio.	38
IV) Inmuno-electrotransferencia.	41
V) Análisis inmunoenzimático. ELISA.	43
VI) ELISA de "punto".	44
VII) Inmunofluorescencia indirecta.	45
VIII) Inmunográficas.	46
IX) Análisis Estadístico.	50
X) Obtención de anticuerpos monoclonales.	50

CONTENIDO**PAGINA**

ANEXO # 2. DESCRIPCION DEL METODO ESTADISTICO.	55
RESULTADOS.	59
DISCUSION.	100
CONCLUSIONES.	113
PERSPECTIVAS.	115
BIBLIOGRAFIA.	117

RESUMEN

La malaria es un problema de salud a nivel mundial. En México el causante de la mayoría de los casos de paludismo (99.9%) es *Plasmodium vivax*, sin embargo, debido a las dificultades para la obtención del antígeno y cultivo del parásito, se ha limitado mucho el estudio de esta especie de *Plasmodium*.

El objetivo de este trabajo fue aportar información en el aspecto de la caracterización antigénica de *P. vivax*, para ello se realizaron ensayos inmunológicos para conocer la respuesta inmune de pacientes y animales inmunes y se produjeron anticuerpos monoclonales contra el parásito.

Por inmunolectrotransferencia (IET), se analizó la respuesta inmune de un grupo de sueros de enfermos de paludismo (de Tapachula, Chiapas) a las proteínas presentes en una mezcla de extractos del parásito. Mediante el método de inmunográficas y el análisis estadístico de estos resultados, se pudo determinar que los antígenos relevantes para el diagnóstico son los de PM 72, 31, 19, 43, 97 y 93 kDa; mientras que las proteínas que ayudan a hacer una caracterización antigénica del parásito son las anteriores más las de PM 170, 126, 87, 82, 39, 140, 131, 79, 48, 45, 34, 25, 152, 20 y 17 kDa.

Se determinó también la respuesta inmune de animales inmunizados con *P. vivax* y se observó que fué similar a la encontrada en humanos.

Se produjeron anticuerpos monoclonales contra *P. vivax*.

Por inmunofluorescencia indirecta (IFI), estos anticuerpos reconocieron antígenos del parásito o de la superficie de eritrocito infectado. Varios de ellos identificaron diversas proteínas de aproximadamente 20, 40 y 80 kDa por el método de IET y algunos reaccionaron contra extracto del parásito por el método de ELISA de "punto".

Esta información contribuye al conocimiento de la respuesta inmune que se despierta durante la infección con *P. vivax*, contra estadios intraeritrocíticos, y al conocimiento de los antígenos reconocidos con mayor o menor frecuencia por el enfermo.

Se considera que el uso de éstos anticuerpos monoclonales puede ser útil para el estudio más detallado de antígenos de *P. vivax* y para la implementación de nuevos métodos diagnósticos.

I N T R O D U C C I O N

A pesar de que el paludismo es un problema importante de salud en nuestro país, el estudio de *P.vivax* (especie de *Plasmodium* predominante en México) ha sido limitado, debido particularmente a las dificultades en la obtención del antígeno y a la ausencia de herramientas, tales como anticuerpos monoclonales y tecnología de DNA recombinante, que permitan estudiar más detalladamente al parásito, conocer la respuesta inmune de los pacientes e identificar epítopes determinantes en la inducción de la respuesta inmune protectora.

El estudio de la respuesta inmune de pacientes a antígenos de *Plasmodium vivax* ha sido poco estudiada. En nuestro país no se han hecho determinaciones de proteínas del parásito reconocidas por anticuerpos presentes en los sueros de individuos infectados, como tampoco se han determinado los perfiles proteínicos de las cepas del parásito presentes en zonas endémicas de paludismo. El conocer los antígenos relevantes en la respuesta inmune del paciente puede ayudar a identificar aquellas proteínas que induzcan un estado de protección adecuado y que sean por consiguiente blancos para el desarrollo de vacunas.

Hasta ahora el método clásico de diagnóstico de paludismo ha sido el método de gota gruesa (91), que aunque tiene alta sensibilidad (detecta hasta 10 parásitos por microlitro de sangre) y especificidad, no deja de ser sumamente tedioso y subjetivo. Por lo tanto, sigue siendo un gran reto desplazar este

método desarrollando metodologías que ayuden a avanzar en el campo del diagnóstico.

En este trabajo nos propusimos estudiar la composición antigénica de *Plasmodium vivax*, analizando la respuesta inmune detectable en sueros de pacientes y produciendo anticuerpos monoclonales útiles en la caracterización de estos antígenos y en el desarrollo de pruebas diagnósticas.

ANEXO # 1. DIFERENTES ASPECTOS DE LA MALARIA.

I) ANTECEDENTES.

La malaria o paludismo, es una enfermedad parasitaria ocasionada por protozoarios del género *Plasmodium*, miembro del subphylum Apicomplexa. Existen más de 100 especies de *Plasmodium* capaces de infectar roedores, aves y primates (129). Cuatro especies de *Plasmodium* infectan al hombre: *falciparum*, *vivax*, *malariae* y *ovale*; las dos primeras son las de mayor importancia debido a su prevalencia, y a que uno de ellos, *P.falciparum* es el responsable del mayor número de muertes por paludismo (115). Los vectores de la malaria humana son mosquitos del género *Anopheles*.

Esta enfermedad fue inicialmente descrita por Hipócrates, en 1880 Laverán describió a su agente causal (90) y más tarde Ross definió el ciclo de vida del parásito (150).

Se acusa al paludismo como causa de la caída de muchas civilizaciones y la razón del fracaso de numerosas campañas militares (95). En la antigüedad se creía que su fuente eran los vapores provenientes de los pantanos, y que se transmitía por la picadura de mosquitos; de allí su nombre de malaria o paludismo, que provienen del latín "mal aria" = malos aires o "palus" = pantano (109).

SITUACION MUNDIAL DE LA MALARIA.

En las últimas décadas la malaria resurgió a pesar de las

medidas de control adoptadas, realizando rociados de insecticidas y proporcionando quimioterapia y quimioprofilaxis con quinina y sus derivados. Las campañas intensivas de control, después de un éxito inicial, trajeron consigo el surgimiento de vectores resistentes a los insecticidas y de parásitos insensibles a la droga (176, 183).

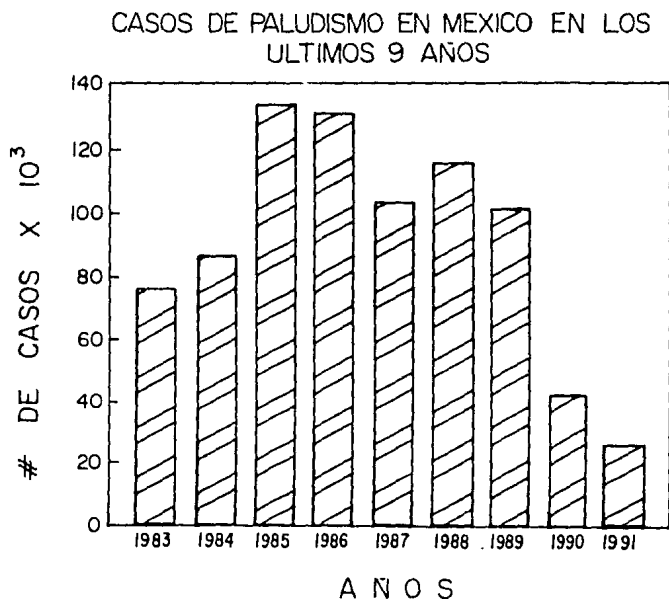
En las naciones subdesarrolladas localizadas en áreas tropicales y subtropicales, el paludismo alcanza proporciones epidémicas y de hecho es la enfermedad parasitaria tropical más importante que afecta al ser humano en la actualidad (157). En los países del primer mundo, la malaria no es un problema de salud prioritario, sin embargo, debido a sus repercusiones económicas, constituye un tópico importante de investigación.

Se estima que el 40% de la población mundial vive en áreas con riesgo de infección (6) y que anualmente se registran alrededor de 500 millones de casos en el mundo (157), de los cuales tan sólo en Africa son fatales 2 millones de ellos (21).

EL PALUDISMO EN MEXICO.

En México, el paludismo representa un problema serio de salud, debido a su extensa distribución y número de casos, que en 1985 Y 1986 llegaron a ser más de 130,000. En los últimos tres años, los estados de la República Mexicana que se han visto más afectados son, en orden descendente: Oaxaca, Chiapas, Sinaloa, Guerrero, Michoacán, Campeche, Quintana Roo, Nayarit, Tabasco y Veracruz. En 1990 y 1991, se contabilizaron menos casos, es decir, 42,388 y 25,594 respectivamente (34, 35). La siguiente

gráfica ilustra la evolución que ha tenido en México la incidencia de la enfermedad en los últimos 9 años (35).

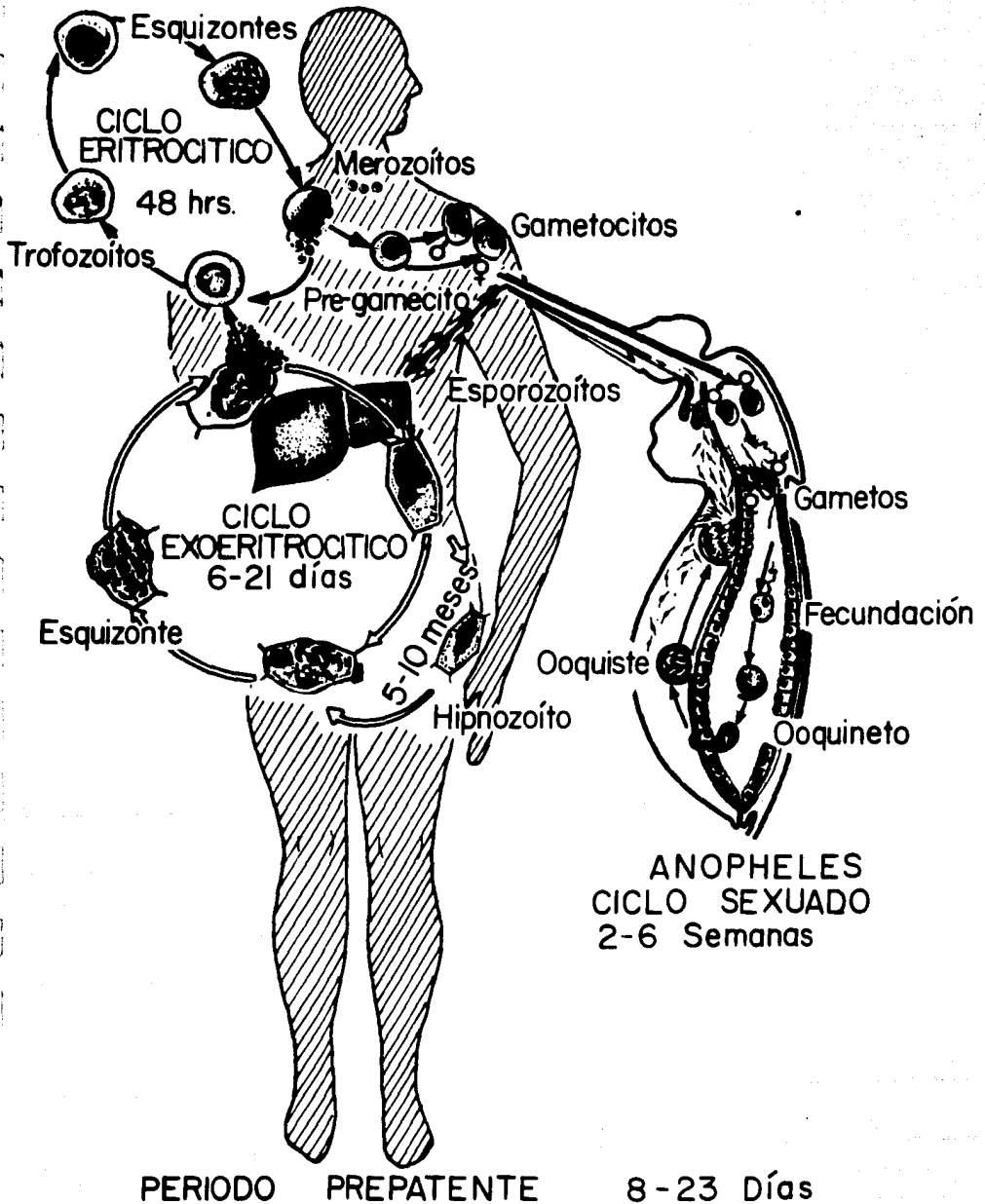


La mayoría de casos de malaria en México (99.9%) son ocasionados por *P. vivax* (33): de un total de 42,388 casos de malaria en México en 1990 sólo 62 de ellos fueron ocasionados por *P. falciparum*. De ahí que se haya elegido esta especie en el presente estudio.

II) CICLO DE VIDA DE Plasmodium. (Fig. 1)

Plasmodium presenta un ciclo de vida complejo, ya que lleva a cabo 3 ciclos en el vertebrado y dos en el insecto. La infección en el humano se inicia con el piquete de la hembra *Anopheles*, la

Figura 1. Ciclo de vida de *Plasmodium vivax*.



cual inyecta la forma infectante llamada esporozoíto. En menos de una hora, el esporozoíto se introduce a las células hepáticas. Dentro de los hepatocitos se lleva a cabo una multiplicación asexual esquizogónica que requiere de un período de 6 a 21 días; en el caso de *P.vivax* se estiman 8 días para completar este ciclo (153).

Cada esquizonte hepático produce un número variable de merozoítos, que van desde 2,000 en el caso de *P.malariae* (42), 10,000 en *P.vivax* (19) y hasta 30,000 en *P.falciparum* (42). Los merozoítos liberados de la esquizogonia exoeritrocítica infectan a los glóbulos rojos, iniciando el ciclo eritrocítico.

Dentro del eritrocito, el parásito se multiplica asexualmente, madurando de trofozoíto joven o forma de anillo a trofozoíto maduro, para luego dividirse por esquizogonia y formar de 10 a 20 merozoítos. Cuando el eritrocito parasitado se rompe, los merozoítos son liberados e infectan nuevos hematíes (109).

Algunas formas asexuales de anillo no siguen esta multiplicación asexual, sino que se diferencian en formas sexuadas o de gametocitos intraeritrocíticos masculinos o femeninos, los cuales son ingeridos por el mosquito en el momento en que succiona sangre. Estas formas del parásito se activan en el aparato digestivo del vector, donde se lleva a cabo la fecundación y el cigoto fertilizado se transforma en un ooquinetto móvil que penetra la pared del intestino medio, donde forma un ooquiste, el cual sigue un proceso llamado esporogonia, que da lugar a la formación de 10,000 a 20,000 esporozoítos (129). Los esporozoítos emigran a las glándulas salivales del vector y se introducen con la saliva

en el torrente sanguíneo del humano cuando el insecto se alimenta de su sangre.

Cuando los glóbulos rojos infectados se rompen, también liberan a la circulación productos tóxicos de deshecho del metabolismo de los parásitos. Estos productos ocasionan la fiebre y escalofríos, síntomas característicos de esta enfermedad. Estos ciclos se llevan a cabo cada 48 horas para *P.falciparum*, *P.vivax* y *P.ovale*, y cada 72 horas para el caso de *P.malarie*.

MALARIAS CON RECIDIVAS.

La malaria ocasionada por *P.falciparum* y *P.malarie* no tiene recidivas (24), mientras que lo contrario se observa con *P.vivax* y *P.ovale* (155). Para explicar este fenómeno, se ha propuesto la existencia del hipnozoíto (83), y se sugiere que las recurrencias de parasitemia son producidas por el desarrollo espontáneo de esquizontes, a partir de formas uninucleadas. Estas provienen de esporozoítos latentes en el hígado. El período de latencia varía con la subpoblación y se asegura que es una propiedad intrínseca del parásito que está bajo control genético (82, 83).

CULTIVO DE Plasmodium.

Se ha logrado el cultivo de *P. falciparum* en sus estadios intraeritrocíticos e intrahepáticos (98, 167), mientras que para *P. vivax* tan sólo se ha podido completar el ciclo hepático (97), lo que ha limitado mucho su estudio.

III) DESCRIPCION ULTRAESTRUCTURAL Y ANTIGENICA DE LOS DIFERENTES ESTADIOS DE Plasmodium.

Cada estadio del desarrollo de *Plasmodium* presenta una forma y un conjunto de funciones características; habita en un microambiente determinado e interactúa con un tejido específico, es decir, que aún cuando todos los estadios poseen el mismo genoma, o complemento de genes, en cada uno de ellos se expresan genes diferentes.

A) CICLO HEPATICO.

EL ESPOROZOITO.

El esporozoito es un organismo unicelular elongado que mide 11 μm de longitud. Está limitado por una cubierta delgada que rodea a una unidad de membrana y una hilera de microtúbulos subyacente (129). La proteína más estudiada del esporozoito, se conoce como proteína circumsporozoítica (CS) y es componente de la cubierta superficial del esporozoito. Esta proteína ha sido identificada en varias especies de *Plasmodium* y ha sido caracterizada con gran detalle gracias a la clonación de su gene, y a que se ha considerado como candidata para vacuna (11, 16, 60). El gene que codifica para la CS de *P.vivax* ha sido el primero de esta especie en ser clonado y caracterizado (10, 101). Esta proteína presenta regiones de secuencias repetitivas, epítopes inmunodominantes para células B, así como regiones no repetitivas que presentan epítopes tanto para linfocitos B como T (146). La CS comparte propiedades estructurales similares entre las diferentes especies de malaria, su tamaño varía entre 40 y 60

kDa (129). Se ha observado heterogeneidad fenotípica en la porción repetitiva de la proteína CS de *P. vivax*(149).

FORMA INTRAHEPÁTICA

Cuando ocurre la invasión del hepatocito, el esporozoito se une a la célula hepática y la plasmalema se invagina en el punto de unión, creando una vacuola parasitófora en la que reside el parásito. En *P. vivax* hay antígenos de estadios asexuales que se comparten con estadios hepáticos (4), así como antígenos específicos de éstos últimos (36). Recientemente se aisló el gene de un antígeno de estadio hepático de *P. falciparum* (51), y se produjo un anticuerpo monoclonal específico contra un antígeno de estadio hepático de *P. berghei* (malaria murina), que parece estar localizado en la membrana de la vacuola parasitófora (159).

B) CICLO ERITROCÍTICO.

FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA INVASION DEL ERITROCITO.

Hay factores genéticos que afectan la susceptibilidad de los eritrocitos a ser infectados, tal es el caso de algunas hemoglobinopatías, talasemias o deficiencias enzimáticas, así como grupos sanguíneos que influyen en la infección por *Plasmodium* (157). También se ha observado que para *P. falciparum* y *P. malarie*, las glicoforinas α y β parecen jugar un papel importante como receptores del merozoíto (125, 139). En *P. vivax* esta función parece ser mediada por el antígeno sanguíneo Duffy (112-114). Así mismo *P. vivax* muestra una preferencia por los eritrocitos inmaduros (77, 116). El antígeno Duffy se encuentra presente en

una glicoproteína o eritroglicano de 35 a 66 kDa (52), que se une de manera específica a proteínas solubles de *P. vivax* y *P. knowlesi* de 135 kDa (15, 179). La clonación reciente del gene del receptor de *P. vivax* en el antígeno Duffy (38), podrá ayudar al conocimiento de la invasión del eritrocito por este parásito.

La preferencia del merozoíto por los reticulocitos, pudiera estar relacionada con la expresión de receptores importantes, con una mayor deformabilidad de la membrana o con otros factores que puedan favorecer el desarrollo intraeritrocítico del parásito (140).

DE MEROZOITO A ESQUIZONTE

El merozoíto que invade el glóbulo rojo está rodeado por una membrana con una doble bicapa lipídica, tiene forma oval, un núcleo, varios organelos citoplásmicos y mide 2 x 1.5 μm . Debajo de la membrana plasmática hay una hilera de microtúbulos, que funcionan como citoesqueleto, manteniendo la estructura celular; una prominencia apical, en la cual entran los ductos de dos organelos llamados rodopocitos y otros elementos adyacentes llamados micronemas. Los rodopocitos y micronemas también se encuentran en los esporozoítos. Al parecer, los rodopocitos producen enzimas, tal vez de naturaleza proteolítica y sustancias como mepacrina, material fosfolipídico y otras (119). El núcleo está cubierto por una cisterna que comunica la matriz nuclear con el citoplasma a través de poros nucleares. En el citoplasma hay abundantes ribosomas asociados al retículo endoplásmico o libres en forma de roseta, como polirribosomas. También se encuentran

cuerpos multilaminados con apariencia de cebolla y aunque su función se desconoce, se ha sugerido que asumen las funciones de la mitocondria o que tal vez intervengan en la síntesis de membranas. Las mitocondrias igualmente presentes, aumentan de tamaño y complejidad conforme madura el parásito. La superficie del merozoíto está cubierta por material fibrilar que forma una cubierta externa. En el momento de la penetración al eritrocito, la parte apical del merozoíto se une al hematíe, posteriormente se invagina y la membrana del eritrocito se resella. Dentro del eritrocito desaparecen los órganos apicales y microtúbulos, para transformarse en la forma anular. El anillo se transforma en trofozoíto uninucleado, que se caracteriza por la pérdida de la forma anular así como por la aparición de grandes vacuolas alimenticias. La formación del esquizonte es un proceso de división nuclear asexual que se acompaña de una importante diferenciación ultraestructural: las mitocondrias se agrandan y abotonan y los microtúbulos se distribuyen azarosamente en el citoplasma. La membrana del esquizonte empieza a invaginarse y finalmente se desprende formando varios merozoítos. Los numerosos núcleos, rodopocitos, micronemas y otros organelos, migran hacia los merozoítos en desarrollo. El citoplasma de la célula infectada es digerido por completo y la membrana de la vacuola parasitófora (MVP) se expande para envolver el esquizonte. Los merozoítos maduros quedan rodeados por sus propias membranas dobles, la MVP y la membrana del eritrocito (53, 119, 129).

En *P. falciparum* se han identificado y caracterizado varios antígenos del merozoíto. Así tenemos al antígeno precursor de los

principales antígenos de superficie del merozoito (PMMSA), conocido también como gp 185 y gp 195, cuyo peso fluctúa entre 190 y 210 kDa. Este antígeno es sintetizado durante la esquizogonia y cuando se acerca el momento de la liberación de los merozoítos, éste polipéptido es procesado en una serie de fragmentos, tres de los cuales (los de PM de 19, 42 y 80-83 kDa) son los principales antígenos de superficie del merozoito (8). Este antígeno ha mostrado ser un importante candidato a vacuna en primates y humanos (126).

El análisis de una biblioteca genómica de expresión de DNA de *P. vivax* con un anticuerpo monoclonal, llevó a la clonación del gene que codifica al antígeno de 200 kDa (32, 171), equivalente al PMMSA de *P. falciparum*. En estos genes se ha observado una homología del 45% en la secuencia de nucleótidos.

Otros antígenos de superficie de merozoito de *P. falciparum* que han sido descritos, son: un antígeno de 45 kDa glicosilado y miristilado (137), la glicoproteína de 56 kDa (156) y otros de 130 y 126-140 kDa (129).

En la vacuola parasitófora de *P. falciparum* se ha determinado la presencia de una proteína de 126 kDa (31) y dentro de los micronemas de los merozoítos, se ha localizado un antígeno de 155 kDa, denominado antígeno de superficie de eritrocito infectado con forma anular (RESA) (137), ya que después de que el merozoito invade el eritrocito, este antígeno se encuentra en la superficie del eritrocito infectado. Se cree que este antígeno se libera vía el poro apical del merozoito en el momento de la invasión. También se han identificado algunos antígenos con PM de 41, 80,

55, 225, 105, 135 y 155 kDa en los rodopocitos de los merozoítos de *P. falciparum* (8, 129).

En *P. vivax*, también se han descrito varios antígenos de estos estadios. Uno de 170 kDa de merozoítos (14), otro de 140 kDa presente en superficies de merozoítos y esquizontes (14), y un tercero de 100-110 kDa en la superficie de esquizontes (4). Además se han identificado antígenos de rodopocitos de PM 53 y 160 kDa (4, 14).

ALTERACIONES ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DEL ERITROCITO INFECTADO POR Plasmodium.

Un eritrocito maduro normal, tiene más funciones metabólicas que biosintéticas. No tiene demandas de aminoácidos, nucleótidos o lípidos exógenos (70). En el glóbulo rojo los componentes estructurales responsables de la propiedad de rigidez y elasticidad, son las proteínas del complejo formado por la malla membrana-citoesqueleto (47, 129). Las principales proteínas del citoesqueleto son los heterodímeros de espectrina, anquirina, banda 4.1, actina y banda 4.9. La espectrina está ligada a la principal proteína transmembranal, la banda 3, por anquirina y la glicoforina A por la banda 4.1. Estas proteínas forman una malla altamente ordenada e ininterrumpida que es muy difícil de romper, y aún en fantasmas de eritrocitos (células lisadas hipotónicamente carentes de hemoglobina) se mantiene la superestructura (26, 47, 162).

El hecho de que las necesidades metabólicas del eritrocito infectado sean 100 veces mayores que las del eritrocito normal,

sugiere la existencia de canales a través de la membrana del eritrocito para satisfacer dichas necesidades.

El citoplasma del glóbulo rojo es una importante fuente de proteínas, sobre todo de hemoglobina, que se utiliza como fuente de aminoácidos, nitrógeno y energía durante las etapas intraeritrocíticas del desarrollo del parásito (6).

El parásito está separado del citoplasma del eritrocito por la vacuola parasitófora que lo envuelve. El parásito tiene un organelo localizado en la membrana plasmática, llamado citostoma, que le sirve para alimentarse, internalizando el citoplasma del eritrocito en vacuolas, dentro de las cuales degrada a las proteínas (pinocitosis intracelular) (6, 129). El parásito modifica la membrana celular del huésped, haciéndola más permeable (6). De acuerdo a su maduración, sus demandas metabólicas se incrementan para la incorporación de nutrientes esenciales y eliminación de catabolitos, para lo cual un número creciente de poros se "insertan" en la membrana de la célula huésped (6). Conforme el parásito se desarrolla dentro del eritrocito, se producen una serie de moléculas, las cuales atraviesan inicialmente la membrana de la vacuola parasitófora, y después el sistema de hendiduras membranosas en el citoplasma de la célula infectada, para finalmente asociarse con la membrana del eritrocito (66, 69, 70, 72, 79, 135).

DEFORMACIONES EN LA MEMBRANA DEL ERITROCITO INFECTADO CON P. falciparum.

Las alteraciones en la membrana del eritrocito infectado con

P. falciparum consisten en la formación de protuberancias que se cree, son las responsables del secuestro de las células parasitadas en vasos sanguíneos (se facilita el desarrollo del parásito por las bajas tensiones de oxígeno), provocando así la obstrucción capilar en diversas regiones, tal como ocurre en el encéfalo, pudiendo llevar a la muerte en la llamada malaria cerebral (93).

De esta manera, aparecen antígenos del parásito localizados en la superficie del eritrocito infectado. En *P. falciparum* destacan: el antígeno de superficie de eritrocito infectado por forma madura (MESA), asociado a las protuberancias del eritrocito, cuyo PM varía de 280-400 kDa (8); la proteína de membrana de eritrocito infectado 1 (*Pf* EMP 1), de PM 230-300 kDa, que se expresa en la superficie de eritrocitos infectados que contienen parásitos maduros y tiene un papel importante en la citoadherencia adquirida por los hematíes infectados (70). Aún cuando se desconoce la función de la proteína de membrana de eritrocito infectado 2 (*Pf* EMP 2), de PM 300 kDa, ésta está localizada en las protuberancias del eritrocito infectado, en esferas electrodensas y en unidades de membrana del eritrocito infectado (66); la proteína 11.1 (*Pf* 11.1) que está asociada con la superficie de hematíes infectados, su gene ha sido secuenciado y codifica para una proteína polimórfica mayor de 250 kDa (66); las proteínas ricas en histidina: HRP 1, HRP 2 y HRP 3, que son producidas por el parásito y migran a la superficie del eritrocito (70); y el receptor de transferrina, molécula de 93-102 kDa, presente en la superficie de eritrocitos infectados con

trofozoítos maduros (66, 145).

ALTERACIONES EN LA MEMBRANA DEL ERITROCITO INFECTADO CON P. vivax.

Por su parte *P. vivax* presenta estructuras caveolares que parecen estar conectadas con vesículas. Estos complejos se encuentran presentes a través de la membrana del glóbulo rojo (2, 96, 171) y corresponden a los gránulos de "Schüfner" que se observan en los frotis de sangre infectada por *P. vivax* teñidos con Romanovsky (154). Nada se sabe acerca de la función de esos complejos, aunque parecerían tener relación con el intercambio de moléculas entre el parásito y la circulación. También encontramos las hendiduras de membrana de "Maurer", las cuales consisten en unidades vesiculares unidas a la membrana con una luz de muy baja densidad electrónica. Frecuentemente, las vesículas son elongadas, aún cuando también pueden tener forma hemicíclica o redonda, aunque tal vez éstas diferentes formas dependan del plano de corte. Se han identificado las hendiduras de Maurer, con material electrodensito, contiguos a las membranas de la vacuola parasitófora y del eritrocito. Se han obtenido anticuerpos monoclonales contra dichas estructuras, que reconocen antígenos de 28 kDa en las hendiduras y de 28, 70 y 95 kDa en las vesículas, indicando el tráfico de antígenos del parásito a la superficie del eritrocito (4, 14, 59, 96, 171).

FORMAS SEXUALES.

Las formas sexuales (gametocitos) en desarrollo de *P. vivax*, poseen citoplasma compacto, denso y habitualmente contienen

considerable cantidad de pigmento. Debido a la posibilidad de producción *in vitro* de gametocitos de *P. gallinaceum*, ha sido posible identificar varias proteínas de gametocitos de esta especie (PM 48,19 y 17 kDa). En gametocitos masculinos se identificó un antígeno de 28 kDa, y antígenos presentes tanto en gametocitos masculinos y femeninos como en cigotos, de PM 240, 56 y 54. Dos proteínas de 26 y 28 kDa se han determinado también en la superficie del oocineto de esta especie de *Plasmodium*.

En los gametocitos de *P. falciparum*, se han determinado antígenos de 230 y 45-48 kDa, que son reconocidos por individuos de áreas hiperendémicas (122).

En *P. vivax* se han estudiado sobre todo antígenos de gametocitos femeninos, entre los que se encuentran los de PM de 10, 15, 27, 31, 53, 58, 67, 70 y un doblete de 37 y 42 kDa. Las proteínas de 17, 20 y 200 kDa presentes en gametocitos femeninos, también se encontraron en estadios sanguíneos asexuales del parásito (134). Con anticuerpos monoclonales se han detectado dos proteínas de 24 y 57 kDa, comunes a estadios sexuales y asexuales (28, 29).

IV) INMUNOLOGIA DEL PALUDISMO.

La respuesta inmune del hospedero a los parásitos del género *Plasmodium*, se ha determinado tanto por reacciones inmunes específicas como inespecíficas. En la malaria humana, reacciones celulares y humorales participan aparentemente en el desarrollo de la inmunidad contra el *Plasmodium* (109, 157, 183).

A) ACTIVACION POLICLONAL Y AUTOANTICUERPOS.

La infección malárica aguda o crónica se caracteriza por la presencia de hipergammaglobulinemia policlonal (49). Sin embargo, sólo una pequeña proporción de esos anticuerpos séricos tienen especificidad para antígenos de *Plasmodium*. La mayor parte la constituyen anticuerpos heterófilos (67), autoanticuerpos (133) o complejos inmunes circulantes (68). Se piensa que su presencia sea el resultado de una activación policlonal de los linfocitos B, por un factor mitogénico del *Plasmodium* o por la pérdida de células T supresoras (109). Esta respuesta puede estar favorecida por el macrófago a través de la secreción de cofactores que activan los linfocitos, tales como interleucina-1 y factores de crecimiento de células B.

Se han detectado anticuerpos anti-eritrocíticos en el suero de pacientes maláricos usando pruebas de hemaglutinación (184), inmunofluorescencia indirecta (IFI) (148) y ELISA (174). En algunos sistemas estos anticuerpos se han detectado 2 días después de la infección (147). Tales anticuerpos están dirigidos contra componentes normales de los glóbulos rojos (85). Se han descrito títulos elevados de anticuerpos contra ciertos polipéptidos de la membrana del eritrocito y componentes del citoesqueleto (17). Los mecanismos de activación de autoanticuerpos pueden ser: la activación policlonal de células B, la modificación de eritrocitos normales por liberación de enzimas de los parásitos, la unión de antígenos solubles del parásito a la superficie de eritrocitos, la inducción de anticuerpos por antígenos de reacción cruzada, la inmunosupresión por activación de células T supresoras; y la

adherencia de complejos inmunes a la superficie de los eritrocitos (44, 180-182).

B) INMUNOSUPRESION.

La segunda alteración inmunológica importante en malaria, es la inmunosupresión, que se presenta como una reducción generalizada de la respuesta inmune tanto humoral como celular (61). Esto pudiera reflejar un mecanismo regulador normal dirigido contra la activación policlonal inicial. En áreas endémicas de malaria por *P.vivax*, se ha observado una inmunosupresión de la respuesta proliferativa de células T, específica a los antígenos del parásito (46, 142).

C) PROTECCION ADQUIRIDA Y RESISTENCIA INNATA.

La infección humana por este protozoario se caracteriza por el desarrollo de un estado de resistencia denominado "inmunidad parcial" o "premonición", en el cual el hospedero es capaz de controlar, pero no de eliminar la infección. Esta resistencia es dependiente del grado de exposición. La malaria puede reinfectar varias veces a un individuo a lo largo de su vida, en gran parte debido a que el parásito evade el ataque del sistema inmune a través de variación y polimorfismo antigénico (39, 41, 71, 76, 80, 106, 161). En áreas hiperendémicas, los niños recién nacidos resisten los ataques de malaria y sólo ocasionalmente se enferman antes de los 3 primeros meses. Desde los 3 meses y hasta los 2 a 5 años de edad, se pueden observar anualmente infecciones con cuadros clínicos debilitantes, muchos de los cuales llegan a

ser fatales. La inmunidad protectora se adquiere gradualmente y puede perderse durante el embarazo, sobre todo en las primigestas, o después de estancias prolongadas fuera de una región endémica. En el caso de embarazo, la infección puede provocar consecuencias clínicas serias, como la muerte de la madre o del feto, o bajo peso del recién nacido (183).

D) RESPUESTA INMUNE HUMORAL.

En 1960 se reportó la protección de niños en la fase aguda de malaria con gammaglobulinas de suero de adultos inmunes (25). Al parecer estos anticuerpos estaban dirigidos contra formas asexuales. En humanos, la respuesta inmune específica a los antígenos del *Plasmodium* está usualmente asociada a la producción de anticuerpos séricos, detectados por IFI, hemaglutinación, precipitación en gel, ensayos inmunoenzimáticos (ELISA), etc. (91, 173, 186). Esta inmunidad adquirida, no sólo es específica de especie (*P.falciparum* o *P.vivax*), sino también del estadio del parásito (87, 111, 118). Recientemente se ha descrito el papel protector de los anticuerpos monoclonales que definen ambas especificidades (40, 63, 94).

Los anticuerpos, solos o con participación del complemento, pudieran también mediar la remoción de eritrocitos infectados por macrófagos en el hígado y en el bazo (9). Por lo tanto, los antígenos del parásito expuestos en la superficie del hematíe infectado, estarían involucrados en dicho proceso (104, 130). En las áreas endémicas de malaria, se ha observado que los niños mayores y adultos desarrollan anticuerpos anti-esporozoitos que

no se determinan en niños más pequeños (132). In vitro, dichos anticuerpos impiden la invasión del hepatocito. Así mismo, los anticuerpos de los pacientes o los producidos in vitro por hibridomas, pueden prevenir la entrada de merozoítos a eritrocitos (37, 151). Los anticuerpos contra la superficie del eritrocito infectado podrían impedir el desarrollo normal del parásito, uniéndose a moléculas esenciales para el transporte de moléculas, o bien facilitando el ataque del complemento o la citotoxicidad mediada por células.

E) RESPUESTA INMUNE MEDIADA POR CELULAS.

En la malaria aguda se observa una reducción considerable en el número de células T circulantes, así como la abrogación de la respuesta proliferativa in vitro a antígenos de *Plasmodium*, y la reducción in vitro de la producción de linfocinas. Los anticuerpos linfocitotóxicos pudieran estar asociados, o ser el mecanismo de reducción linfocitaria severa (18, 178). La liberación de linfocinas (tales como el interferón gamma (IFN), el factor quimiotáctico de macrófagos y las interleucinas-2 y 3) por las células T activadas por los antígenos de *Plasmodium*, puede promover la activación de células efectoras (células asesinas naturales, leucocitos polimorfonucleares, macrófagos), capaces de destruir al parásito. En niños nigerianos que experimentaron incrementos de parasitemia, se observó un aumento en la actividad de células asesinas naturales y niveles de IFN circulantes (121). Se reportó así mismo, la presencia de IFN en el suero de humanos infectados (141). En otros estudios se encontró que la

estimulación *in vitro* de células T de individuos enfermos o de áreas endémicas con antígenos del parásito, produjo IFN e interleucina-2 (168). Tanto la interleucina-1 como el IFN han mostrado un efecto inhibitorio en el desarrollo de *Plasmodium falciparum* en cultivos de hepatocitos humanos (103). Al parecer los anticuerpos detectables son producidos por células B que reciben ayuda de células T activadas por antígenos de *Plasmodium* (74). Es importante la actividad de linfocitos T citotóxicos dependiente o independiente de anticuerpos (123).

La infección malárica es un estímulo potente para la hiperplasia del sistema fagocítico mononuclear. Hay clones de células T específicas que activan macrófagos los cuales a su vez liberan factores tóxicos para el parásito, tales como radicales libres de oxígeno y productos de peroxidación lipídica generados por estas moléculas, factor de necrosis tumoral y enzimas como la poliamino oxidasa. Dichas moléculas causan la muerte del parásito intraeritrocítico produciendo las llamadas "formas de crisis", que consisten en parásitos degenerados dentro de eritrocitos aparentemente intactos (54, 120).

F) INMUNIDAD HACIA FORMAS INTRAHEPATICAS.

Los estadios intrahepáticos han sido poco estudiados, por haberse considerado inaccesibles al sistema inmune del huésped (27). Sin embargo, los hepatocitos han sido implicados como los blancos de los linfocitos T citotóxicos CD8+. De todo el ciclo de vida de *Plasmodium*, sólo el estadio intrahepático reside dentro de una célula que posee los antígenos funcionales Clase I del

complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), y que son necesarios para la actividad de los linfocitos T citotóxicos (160). Se ha observado que la inmunización con esporozoítos irradiados, provoca una activación de células T CD8+ contra hepatocitos infectados (62, 152, 177). También se ha visto que células T CD4+ han mostrado mediar protección contra retos con esporozoítos. Estas células pueden actuar de varias maneras: vía IFN, vía interleucina 6 (IL-6), por actividad citotóxica contra hepatocitos infectados a través de antígenos clase II de MHC inducidos por IFN, y/o a través de células de Kupffer (160). Tanto el IFN, la interleucina 1 (IL-1), IL-6 y el factor de necrosis tumoral (TNF), han mostrado inhibir el desarrollo de parásitos intrahepáticos. El IFN puede operar no sólo por su actividad directa en hepatocitos (99), sino también activando células fagocíticas (células de Kupffer) (102, 153, 165). La actividad de la IL-1 anti-estadio intrahepático puede estar mediada, en parte, por la proteína reactiva de crisis (CRP) y otros factores inflamatorios. La IL-1 estimula hepatocitos, vía IL-6, para que sintetisen CRP, la cual ha mostrado unirse a los esporozoítos e inhibir la fase temprana de la infección intrahepática. El FNT derivado de macrófagos y la IL-1 estimulan células de hígado no parenquimatosas para que sintetisen IL-6, la cual origina que las células de Kupffer produzcan óxidos de nitrógeno a partir de arginina. Estos óxidos de nitrógeno se cree que reducen el nivel de ATP en los hepatocitos vecinos, inhibiendo por consiguiente el desarrollo intrahepático.

G) PAPEL DEL BAZO EN LA MALARIA.

El bazo es de gran importancia para la sobrevivencia del hombre en áreas maláricas. Es característico encontrar el crecimiento del bazo en los enfermos (144). Aunque los mecanismos mediante los cuales el bazo mata a los parásitos no se entienden por completo, este órgano es la principal defensa de el hospedero contra las formas intraeritrocíticas y su remoción resulta con frecuencia en altas parasitemias que pueden ser fatales para el hospedero (50). También se observa que el bazo modula la expresión de antígenos de superficie de los eritrocitos infectados y que los parásitos de malaria tienen la capacidad de evadir éste órgano de defensa (12).

H) EL COMPLEMENTO.

En pacientes con anticuerpos fijadores de complemento, al llevarse a cabo la ruptura del esquizonte, se observa una reducción cíclica de C1 y C4. También se ha visto en áreas endémicas de *P. falciparum*, que los pacientes presentan activación de la vía clásica del complemento (48).

I) INMUNOLOGIA CLINICA.

Los hallazgos clínico-patológicos observados durante la infección aguda o crónica por *Plasmodium*, están determinados en gran parte por la respuesta inmune contra el parásito y/o las alteraciones inmunológicas observadas en estos pacientes (109). La anemia es uno de los signos más frecuentes en la malaria y está provocada por la destrucción masiva de eritrocitos durante el

ciclo parasitario, por la hemólisis mediada por reacciones inmunes, así como por una depresión moderada y transitoria de la eritropoyesis. Los mecanismos inmunológicos también afectan a los eritrocitos no parasitados (1, 185). El signo típico de la malaria es la fiebre, que se asocia como se mencionó anteriormente a la ruptura de esquizontes. Es muy probable que la ingestión de los restos del parásito por los macrófagos y células de Kupffer, pudiera desencadenar la liberación de pirógenos endógenos (IL-1) (183).

La respuesta del huésped que interfiere con la replicación o que acelera la destrucción de los parásitos, parece estar dirigida principalmente a los merozoítos, trofozoítos intraeritrocíticos en desarrollo o al eritrocito infectado (183).

J) INFLUENCIA DE LOS FACTORES GENETICOS EN MALARIA.

Existen factores genéticos que ayudan a disminuir la vulnerabilidad a la malaria (anemia falciforme, deficiencia de la enzima glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa) (73). Carter y Quakyi (23, 136), proponen que algunos factores genéticos pueden explicar en parte la falta de respuesta inmunológica en humanos a los antígenos de *P.falciparum* que han sido considerados como candidatos a vacunas. Además se ha postulado que la respuesta de anticuerpos a los antígenos maláricos es controlada por genes localizados en el locus del sistema principal de histocompatibilidad o HLA (124, 143).

V) DESARROLLO DE VACUNAS.

Con el propósito de despertar una protección inducida que pueda ser más duradera y amplia que la natural, se ha trabajado en el desarrollo de varias vacunas contra malaria. Para ello es necesario tomar en cuenta muchos antígenos blancos, en particular por la gran variedad de estadios del parásito. Una vacuna dirigida a esporozoítos o merozoítos necesitaría despertar una respuesta rápida, ya que la existencia extracelular de estas formas es muy corta. Para identificar los antígenos blanco se utilizan: anticuerpos monoclonales que permiten identificar antígenos comunes que se presentan en las numerosas cepas de las especies de *Plasmodium*; sueros de individuos inmunes, que ayudan a identificar los antígenos inmunogénicos; así como estudios para identificar los epítopes reconocidos por células T. Algunos insisten en que el blanco de la vacuna del paludismo deben ser los esporozoítos (11, 60), los merozoítos (126) y los gametocitos (22). Sin embargo resultaría de gran interés una vacuna contra los antígenos del parásito presentes en la superficie del eritrocito infectado, así como otra dirigida contra las formas intrahepáticas.

En el caso de la vacuna contra esporozoítos, se impediría que el parásito introducido por el piquete del mosquito, se estableciera en el hospedero. En tanto que si se dirigiera contra los merozoítos, se restringiría la replicación asexual del parásito intraeritrocítico. En el caso de la tercera, es decir contra gametocitos, se inducirían anticuerpos en el humano que impedirían la replicación sexual en el intestino del mosquito,

bloqueando por lo tanto la transmisión. Por último, la vacuna contra antígenos parasitarios en la superficie de hematíes infectados, induciría la opsonización o inhibiría el crecimiento del parásito dentro del eritrocito, por lo que se restringiría también la replicación asexual del parásito.

Las posibles limitaciones que puede tener una vacuna basada en CS son: la diferente inmunogenicidad de la molécula, la existencia de restricción genética de la respuesta inmune y posibles formas alternas de la molécula (41). Good y sus colaboradores (45) reportaron que un grupo de africanos inmunizados con CS dieron una respuesta inmune baja, debido a que la CS no era inmunogénica para las células T de todos ellos, probablemente debido a una restricción a nivel del MHC. Además, concluyeron que la región de CS inmunogénica es variable. A su vez Rosenberg (149), ha encontrado heterogeneidad en CS de *Plasmodium vivax*.

La eficiencia de una vacuna dirigida contra los estadios intraeritrocíticos de *Plasmodium* pudiera ser obstruida por el polimorfismo fenotípico exhibido por *P. falciparum* y *P. vivax*. En el hospedero las variaciones antigénicas durante los ciclos del parásito, pueden deberse a la presión del sistema inmune (65).

No se sabe si los antígenos de superficie de *P. vivax* tengan una variación antigénica similar a la de las otras especies de malaria (20, 56, 100). En ensayos de vacunación con *P. knowlesi*, se inducen mecanismos de adaptación (78), y el bazo influye en esta variación antigénica (13). Respecto a *P. falciparum*, éste ha mostrado mecanismos de resistencia a las drogas, así como

variación y polimorfismo antigénico (39, 41, 76, 80, 108). Aunque el polimorfismo fenotípico en *P.vivax* no se ha reflejado en la resistencia a las drogas, si ha mostrado un nivel muy alto de polimorfismo antigénico en sus formas asexuales intraeritrocíticas (106, 169), en sus antígenos de formas sexuadas y en CS (30, 107). En La India, se ha observado también, un polimorfismo cariotípico en el análisis de diferentes aislados de *P.vivax* (88).

Una vacuna que interrumpiera el desarrollo del parásito en el mosquito, no sólo disminuiría la transmisión, sino también el nivel de polimorfismo y transmisión de parásitos resistentes a la vacuna contra los diferentes estadios. La infección natural por *P.vivax* induce la síntesis de anticuerpos que bloquean la transmisión, y dicha protección es reforzada por ataques subsecuentes separados por períodos menores de 4 meses (105, 138). Cuando la concentración de estos anticuerpos disminuye, en lugar de bloquear, favorece el desarrollo del parásito (107, 128). La inmunidad natural contra las formas sexuales, que bloquea la transmisión, representa un aspecto significativo de inmunidad antimalárica, que protege poblaciones humanas contra la diseminación de la infección bajo condiciones epidémicas. En *P.vivax* se encontró que los anticuerpos monoclonales contra proteínas de 24 y 57 kDa, comunes a estadios sexuales y asexuales, pueden modular el desarrollo sexual y también bloquear la transmisión (28, 29). En *P. vivax*, ciertos anticuerpos monoclonales que bloquean la transmisión, están dirigidos a antígenos de 20 y 24 kDa y a un doblete de 37 y 42 kDa. Estos anticuerpos han permitido definir varios blancos en la superficie

de gametos femeninos, al parecer relacionados con epítopes conformacionales, que presentan alto polimorfismo (134).

DISEÑO EXPERIMENTAL

A) Para estudiar el perfil proteínico de *P. vivax* en sus estadios intraeritrocíticos y la respuesta inmune detectable en el suero de los pacientes, la estrategia fué:

1.- Obtener el extracto del parásito a partir de sangre de pacientes infectados con *P. vivax*, ya que este parásito no se puede cultivar.

2.- Realizar electroforesis del extracto parasitario en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS), para observar su perfil proteínico.

3.- Transferir el extracto del parásito por el método de inmunolectrotransferencia (IET) a papel de nitrocelulosa, y utilizar sueros de pacientes y de personas sanas, para detectar las proteínas del parásito, antigénicas para los enfermos de paludismo. También se emplearon sueros de animales (conejo y ratón) inmunizados con extractos parasitarios y sanos, para determinar las proteínas del parásito antigénicas para los animales inmunizados.

La selección de estos métodos para realizar esta primera parte del objetivo, se basó en que la técnica de PAGE-SDS permite separar las proteínas de diferente peso molecular de la muestra a estudiar y posteriormente tefirlas, por lo que es un método adecuado para estudiar el perfil proteínico del extracto del parásito. Concatenado al procedimiento anterior, el método de inmunolectrotransferencia (IET) permite la búsqueda de antígenos del parásito reconocidos por anticuerpos presentes en el suero de

pacientes y animales inmunizados, además de ser un método sencillo y reproducible.

B) La producción de anticuerpos monoclonales, fué utilizada para el estudio más detallado de los antígenos de *P. vivax* y para el desarrollo de métodos diagnósticos. Con esta técnica se pueden obtener anticuerpos de alta afinidad y especificidad. Los pasos a seguir para lograr la realización de este objetivo fueron:

- 1.- Obtención del extracto de *P. vivax* de sangre de pacientes.
- 2.- Inmunización de ratones y realización de fusiones celulares de células esplénicas de ratón inmune con células de mieloma.
- 3.- Selección de hibridomas productores de anticuerpos anti-*Plasmodium* mediante métodos de IFI y de ELISA.
- 4.- Clonación de hibridomas y caracterización de anticuerpos monoclonales por: IET, ELISA e IFI.
- 5.- Estandarización de un método inmunoenzimático (ELISA de "punto"), para utilizarlo como método diagnóstico de malaria.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

I) OBTENCION DEL ANTIGENO. a) Antígeno de P.vivax : Los parásitos se obtuvieron a partir de sangre de pacientes palúdicos del Centro de Investigación de Paludismo, en Tapachula, Chiapas, bajo la asesoría del Dr. Mario Henry Rodríguez López y la QBP Lilia González Cerón. El diagnóstico de los pacientes se hizo utilizando la técnica de gota gruesa, teñida con colorante de Giemsa (Sigma Chemical Company, St. Louis, M063178 USA) y observada con microscopio de luz(42). Los parásitos se concentraron sometiendo la sangre infectada a gradientes discontinuos de Percoll(Pharmacia LKB Biotechnology Products, Uppsala, Sweden) (8).

El método de gradientes discontinuos de Percoll, se realizó de la siguiente manera:

Se preparó Percoll isotónico adicionando 9 volúmenes de Percoll a 1 volumen de solución salina concentrada 10X (8.5% NaCl). Se hicieron diluciones subsecuentes de 50%, 45%, 40% y 30%, diluyendo la preparación isotónica de Percoll con medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco BRL Life Technologies Inc. Chagrin Falls, Ohio 44022 USA). Los gradientes discontinuos se prepararon poniendo 2 ml de cada dilución en tubos de centrifuga de 15 ml. En la parte superior de la capa de Percoll al 30%, se pusieron 2 ml del paquete celular de la sangre previamente lavado con medio de cultivo y diluido 1:3 con éste. Se procedió a centrifugar a 1,450 x g por 10 minutos. Las bandas resultantes se colectaron

con pipetas Pasteur y se lavaron 2 veces con medio de cultivo. Se midió el volúmen de éstas bandas y se prepararon frotis teñidos con Giemsa para determinar estadios predominantes del parásito . Se hizo un recuento de parásitos utilizando una cámara de Neubauer. Al material obtenido se le adicionó EDTA 0.2 mM. Este extracto se utilizó para la inmunización de ratones y conejos.

Para la preparación del antígeno usado en los ensayos de ELISA, geles de PAGE-SDS y ELISA de "punto", se le agregó además 0.2% de Triton 100x (Sigma) y los inhibidores de proteasas: TLCK (N- α -p-TOSYL-L-LYSINE CHLOROMETHYL KETONE Hydrochloride, Sigma) 5mM ; TPCK (N-TOSYL-L-PHENYLALANINE CHLOROMETHYL KETONE PM 351.9, Sigma) 5 mM ; PMSF (Phenylmethyl sulfony fluoride, Sigma) 2 mM ; Chymostatin (Sigma) 50 μ g ml⁻¹; Leupeptin (Acetyl-L-leucyl-leucil-L-arginina, PM 475.6, Sigma) 50 μ g ml⁻¹ y Aprotinin (Sigma) 100,000 U ml⁻¹ (163).

Para el ensayo de ELISA, este antígeno se sonicó 7 ciclos de 20 segundos en un baño de hielo con un sonicador (Sonifier cell disruptor 185. Branson Sonic Power Co. VWR Scientific Delivers Worldwide. San Francisco, CA 94120 USA). Posteriormente, se centrifugó a 9,000 x g durante 30 minutos, se colectó el sobrenadante y se almacenó a -70°C (172).

b) Antígeno de P. falciparum : Inicialmente se usó un cultivo de *P. falciparum* cepa 3d7 o HB3 (175), enviado por la Dra. Isabella A. Quakyi del N.I.H. (Bethesda, Maryland) a nuestro laboratorio, a través del Dr. F.J. Antuñano, de la OPS. El parásito se cultivó en medio RPMI-1640 suplementado con HEPES 25mM, 0.05% de hipoxantina, 0.001% de gentamicina, 10% de suero o plasma humano,

0.24% de bicarbonato de sodio, 2% de glucosa, piruvato de sodio 1 mM y glutamina 2 mM. Se incubaron a 37°C en un ambiente de baja tensión de oxígeno y alto CO₂, propiciado en un desecador cerrado de vidrio en el que se encendió una vela hasta que ésta se apagó espontáneamente (58,167). La sincronización del cultivo se realizó mediante la técnica de sorbitol (86). Esta consiste en centrifugar el cultivo a 550 x g durante 5 minutos, descartar el sobrenadante y resuspender la pastilla o botón celular (@ 1 ml) en 5 ml de D-sorbitol al 5% (0.274 mol/lit) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se repitió el procedimiento, y después de la centrifugación final, el paquete de eritrocitos se resuspendió en un volúmen igual de medio de cultivo suplementado. Finalmente, se adicionaron eritrocitos normales y medio de cultivo para obtener un hematocrito de 8%, y se continuó el cultivo.

La obtención del extracto de antígeno se realizó como se describió para *P. vivax*. Uno de los problemas que encontramos con el cultivo de *P. falciparum* y que nos obligó a buscar otras fuentes de suministro de antígeno, fue la dificultad para encontrar un suero apropiado para el crecimiento del parásito. Un antígeno crudo de *P. falciparum* cepa FCB-2 (Colombia) fue obtenido gracias a la colaboración con el Dr. Moisés Wasserman del Instituto Nacional de Salud del Ministerio de Salud, República de Colombia. El antígeno se obtuvo de un cultivo sincronizado en fase de esquizontes, concentrados en un gradiente isopícnico de Percoll. Los eritrocitos se lisaron con saponina y el sedimento se trató con Tritón 100x al 0.5%. Finalmente, el material se congeló y se liofilizó. En este antígeno la contaminación con eritrocitos se

encontraba disminuida pero no eliminada.

Las laminillas para IFI con *P. falciparum* se obtuvieron del cultivo realizado en nuestro laboratorio; y otras fueron enviadas por el Dr. M. Wasserman (también procedían de cultivo).

c) **Antígeno de Sangre Normal AB Rh positiva.** Debido a que el extracto de *P. vivax* obtenido de la sangre de los pacientes no se logró obtener puro, es decir tenía elementos de la sangre, fue necesario trabajar en todo el estudio con un extracto de sangre normal tipo sanguíneo AB RH positivo como control negativo. Se seleccionó este tipo sanguíneo para eliminar cualquier tipo de reactividad con antígenos de tipo sanguíneo ABO Rh. Esta sangre fue tratada como anteriormente se describe para cada tipo de ensayo.

II) **DETERMINACION DE PROTEINAS.** La determinación de proteínas tanto en los extractos antigénicos como en los diferentes anticuerpos monoclonales y sueros, se realizó por el método de Lowry y col.(92), empleando albúmina sérica bovina (Sigma) como proteína de referencia.

III) **ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE DODECIL SULFATO DE SODIO (SDS-PAGE).**

Antígeno usado para los ensayos de PAGE-SDS e IET. Se utilizaron 350 µg de proteína del extracto de *P. vivax* para cada gel preparativo, mientras que del extracto de sangre normal se utilizaron 700 µg de proteína.

El extracto de *P. vivax* que se utilizó, consistió en una mezcla de extractos de 6 pacientes con parasitemias de 7,000 a 82,000 parásitos por μ l, de edades y sexo diferentes, y en todos ellos la infección se había iniciado de 3 a 8 días antes de la toma de la muestra. La mitad de los pacientes sufrían paludismo por primera vez, los demás no se acordaron. Estas muestras se tomaron en Tapachula, Chiapas y sus alrededores del 1 al 12 de mayo de 1990.

La SDS-PAGE se realizó en una unidad de electroforesis para geles verticales en placa (Bio-Rad Laboratories, 32nd & Griff in Ave., Richmond, California. 94804 USA) en condiciones reductoras (84). El gel espaciador o separador contenía 10% de acrilamida (Bio-Rad), 0.26% de bis-acrilamida (Bio-Rad) en amortiguador Tris base-agua 0.37M pH 8.8, utilizando como catalizadores: TEMED al 0.043% volúmen/volúmen (v/v) (Bio-Rad) y persulfato de amonio al 0.03% (Bio-Rad). El gel concentrador o introductor contenía 5% de acrilamida, 0.14% de bis-acrilamida en amortiguador Tris base-agua pH 6.8, y como catalizadores 0.1% de TEMED y 0.05% de persulfato de amonio. El espesor de los geles fue de 1.5 mm. El amortiguador de muestra (2x) contenía Trisma base 125 mM, β -mercaptoetanol al 5%, glicerol al 25% v/v, SDS al 2% y pironina-y al 0.002%, a un pH de 6.8.

El corrimiento electroforético se realizó para cada placa a 20 miliAmperios (mAmp) para el gel concentrador y 40 mAmp para el separador. Como amortiguador de corrimiento se utilizó Tris base 0.025 M, glicina 192 mM, SDS al 0.1% a un pH de 8.3.

Se usaron marcadores de peso molecular (PM) bajos y altos.

Los bajos (Pharmacia Laboratory) fueron: fosforilasa b, 94 kDa; albúmina sérica bovina, 67 kDa; ovoalbúmina, 43 kDa; anhidrasa carbónica, 30 kDa; inhibidor de tripsina de soya, 20 kDa y α -lactoalbúmina, 14.4 kDa. Los marcadores de PM altos (Sigma) fueron: α 2-macroglobulina, 180 kDa; β -galactosidasa, 116 kDa; fructosa-6-fosfatoquinasa, 84 kDa; piruvatoquinasa, 58 kDa; fumarasa, 48.5 kDa; deshidrogenasa láctica, 36.5 kDa y trisafosfato isomerasa, 26.6 kDa.

Posteriormente, los geles se tñeron durante 1 hora en una solución de azul de Coomasie R-250 (Bio-Rad) al 0.1% en isopropanol-ácido acético-agua 25:10:65. Los geles se destñeron empleando una solución igual que la anterior pero sin azul de Coomasie, hasta que se visualizaron las bandas. Finalmente se pasaron a una solución de ácido acético al 10% para eliminar la tinción de fondo.

Tinciones de plata se realizaron sumergiendo los geles en una solución al 50% de metanol durante 1 hora. Luego se trató cada gel durante 15 minutos con una solución teñidora (cada 100 ml contenían 4 ml de una solución al 20% de nitrato de plata, 1.4 ml de hidróxido de amonio concentrado y 21 ml de hidróxido de sodio al 0.36% y agua desionizada). El gel se lavó varias veces con agua desionizada; se agregó la solución reveladora (cada 500 ml contenían 2 ml de ácido cítrico al 1%, 0.25 ml de formaldehído al 37% y agua desionizada), el revelado se detuvo con una solución al 50% de metanol (110).

Los PM de las bandas que se separaron en la electroforesis, se obtuvieron graficando las movilidades relativas (Rfs), donde el

Rf es igual a la distancia recorrida del inicio del gel al centro de la banda de la proteína (dP) entre la distancia total recorrida por el colorante en el gel; contra los logaritmos de los PM conocidos, y extrapolando así los PM desconocidos a partir de sus Rfs.

IV) INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (IET) (166). La electrotransferencia de proteínas de los geles de PAGE-SDS al papel de nitrocelulosa (Bio-Rad), se llevó a cabo durante 1 hora a 24 volts en un equipo para electrotransferencia (Idea Scientific Company, Box 2078, Corvallis, OR 97339) y con una fuente de poder (Schauer MULTI CELL 10 battery charger, Schauer Manufacturing Corp., Cincinnati, Ohio 45242), empleando una solución amortiguadora de glicina 192 mM y metanol al 5% en Tris base 25 mM, con un pH de 8.3. Este mismo amortiguador se utilizó para equilibrar el gel (por inmersión) durante una hora, antes de la transferencia. Al finalizar la transferencia, para comprobar su realización, una parte del papel de nitrocelulosa se tiñó con tinta India al 0.1% en PBS-Tween 0.3% (Tween 20, Sigma), durante 1 hora y después se lavó exhaustivamente con agua (55). Para bloquear sitios inespecíficos, el resto del papel de nitrocelulosa se incubó durante 18 horas a 4°C en agitación con una solución de PBS-Tween 0.3%-leche 5% (leche descremada Sveltes, Nestlé, México, D.F.). Los siguientes pasos se hicieron en agitación constante, lavando 3 veces durante 10 minutos, con PBS-Tween 0.3%. Posteriormente, el papel de nitrocelulosa se secó y conservó hasta su uso a -20°C (en condiciones de ausencia de humedad), o bien, se

procedió a la incubación con el primer anticuerpo (sueros, sobrenadante de cultivo de hibridoma, anticuerpo monoclonal purificado, etc) por 2 horas a 37°C o 18 horas a 4°C. Luego se lavó con PBS-Tween 0.3% y se incubó con el segundo anticuerpo [anti-inmunoglobulinas de ratón, conejo o humano] (Zymed Laboratories, Inc., 52 So. Linden Ave., Suite 3 So. San Francisco, CA 94080) acoplado a peroxidasa diluido 1:1000 en esta misma solución, en las mismas condiciones que el primer anticuerpo. Posteriormente se lavó como en el paso anterior, pero aumentando un lavado con PBS, y se agregó la solución de sustrato (4-cloro, 2-naftol 2 mM, H₂O₂ al 0.08%, en PBS-metanol) para revelar de 30 a 60 minutos. Finalmente se lavó con agua, se secó al aire y se guardó en oscuridad.

Las diluciones de los sueros normales e inmunes de conejo, ratón y humano como primer anticuerpo fueron de 1:100 y se realizaron en PBS-Tween 0.3%.

En los ensayos en que se utilizaron sueros humanos adsorbidos, como primer anticuerpo, la adsorción se realizó utilizando 2 volúmenes de paquete celular de sangre normal de tipo sanguíneo AB Rh positivo con 1 volumen de suero a 37°C por 30 minutos. Esta operación se repitió dos veces, se centrifugó 7 minutos a 700 x g y se separó el suero.

SUEROS.

Sueros normal e inmune de conejo.-Un conejo de 2 meses fué inmunizado administrándole 23 millones de parásitos en una

suspensión con adyuvante completo de Freund (Gibco) (ACF) por vía intraperitoneal (IP), intramuscular, intradérmica y en cojinete plantar. A los 8 días se le inyectaron 7 millones de parásitos por las mismas vías, pero usando adyuvante incompleto de Freund (Gibco) (AIF). Una semana después se realizó la tercera inmunización con 19 millones de parásitos de manera similar a la anterior y se sangró a blanco 1 semana después.

Sueros normal e inmune de ratón.- Ratones hembra BALB/c de 4 semanas, se inmunizaron por vía IP con 7 millones de parásitos incorporados en ACF. A los 28 días se realizó la segunda inmunización por la misma vía y con el mismo número de parásitos, en AIF. Dos semanas después se realizó la tercera y última inmunización por vías IP e IV en la que se administraron 7 millones de parásitos. Se sangró a blanco una semana después.

Sueros normales y de individuos infectados con *P. vivax*.- Se utilizaron 10 sueros de personas sanas y 20 de personas infectadas con *P. vivax*. La selección de los sueros fue al azar, sin importar edad y sexo. Todos los pacientes presentaban parasitemias superiores a 1,000 parásitos por μ l de sangre. Estos sueros fueron colectados de julio de 1988 a julio de 1991.

V) ANALISIS INMUNOENZIMATICO. ELISA.- Para evaluar la presencia de anticuerpos anti-*Plasmodium* en los sobrenadantes de hibridomas, se empleó el método de Voller (172), el antígeno (*P. vivax*, *P. falciparum* o de sangre normal) se diluyó en amortiguador de fosfatos 0.15 M (PBS) pH 7.2, a una concentración final de 5 μ g/ml. Se utilizaron antígenos tratados de diferente

manera, es decir con o sin detergente y sonicados o sin sonicar.

Cada uno de los pozos de las placas para ELISA (Dynatech Laboratories Inc. 14340 Sullyfield Circle, Chantilly, Virginia 22021) se cubrieron con 100 μ l de esta solución, dejándose a temperatura ambiente durante 21 horas. Posteriormente se decantaron y se bloquearon con una solución de leche al 5% en PBS, de 30 a 60 minutos a temperatura ambiente. Después se lavaron 3 veces con una solución de PBS-Tween 0.05%. A continuación se colocaron las muestras problema y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Se lavaron las placas como se describió anteriormente y fueron incubadas a temperatura ambiente con el anticuerpo anti-Ig de ratón acoplado a peroxidasa durante 2 horas. Se lavaron una vez más y se adicionó el sustrato (solución de 0.04% de orto-fenilendiamina y 0.04% de H₂O₂ al 30% en amortiguador de citratos pH 5.0). La reacción se detuvo a los 10 minutos con una solución de ácido sulfúrico 2.5 M y se leyó la densidad óptica (D.O.) a 490 nm en un lector de ELISA (Dynatech).

El punto de corte establecido para considerar positivos los sobrenadantes de hibridomas probados por el ensayo de ELISA fue para lecturas mayores a 0.1 de D.O.

VI) ELISA DE "PUNTO" (57) .- Este método es similar a la anterior, pero en lugar de utilizar placas de plástico como soporte del antígeno, se usa papel de nitrocelulosa. El papel de nitrocelulosa, se sujeta en un instrumento llamado aparato Bio-Dot (Bio-Rad), que tiene orificios para 96 pocitos. El antígeno se calentó previamente durante 3 minutos a 100°C, se diluyó en PBS y

se agregaron 5 μ g de antígeno en cada pocito, en un volúmen de 50 μ l.

En los experimentos en los que se utilizó sangre se utilizaron diferentes variables, es decir: con o sin detergente (NP40 o tritón 100X al 0.2%), sonicada o sin sonicar, centrifugada o dejándola sedimentar; y diluida en PBS o agua a diluciones desde 1:10 hasta 1:10,000.

En los ensayos en que se utilizaron sueros como antígeno, se usaron directos o diluidos 1:2 en PBS, centrifugados o sedimentados.

Después de permitir que el antígeno se filtrara por el papel de nitrocelulosa, se sacó dicho papel del aparato, se lavó con PBS y se bloqueó durante 2 horas, en agitación y a temperatura ambiente con PBS-Tween 0.25%-Leche 5%. Después se lavó dos veces con PBS-Tween 0.25% durante 5 minutos. Se adicionó el primer anticuerpo (anticuerpo monoclonal o control correspondiente diluido en PBS-Tween 0.25% -Leche 0.5%) y se incubó durante 2 horas a 37°C. Se lavó de la manera anteriormente descrita y se adicionó el segundo anticuerpo (anti-Ig de ratón acoplado a peroxidasa) diluido 1:1000 en PBS-Tween 0.025% - Leche 0.5%, incubando en las mismas condiciones que el primer anticuerpo. Se lavó como se mencionó anteriormente y una vez más con PBS. Finalmente, se adicionó el sustrato (4-cloro, 2-naftol 2 mM, H₂O₂ al 0.08%, en PBS-metanol), y se dejó durante 40 minutos. Se lavó con agua, se secó y guardó en la oscuridad.

Para la determinación de clases y subclases de los anticuerpos monoclonales se usaron anticuerpos acoplados a

peroxidasa dirigidos contra IgG1, 2a, 2b y 3 de ratón (Zymed), diluidos 1:1000 en PBS-Tween 0.025% -Leche 0.5%.

VII) INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA (IFI) (7): Para la prueba de IFI, se lavó el paquete celular de sangre parasitada con medio de cultivo y se diluyó adecuadamente para ver de 20-25 parásitos por campo, al observar preparaciones por la metodología de gota gruesa, a un aumento de 600x. Posteriormente, dicha sangre diluida se depositó en laminillas especiales para este ensayo (Cell-line associates, Inc), y se dejó secar a temperatura ambiente.

En cada uno de los círculos de la laminilla se colocaron 20 µl de muestra problema y respectivos controles positivos y negativos diluidos en PBS-Tween 0.05%. Se incubaron a 37°C durante 45 minutos y se lavaron 2 veces con una solución de PBS-Tween 0.05%. A continuación se colocó el segundo anticuerpo, el anticuerpo anti-Ig de ratón acoplado a isotiocianato de fluoresceína (Cappel, Cochranville PA 19330 Division of Cooper Diagnostics) diluido 1:100 en PBS-Tween 0.05% y se incubó de la manera arriba descrita. Después se lavó con PBS-Tween 0.05%, se montó con glicerol amortiguado a pH 8-9 y se observó al microscopio de fluorescencia (Nikon, Corporation Fuji Bldg., 2-3, Marunouchi 3-chome, Chiyoda-Ku, Tokyo 100, Japan) con filtro de excitación de 300-380 nm.

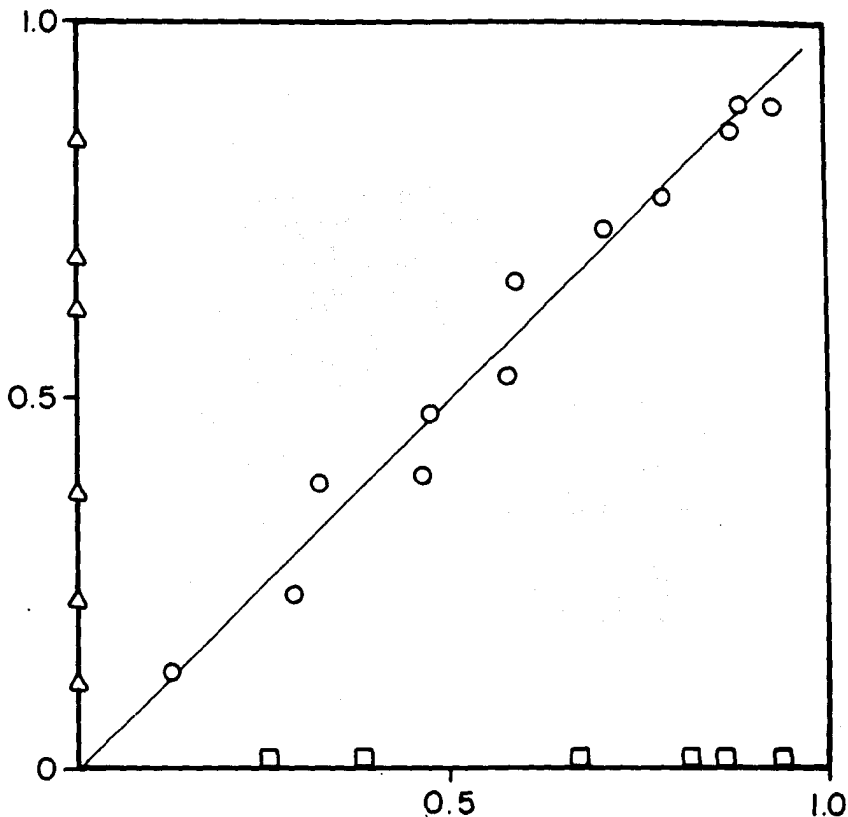
Para la determinación de clases de Ig de los anticuerpos monoclonales, se utilizaron anticuerpos fluoresceinados contra IgG e IgM de ratón (Cappel) como segundo anticuerpo.

VIII) INMUNOGRAFICAS. Para analizar los resultados obtenidos de la inmunolectrotransferencia con sueros de humanos, se utilizó el método de inmunográficas descrito por Larralde y col. (89). Se realizaron 2 tipos de gráficas; en uno, (Fig. 2) se graficó la frecuencia con la cual cada banda de antígeno individual en una inmunolectrotransferencia reaccionó con un juego de sueros obtenidos de pacientes con paludismo, contra la frecuencia de la misma banda cuando reaccionó con sueros de individuos normales. Se utilizaron como antígenos los extractos de *P.vivax* y el control de sangre normal AB Rh positivo. En el otro, (Fig. 3) se graficó la frecuencia de reacción de cada banda de antígeno de extracto de sangre infectada con sueros de pacientes, contra la frecuencia encontrada en sueros de pacientes pero con antígeno de extracto de sangre normal, después de restar la reactividad de fondo de los sueros normales. Este tipo de gráfica sitúa cada banda en regiones de la gráfica con diferente significado inmunológico.

La recolección de los valores de frecuencia para cada banda se hizo construyendo un patrón maestro de IET el cual incluyó todas las diferentes bandas en la mezcla antigénica, que aparecieron al menos una vez en los papeles de nitrocelulosa cuando reaccionaron con todos los sueros, ordenados por peso molecular, y después marcando la presencia o ausencia de cada banda en cada suero.

El valor de frecuencia de cada banda individual, es la suma de todos los sueros en esa categoría que reaccionaron con esa banda en esa categoría, dividida entre el número total de sueros en dicho grupo.

FRECUENCIA DE REACCION DE LA BANDA CON
SUEROS NORMALES F (Bi) NORMAL



FRECUENCIA DE REACCION DE LA BANDA
CON SUEROS DE PACIENTES F (Bi)
ENFERMEDAD

Figura 2. Graficación de la frecuencia de reacción de cada banda de antígeno F (Bi) en el grupo de sueros de una determinada enfermedad contra la frecuencia encontrada en sueros normales.

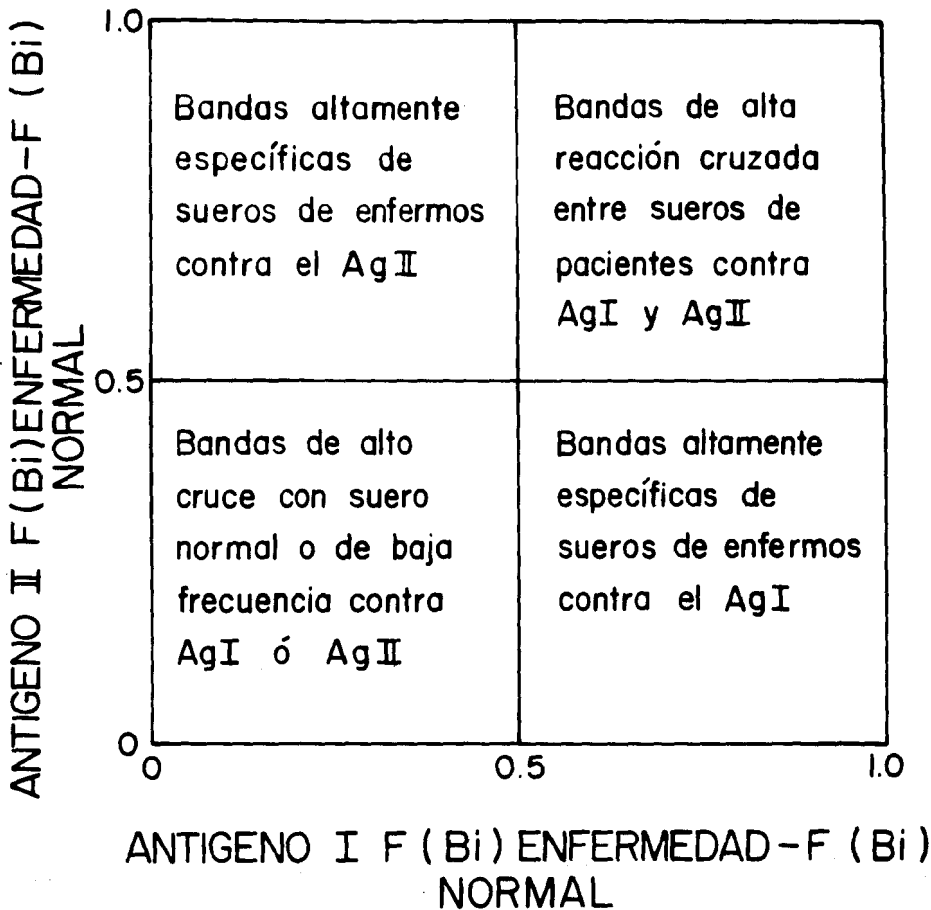


Figura 3 . Graficación de la frecuencia de reacción de cada banda de antígeno con sueros de una enfermedad determinada contra la frecuencia encontrada en sueros de la misma enfermedad pero con diferente antígeno después de restar la reactividad de fondo (sueros normales).

IX) ANALISIS ESTADISTICO.- Se utilizó un análisis exacto, en el que se emplearon la prueba exacta de Fisher y la distribución hipergeométrica no central.

Se estudió, para cada banda de proteína, si la probabilidad de reconocimiento de la proteína del extracto del parásito por el suero del paciente, era *significativamente* mayor a la probabilidad de reconocimiento de esa misma proteína por el suero normal.

En los casos en que hubiera habido un reconocimiento de esa misma banda de proteína pero en el extracto de sangre normal, se tomó en consideración este hecho para calcular la *significancia* mencionada en el párrafo anterior.

Dichas evaluaciones de la *significancia estadística* se detallan en el anexo # 2 de ésta tesis.

X) OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.

(a) Línea celular de mieloma .- Se empleó la línea de mieloma de ratón SP2/0 (deficiente en la enzima hipoxantina guanidina fosforibosil transferasa , HGPRT), que se mantuvo en cultivo en medio RPMI-1640 enriquecido con : 100 U de penicilina G / ml, 0.1 mg de estreptomycin/ml, 0.25 µg de anfotericina/ml, aminoácidos no esenciales 0.1mM (Gibco), piruvato de sodio 1mM (Gibco), L-glutamina 2mM (Gibco), 10% de suero fetal bovino Hyclone (Hyclone Laboratories , A Division of Sterile Systems, Inc. Longan Utah 1-800-Hyclone). Estas células se mantuvieron en una estufa de cultivo a 37 °C con un ambiente de 5% de CO₂ y 95% de aire.

Para eliminar a las probables mutantes HGPRT+, se cultivaron

las células en medio de cultivo con 8-Azaguanina 3.3×10^{-5} M durante una semana. Tres días antes de la fusión las células se cultivaron en medio sin 8-Azaguanina, para usarlas en su fase de crecimiento logarítmico.

(b) Inmunizaciones y fusiones.- Se utilizaron ratones hembras de la cepa BALB/c de 4 a 6 semanas de edad, los cuales se inmunizaron de acuerdo a los siguientes protocolos:

Primera Fusión: La primera inmunización se realizó inyectando 2 ratones hembras con 2 millones de parásitos por vía IP en ACF. Diez días después y 5 días antes de la fusión, se inocularon por vía intraesplénica 2 grupos, con extractos correspondientes a 1.5 y 6 millones de parásitos.

Segunda Fusión: Se inoculó un ratón con 2 millones de parásitos por vía IP en ACF y 17 días después por la misma ruta, pero sin ACF. Después de 40 y 73 días se inocularon por vía IV e IP, con 3.5 millones de parásitos. Tres días después de la última inmunización, se extrajo el bazo y se realizó la fusión.

Tercera Fusión: Dos ratones se inocularon con 10 millones de parásitos incorporados en ACF por vía IP. Después de 22 días se inocularon con 10 millones de parásitos por vía IP sin adyuvante. La tercera inmunización se realizó el día 132 inyectando 2 millones de parásitos por vía IV; el día 154 se llevó a cabo la cuarta inmunización con 10 millones de parásitos administrados por vías IP e IV. La fusión se realizó 3 días después.

Cuarta Fusión: Se utilizaron 2 esquemas de inmunización: (a) Cinco ratones se inocularon con 5 millones de parásitos, vía

cojinete plantar, y 14 días después se realizó la fusión y (b) Un ratón se inoculó al día 0 y 22, con 2 millones de parásitos por vía IP; la primera con ACF y la segunda sin adyuvante. El día 33 se inocularon con 3 millones de parásitos por vía intraesplénica. La fusión se realizó 4 días después.

En todos los protocolos anteriores las fusiones se realizaron con los linfocitos de bazo, excepto en el esquema (a) de la cuarta fusión, en la cual se obtuvieron los linfocitos a partir de ganglios linfáticos inguinales y poplíteos. En las 2 fusiones posteriores se siguió el protocolo de inmunización (b) de la cuarta fusión, el cual mostró en nuestras manos dar mejores resultados. En el protocolo de inmunización de la sexta fusión hubo un reto extra en el día 66 con 3 millones de parásitos por vía intraesplénica y 4 millones por vía IV, tres días después se realizó la fusión.

Las fusiones se realizaron de acuerdo al método descrito por Köhler y Milstein (81), usando polietilenglicol 1,300-1,600 (Sigma) al 33%, células de bazo y la línea de mieloma SP2/0, en una relación 5:1. En el caso de los nódulos linfáticos, la relación fue de 2:1. La pastilla obtenida de las células fusionadas se resuspendió en medio de cultivo completo, suplementado con hipoxantina 0.1 mM y timidina 0.016m (HT), y se colocaron en placas de cultivo (Costar, 205 Broadway, Cambridge, MA 02139) de 96 pozos en alícuotas de 100 μ l por pozo. A las 24 horas se agregaron otros 100 μ l de medio completo suplementado con HT y aminopterina 8×10^{-7} M es decir HA2T. Cada tercer día se alimentaron los cultivos, retirando la mitad del medio de cada

pozo y reemplazándolo con el mismo volúmen de medio. Al día 11 post-fusión, se suprimió la aminopterina de los suplementos y al día 17 se omitió HT.

(c) **Selección y clonación de hibridomas.**- Los sobrenadantes se analizaron por los métodos de ELISA e IFI, y posteriormente algunos de ellos por ELISA de "punto". Algunos de los hibridomas secretores de anticuerpos anti-*Plasmodium*, fueron clonados por el método de dilución limitante o por clonación en agar suave (43). El primero consiste en diluir las células de hibridoma adecuadamente, de manera que al depositarlas en la placa de cultivo de 96 pozos, quede el equivalente de media célula por pozo. El segundo método consiste en hacer suspensiones de diluciones seriadas en medio de cultivo con agar y dejarlas solidificar posteriormente. A más tardar a las 2 semanas se observaron en el agar colonias aisladas, las cuales corresponden a una clona cada una de ellas.

(d) **Expansión de hibridomas.**- Se expandió tanto *in vitro* como *in vivo*. *In vitro*, las clonas se pasaron a placas de cultivo de 24 pozos (Costar) y posteriormente a botellas de 50 ml (Costar). *In vivo*, a ratones BALB/c de 10 semanas se les inocularon 0.5 ml de pristeína (2,6,10,14-tetrametil pentadecano, Sigma) por vía IP; a los 15 días se repitió dicha administración. Después de 1 a 8 semanas se les inyectaron por vía IP, de 1 a 5 millones de células de hibridoma de un cultivo en fase de crecimiento logarítmico. Después de 1 ó 2 semanas, cuando el tumor se desarrolló, se obtuvo

por punción peritoneal el líquido de ascitis, el cual contenía altas concentraciones del anticuerpo monoclonal.

(e) Almacenamiento de células.- Tanto las células SP2/0 como las líneas de hibridomas obtenidos, se congelaron en criotubos de plástico (Nunc Inter Med, Postbox 280, Kamstrup, DK 4000 Roskilde, Denmark), en concentraciones de 3-7 millones de células por ml de solución crioprotectora (95% de suero fetal de ternera Hyclone y 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma)). Se guardaron a -70°C durante 24 horas. Posteriormente se pasaron a nitrógeno líquido (-196°C).

(f) Purificación de los Anticuerpos Monoclonales.- Se precipitaron en frío, con una solución saturada de sulfato de amonio de pH 7.2, se resuspendieron en PBS; el procedimiento se repitió dos veces y posteriormente se dializaron contra PBS-timerosal 0.01%.

(g) Anticuerpos Monoclonales de referencia.- Se usaron como controles 5 anticuerpos monoclonales anti-*P. vivax* que nos proporcionó el Dr. John W. Barnwell de la Universidad de Nueva York, a través del Dr. Alberto Pellegrini de la Organización Panamericana de la Salud. Los anticuerpos fueron:
3F8.A2 - merozoito; 102.F10 - forma de anillo y merozoito, y
2H8.D3, 4C12.B10 y 1A3.A9 - glóbulo rojo infectado.

ANEXO # 2. DESCRIPCION DEL METODO ESTADISTICO.

Análisis Estadístico.- Se utilizó un análisis en el que se pretendió identificar, para el extracto del parásito, la *significancia estadística* asociada a la aseveración de que "los pacientes reconocen la proteína de que se trate con mayor probabilidad que los sanos". Esto se hizo para cada una de las proteínas que se identificaron en el ensayo de IET.

Para lo anterior se partió del siguiente modelo, aplicado a cada una de las proteínas estudiadas:

De $n=20$ sueros de pacientes, se supone que si p_1 es la probabilidad de que un paciente reconozca la proteína, entonces el número de pacientes R que reconocerán esa proteína, sigue una distribución binomial de parámetros n y p_1 ; esto es:

$$P (R = r ; n, p_1) = \binom{n}{r} p_1^r (1 - p_1)^{n-r}$$

para r tomando los valores $0, 1, 2, \dots, n$.

Por otro lado si de los $m=10$ sueros normales, la probabilidad de que un individuo reconozca la proteína es p_0 , entonces el número de individuos S que reconocerán esa proteína, sigue una distribución también binomial, de parámetros m y p_0 .

La prueba estadística se concentró en ver si la hipótesis (de nulidad) $H_0: p_1 = p_0$ se rechazaba con la evidencia. En teoría estadística, se dice que la hipótesis alternativa, en este caso $H_1: p_1 > p_0$ resultó *significativa* si H_0 es refutada por la evidencia.

Para medir el grado de significancia, se evalúa la

probabilidad de haber observado la evidencia obtenida (o evidencia aún más contradictoria a H_0) bajo el supuesto de que H_0 es cierta.

En el caso de proteínas en las que no hubo observaciones (de reconocimiento en esa banda) ni por los pacientes ni por los individuos normales ante el extracto de sangre normal, no existió información previa sobre los posibles valores (en una situación de control) de p_1 y p_0 . En estos casos se procedió a probar:

$$H_0: p_1 = p_0 \text{ vs. } H_1: p_1 > p_0$$

Con los datos del número de reconocimientos R y S , anteriormente mencionados, por medio de la prueba exacta de Fisher que se puede ilustrar en una tabla 2x2 como la que se presenta a continuación en la que R fué igual a r y $S=s$.

	Rec.	No Rec.	Total
SI	r	n-r	n
SN	s	m-s	m

SI= Sueros inmunes

SN= Sueros normales

Rec.= Reconocimiento de la banda de proteína

No Rec.= No hubo reconocimiento de la proteína

Condicionando en el total de la primera columna $k=(r+s)$ se puede evaluar:

$$P (R = r; n, m, k) = \frac{\binom{n}{r} \binom{m}{s}}{\binom{n+m}{k}}$$

y con esta distribución (conocida como Hipergeométrica) se calcula la probabilidad de haber observado un valor r "grande" (o cualquiera más grande), bajo la hipótesis de nulidad $H_0: p_1 = p_0$.

A esta probabilidad se le conoce como el "valor-p" (p-value del Inglés) y también se le llama la *significancia*.

En aquellos casos en los que hubo pacientes y/o individuos que reconocieron la proteína bajo estudio tratándose del extracto de sangre normal, la hipótesis que se tomó como de nulidad fué la sugerida por las proporciones observadas en el caso de sangre normal; esto es, se tomaron p_1 y p_0 como las proporciones observadas..

En los datos del extracto de sangre con parásitos y bajo la hipótesis de nulidad anteriormente mencionada, si p_1 , p_0 son las probabilidades "asociadas" al caso de sangre normal, entonces para los datos del extracto de parásito, en donde al igual que antes R y S son el número de pacientes o individuos que reconocen la proteína,

R se distribuye binomial (n, p_1)

S se distribuye binomial (m, p_0)

y condicionando con k ,

$$P (R = r; n, m, k, \psi) = \frac{\binom{n}{r} \binom{m}{s}}{\sum_j \binom{n}{j} \binom{m}{k-j}} \psi^r \psi^j$$

en la cual
$$\psi = \frac{p_1 (1-p_0)}{p_0 (1-p_1)}$$

es el llamado cociente o razón de "momios" (o ventajas).

La anterior distribución se conoce como Hipergeométrica no central (del parámetro de no centralidad ψ).

O sea que en este caso se probó que

$$H_0: \frac{p_1^* (1-p_0^*)}{p_0^* (1-p_1^*)} = \psi \quad \text{vs.} \quad H_1: \frac{p_1^* (1-p_0^*)}{p_0^* (1-p_1^*)} > \psi$$

con p_1^* , p_0^* representando a las verdaderas probabilidades para el extracto de sangre con parásitos.

Vale la pena observar que $p_1 > p_0$ dá valores de ψ mayores que 1 y $p_1 < p_0$, valores de $\psi < 1$.

En Epidemiología es muy utilizado este concepto de razón o cociente de "momios" y se utiliza para ver si $p_1 > p_0$ y porqué tanto.

RESULTADOS

PERFIL PROTEICO DEL EXTRACTO DE Plasmodium vivax.- El extracto de *P. vivax* obtenido de sangre de pacientes, se corrió en PAGE-SDS y se tñó con plata. De la misma manera se corrió un control que consistió en un extracto de sangre normal tipo sanguíneo AB Rh positivo (Fig. 4: *b* y *a*, respectivamente). Estos extractos se electrotransfirieron a papel de nitrocelulosa (Fig. 4: *d* y *c*) y se tificaron con tinta India.

En el carril *a* que corresponde al extracto de sangre normal, se pueden ver aproximadamente 21 bandas, de las cuales destacan las de PM: 240, 220, 97, 80, 76, 60, 54, 45, 43, 31, 22 y 17 kDa. En el carril *c* se observan aproximadamente 30 bandas, las más intensas corresponden a las de : 240, 220, 97, 84, 82, 76, 69, 61, 54, 48, 45, 43, 41, 39, 31, 22 y 17 kDa.

En el carril *b*, que contiene el extracto de sangre con parásitos se pueden apreciar alrededor de 35 bandas, de éstas resaltan las de PM: 240, 220, 202, 112, 108, 97, 93, 82, 72, 69, 64, 58, 54, 48, 45, 43, 41, 39, 37, 34, 33, 32, 26, 23 y 20 kDa. En el carril *d* se ven alrededor de 30 bandas, las mayores de 48 kDa son más intensas. Las bandas más sobresalientes fueron las de PM: 240, 220, 202, 180, 160, 131, 116, 97, 93, 82, 72, 58, 54, 48, 43, 41, 34 y 22 kDa. Al parecer, hubo una mejor electrotransferencia de proteínas de alto peso molecular.

Los extractos de los carriles *a*, *b*, *c* y *d* corresponden a diferentes corrimientos, pero hay homogeneidad en cuanto a los antígenos usados, es decir el extracto de sangre normal que se utilizó en el carril *b* es el mismo que en el *d*; y en *a* y *c* se

corrió un concentrado de extractos de parásitos de 6 pacientes, rico en esquizontes.

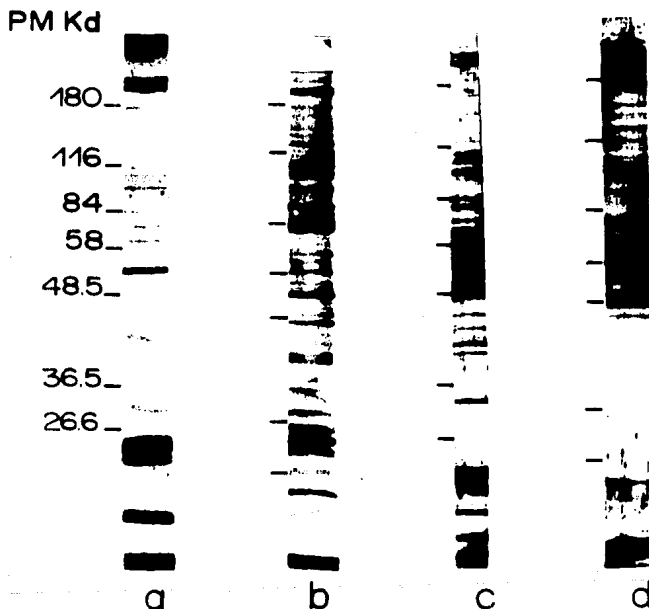
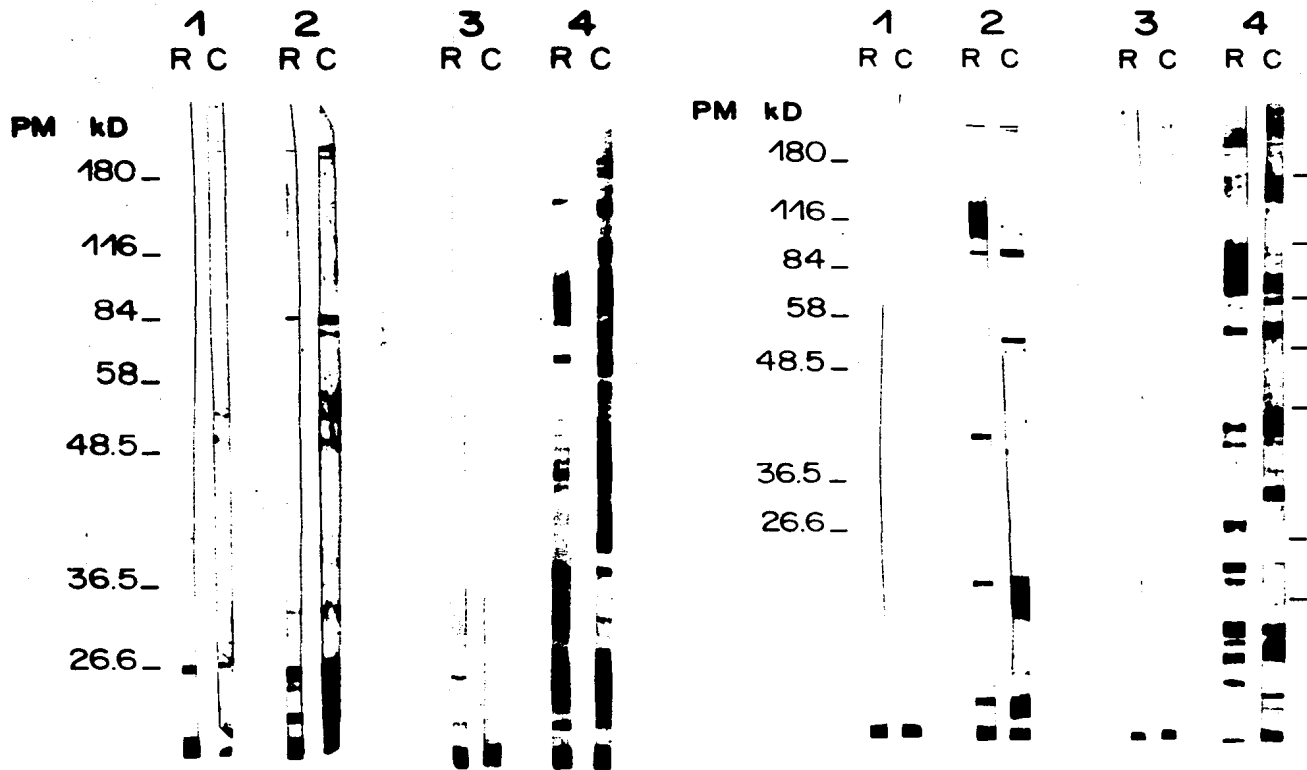


Figura 4. Extractos de sangre control (a y c) y sangre infectada con *P. vivax* (b y d) corridos en PAGE-SDS. Teñidos con nitrato de plata (a y b); electrotransferidos a papel de nitrocelulosa y teñidos con tinta India (c y d).

INMUNOGENICIDAD DEL EXTRACTO DE *P. vivax*.- Los extractos del parásito y de sangre normal electrotransferidos a papel de nitrocelulosa, se utilizaron para detectar la inmunogenicidad del concentrado de *P. vivax* en animales (ratón y conejo) previamente inmunizados, conforme al protocolo descrito en la sección anterior. En las figuras 5 y 6 se puede ver que ambas especies de animales tuvieron una respuesta inmune hacia proteínas del extracto. Para el antígeno de sangre normal (Fig. 5 y 6, números 1 y 2) observamos que hay cierta reactividad de los sueros de animales normales (1) contra las bandas de PM: 240, 220, 54, 53, 50, 22 y 20 kDa. Para este mismo antígeno los sueros de animales inmunes (2) reconocen bandas de 240, 220, 210, 112, 100, 93, 87, 75, 54, 53, 50, 43, 34 y 22-17 kDa.

Para el antígeno de extracto de *P. vivax* (Fig. 5 y 6, números 3 y 4) se presentó sólo ligera reactividad con los sueros de animales normales (3), hacia las proteínas de 75, 54, 50 y 22 kDa. Con este mismo extracto, pero utilizando sueros inmunes de ratón y conejo (4), las proteínas reconocidas, eliminando las identificadas por los controles, fueron las de PM: 170, 160, 152, 140, 131, 126, 97, 87, 82, 72, 69, 61, 58, 53, 48, 45, 41, 39, 37, 33, 29 y 26 kDa.



Figuras 5 y 6. Se incubaron sueros de ratones (R) y conejos (C) normales (1 y 3) e inmunes (2 y 4) con antígenos de: extracto de sangre normal (1 y 2) y de *P. vivax* (3 y 4), corridos en PAGE-SDS y electrotransferidos a papel de nitrocelulosa.

RESPUESTA INMUNE DE PACIENTES HACIA EL EXTRACTO DE P. vivax .- De la misma manera, los extractos del parásito y sangre normal electrotransferidos a papel de nitrocelulosa, se incubaron con sueros de personas normales y de pacientes seleccionados al azar, sin tomar en cuenta edad, sexo o etapa de infección (Fig. 7 y 8). En la figura 7 se vé la reactividad de 10 sueros normales contra el extracto de sangre normal (A). La mayoría de estos sueros reconoció proteínas de PM: 240, 220, 82, 69, 61, 58, 54, 53, 31, 22, 21, 19 y 18 kDa. Mientras que los mismos sueros pero utilizando extracto del parásito (B), reconocen sobre todo las proteínas de: 75, 61, 58, 54, 50, 48, 41, 39, 22, 18 y 17 kDa.

En la figura 8 se observa la reactividad de los sueros de 20 pacientes hacia proteínas de extracto de sangre normal (A), la mayoría de los sueros reconocieron las proteínas de PM: 240, 220, 75, 69, 61, 58, 54, 53, 41, 31, 29, 22, 21, 20, 19, 18 y 17 kDa. En esta misma figura se puede ver el reconocimiento de proteínas del extracto del parásito por sueros de pacientes (B), hubo reacción contra las bandas de PM: 240, 220, 202, 187, 170, 160, 152, 140, 131, 126, 112, 100, 97, 93, 87, 82, 79, 75, 72, 69, 61, 58, 54, 53, 48, 45, 43, 41, 39, 37, 34, 33, 32, 31, 29, 26, 25, 23, 22, 21, 20, 19, 18 y 17 kDa.

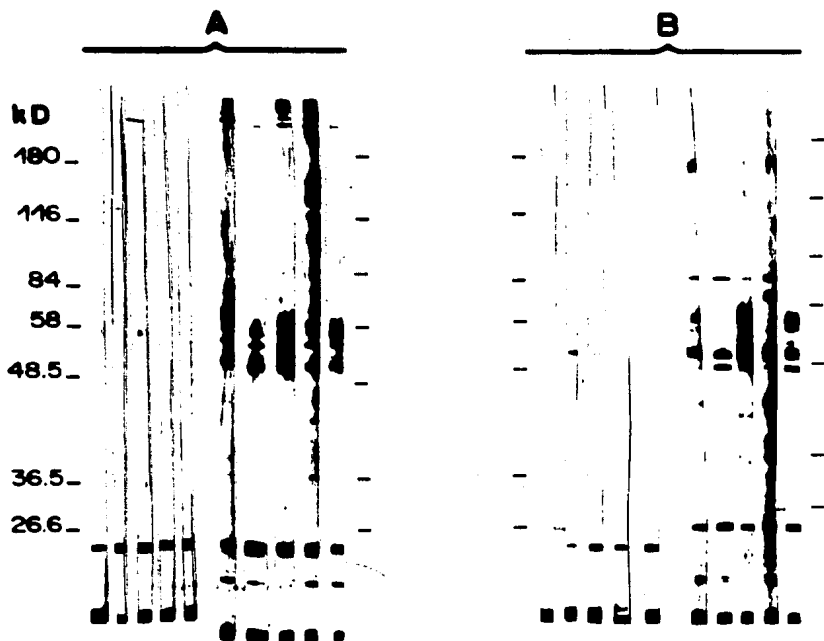


Figura 7. IET que muestra la reacción de los sueros de personas sanas contra extractos de sangre normal (A), y de sangre infectada con *P. vivax* (B).

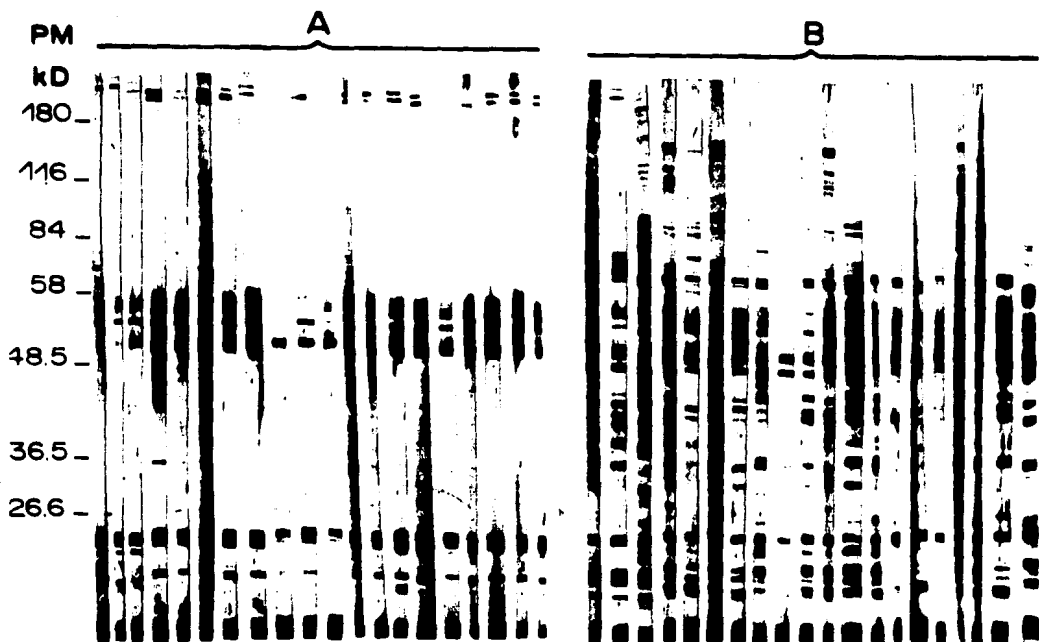


Figura 8. IET que muestra la reacción de sueros de individuos infectados contra extracto de sangre normal (A), y de sangre infectada con *P. vivax* (B).

INMUNOGRAFICAS.- Para el método de Inmunográficas, se elaboraron

dos tablas: una de ellas (Tabla I) se hizo con las frecuencias de cada banda para las diferentes categorías: extracto de sangre normal (cuarta y quinta columnas) e infectada (sexta y séptima columnas) como antígeno, incubados con sueros normales (cuarta y sexta columnas) y de pacientes (quinta y séptima columnas). La otra tabla (Tabla II), se construyó con la resta de frecuencias de reactividad de los sueros normales a sueros inmunes utilizando como antígenos extracto de sangre normal (cuarta columna) y extracto de sangre con parásitos (quinta columna).

En las figuras 9 y 10 tenemos las inmunográficas de las frecuencias de reactividad de sueros normales y de pacientes con extracto de sangre normal (Fig. 9, datos tomados de la Tabla I, cuarta y quinta columnas) y extracto de sangre infectada (Fig. 10, datos de la Tabla I, sexta y séptima columnas). En la figura 11 hicimos una eliminación de las proteínas de sangre normal reconocidas por los sueros en el extracto de sangre infectada, para dejar solamente las proteínas del parásito que reaccionaron con los sueros normales y de paciente. En la figura 12 graficamos la frecuencia de reacción de cada banda de antígeno de extracto de sangre infectada con sueros de pacientes, contra la frecuencia encontrada en sueros de la misma enfermedad pero contra antígeno de extracto de sangre normal, después de restar la reactividad de fondo (sueros normales) (Tabla II, cuarta y quinta columnas). La figura 13 se construyó de la figura 12, al eliminar las bandas de antígenos presentes en extracto de sangre normal, por lo que quedaron tan sólo las proteínas propias del parásito.

TABLA I

**RESULTADOS DE IET OBTENIDOS CON SUEROS HUMANOS NORMALES Y DE
PACIENTES CON SUS RESPECTIVAS FRECUENCIAS DE REACTIVIDAD.**

No.de Banda	cm	PM	AB-SN	AB-SI	P.v-SN	P.v-SI
1	0.75	240	0.8	0.95	0	0.15
2	0.9	220	0.6	0.95	0	0.15
3	1.1	202	0	0	0	0.15
4	1.3	187	0	0	0	0.1
5	1.6	170	0	0	0	0.5
6	1.75	160	0	0	0	0.1
7	1.9	152	0	0	0	0.3
8	2.15	140	0	0	0.1	0.55
9	2.3	131	0	0	0.1	0.5
10	2.4	126	0	0	0	0.5
11	2.75	112	0	0	0	0.05
12	3.2	100	0	0	0	0.1
13	3.35	97	0	0	0	0.8
14	3.6	93	0	0	0	0.7
15	3.9	87	0	0	0	0.5
16	4.15	82	0.3	0.05	0	0.45
17	4.35	79	0	0	0	0.35
18	4.5	75	0.1	0.25	0.8	1
19	4.7	72	0.1	0.05	0.1	0.9
20	4.9	69	0.5	0.95	0.1	0.9
21	5.5	61	0.8	0.95	0.5	0.95
22	5.65	58	0.9	1	0.4	0.95

No.de Banda	cm	PM	AB-SN	AB-SI	P.v-SN	P.v-SI
23	6	54	0.5	1	0.4	0.9
24	6.2	53	1	1	1	1
25	6.5	48	0	0.05	0.5	0.95
26	6.8	45	0	0.05	0	0.45
27	7.1	43	0	0.05	0	0.85
28	7.3	41	0.1	0.25	0.3	0.8
29	7.6	39	0	0	0.4	0.95
30	7.8	37	0	0	0	0.25
31	8.1	34	0	0	0	0.45
32	8.2	33	0	0	0.1	0.3
33	8.4	32	0	0	0	0.1
34	8.5	31	0.2	0.5	0.1	0.9
35	8.9	29	0	0.1	0.1	0.4
36	9.4	26	0	0	0	0.1
37	9.6	25	0	0	0	0.45
38	9.8	23	0	0	0	0.1
39	10.1	22	1	1	1	1
40	10.3	21	0.5	1	0	0.3
41	10.5	20	0	0.15	0	0.55
42	10.8	19	0.3	0.2	0.1	0.9
43	10.95	18	0.5	0.95	0.3	0.85
44	11.25	17	0	0.15	0.5	1

AB-SN : Frecuencia de reactividad de sueros normales con el antígeno de extracto de sangre normal.

AB-SI : Mismo que anterior, pero con sueros de pacientes. P.v-SN : Frecuencia de reactividad de sueros normales con el antígeno de extracto de sangre infectada.

P.v-SI : Mismo que anterior, pero con sueros de pacientes.

PM, Peso molecular de la banda de reacción; cm, distancia recorrida por la banda en el papel de nitrocelulosa.

TABLA II
RESTA DE FRECUENCIAS DE REACTIVIDAD POR IET DE LOS SUEROS
NORMALES A LOS SUEROS INMUNES UTILIZANDO EXTRACTOS DE SANGRE
NORMAL Y PARASITADA COMO ANTIGENOS.

No.de Banda	cm	PM	R1	R2
1	0.75	240	0.15	0.15
2	0.9	220	0.35	0.15
3	1.1	202	0	0.15
4	1.3	187	0	0.1
5	1.6	170	0	0.5
6	1.75	160	0	0.1
7	1.9	152	0	0.3
8	2.15	140	0	0.45
9	2.3	131	0	0.4
10	2.4	126	0	0.5
11	2.75	112	0	0.05
12	3.2	100	0	0.1
13	3.35	97	0	0.8
14	3.6	93	0	0.7
15	3.9	87	0	0.5
16	4.15	82	-0.25	0.45
17	4.35	79	0	0.35
18	4.5	75	0.15	0.2
19	4.7	72	-0.05	0.8
20	4.9	69	0.45	0.8
21	5.5	61	0.15	0.45

No.de Banda	cm	PM	R1	R2
22	5.65	58	0.1	0.55
23	6	54	0.5	0.5
24	6.2	53	0	0
25	6.5	48	0.05	0.45
26	6.8	45	0.05	0.45
27	7.1	43	0.05	0.85
28	7.3	41	0.15	0.5
29	7.6	39	0	0.55
30	7.8	37	0	0.25
31	8.1	34	0	0.45
32	8.2	33	0	0.2
33	8.4	32	0	0.1
34	8.5	31	0.3	0.8
35	8.9	29	0.1	0.3
36	9.4	26	0	0.1
37	9.6	25	0	0.45
38	9.8	23	0	0.1
39	10.1	22	0	0
40	10.3	21	0.5	0.3
41	10.5	20	0.15	0.55
42	10.8	19	-0.1	0.8
43	10.95	18	0.45	0.55
44	11.25	17	0.15	0.5

R1 = Resta de frecuencias de reactividad de sueros normales a sueros de pacientes usando extracto de sangre normal.

R2 = Lo mismo que R1 pero con extracto de sangre con parásitos.

EXTRACTO DE SANGRE NORMAL

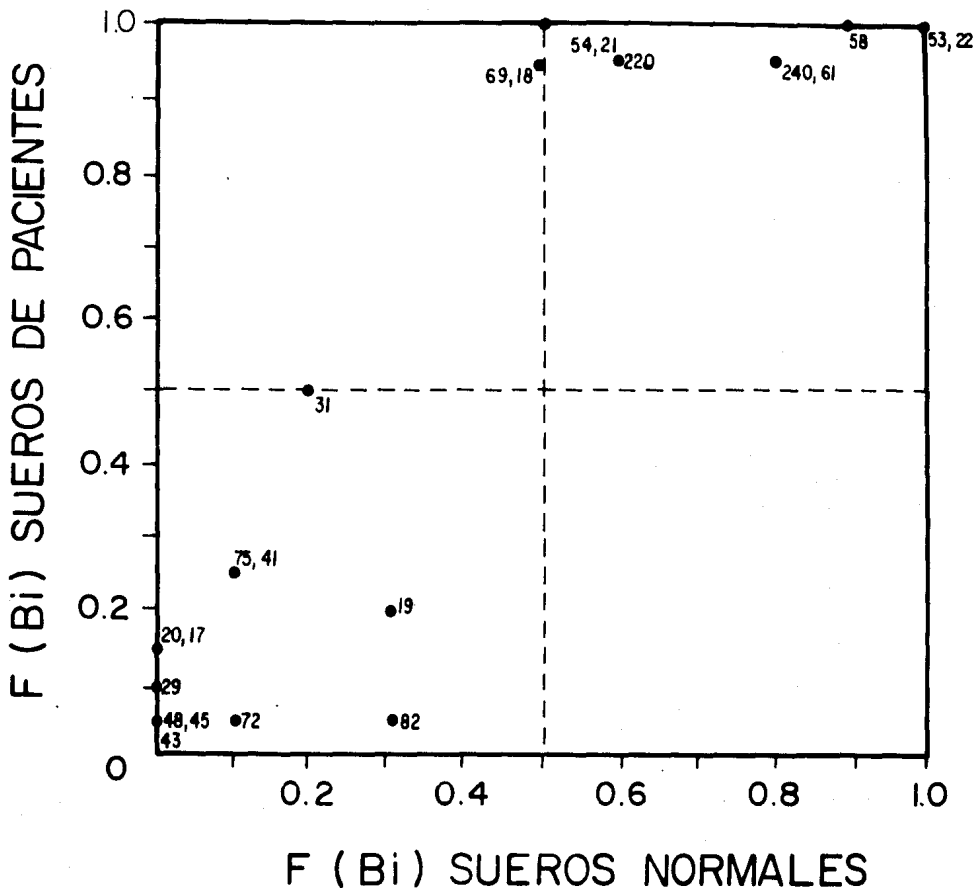


Figura 9. Inmunográfica de frecuencias simples de la reacción de sueros de personas sanas y de enfermas con extracto de sangre normal. Si se divide la gráfica en 4 cuadrantes: en la sección superior izquierda, se tienen los antígenos propios autoantigénicos en los enfermos; en la superior derecha, se ven

los antígenos propios autoantigénicos tanto en sanos como en enfermos, en la derecha inferior, se observan los antígenos propios autoantigénicos en los sanos, y en la inferior izquierda, las bandas poco inmunogénicas para ambos grupos.

EXTRACTO DE SANGRE INFECTADA

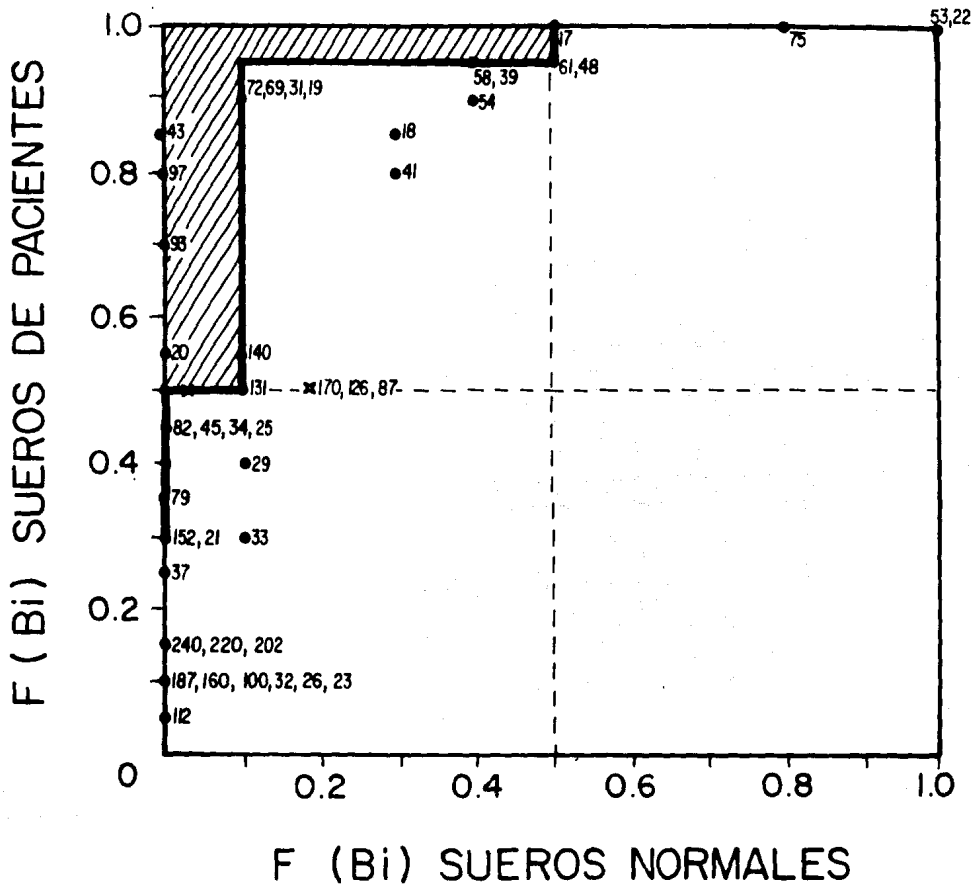


Figura 10. Inmunográfica de frecuencias simples de la reacción de sueros de personas sanas y enfermas, con extracto de sangre infectada con *P. vivax*. Si se secciona la gráfica en 4 cuadros: en el superior derecho, se observan antígenos del extracto del parásito reconocidos tanto por sanos como por enfermos; en el

superior izquierdo, se ven los antígenos inmunogénicos para los enfermos, algunos de ellos reconocidos un poco por sueros normales; y en el inferior izquierdo se encuentran bandas reconocidas preferentemente por enfermos, aunque con baja frecuencia.

En el área sombreada



se ven las proteínas

estadísticamente significativas.

EXTRACTO DE *Plasmodium vivax*.

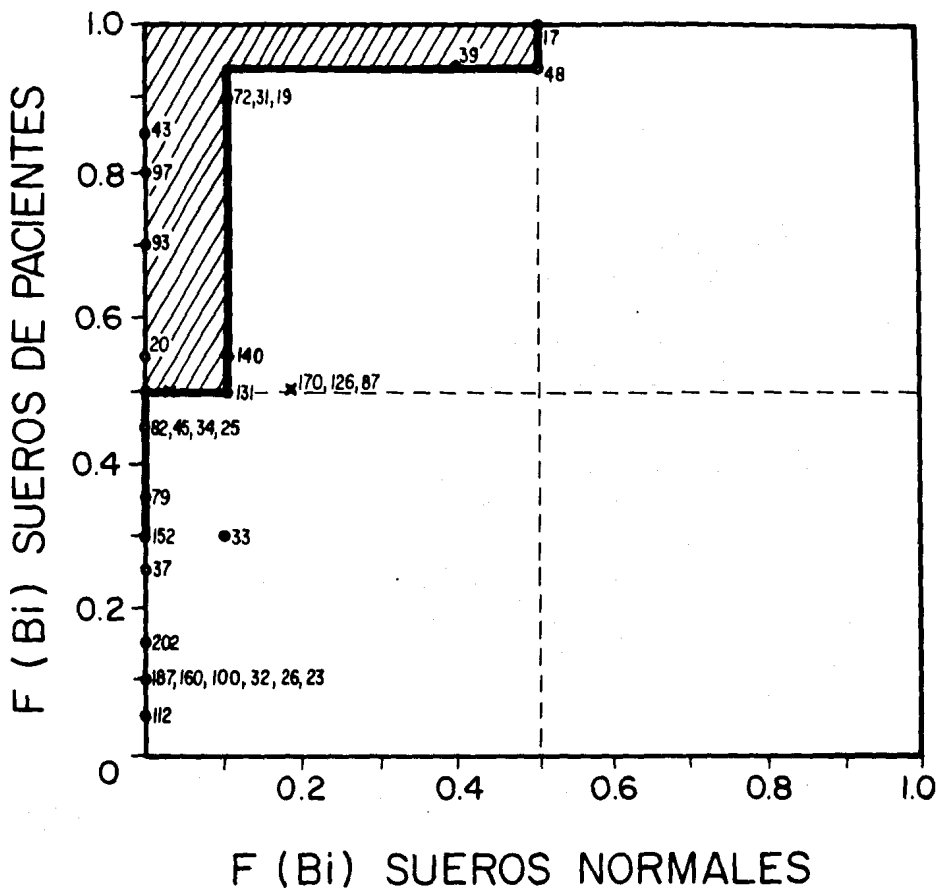


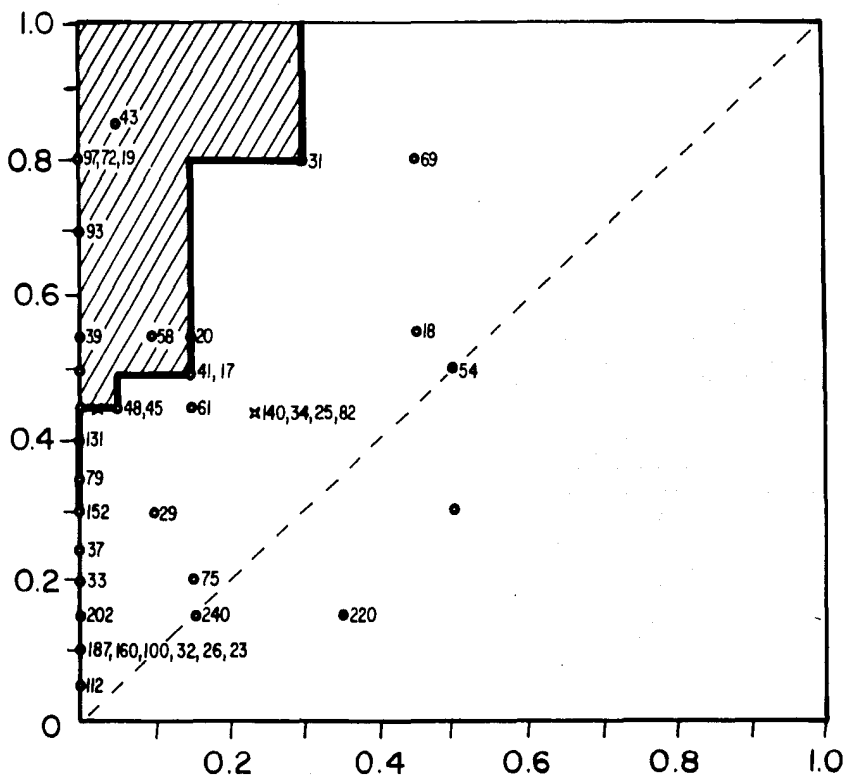
Figura 11. Inmunográfica de frecuencias de reactividad de sueros de personas sanas y de enfermas con proteínas de *P. vivax*. En esta gráfica, se eliminaron todas las proteínas de sangre normal que aparecieron en la figura 9, considerando que las demás proteínas presentes en el extracto de sangre con parásitos (Fig.

10) sean de *P. vivax*. Estas fueron reconocidas con mayor o menor frecuencia por los enfermos, y muy poco o nada por los sanos, excepto la de 39 kDa reconocida por el 40% de los sanos y el 95% de los pacientes.

Las proteínas cuya frecuencia de reactividad de sueros de pacientes con los antígenos de extracto de sangre normal y parasitada fueron marcadamente diferentes, se incluyeron en esta gráfica por considerarse distintas proteínas o bien, proteínas modificadas por la infección.

Las proteínas estadísticamente significativas se pueden apreciar en el área sombreada  .


F (Bi) PAC. - F (Bi) NORM. SANGRE INFECTADA



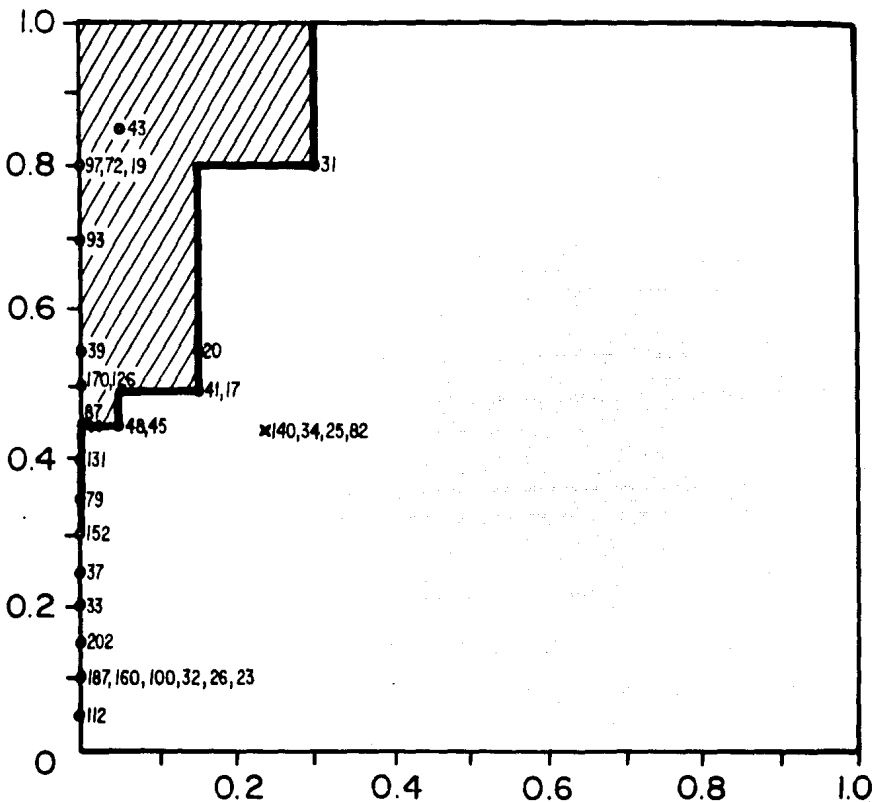
F (Bi) PAC. - F (Bi) NORM. SANGRE NORMAL

Figura 12. Graficación de la frecuencia de reacción de cada banda de antígeno de extracto de sangre normal con sueros de pacientes contra la frecuencia encontrada en sueros de pacientes pero con antígeno de extracto de sangre con parásitos, después de restar la reactividad de fondo (sueros normales). Se situó cada banda

antigénica, en regiones de la gráfica con diferente significado inmunológico, ya que se desplazaron algunos puntos dándoles más importancia a las proteínas antigénicas en la enfermedad. Si se divide la gráfica en 2 triángulos trazando una línea que salga del origen de los ejes, en el triángulo superior se observan los antígenos frecuentemente vistos en el extracto de sangre por los pacientes, más no tanto por los normales; y en el triángulo inferior se distinguen los antígenos muy vistos por los pacientes en la sangre normal, o sea autoantígenos.

En el área sombreada  se ven las proteínas estadísticamente significativas.

F (Bi) PAC. - F (Bi) NORM. SANGRE INFECTADA



F (Bi) PAC. - F (Bi) NORM. SANGRE NORMAL

Figura 13. Fué construida a partir de la 12 pero descartando las proteínas de sangre normal reconocidas por los sueros, para observar sólomente las proteínas del parásito.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

ANALISIS ESTADISTICO.

En el análisis estadístico realizado para cada banda de proteína, se obtuvieron diferentes estimaciones de ψ que originaron diversos valores-p, como se observa en la siguiente tabla (Tabla III).

TABLA III

VALORES-P PARA LA SIGNIFICANCIA DEL MAYOR RECONOCIMIENTO DE LA PROTEINA POR LOS PACIENTES Y ESTIMACIONES DE ψ OBTENIDAS PARA CADA UNA DE LAS BANDAS DE PROTEINA.

No. de Banda	PM	ψ	valor-p
1	240	4.75	0.72
2	220	12.67	0.88
3	202	1	0.28
4	187	1	0.43
5	170	1	0.00*
6	160	1	0.43
7	152	1	0.06
8	140	1	0.02
9	131	1	0.04
10	126	1	0.00
11	112	1	0.66
12	100	1	0.44
13	97	1	0.00
14	93	1	0.00
15	87	1	0.00

No. de Banda	PM	ψ	valor-p
16	82	0.12	0.00
17	79	1	0.04
18	75	3	0.34
19	72	0.47	0.00
20	69	19	0.32
21	61	4.75	0.26
22	58	4.44	0.13
23	54	40	0.96
24	53	n.d	n.d
25	48	1.05	0.01
26	45	1.05	0.01
27	43	1.05	0.00
28	41	3	0.20
29	39	1	0.00
30	37	1	0.11
31	34	1	0.01
32	33	1	0.23
33	32	1	0.44
34	31	4	0.01
35	29	2.22	0.36
36	26	1	0.44
37	25	1	0.01
38	23	1	0.44
39	22	n.d	n.d

No. de Banda	PM	ψ	valor-p
40	21	40	0.90
41	20	3.53	0.09
42	19	0.58	0.00
43	18	19	0.85
44	17	3.53	0.05

n.d = no se determinaron

* = todo en 2 decimales

El ψ es el evaluado con la sangre normal y el valor-p es la la significancia observada en los resultados en el extracto de sangre con parásitos.

$\psi = 1$ se tomó cuando la proteína no fué reconocida en el extracto de sangre normal. Ver anexo # 2.

Estos resultados nos permitieron clasificar las bandas de proteína en 4 grupos, aquellas en las cuales la diferencia entre la reactividad de sueros de pacientes a proteínas de extracto de sangre parasitada con respecto a los sueros de individuos normales fue, muy significativa, significativa, medianamente significativa y no significativa; habiendo tomado en cuenta las proporciones observadas de reactividad en esas mismas bandas para sangre normal. En la siguiente tabla (Tabla IV) podemos ver los 4 grupos.

TABLA IV

CLASIFICACION DE LAS BANDAS DE PROTEINA DE ACUERDO A SU GRADO DE SIGNIFICANCIA.

valor-p	grado de significancia	PM @ kDa de las proteínas
< .01	muy significativa	170, 126, 97, 93, 87, 82, 72, 43, 39, 19.
<.05	significativa	140, 131, 79, 48, 45, 34, 31, 25.
<0.1	medianamente significativa	152, 20, 17.
>0.1	no significativa	240, 220, 202, 187, 160, 112, 100, 75, 69, 61, 58, 54, 53, 41, 37, 33, 32, 29, 26, 23, 22, 21, 18.

OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.- Se llevaron a cabo 6 fusiones y se obtuvieron 21 hibridomas (Tabla VI).

TABLA V. ENSAYO DE CLONAS QUE REACCIONAN CON Plasmodium.

#F	Hibridoma Clona		IFA		ELISA		"Punto"		Ig Clase/
	a		<i>P.v</i>	<i>P.f</i>	<i>P.v</i>	<i>P.f</i>	<i>P.v</i>	<i>P.f</i>	Subclase
F6	2G2	C5	++	-	0.11	-	+++	-	IgG1
F6	5F2	B3	++	-	-	-	++	-	IgG
F6	2C12	E3	++	-	-	-	+	-	IgG
F4	1E6	A5	++	-	0.16	-	+	+	IgG1
F4	3H11	A2	++	-	-	-	+	-	IgG1
F5	4D2	H8	++	-	0.35	-	+	-	IgG1
F6	2C6	G11	++	-	-	-	-	-	IgG
F3	3E3	A2	+	-	-	-	+	-	IgG
F2	1B9	C2	+	-	-	-	-	-	IgG
F1	I5C9	A1	+	-	-	-	-	-	
F5	4F7	A5	+	-	0.12	-	-	-	
F6	10E6	C4	+	-	0.2	-	-	-	IgG
F4	3D2		+	-	0.13	-	-	-	IgG
F6	1B10		+	-	0.21	-	-	-	
F4	3D12		+	-	-	-	-	-	IgG
F4	2A8		+	+	-	-	-	-	IgG
F1	I9F9	C6	+	+	-	-	-	-	
F2	4D9	B1	+	+	-	-	-	-	IgG
F1	S5A3	B3	+	+	-	-	-	-	
F5	2G7	E7	+	+	0.22	0.96	++	+++	IgG

a *P.v*, *P.vivax* ; *P.f*, *P.falciparum*.

b #F, Número de fusión

Los anticuerpos monoclonales de referencia se probaron por ELISA e IFI. Sólo uno de ellos, el 4C12.B10, reaccionó por ELISA con el extracto de *P. vivax*. Por IFI todos reaccionaron con *P. vivax*.

IFI.- Por IFI, 15 anticuerpos mostraron una reacción positiva específica contra *P. vivax* y 5 reaccionaron tanto con *P. vivax* como con *P. falciparum* (Tabla V). En todos los casos, la fluorescencia observada fue bien definida y brillante. Los patrones de IFI fueron los siguientes (Fig. 14): (i) contra la superficie de todos los eritrocitos infectados con *Plasmodium*, se observa una inmunofluorescencia intensa y heterogénea, la presentaron los anticuerpos 2G2C5, 5F2B10, 1E6C5, 4D2H8, 3D12, I5C9A1, 4F7A5, 3H11A2, I9F9D3 Y S5A3B3; (ii) también es contra la superficie de todos los eritrocitos parasitados, pero es punteada, moteada, sólo el hibridoma 2C12E3 reaccionó de esta manera, se observaron preparaciones de 2 pacientes con éste anticuerpo; en el primero se observan de 2 a 5 puntos gruesos o granos definidos en cada célula infectada, mientras que en el otro paciente se observa un punteado fino en toda la superficie del eritrocito infectado; (iii) fluorescencia específica de los parásitos, es heterogénea e intensa y reacciona con todos ellos, este patrón lo presentaron los anticuerpos monoclonales 1B9C2, 10E6C4 y 4D9B1; y (iv) este tipo de reactividad es similar al anterior, pero sólo fluorescen de un 10 a un 30% de los parásitos, los anticuerpos 2C6G11, 3E3A1 y 2A8 reconocieron al parásito de esta manera.

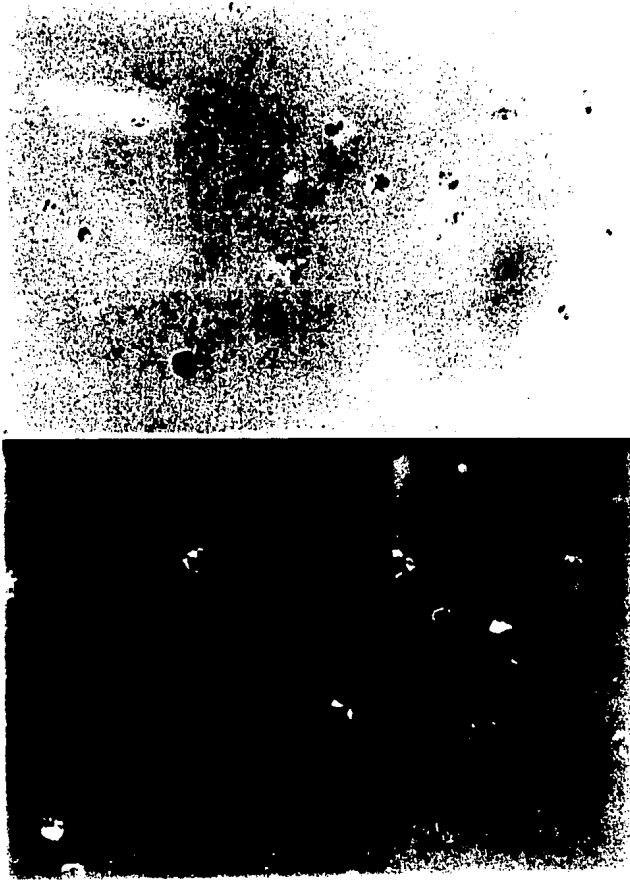
Estos resultados se pueden resumir en la siguiente tabla (Tabla VI).

TABLA VI

CLASIFICACION DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-Plasmodium
DE ACUERDO A SU PATRON DE IFI.

PATRON DE IFI	HIBRIDOMAS
i	2G2C5, 5F2B10, 1E6C5, 4D2H8, 3D12, 15C9A1, 4F7A5, 3H11A2, 19F9D3, S5A3B3, 3D2.
ii	2C12E3
iii	1B9C2, 10E6C4, 4D9B1.
iv	2C6G11, 3E3A1, 2A8.

Figura 14. Patrones de tinción en la prueba de IFI producidos por los anticuerpos monoclonales de los diferentes grupos (i, ii, iii y iv), control negativo (v) [sobrenadante de SP2/0, y control positivo (vi) [suero de ratón inmune], en formas parasitarias intraeritrocíticas de *Plasmodium vivax* (preparaciones secadas al aire). Las fotografías (aumento 600x) fueron tomadas en campo claro y oscuro para evidenciar la localización del parásito.



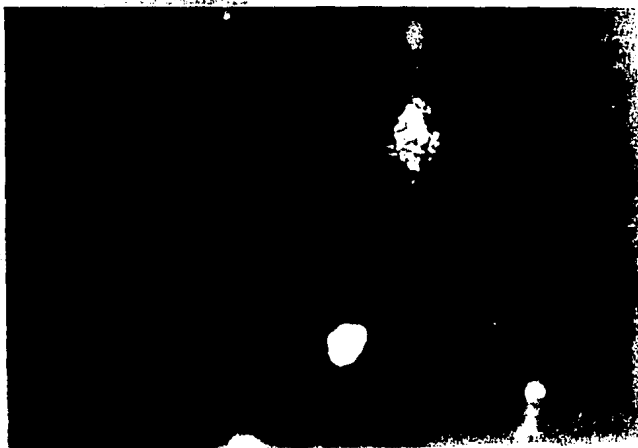
ii



ii



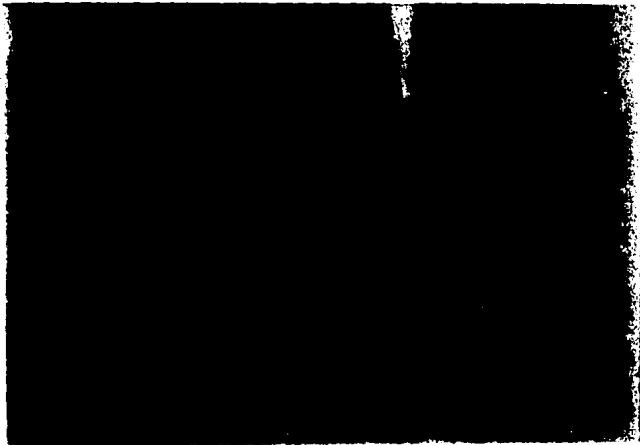
iii



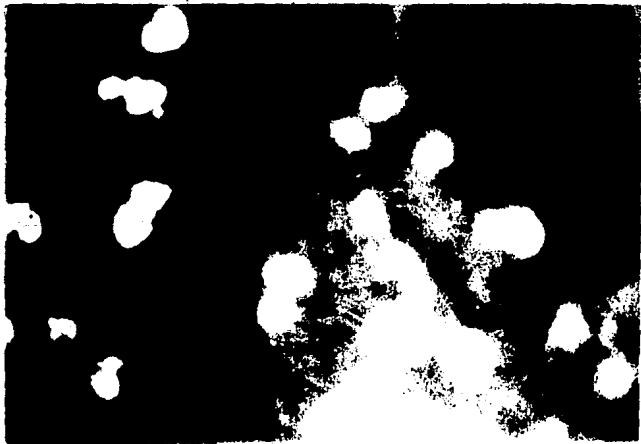
iv



2



vi



RESULTADOS EN EL ENSAYO DE ELISA.- Por ELISA (Tabla V), 7 anticuerpos monoclonales (2G2C5, 1E6C5, 4D2H8, 4F7A5, 10E6C4, 3D2, 1B10) reaccionaron específicamente con *P. vivax*, con lecturas de densidad óptica de 0.1 a 0.35, mientras que sólo un anticuerpo (2G7E7) reaccionó con *P. vivax* y *P. falciparum*, mostrando lecturas de 0.22 y 0.96 respectivamente. Este último anticuerpo, por IFI también mostró la misma especificidad (Tabla V). Las lecturas del ELISA de los monoclonales que se obtuvieron (densidad óptica 0.1-0.3) fueron más bajas que la del monoclonal de referencia, 4C12.B10 (D.O= 1).

RESULTADOS DEL ELISA DE "PUNTO".- Con el propósito de mejorar el ensayo anterior en cuanto a su sensibilidad, se ensayó la prueba de ELISA de "punto". Se estandarizó la metodología y la mayoría de los anticuerpos que utilizamos habían presentado alta reactividad por IFI. Se ensayaron nueve anticuerpos monoclonales (Fig. 15), de los cuales ocho reaccionaron positivamente; seis fueron específicos para *P. vivax* y dos cruzaron con *P. falciparum*. Se incluyeron como controles negativos: diluyente, suero normal de ratón, anticuerpo monoclonal anti-*E. histolytica* (Fig. 15: 1, 3, 4), y como controles positivos: anticuerpo monoclonal de referencia anti-*P. vivax* (4C12.B10) (Fig. 15: 2) y un suero de ratón inmunizado con el extracto crudo de *P. vivax* (Fig 15: 5). A diferencia de los controles positivos, los negativos no presentan reactividad. En todos los casos, los monoclonales ensayados y los controles negativos no reaccionaron con el extracto de sangre normal AB Rh positiva (Fig. 15: C), lo

cual difiere de lo observado con el suero policlonal del ratón inmune (Fig 15: C, 5), que como ya se indicó, se inmunizó con un extracto de *P. vivax* contaminado con eritrocitos. Al ensayar estos anticuerpos monoclonales contra *P. falciparum*, se observó con 6 de ellos una reacción específica hacia *P. vivax* y con los otros 2, reactividad con ambas especies de *Plasmodium*.

Cuando comparamos los resultados obtenidos por ELISA y por ELISA de "punto" (Tabla V), cuatro de ellos fueron positivos con ambas pruebas, mientras que los otros cuatro sólo dieron positivo con el ELISA de "punto". Además, un anticuerpo monoclonal, el 1E6C5, que mostró ser específico a *P. vivax* por ELISA e IFI; en ELISA de "punto" reaccionó también con *P. falciparum*.

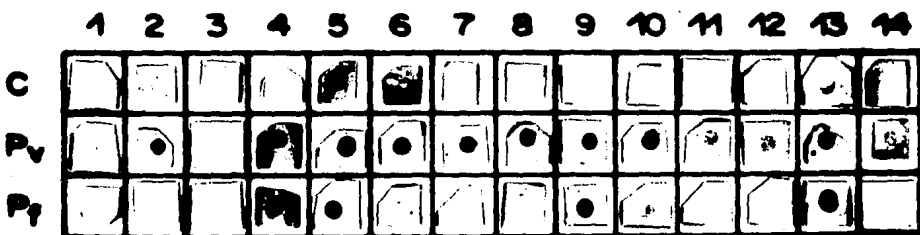


Figura 15. ELISA de "punto" de sobrenadante de SP2/0 (1); anticuerpo monoclonal de referencia 4C12.B10 (2); anticuerpo monoclonal anti-amiba (del laboratorio del Dr. Librado

Ortiz-Ortiz) (3); suero normal de ratón diluido 1:200 (4); suero inmune de ratón diluido 1:200 (5); sobrenadantes de los hibridomas anti-*Plasmodium*: 2G2C5, 5F2B3, 2C12E3, 1E6A5, 3H11A2, 4D2H8, 3E3A1, 2G7E7, 2C6G11 (6-14). En todos los casos, se probaron extractos de sangre normal AB Rh positiva (C); *P. vivax* (P.v) y *P. falciparum* (P.f).

Como se puede ver en las Tablas V y VI, y en la figura 14, en la primera fusión, se obtuvieron 3 anticuerpos monoclonales negativos por el ensayo de ELISA y cuyo patrón de IFI es contra la superficie de eritrocito. Los 2 anticuerpos monoclonales producidos en la segunda fusión, tampoco reaccionaron en ELISA y por IFI reconocieron al parásito. En la tercera fusión el anticuerpo monoclonal obtenido, por IFI reconoce sólo a un porcentaje de los parásitos. Se produjeron en la cuarta fusión 5 anticuerpos monoclonales, 2 de ellos positivos en ELISA y 4 de ellos por IFI reconocieron superficie de eritrocito infectado; por el ensayo de ELISA de "punto" dieron positivo 2 de ellos. En la quinta fusión, se obtuvieron 3 anticuerpos, todos ellos reaccionaron en ELISA, por IFI 2 de ellos reconocieron superficie de eritrocito infectado y en ELISA de "punto" 2 dieron positivo. Por último, en la sexta fusión, se obtuvieron 5 anticuerpos monoclonales, 3 de ellos reaccionaron por ELISA, en IFI reconocieron algunos de ellos superficie de eritrocito infectado y otros el parásito. Por ELISA de "punto" 3 de ellos resultaron positivos.

CLASE Y SUBCLASE DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES.- La clase y subclase de algunos de los anticuerpos monoclonales tipificados, correspondió en todos ellos a la clase IgG, y de estos, cuatro han sido clasificados como IgG1 (Tabla V).

IET.- Por la prueba de IET, se probaron varios anticuerpos monoclonales; sin embargo, sólo se obtuvo reactividad en 7 de ellos (Fig. 16), con proteínas de *P. vivax*. En la figura 16 se observa el reconocimiento de bandas de antígenos de *P. vivax*, incluyendo siempre el respectivo control de extracto de sangre normal. Así es como se puede ver que los anticuerpos monoclonales 5F2B3 y 2G2C5 (a, b, c, d), al haberse probado en 2 corrimientos con antígenos diferentes (se explica la diferencia en la figura), reaccionaron con una proteína de aproximadamente 20-25 kDa; a su vez 3H11A2 (e), reconoció una banda de alrededor de 45 kDa; 4D2H8 (f) reaccionó con 2 bandas, una de 20 y otra de 80 kDa; 1E6C5 (g) identificó proteínas de alrededor de 20, 45 y 85 kDa, de manera más sobresaliente la de 45 kDa; 2C12E3 (h) y 3E3A2 (i) reconocieron una proteína de aproximadamente 85 kDa. Estos resultados se sumarizan en la Tabla VII.

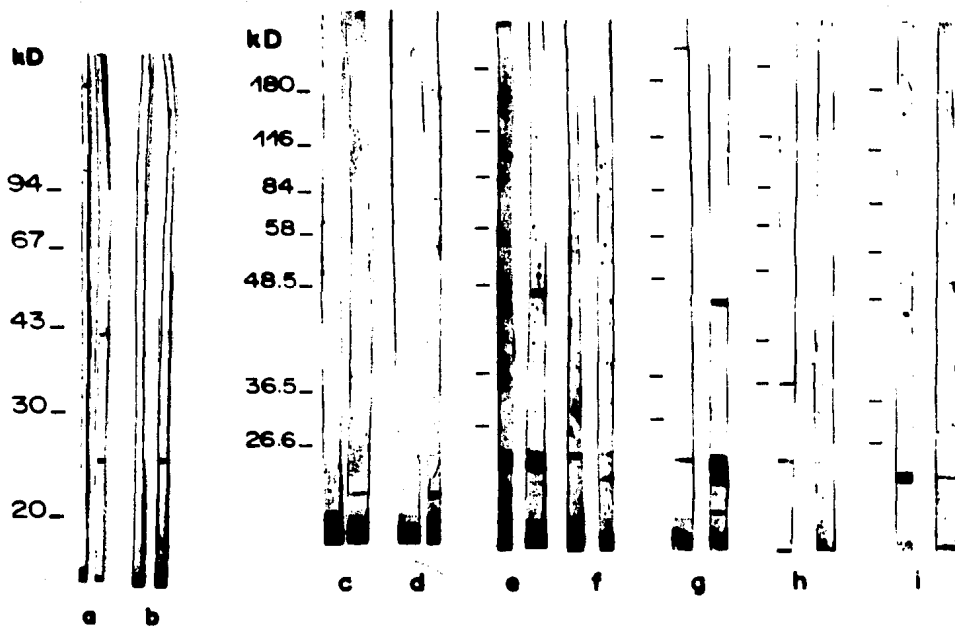


Figura 16. Reactividad de anticuerpos monoclonales anti-*Plasmodium* por IET contra los extractos de sangre normal AB Rh positiva (carril izquierdo) y el de *P. vivax* (carril derecho). Los antígenos de a y b corresponden al extracto obtenido de la sangre de un paciente y de c a i es la suma de concentrados de 6 pacientes. a y c: 5F2B3; b y d: 2G2C5; e: 3H11A2; f: 4D2H8; g:1E6A5; h: 2C12E3 e i:3E3A2.

TABLA VII

PROTEINAS DEL EXTRACTO DE P. vivax RECONOCIDAS POR LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES.

HIBRIDOMA	PROTEINA <i>P. vivax</i> (kDa)
2G2C5	20-25
5F2B3	20-25
4D2H8	20 y 70-80
3H11A2	45
1E6A5	20, 45 y 85
2C12E3	85
3E3A2	85

D I S C U S I O N

El objetivo de este estudio, fue de estudiar la respuesta inmune de un grupo de enfermos de malaria hacia *P. vivax*, determinar las proteínas del parásito importantes en el diagnóstico, contribuir en la caracterización antigénica del perfil proteico de *P. vivax* en nuestro país y producir anticuerpos monoclonales que puedan ayudar al estudio más profundo de los antígenos relevantes del parásito y al desarrollo de métodos diagnósticos.

Se analizó la respuesta inmune de un grupo de sueros de enfermos de paludismo del sureste del país (en Tapachula, Chiapas), a las proteínas de una mezcla de extractos de *P. vivax* locales (Figs. 7 y 8). El perfil proteínico de esta mezcla de extractos de *P. vivax* fue previamente analizado (Fig. 4). Se determinó también la respuesta inmune de animales inmunizados con *P. vivax* (Figs. 5 y 6), y se observó que fue similar a la encontrada en humanos. Esta información contribuye al conocimiento de la respuesta inmune que se despierta durante la infección con *P. vivax* contra estadios intraeritrocíticos, y al conocimiento de los antígenos reconocidos con mayor o menor frecuencia. Todos ellos importantes para hacer una caracterización antigénica de algunos extractos de *P. vivax* obtenidos en el sureste de México; y aquellos identificados por la mayoría de los pacientes, útiles para el diagnóstico de la enfermedad.

Los anticuerpos monoclonales que se produjeron contra el parásito reconocieron diversas proteínas de aproximadamente 20, 40 y 80 kDa, de PM (Fig. 16). Por el método de IFI dichos anticuerpos interactuaron con el parásito o con proteínas de la

superficie de eritrocito infectado (Fig. 14). Varios anticuerpos reaccionaron por el metodo de ELISA de "punto" contra el extracto del parásito, con diferente intensidad (Fig. 15). Estos anticuerpos constituyen herramientas útiles para estudiar de manera más detallada los antígenos del parásito y para implementar nuevos métodos diagnósticos.

En los ensayos realizados para determinar el perfil proteínico del extracto de *P. vivax* (Fig. 4), entre las proteínas del extracto normal (Fig. 4 a y c) la mayoría de ellas corresponden a proteínas de eritrocito ya caracterizadas; entre las que se destacan: la espectrina, proteína periférica y de citoesqueleto compuesta por 2 péptidos de 240 y 220 kDa (3, 26, 47, 162, 167 a); la banda 3, que es una proteína integral involucrada en el transporte de iones, de PM 90-100 kDa (3, 47, 162, 167 a); las glicoforinas A, B y C o sialoglicoproteínas, cuyos PM van de 30-50 kDa (162, 167 a); la banda 4.1, componente de citoesqueleto que se une a la espectrina cerca del sitio de unión de actina y cuyo PM oscila entre 78 y 88 kDa (3, 47, 162, 167 a); la banda 4.2, de PM @ 72-76 kDa (3, 162); la banda 4.5, que interviene en el transporte de glucosa y cuyo PM fluctúa alrededor de 70 kDa (162); la banda 4.9, que es componente de citoesqueleto y tiene un PM de @ 60 kDa (47); la actina, proteína de citoesqueleto y periférica en la superficie interna de la membrana, también conocida como banda 5, de PM 42-48 kDa (3, 47, 162, 164, 167 a); la banda 6 o gliceraldehido-6-fosfato deshidrogenasa, de PM @ 35 kDa (3, 162); la banda 7, cuyo PM es de @ 20 kDa (162, 16 a); y la banda 8 de alrededor de 23 kDa (16 a).

Como se puede ver en la figura 4, en el extracto de sangre con parásitos (Fig 4 b y d) hay un número mayor de bandas, con respecto a las observadas en el extracto de sangre normal, y entre éstas, la mayoría relacionables con las proteínas de eritrocito anteriormente descritas. Es muy factible que las bandas adicionales correspondan a proteínas de *P. vivax*, como lo son las de PM: 202, 180, 160, 131, 116, 112, 108, 93, 72, 64, 58, 37, 34, 33, 26 y 20 kDa. Las proteínas de 180, 131, 116, 37, 34 y 33 no han sido descritas por otros autores. La de 202 kDa puede corresponder al antígeno de superficie de merozoito (14, 32, 171); la de 160 kDa a un antígeno de rodopcito (4, 14); las de 112 y 64 kDa a proteínas de superficie de eritrocito infectado (169), la de 108 a antígeno de esquizonte (4); las de 93 y 72 kDa a antígenos de complejos vesiculares caveolares (4, 14, 75); la de 58 a un antígeno compartido por estadios sexuales y asexuales (29); la de 26 a un antígeno estructural del parásito (169); y la de 20 kDa a un antígeno compartido entre el gameto femenino y las formas asexuales del parásito (134). Todos ellos identificados por anticuerpos monoclonales.

Dadas las limitaciones de esta metodología, estas observaciones no nos dan información concluyente; sin embargo, por los ensayos de IET con sueros inmunes de animales y humanos, fue posible determinar con mayor certeza las proteínas correspondientes a *P. vivax*.

En esta parte del trabajo sólo se pudo ver a grandes rasgos la compleja composición proteínica del extracto de *P. vivax* obtenido de un grupo de pacientes de Tapachula, Chiapas. Cabe agregar que nuestras observaciones inherentes a la presencia de

proteínas de eritrocitos en el extracto de sangre control, corroboran lo reportado por numerosos autores (3, 26, 47, 162, 164), validando así, la metodología empleada a lo largo del presente estudio.

En los estudios de la respuesta inmune de pacientes hacia las proteínas de *P. vivax* por IET, se pudo ver en el control de sangre normal como antígeno (Fig. 9), una reactividad tanto de sueros sanos, como de enfermos a varios antígenos propios; de PM: 54, 21, 69, 18, 220, 240, 61, 58, 53 y 22 kDa. La mayoría de ellos corresponden a proteínas de eritrocitos descritas anteriormente, parece ser que particularmente las proteínas de 54, 21, 69, 18 y 220 kDa despertaron una respuesta de anticuerpos mayor durante la enfermedad, tal vez debido a la activación policlonal o a la formación de anticuerpos anti-eritrocitos como se comentó en el anexo #1.

Con el objeto de reducir el fondo o reacción inespecífica de los sueros contra proteínas de los sueros contra proteínas de sangre normal, se hicieron ensayos de adsorción, incubando con sangre normal los sueros inmunes y normales previamente a su ensayo por IET. Sin embargo no se observaron mejorías, tal vez debido a que tan solo se pudieron adsorber los anticuerpos contra proteínas de superficie de eritrocito y los anticuerpos que queríamos eliminar estaban dirigidos contra proteínas integrales de membrana y de citoesqueleto del glóbulo rojo.

En las proteínas de extracto de sangre con parásitos inmunogénicas para los enfermos (cuadrante superior izquierdo de la figura 10), se puede advertir, que las proteínas del parásito

de incidencia significativa, son las reconocidas por un 30-50% de los pacientes mas no por los normales; por un 50-95% de los enfermos y un 10% de los sanos y por un 95-100% de los infectados y hasta un 50% de los normales. Lo anterior se observa con mayor claridad en la figura 11.

Las proteínas de *P. vivax* inmunogénicas para los pacientes, fueron las bandas de PM: 17, 48, 39, 72, 31, 19, 43, 97, 93, 20, 140, 170, 126, 87 y 131 kDa (se observan en el cuadrante superior izquierdo de la figura 11). Todas ellas resultaron significativas. En el cuadrante inferior izquierdo de esta figura, se pueden ver varias proteínas que a pesar de haber sido identificadas con baja frecuencia por los sueros de los pacientes, no fueron identificadas por los sueros normales, por lo que nos pueden hablar de antígenos específicos de *P. vivax*. No obstante, de estas proteínas, sólo resultaron significativas las de PM 82, 45, 34, 25, 79 y 152 kDa, reconocidas por un 30-50% de los pacientes, mas no por los sanos. Cabe señalar, que algunas proteínas del parásito (PM:17, 19, 20, 31, 43, 45, 48, 72 y 82 kDa) a pesar de estar presentes como antígenos de sangre normal (Fig. 9), al realizar la inmunográfica de resta de frecuencias (Fig. 12), se desplazaron hacia zonas de mayor reconocimiento específico por sueros de pacientes. Además al comparar las figuras 9 y 10, se hace manifiesto que estas proteínas pasan de menor a mayor frecuencia de reactividad con sueros de pacientes cuando usamos extracto de sangre normal y extracto de sangre parasitada, por lo que pensamos que pueda tratarse de proteínas diferentes, es decir, de sangre normal y del parásito que estén migrando a la misma distancia en el corrimiento electroforético, o bien, que sean

de incidencia significativa, son las reconocidas por un 30-50% de los pacientes mas no por los normales; por un 50-95% de los enfermos y un 10% de los sanos y por un 95-100% de los infectados y hasta un 50% de los normales. Lo anterior se observa con mayor claridad en la figura 11.

Las proteínas de *P. vivax* inmunogénicas para los pacientes, fueron las bandas de PM: 17, 48, 39, 72, 31, 19, 43, 97, 93, 20, 140, 170, 126, 87 y 131 kDa (se observan en el cuadrante superior izquierdo de la figura 11). Todas ellas resultaron significativas. En el cuadrante inferior izquierdo de esta figura, se pueden ver varias proteínas que a pesar de haber sido identificadas con baja frecuencia por los sueros de los pacientes, no fueron identificadas por los sueros normales, por lo que nos pueden hablar de antígenos específicos de *P. vivax*. No obstante, de estas proteínas, sólo resultaron significativas las de PM 82, 45, 34, 25, 79 y 152 kDa, reconocidas por un 30-50% de los pacientes, mas no por los sanos. Cabe señalar, que algunas proteínas del parásito (PM:17, 19, 20, 31, 43, 45, 48, 72 y 82 kDa) a pesar de estar presentes como antígenos de sangre normal (Fig. 9), al realizar la inmunográfica de resta de frecuencias (Fig. 12), se desplazaron hacia zonas de mayor reconocimiento específico por sueros de pacientes. Además al comparar las figuras 9 y 10, se hace manifiesto que estas proteínas pasan de menor a mayor frecuencia de reactividad con sueros de pacientes cuando usamos extracto de sangre normal y extracto de sangre parasitada, por lo que pensamos que pueda tratarse de proteínas diferentes, es decir, de sangre normal y del parásito que estén migrando a la misma distancia en el corrimiento electroforético, o bien, que sean

proteínas de sangre normal que hayan sido modificadas durante la infección. También el análisis estadístico apoya la importancia de estas bandas, ya que todas ellas resultaron significativas.

En la figura 12, se advierte el desplazamiento que tuvieron varias proteínas como las de PM 17, 48, 39, 72 y 19 kDa, hacia zona de mayor especificidad de reconocimiento por sueros de pacientes. En la figura 13 se puede ver con mayor claridad los antígenos del parásito en su nueva ubicación en la inmunográfica y el área que comprende las proteínas significativas estadísticamente.

Conjuntando las valoraciones de los resultados que nos dan tanto el método de inmunográficas (Figs. 9-13) como el análisis estadístico (Tablas III y IV), podemos concluir que: por su alta frecuencia y significancia, la detección de los antígenos de PM 72, 31, 19, 43, 97 y 93 kDa, pudiera ser útil en el diagnóstico de la enfermedad, ya que son proteínas reconocidas por la mayoría de los pacientes, y muy poco, o nada, por los sanos. Por otro lado, hay un grupo importante de antígenos, que aunque algunos de ellos no fueron identificados frecuentemente por pacientes, por su significancia son relevantes; ellos son, de mayor a menor grado de significancia, las proteínas de PM: 170, 126, 87, 82, 39, 140, 131, 79, 48, 45, 34, 25, 152, 20 y 17 kDa.

De todos estos antígenos de *P. vivax* identificados por los sueros de pacientes, la mayoría de ellos ya han sido descritos en lo referente a su reactividad con anticuerpos monoclonales. Los de 170 y 140 kDa corresponden a antígenos de superficie de merozoito y esquizonte (14), los de 43, 45, 97 y 82, corresponden a proteínas estructurales del parásito (169), los de 48, 87 y 39

kDa, son antígenos de superficie de eritrocito infectado (169), el de 31 kDa se ha encontrado en hendiduras de eritrocito infectado (14, 75), los de 93, 72, 25 y 20 kDa fueron descritos en la sección anterior de discusión de resultados del perfil protéico del parásito. Los antígenos de 152, 131, 126, 79, 34 y 19 kDa no han sido reportados por otros autores.

Tal vez, las vacunas más efectivas y prácticas, pudieran elaborarse utilizando antígenos blanco cuya función sea crítica para la sobrevivencia del parásito y es probable que la respuesta inmune inducida por estos antígenos durante la infección natural no sea muy elevada. Desde este enfoque el grupo de proteínas de *P. vivax* que fueron reconocidas con baja frecuencia por los pacientes pudieran ser de gran importancia. Sin embargo, para determinar cuáles de éstos antígenos podrían ser útiles para vacunación, hacen falta más estudios. En estos estudios habría que utilizar un mayor número de sueros, sueros de personas protegidas y extractos del parásito de diferentes zonas del país.

El estudio de la respuesta inmune de los pacientes incluidos en este trabajo, es limitado ya que los sueros fueron tomados durante la infección activa, lo que indica que el paciente no había montado una respuesta inmune completa y que parte de los anticuerpos podían haberse adsorbido por antígenos circulantes. A pesar de que se utilizaron sueros de individuos que presentaban tanto respuesta inmune primaria como secundaria, no se observaron diferencias en el reconocimiento de antígenos del parásito entre los dos grupos.

Concretando, esta parte del estudio nos ayudó a conocer la respuesta inmune hacia *P. vivax* de un grupo de pacientes de

En los estudios de IET para identificar las proteínas de *P. vivax* que despertaron respuesta inmune vía inmunización, en animales de experimentación (conejo y ratón) (Fig. 5 y 6), se pudo ver que eran las mismas que resultaron antigénicas para los humanos. Sin embargo, dentro de las proteínas antigénicas para los animales encontramos 2 grupos de proteínas que no habían sido significativas en humanos. El primer grupo fueron proteínas encontradas en el control de sangre normal, de PM: 29, 41, 53, 58, 61 y 69 kDa. Y el segundo grupo fueron proteínas que habían sido reconocidas con muy baja frecuencia por los sueros de los pacientes, de PM: 26, 33, 37 y 160 kDa. Estos dos grupos de proteínas no aparecieron en los controles negativos (Fig. 5 y 6) de los animales, y como el número de muestras fue demasiado limitado y mucho menor en comparación con el ensayo realizado con sueros humanos, no se puede sugerir que se trate de proteínas que se hayan vuelto inmunogénicas mediante manipulación (inclusión de adyuvantes) en animales de experimentación.

En esta sección, nos concretamos a decir que la respuesta inmune inducida en conejo y ratón con un extracto de *P. vivax* es similar a la encontrada en un grupo de enfermos.

El hecho de tener un extracto capaz de despertar una respuesta inmune en el ratón, nos permitió la producción de anticuerpos monoclonales, que de otra manera no se hubiera podido lograr.

Al parecer, las fusiones que dieron mejor rendimiento, fueron

la cuarta y la sexta (Tabla V), ya que para el ensayo de ELISA hubo mayor reactividad de los anticuerpos, y por IFI, se observaron más patrones de inmunofluorescencia (Fig. 14). Los protocolos de inmunización son diferentes para las diversas fusiones, sin embargo, algo que sí pudimos constatar, fué que el último reto por vía intraesplénica ayudó mucho a potenciar la respuesta inmune.

La mayoría de los anticuerpos monoclonales obtenidos reaccionaron por IFI únicamente con *P. vivax*, aunque 5 de ellos reconocieron tanto a *P. vivax* como a *P. falciparum* (Tabla V).

Los patrones de inmunofluorescencia obtenidos nos indican que la mayoría de los anticuerpos monoclonales van dirigidos hacia epítopes de proteína de superficie de eritrocito infectado con *Plasmodium* (Tabla VI). El primero de los patrones (i) (Fig. 14), en el cual fluoresce la superficie de todos los eritrocitos infectados de manera heterogénea, resultó comparable con algunos patrones ya observados (7, 96). En los trabajos de Barnwell (96), se localiza este tipo de inmunofluorescencia en las hendiduras del eritrocito infectado y lo definen como un antígeno del parásito de aproximadamente 28 a 31 kDa, datos que coinciden con los nuestros, ya que los anticuerpos monoclonales que agrupamos en esta categoría, reconocieron antígenos del parásito de @ 20, 40 y 80 kDa (Fig. 16, Tabla VII). El patrón (ii) de IFI (Fig. 14), parece marcar en el caso del aislado de uno de los pacientes, los puntos de "Schüfner", dado que se observó un moteado fino, como ya ha sido descrito (14, 29, 96, 169, 171), sin embargo la IFI presentada con el aislado del otro paciente con el mismo anticuerpo, se restringió a menos puntos, aunque un poco más

grandes y densos. Udagama (171) y Mendis (169) describen este último patrón, pero con puntos finos además de los puntos gruesos; Udagama (171) menciona el momento diferente de desarrollo del parásito, es decir, que en el primer tipo de fluorescencia el trofozoíto está menos maduro. Matsumoto (96) observa el primer tipo de fluorescencia y lo atribuye a una proteína del parásito de 95 kDa, lo cual coincide con nuestros resultados de IET con este anticuerpo, en los que se reconoció una proteína de *P. vivax* de aproximadamente 85 kDa (Fig. 16). En el patrón (iii) (Fig. 14), los anticuerpos van dirigidos precisamente hacia el parásito y reaccionan con el 100% de ellos. En ensayos de IET, no se observó reactividad de estos anticuerpos con el extracto del parásito. Otros grupos de investigadores han observado también este tipo de inmunofluorescencia (29, 96, 169). En el patrón (iv) (Fig. 14), la reactividad fue similar a la anterior, ya que los anticuerpos se unieron al parásito; sin embargo, solo reaccionaron con un 10-30% de ellos. Es posible que se trate de algún antígeno del parásito que sea estadio específico, sin embargo resulta prematuro emitir consideraciones a este respecto hasta no realizar estudios que lo confirmen. Uno de los anticuerpos agrupados en esta categoría, por IET reconoció una proteína de aproximadamente 85 kDa (Fig. 16). Estos datos nos permiten concretar la presencia de antígenos de aproximadamente 20, 40 y 80 kDa que el parásito exporta a la superficie del eritrocito infectado y otra proteína de @ 85 kDa propia de los parásitos y presente en sólo algunos de ellos.

En los ensayos de IET (Fig. 16), los anticuerpos monoclonales 2G2C5 y 5F2B3, reconocieron a un antígeno de 20-25 kDa, mientras que el 4D2H8 identificó 2 proteínas, una de 20 y otra de 70-80 kDa. El 3H11A2 reaccionó con la banda de 45 kDa; el 1E6A5 se unió a 3 proteínas de @ 20, 45 y 85 kDa, en tanto que el 2C12E3 y el 3E3A2, reconocieron una proteína de @ 85 kDa, aunque sus patrones de IFI parecen indicar que se trata de antígenos diferentes.

El hecho de que algunos anticuerpos monoclonales reconocieron proteínas de varios pesos moleculares puede deberse a una degradación del extracto, o bien a la presencia de antígenos de reacción cruzada debido a epítopes compartidos por diferentes proteínas (5, 171).

La falta de reconocimiento de proteínas del parásito por varios de los anticuerpos monoclonales pudiera explicarse por el tratamiento del antígeno para este ensayo, que difiere mucho del manejo que se les dá a las muestras en la prueba de IFI, es decir, en IET interviene calor, detergentes, y otros factores; además hay que considerar la conformación espacial del antígeno. Para descartar la posibilidad de que fueran epítopes afectados por las condiciones de reducción por β -mercaptoetanol, se corrieron geles sin este reductor y no se observaron diferencias.

Hay varias proteínas de *P. vivax* identificadas por los sueros de pacientes en IET y cuyos PM se aproximan a los pesos de los antígenos reconocidos por los anticuerpos monoclonales. Estas proteínas son, las de PM: 87, 82, 72, 43, 19, 79, 45, 25 y 20 kDa, cabe señalar que los antígenos de 43 y 19 kDa son algunas de las proteínas que consideramos relevantes para el diagnóstico de la enfermedad.

Por otro lado, el ensayo de ELISA que utilizamos para analizar los sobrenadantes de los hibridomas, dió una reacción positiva y bien definida con uno de los monoclonales de referencia (4C12.B10), sin embargo, con los otros cuatro anticuerpos no reaccionó. Los monoclonales obtenidos en este estudio, mostraron lecturas bajas (D.O. 0.1-0.3) (Tabla V). Para descartar que en algo estuvieran interfiriendo el detergente (Tritón 100x) o la sonicación en el tratamiento del antígeno, se realizaron ensayos descartando estas condiciones, sin obtener mejoría alguna. Con el fin de mejorar este método, estandarizamos la prueba de ELISA de "punto" (Fig. 15). Los resultados obtenidos nos sugieren que esta técnica en las condiciones utilizadas puede ser más sensible que el ELISA. En este ensayo se procedió a probar sangre de individuos parasitados con *P. vivax* y sus respectivos controles, y no se obtuvieron resultados satisfactorios. La mancha dejada por la sangre propició la interpretación de falsos positivos. En esta metodología también probamos diferentes condiciones en la preparación del antígeno: con o sin calor, con o sin detergentes, sonicando o sin sonicar, centrifugando o por sedimentación y utilizando diferentes diluyentes; sin obtener resultados sustancialmente diferentes. También fueron negativos los ensayos de sueros de pacientes enfermos mediante este método, en dónde se buscó, sin éxito, algún antígeno soluble del parásito presente en la circulación de los enfermos.

Cabe hacer notar que la principal dificultad para la realización de este trabajo, fue la obtención del antígeno, ya que

a pesar de la buena disposición y ayuda del personal que labora en el Centro de Investigación de Paludismo (Tapachula, Chiapas), fué difícil la localización de enfermos de paludismo con altas parasitemias que no hubieran ingerido derivados de quinina (se destruyen los parásitos), y el rendimiento de la metodología utilizada para la concentración de parásitos (gradientes discontinuos de Percoll) (8) fue bajo, aunque superior a otros métodos ensayados (64, 125). Usando el método de Percoll para concentrar los protozoarios, no se obtuvo un extracto de *P. vivax* puro, ya que hubo contaminación con eritrocitos, leucocitos y otros elementos de la sangre. De ahí que la elección de nuestra muestra control negativo que se manejó durante todo el estudio, es decir, extracto de sangre normal tipo sanguíneo AB Rh positivo, fue esencial.

CONCLUSIONES

- 1.- En el estudio del perfil proteínico del extracto de sangre con parásitos se identificaron tanto proteínas de sangre normal como proteínas de *P. vivax*, algunas de estas no han sido reportadas por otros autores.
- 2.- Los ensayos de IET con sueros humanos normales y de pacientes, permitieron definir las proteínas del parásito hacia las cuales reacciona el sistema inmune del enfermo.
- 3.- Mediante el método de inmunográficas y el análisis estadístico de los resultados obtenidos en la IET con sueros humanos, se pudo determinar que los antígenos relevantes para el diagnóstico son las proteínas de PM 72, 31, 19, 43, 97 y 93 kDa, mientras que las que ayudan a hacer una caracterización antigénica del parásito son las anteriores más las de PM 170, 126, 87, 82, 39, 140, 131, 79, 48, 45, 34, 25, 152, 20 y 17 kDa.
- 4.- El extracto de *P. vivax* obtenido a partir de la sangre de pacientes, también mostró ser antigénico para ratón y conejo, ya que por IET, los sueros de ambos animales reconocieron los antígenos de *P. vivax* identificados por los sueros de pacientes.
- 5.- Los anticuerpos monoclonales producidos en este estudio reaccionan, algunos contra el parásito, y otros contra la superficie del eritrocito infectado pudiéndose describir 4

patrones diferentes de IFI.

6.- Se pudieron detectar varias proteínas de *P. vivax* de alrededor de 20, 40 y 80 kDa, reconocidas por los anticuerpos monoclonales.

7.- La prueba de ELISA de "punto" resultó más sensible que el ELISA convencional, así como más específica, con los anticuerpos monoclonales anti-*Plasmodium*; sin embargo, para su aplicación como método diagnóstico se necesita aumentar su sensibilidad y especificidad.

PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en esta tesis, son considerados como hallazgos que pueden extenderse y complementarse mediante:

I.- El empleo de estos anticuerpos monoclonales en estudios de microscopía electrónica, será necesario para proporcionar información acerca de la localización más detallada de los antígenos identificados, ya sea en el parásito o en la superficie del eritrocito infectado.

II.- El empleo de los anticuerpos monoclonales que presentan los patrones de IFI (i) y (ii) (Fig. 14) puede servir para estudiar las vías mediante las cuales el parásito exporta proteínas a la superficie del eritrocito infectado.

III.- La aplicación de estos anticuerpos para determinar antígenos blanco de *P. vivax*, importantes en la invasión del parásito a los hepatocitos y hematíes y la probable determinación de epítopes que puedan tener un papel destacado en la inmunidad bloqueadora de la transmisión.

IV.- Como en nuestro país no se han hecho estudios en las zonas endémicas de paludismo para investigar el polimorfismo antigénico de *P. vivax*, sería de gran interés la aplicación de estos anticuerpos con este fin y también podrían utilizarse para estudiar el polimorfismo antigénico de cepas de *P. vivax* de

diferentes partes del mundo.

V.- Por los resultados en IET, pensamos que estos anticuerpos monoclonales se pueden usar para purificar antígenos que se correlacionan con proteínas identificadas por los enfermos y de esta manera poder hacer estudios más detallados de las proteínas relevantes en la inducción de la respuesta inmune del paciente.

VI.- La aplicación de estos anticuerpos monoclonales en el análisis de una biblioteca de expresión λ gt 11, por ejemplo, pudiera servir para clonar los genes que codifican para las proteínas reconocidas por estos anticuerpos, es decir, sólo para epítopes que no fueran conformacionales.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Adner, M. M., Alstat, L.B. y Conrad, M.E. (1968). Coombs positive haemolytic disease in malaria. *Ann. Intern. Med.* 68: 33.
- 2.- Aikawa, M., Miller, L.H. y Rabbege, J. (1975). Caveola-vesicle complexes in the plasmalemma of erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium cynomologi*. *Am. J. Pathol.* 79: 285.
- 3.- Aikawa, M., Udeinya, I.J., Rabbege, J., Dayan, M., Leech, J.H., Howard, R.J. y Miller, L.H. (1985). Structural alteration of the membrane of erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *J. Protozool.* 32 (3): 424.
- 4.- Aley, S.B., Barnwell, J.V., Bates, M.D., Collins, W. y Hollingdale, M.R. (1987). *Plasmodium vivax*: exoerythrocytic schizonts recognized by monoclonal antibodies against blood-stage schizonts. *Exp. Parasitol.* 64: 188.
- 5.- Anders, R.F. (1986). Multiple cross-reactivities amongst antigens of *Plasmodium falciparum* impair the development of protect immunity against malaria. *Parasite Immunol.* 8: 529.
- 6.- Anders, R.F. (1988). Antigens of *Plasmodium falciparum* and their potential as components of a malaria vaccine. En: *The Biology of Parasitism*. Alan R. Liss Inc, New York. pp. 201.

7.- Andrysiak, P.M., Collins, W.E. y Campbell, G.H. (1986). Stage-specific and species-specific antigens of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium ovale* defined by monoclonal antibodies. *Inf.Immun.* 54: 609 .

8.- 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.

9.- Arese, P., Turrini, F. y Ginsburg, H. (1991). Erythrophagocytosis in malaria: host defence or menace to the macrophage ?. *Parasitol. Today.* 7: 25.

10.- Arnot, D.E., Barnwell, J.W., Tam, J.P., Nussenzweig, V., Nussenzweig R.S. y Enea V. (1985). Circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*. Gene cloning and characterization of the immunodominant epitope. *Science.* 230: 815.

11.- Ballou, W.R., Hoffman, S.L., Sherwood, J.A., Hollingdale, M.R., Neva, F.V., Hockemeyer, W.T., Gordon, D.F.A., Schneider, D.M., Wirtz, R.A., Young, J.F., Wasserman, G.F., Reeve, P., Diggs, C.L. y Chulay, J.D. (1987). Safety and efficacy of a recombinant DNA *Plasmodium falciparum* vaccine. *Lancet* i. pp. 1277.

12.- Barnwell, J.W., Howard, R.J. y Miller, L.H. (1983). Influence of the spleen on the expression of surface antigens on parasitized erythrocytes. *En: Malaria and the red cell.* (Ciba

13.- Barnwell, J.W., Russell, J.H., Coon, H.G. y Miller, L.H. (1983). Splenic requirement for antigenic variation and expression of the variant antigen on the erythrocyte membrane in cloned *Plasmodium knowlesi* malaria. *Infect. Immun.* 40: 985.

14.- Barnwell, J.W. (1986). Antigens of *Plasmodium vivax* blood stage parasite identified by monoclonal antibodies. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* (Rio de Janeiro). 81: 59.

15.- Barnwell, J.W., Nichols, M.E. y Rubinstein, P. (1989). *In vitro* evaluation of the role of the Duffy blood group in erythrocyte invasion by *Plasmodium vivax*. *J. Exp. Med.* 169: 1795.

16.- Barr, P.J., Gibson, H.L., Enea, V., Arnot, D.E., Hollingdale, M.R. y Nussenzweig, V. (1987). Expression in yeast of a *Plasmodium vivax* antigen of potential use in a human malaria vaccine. *J. Exp. Med.* 165: 1160.

16 a.- Bennett, V. (1985). The membrane skeleton of human erythrocytes and its implications for more complex cells. *Ann. Rev. Biochem.* 54: 273.

17.- Berzins, K., Wahlgren, M., Berzins, K. y Perlmann, P. (1983) Studies on the specificity of antierythrocyte antibodies in the serum of patients with malaria. *Clin. Exp. Immunol.* 54: 313.

- 18.- Boonpucknavig, S. y Udomsangpetch, R. (1983). Immunological aspects in *Plasmodium falciparum* infection. J. Clin. Lab. Immunol. 12:37.
- 19.- Bray, R.S. (1957). Studies on malaria in chimpanzees II. *Plasmodium vivax*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 6: 514.
- 20.- Brown, K.N. y Brown I.N. (1965). Immunity to malaria: antigenic variation in chronic infections of *Plasmodium knowlesi*. Nature. 208: 1286.
- 21.- Campbell, C.C.(1991). Challenges facing antimalarial therapy in Africa. J. Infec.Dis. 163: 1207.
- 22.- Carter, R., et al. (1988). Immunity to sexual stages of malarial parasites. En: Malaria immunology. Eds. Perlmann, P. y Wigzell, H. Karger, Basel. Progr. Allergy. 41: 193.
- 23.- Carter, R., Graves, P.M., Quakyi, I.A. y Good, M.F. (1989). Restricted or absent immune responses in human populations to *Plasmodium falciparum* gamete antigens that are targets of malaria transmission-blocking antibodies. J. Exp. Med. 169: 135 .
- 24.- Coatney, G.R. , Collins, W.E., Warren, Mc. W. y Contacos, P.G. (1971). The primate malarias. Government Printing Office. Washington, D.C.
- 25.- Cohen, S., Mc Gregor, I.A. y Carrington, S. (1961).

Gammaglobulin and acquired immunity to human malaria. *Nature*. 192:

733 .

26.- Cohen, C.M. y Branton, D. (1981). The normal and abnormal red cell cytoskeleton: a renewed search for molecular defects. *TIBS*.

pp. 266.

27.- Cox, F.E.G. (1988) Which way malaria? *Nature*. 331: 486.

28.- David, P.H., del Portillo, H.A., Gysin, J., Udagama, P., Mattei, D.M., Khoury, E., Aikawa, M., Peiris, J.S.M., Premawansa, S., Maitipe, P. y Mendis, K.N. (1988). *Plasmodium vivax* asexual erythrocytic stage antigens: a 200 kDa polymorphic schizont-surface antigen, antigens present in Schüfner's dots and an antigen shared between asexual stages and gametes involved in transmission blocking immunity. En: Tenth Meeting of the Scientific Working Group on the Immunology of Malaria. 13-15 April, 1988, IMMAL-SWG 10/WP.

29.- David, P.H, del Portillo, H.A. y Mendis, K.N. (1988). *Plasmodium vivax* malaria: parasite biology defines potential targets for vaccine development. *Biol. Cell*. 64: 251.

30.- De la Cruz, V.F., Lal, A.A., Welsh, J.A. y Mc Cutchan T.F. (1987). Evolution of the immunodominant domain of the circumsporozoite protein gene from *Plasmodium vivax*. *J. Biol. Chem.* 262: 6464.

31.- Delplace, P., Bhatia, A., Cagnard, M., Camus, D., Colombet, G., Debrant, A., Dubremetz, J.F., Dubreuil, N., Prensier, G., Fortier, B., Haq, A., Weber, J. y Vernes, A. (1988). Protein p 126: a parasitophorous vacuole antigen associated with the release of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Biol. Cell.* 64: 215.

32.- Del Portillo, H.A., Gysin, J., Mattei, D.M., Khouri, E., Udagama, P.M., Mendis, K.N. y David, P.H. (1988). Cloning and expression of a major blood-stage surface antigen of *Plasmodium vivax*. *Exp. Parasitol.* 67: 346.

33.- Boletín de paludismo y otras enfermedades transmitidas por vector. Dirección General de Epidemiología, S.S.A. (México) (1991). 3 (1): 7.

34.- Informe Semanal de la Dirección General de Epidemiología, S.S.A. (México) (1991). 3 (24): 16.

35.- Concentración de Informes Semanales de la Dirección General de Epidemiología, S.S.A. (México) (1983-1991).

36.- Druilhe, P., Puebla R.M., Miltgen, F., Perrin, L., Gentilini, M. (1984). Species and stage-specific antigens in exoerythrocytic forms of *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33: 336.

37.- Epstein, N., Miller, L.H., Kaushel, D.C., Udeinya, I.J., Rener, J., Howard, R.J., Asofsky, R., Aikawa, M. y Hess, R.L.

(1981). Monoclonal antibodies against a specific surface determinant on malarial (*Plasmodium knowlesi*) merozoites block erythrocyte invasion. J. Immunol. 127: 212.

38.-Fang, X., Kaslow, D.C., Adams, J.H. y Miller, L.H. (1991) Cloning of the *Plasmodium vivax* Duffy receptor. Mol. Biochem. Parasitol. 44: 125.

39.- Fenton, B., Clark, J.T., Wilson, C.F., Mc Bride, J.S. y Walliker, D. (1989). Polymorphism of a 35-38 KD a *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen. Mol. Biochem. Parasitol. 34: 79.

40.- Freeman, R.R., Trejdosiewicz, A.J. y Cross, G.A.M. (1980). Protective monoclonal antibodies recognising stage-specific merozoite antigens on a rodent malaria parasite. Nature. 284: 366.

41.- Galey, B., Druilhe, P., Ploton, I., Desgranges, C., Asaranich, A., Harinasuta, T., Marchand, C., Brahimi, K., Charoenvit, Y., Paul, C., Youn, J., Gross, M. y Beaudoin, R.L. (1990). Evidence for diversity of *Plasmodium falciparum* sporozoite surface antigens derived from analysis of antibodies elicited in humans. Infect. Immun. 58: 2995.

42.- Garnham, P.C.C. (1966). Malaria parasites and other *Haemosporidia*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

43.- Goding, J.W. (1983). Monoclonal antibodies: Principles and Practice. Production and application of monoclonal antibodies in cell Biology, Biochemistry and Immunology. Academic Press, Inc. London. LTD.

44.- Good, M.F. (1988). T cells, T sites, and malaria immunity-further optimism for vaccine development. J. Immunol. 140: 1715.

45.- Good, M.F., Kumar, S. y Miller, L.H.(1988). Real difficulties for malaria sporozoite vaccine development: non responsiveness and antigenic variation. Immunol. Today. 9: 351.

46.- Goonewardene, R., Carter, R., Gamage, C.P., Del Giudice, G, David, P.H., Howie, S. y Mendis, K.N. (1990). Human T cell proliferative responses to *Plasmodium vivax* antigens : evidence of immunosuppression following prolonged exposure to endemic malaria. Eur. J. Immunol. 20: 1387 .

47.- Gratzer, W.B.(1981). The red cell membrane and its cytoskeleton. Biochem. J. 198: 1.

48.- Greenwood, B.M., Brueton, M.J. (1974). Complement activation in children with acute malaria. Clin. Exp. Immunol. 18: 267.

49.- Greenwood, B.M.(1974). Possible role of a B-cell mitogen in hypergamma-globulinaemia in malaria and trypanosomiasis. The Lancet. 16: 435 .

50.- Grun, J.L., Long, C.A. y Weidanz, W.P. (1985). Effects of splenectomy on antibody-independent immunity to *Plasmodium chabaudi adami* malaria. *Infect. Immun.* 48: 853.

51.- Guerin-Marchand, C., Druilhe, P., Galey, B., Londono, A., Patarapotikul, J., Beaudouin, R., Tartr, A., Mercereau-Puijalon, O., Dubeaux, C. y Langsley, G. (1987). A liver-stage specific antigen of *Plasmodium falciparum* characterized by gene cloning. *Nature.* 329: 164.

52.- Hadley, T.J., David, P.H., Mc Ginniss, M.H. y Miller, L.H. (1984). Identification of an erythrocyte component carrying the Duffy blood group Fya antigen. *Science.* 223: 597.

53.- Hadley, T.J., Klotz, F.W. y Miller, L. H. (1986). Invasion of erythrocytes by malaria parasites a cellular and molecular overview. *Ann. Rev. Microbiol.* 40: 451.

54.- Haidaris, C.G., Haynes, D., Meltzer, M.S. y Allison, A.C. A.C.(1983). Serum containing tumor necrosis factor is cytotoxic for the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Infect. Immun.* 42: 385.

55.- Hancock, K. y Tsang, V.C.W. (1983). India ink staining of proteins on nitrocellulose paper. *Anal.Biochem.* 133: 157.

56.- Handunnetti, S.M., Mendis, K.N. y David, P.H. (1987). Antigenic variation of cloned *Plasmodium fragile* in its natural host *Macaca sinica*: sequential appearance of successive variant antigenic types. J. Exp. Med. 165: 1269.

57.- Hawkes, R., Niday, E y Gordon, J. (1982). A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. Anal. Biochem. 119: 142.

58.- Haynes, J.D., Diggs, C.L., Hines, F.A. y Desjardins, R.E. (1976). Culture of human malaria parasites *Plasmodium falciparum*. Nature. 263: 767.

59.- Heidrich, H. G. (1988). Isolation and functional characterization of *Plasmodium falciparum* merozoite antigens. Biol. Cell. 64: 205.

60.- Herrington, D.A., Clyde, D.F., Losonsky, G., Cortesia, M., Murphay, F.R., Davis, J., Baqar, A., Félix, A.M., Heimer, E.P., Gillesen, D., Nardin, E., Nussenzweig, R.S., Nussenzweig, V., Hollingdale, M.R. y Levine, M.M. (1987). Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* sporozoites. Nature. 328: 257.

61.- Ho, M., Webster, H.K., Looareesuwan, S., Supanavanond, W., Phillips, R.E., Chanthavanich, P. y Warrell, D.A. (1986). Antigen-specific immunosuppression in human malaria due to *Plasmodium falciparum*. J. Infect. Dis. 153: 763.

62.- Hoffman, S.L., Isenbarger, D., Long, G.W., Hollingdale, M.R., Van der Meide, P.H., Finbloom, D.S. y Ballou, W.R. (1989). Sporozoite vaccine induces genetically restricted T cell elimination of malaria from hepatocytes. *Science*. 244: 1078.

63.- Holder, A.A. y Freeman, R.R. (1982). Biosynthesis and processing of a *Plasmodium falciparum* schizont antigen recognized by immune serum and a monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* 156: 1528.

64.- Homewood, C.A. y Neame, K.D. (1976). A comparison of methods used for the removal of white cells from malaria-infected blood. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 70: 249.

65.- Hommel, M., David, P.H. y Oligino, L.D. (1983). Surface alterations of erythrocytes in *Plasmodium falciparum* malaria: antigenic variation, antigenic diversity and role of the spleen. *J. Exp. Med.* 157: 1137.

66.- Hommel, M. y Semoff, S. (1988). Expression and function of erythrocyte-associated surface antigens in malaria. *Biol. Cell.* 64: 183 .

67.- Houba, V., Page Foulk , W. y Matola, Y.G. (1974). Heterophilic antibodies in relation to malaria infection: population and experimental studies. *Clin. Exp. Immunol.* 18: 89.

68.- Houba, V., Lambert, P.H., Voller, A. y Soyanwo, M.A.O. (1976). Clinical and experimental investigation of immune complexes in malaria . Clin. Immunol. Immunopathol. 6: 1 .

69.- Howard, R.J., Lyon, J.A., Uni, S., Saul, A.J., Aley, S.B., Klotz, F., Panton, L.J., Sherwood, J.A., Marsh, H., Aikawa, M. y Rock, E.P. (1987). Transport of a *Plasmodium falciparum* Mr 300,000 protein (*Plasmodium falciparum* EMP-2) from the intraerythrocytic asexual parasite to the cytoplasmic face of the host cell membrane . J. Cell. Biol. 104: 1269.

70.- Howard, R.J. (1988). *Plasmodium falciparum* proteins at the host erythrocyte membrane: their biological and immunological significance and novel parasite organelles which deliver them to the cell surface. En: The Biology of Parasitism. Alan R. Liss Inc. pp. 111.

71.- Hudson, D.E., Eellems, T.E. y Miller, L.H. (1988). Molecular basis for mutation in a surface protein expressed by malaria parasites. J. Mol. Biol. 203: 707 .

72.- Hui, G.S. y Siddiqui, W.A. (1988). Characterization of a *Plasmodium falciparum* polypeptide associated with membrane vesicles in the infected erythrocytes. Mol. Biochem. Parasitol. 29: 283.

73.- Ifediba, T.C., Stern, A., Ibrahim, A. y Rieder, R.F. (1985) *Plasmodium falciparum* in vitro: diminished growth in Hemoglobin H disease erythrocytes. *Blood*. 65 :452.

74.- Kabilan, L., Troye-Blomberg, M., Patarroyo, M.E., Bjorkman, A. y Perlmann, P. (1987). Regulation of the immune response in *Plasmodium falciparum* malaria. IV. T cell dependent production of immunoglobulin and anti-*Plasmodium falciparum* antibodies in vitro. *Clin. Exp. Immunol.* 17: 1763.

75.- Kamboj, K.K., Barnwell, J.W., Nussenzweig, R.S. y Cochrane, A.H. (1988). Characterization of cross-reactive blood-stage antigens of the *Plasmodium cynomolgi* complex using anti-*Plasmodium vivax* monoclonal antibodies. *J. Parasitol.* 74 (3): 403.

76.- Kimura , K., Matteri, D., di Sánti, S.M. y Scherf, A. (1990). Genetic diversity in the major merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum*: high prevalence of a third polymorphic form detected in strains derived from malaria patients. *Gene*. 91: 57.

77.- Kitchen, S.F. (1938). The infection of reticulocytes by *Plasmodium vivax*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 18: 347.

78.- Klotz, F.W., Hudson, D.E., Coon, H.G. y Miller, L.H. (1987). Vaccination-induced variation in the 140 kDa merozoite surface antigen of *Plasmodium knowlesi* malaria. *J. Exp. Med.* 165: 359.

79.- Knapp, B., Hundt, E. y Küper, H.A. (1989). A new blood stage antigen of *Plasmodium falciparum* transported to the erythrocyte surface. *Mol. Biochem. Parasitol.* 37: 47.

80.- Knowles, G., Davidson, W.L., Mc Bride, J.S. y Jolley, D. (1984). Antigenic diversity found in isolates of *Plasmodium falciparum* from Papua New Guinea by using monoclonal antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33: 204.

81.-Köhler, G. y Milstein, C.(1976). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predetermined specificity. *Nature.* 256: 495.

82.- Krotoski, W.A., Bray, R.S., Garnham, P.C.C., Gwadz, R.W., Killick-Kendrick, R., Draper, C.C., Cogswell, F.B., Targett, G.A.T., Krotoski, D.M., Guy, M.W. y Koontz, L.C. (1982). Observations on early and late post-sporozoite tissue stages in primate malaria, II. The hypnozoite of *Plasmodium cynomolgi bastianellii* from 3 to 105 days after infection, and detection of 36 to 40-hour pre-erythrocytic forms. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31: 211.

83.- Krotoski, W.A. (1985). Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79: 1.

84.- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680.

- 85.- Lafrancois, G., Bouvet, E., Labras, J., Vroklans, M., Simonneau, M. y Vachon, F. (1981). Anti-erythrocyte immunization during chronic *falciparum* malaria. *Lancet*. 2:661.
- 86.- Lambros, C., y Vanderberg, J.P. (1979). Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocyte stages in culture. *J. Parasitol.* 65: 418.
- 87.- Langreth, S.G. y Reese, R.T. (1979). Antigenicity of the infected-erythrocyte and merozoite surfaces in *falciparum* malaria. *J. Exp. Med.* 150: 1241.
- 88.- Langsley, G., Patarapotikkul, J., Handunnetti, S., Khouri, E., Mendis, K.N. y David, P.H. (1988). *Plasmodium vivax*: karyotype polymorphism of field isolates. *Exp. Parasitol.* 67: 301.
- 89.- Larralde C., Montoya, R.M., Sciutto, E., Díaz, M.L., Govezensky, T. y Coltori, E. (1989). Deciphering Western Blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40: 282.
- 90.- Laveran, A. (1880). Note sur un nouveau parasite trouvé dans le sang de plusieurs malades atteints de fièvre palustre. *Bull. Acad. Natl. Med. (Paris)* 9: 1235.

91.- Lopez, A.F. y Schmunis, G. (1988). Diagnóstico de malaria. Pub. Cient. No. 512. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. Washington, D.C. USA.

92.- Lowry, O.H., Rosebrough, M.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265.

93.- Luse, S.A., y Miller, L.H. (1971). *Plasmodium falciparum* malaria. Ultrastructure of parasitized erythrocytes in cardiac vessels. Am. J. Trop. Med. Hyg. 20: 660.

94.- Majarian, W.R., Daly, T.M., Weidanz, W.P. y Long, C.A. (1984). Passive immunization against murine malaria with an IgG3 monoclonal antibody. J. Immunol. 132: 3131 .

95.- Manson-Bahr, P. (1963). The story of malaria: the drama and actors. Int. Rev. Trop. Med. 2: 290.

96.- Matsumoto, Y., Aikawa, M. y Barnwell, J.W. (1988). Immunoelectron microscopic localization on vivax malaria antigens to the clefts and caveola-vesicle complexes of infected erythrocytes. Am. J. Trop. Med. Hyg. 39: 317.

97.- Mazier, D., Landau, I., Druilhe, P., Miltgen, F., Guguen-Guillouzo, C., Baccam, D., Baxter, I., Chigot, J.P. y Gentilini M. (1984). Cultivation of the liver forms of *Plasmodium vivax* in human hepatocytes. Nature. 307: 367.

98.- Mazier, D., Beaudoin, R.L., Mellouk, S., Druilhe, P., Texier, B., Trosper, J., Miltgen, F., Landau, I., Paul, C., Brandicourt, O., Guguen-Guillouzo, C., Langlois, P. y Gentilini M. (1985). Complete development of hepatic stages of *Plasmodium falciparum* in vitro. *Science*. 227: 440.

99.- Mazier, D., Sedegah, M., Szarfman, A., Water, S.L., Miltgen, F., Nudelman, S. y Nussler, A. (1988). Pre-erythrocytic stages of plasmodia. Role of specific and nonspecific factors. *Biol. Cell*. 64: 165.

100.- Mc Bride J.S., Walliker, D. y Morgan, G. (1982). Antigenic diversity in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*. 217: 254.

101.- Mc Cutchan, T.F., Lal, A.A., de la Cruz, V.F., Miller, L.H., Maloy, W.L., Charoenvit, Y., Guerry, P., Wistar, R.Jr., Hoffman, S.L., Hockmeyer, W.T., Collins, W.E. y Wirth, D.F.(1985). Sequence of the immunodominant epitope of the surface protein on sporozoites of *Plasmodium vivax*. *Science*. 230 : 1381.

102 .- Meis, J.T.G.M., Jap, P.H.K., Hollingdale, M.R. y Verhave, J.P.(1987). Cellular responses against exoerythrocytic forms of *Plasmodium berghei* in rats. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 37:506.

103.- Mellouk, S., Maheshar, R.K., Rhodes-Feuillette, A., Beaudouin, R.L., Berbiguier, N., Matile, H., Miltgen, F., Landau, I., Pied, S., Chigot, J.P., Friedman, R.M. y Mazier, D. (1987). Inhibitory activity of interferons and interleukin 1 on the development of *Plasmodium falciparum* in human hepatocyte cultures. *J Immunol.* 139: 4192.

104.- Mendis, K.N., David, P.H., Hommel, M., Carter, R. y Miller, L.H. (1983). Immunity to malarial antigens on the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32: 926.

105.- Mendis, K.N., Munasinghe, Y., de Silva, Y., Keragala, I. y Carter, R. (1987). Malaria transmission blocking immunity induced by natural infections of *Plasmodium vivax* in humans. *Infect. Immun.* 55: 369.

106.- Mendis, K.N., Peiris, J.S.M., Premawansa, S. Udagama, P.V. Ranakawa, M., Carter, R., Munasinghe, Y. y David, P.H. (1987). Immunomodulation of parasite transmission in *Plasmodium vivax* malaria. Anti-gamete antibodies can both block and enhance transmission. *Molecular Strategies of Parasitic Invasion*. Alan R. Liss Inc. New York. pp. 417.

107.- Mendis, K.N., Ithalamulla, R.I. y David, P.H. (1988). Diversity of *Plasmodium vivax*-induced antigens on the surface of infected human erythrocytes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 38: 42.

108.- Mendis, K.N., David, P.H. y Carter R.F (1991). Antigenic ployomorphism in malaria: is it an important mecanism for immune evasion? Immunol. Today. 12 (3): A34.

109.- Merino, F. (1987). Respuesta Inmunológica en la malaria. Inmunología. 6: 30.

110.- Merril, C.R., Goldman, D. y Van Kauren, M.L. (1984). Gel protein stains: silver stain. Meth. Enzymol. 104: 441.

111.- Miller, L.H., Aikawa, M. y Dvorak, J.A. (1975). Malaria (*Plasmodium knowlesi*) merozoites: immunity and the surface coat. J. Immunol. 114: 1237.

112.- Miller, L.H., Mason, S.J., Dvorak, J.A., Mc. Ginniss, M.H y Rothman, I.K. (1975). Erythrocyte receptors for (*Plasmodium knowlesi*) malaria: Duffy blood group determinants. Science 189: 561.

113.- Miller, L.H., Mason, S.J., Clyde, D.F. Y Mc Ginniss M.H. (1976). The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks, the Duffy blood group genotype, FyFy. N. Engl. J. Med. 295: 302.

114.- Miller, L.H., Mc Ginniss, M.H., Holland, P.V. y Sigmond, P. (1978). The Duffy blood group phenotype in American blacks with *Plasmodium vivax* in Vietnam. Am. J. Trop. Med. Hyg. 27: 1069.

115.- Miller, L.H., Howard, R.J., Carter, R., Good, M.F., Nussenzweig, V. y Nussenzweig, R.S.(1986). Research toward malaria vaccines. *Science*. 234: 1349.

116.- Mons, B., Croon, J.J.A.B., Van der Star, W. y Van der Kaay.(1988). Erythrocytic schizogony and invasion of *Plasmodium vivax* in vitro. *Int. J. Parasitol.* 18: 307.

117.- Moreno, S.M.L., Urrea, A.L.L. y Wasserman, L.M. (1989). Análisis cualitativo y cuantitativo de la respuesta inmune humoral a *Plasmodium falciparum* en personas protegidas y no protegidas. *Biomédica*. 9 (3 y 4): 75. Bogotá, Colombia.

118.- Nardin, E.H., Nussenzweig, R.S., Mc Gregor, I.A. y Bryan, J.H.(1979). Antibodies to sporozoites: their frequent occurrence in individuals living in an area of hyperendemic malaria. *Science*. 206: 597.

119 = 132 a.

120.- Ockenhouse, C.F., Schulman, S. y Shear, H.L.(1984). Induction of crisis forms in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* by γ -interferon-activated, monocyte-derived macrophages. *J. Immunol.* 133: 1601.

121.- Ojo-Amaize, E.A., Salimonu, L.S., Williams, A.I.O., Akiwolere, O.A.O., Shabo, R., Alm, G.V., y Wigzell, H. (1981). Positive correlation between degree of parasitaemia, interferon titers, and natural killer cell activity in *Plasmodium falciparum* infected children. *J. Immunol.* 127: 2296.

122.- Ong, C.S.L., Zhang, K.Y., Eida, S.J., Graves, P.M., Dow, C., Looker, M., Rogers, N.C., Chiodini, P.L. y Targett, G.A.T. (1990). The primary antibody response of malaria patients to *Plasmodium falciparum* sexual stage antigens which are potential transmission blocking vaccine candidates. *Parasite Immunol.* 12: 447.

123.-Orago, A.S.S. y Solomon, J.B., (1986). Antibody-dependent and -independent cytotoxic activity of spleen cells for *Plasmodium berghei* from susceptible and resistant rats. *Immunol.* 59: 283.

124.- Osoba, D., Dick, H.M., Voller, A., Goosen, T.J., Goodsen, T., Draper, C.C. y de The, G.(1979). Role of the HLA complex in the antibody responses to malaria under natural conditions . *Immunogenetics.* 9: 323.

125.- Pasvol, G., Wilson, R.J.M., Smalley, M.E. y Brown, J. (1978). Separation of viable schizont-infected red cells of *Plasmodium falciparum* from human blood. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 72: 87.

126.- Pasvol, G., Jungery, M., Weatherall, D.J., Parsons, S.F., Anstee, D.J. y Tanner, M.J.A. (1982). Glycophorin as a possible receptor for *Plasmodium falciparum*. *Lancet* 2 : 47.

127.- Patarroyo, M.E., Amador, R., Clavijo, P., Moreno, A., Guzman, F., Romero, P., Tascon, R., Franco, A., Murillo, L.A., Ponton, G. y Trujillo G.(1988). A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 332: 158.

128.- Peiris, J.S.M., Premawansa, S., Ranakawa, M., Udagama, P., Muneshinge, Y., Nanayakkara, M., Gamage, P., Carter, R., David, P.H. y Mendis, K.N.(1988). Monoclonal and polyclonal antibodies can both block and enhance transmission of human *Plasmodium vivax* malaria . *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 39: 26.

129.- Perkins, M.E.(1990). *Cell Biology of Plasmodium*. En: Wyler, D.J. M.D. *Modern Parasite Biology Cellular, Immunological, and Molecular Aspects*. W.H. Freeman and Company New York. pp: 5.

130.- Perlmann, H., Carlsson, J., Bjorkman, A., Patarroyo, M.E., Berzins, K., Wahlgren, M. y Perlmann P. (1984) Antibodies in malarial sera to parasite antigens in the membrane of erythrocytes infected with early asexual stages of *Plasmodium falciparum* . *J. Exp. Med.* 159: 1686.

- 131.- Perrin, L.H. y Dayal, R. (1982). Immunity to asexual erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*: role of defined antigens in the humoral response. *Immunological Rev.* 61: 245.
- 132.- Pessi, A., Michel, M., Bianchi, E., Mendis, A., Tougne, Ch., Verdini, A.S., Lambert, P-H., Carter, R., Mendis, K. y Del Giudice, G. (1990). Use of synthetic peptides in the study of the antibody response to *Plasmodium vivax* sporozoites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 42: 17.
- 132 a.- Peters, W. (1987). Chemoterapy and drug resistance in malaria. *The malaria parasite.* Academic Press. New York. pp. 19.
- 133.- Phanuphak , P., Tirawatnpong, S. y Hanvanich, M.(1983). Autoantibodies in *falciparum* malaria: a sequential study in 183 Thai patients. *Clin. Exp. Immunol.* 53: 627.
- 134.- Premawansa, S., Peiris, J.S.M., Perera, K.L.R.L., Ariyaratne, G., Carter, R. y Mendis, K.N. 1990. Target antigens of transmission blocking immunity of *Plasmodium vivax* malaria. Characterization and polymorphism in natural parasite isolates. *J. Immunol.* 144: 4376.
- 135.- Quakyi, I.A., Matsumoto, Y, Carter, R. y Udomsangpetch, R.(1989). Movement of a *falciparum* malaria protein through the erythrocyte cytoplasm to the erythrocyte membrane is associated with lysis of the erythrocyte and release of gametes. *Infect. Immun.* 57: 833.

136.- Quakyi, I.A., Otoo, L.N., Pombo, D., Sugars, L.Y., Menon, A., De Groot, A.S., Johnson, A., Alling, D., Miller, L.H. y Good, M.F. (1989). Differential non-responsiveness in humans of candidate *Plasmodium falciparum* vaccine antigens. Am. J. Trop. Med. Hyg. 41: 125 .

137.-Ramasamy, R. y Geysen, H.M. (1990). Novel cross-reactive epitopes on asexual blood stage antigens of *Plasmodium falciparum*. Parasite Immunol. 12: 457.

138.- Ranawaka, M.B., Munesinghe, Y.D., de Silva, D.M.R., Carter, R. y Mendis, K.N.(1988) Boosting of transmission-blocking immunity during natural *Plasmodium vivax* infections in humans depends upon frequent reinfection. Infect. Immun. 56: 1820.

139.- Ravetch, J.V., Kochan, J. y Perkins, M.(1985). Isolation of the gene for a glycoprotein-binding protein implicated in erythrocyte invasion by a malaria parasite. Science. 227: 1593.

140.- Rapoport, S.M.(1986). The reticulocyte. CRC Press Inc. Orlando, Florida.

141.- Rhodes-Feuillette, A., Bellosguardo, M., Druilhe, P., Ballet, J.J., Chousterman, S., Canivet, M. y Peries, J. (1985). The interferon compartment of the immune response in human malaria II. Presence of serum interferon gamma following the acute attack. J. Interferon. Res. 5: 169.

142.- Riley, E.M., Jobe, O. y Whittle, H.C.(1989). CD8+ T cells inhibit *Plasmodium falciparum*- induced lymphoproliferation and gamma interferon production in cell preparations from some malaria-immune individuals. *Infect. Immun.* 57: 1281.

143.- Riley, E.M., Olerup, O, y Troye-Blomberg, M.(1991). The immune recognition of malaria antigens. *Parasitol. Today.* 7: 5.

144.- Roberts, D.W. y Weidans, W.P., (1978). Splenomegaly, enhanced phagocytosis, and anemia are thymus dependent responses to malaria. *Infect. Immun.* 20: 728.

145.- Rodríguez, M.H. y Jungery, M.(1986). A protein on *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes functions as a transferrin receptor. *Nature.* 324: 388.

146.- Romero, P., Heimer, E.P., Herrera, S., Felix, A.M., Nussenzweig, R.S. y Zavala F.(1987). Antigenic analysis of the repeat domain of the circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*. *J. Immunol.* 139: 1679.

147.- Ronai, Z. y Sulitzeanu, D. (1983) Anti-red blood cell autoantibodies induced in rat by *Plasmodium berghei* infection bind to a cross-reacting determinant present also in other cell types. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 26: 327 .

- 148.- Rosenberg, E.G., Strickland, C.T., Yang, S.L. y Whalen, C.(1973). IgM antibodies to red cells and autoimmune anaemia in patients with malaria. Am. J. Trop. Med. Hyg. 22: 146 .
- 149.- Rosenberg, R., Wirtz, R.A., Lanar, D.E., Sattabongkot, J., Hall, T., Waters, A.P. y Prasittisuk, Ch.. (1989). Circumsporozoite protein heterogeneity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. Science. 245: 973.
- 150.- Ross,R. (1897). On some peculiar pigmented cells found in two mosquitoes fed on malaria blood. Brit. Med. J. *ii*: 1786.
- 151.- Saul, A., Cooper, J., Ingram, L., Anders, R.F. y Brown, G.V. (1985). Invasion of erythrocytes in vitro by *Plasmodium falciparum* can be inhibited by monoclonal antibodies directed against an S antigen. Parasite Immunol. 7: 587.
- 152.- Schofield., Villaquirian, J., Ferreira, A. y Schelleken, S.H.(1987). Gamma interferon, CD8+ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites. Nature. 330: 664.
- 153.- Shortt, H.E. y Garnham P.C.C. (1948). The pre-erythrocytic development of *Plasmodium cynomolgi* and *Plasmodium vivax*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 41: 785.
- 154.- Schüffner, W.A.P.(1899). Beitrage zur Kenntniss der Malaria. Dtsch. Arch . Clin. Med. 64: 428.

- 155.- Shute, P.G. (1946). Latency and long term relapse in benign tertian malaria. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 4: 189.
- 156.- Stanley, H.A., Howard, R.F. y Reese R.T. (1985). Recognition of a Mr 56 K glycoprotein on the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites by mouse monoclonal antibodies. J. Immunol. 134 (5): 457.
- 157.-Stevenson, M.M. (1989). Malaria: host responses to infection. CRC Press Inc. Boca Ratón, Florida. Prefacio.
- 158.- Stevenson M.M. Genetic Control of host resistance to malaria. (1989). En: Stevenson, M.M. Malaria: host responses to infection. CRC Press. Inc. Boca Raton, Florida. pp 147.
- 159.- Suhrbier, A., Winger, L., O'Dowd, C., Hodivala, K. y Sinden, R.E.(1990). An antigen specific to the liver stage of rodent malaria recognized by a monoclonal antibody. Parasite Immunol. 12: 473.
- 160.- Suhrbier, A. (1991). Immunity to the liver stage of malaria Parasitol. Today. 7 (7): 160.
- 161.- Tanabe, K., Mackay, M., Goman, M. y Scaife, J.G.(1987). Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. J. Mol. Biol. 195: 273.

162.- Tanner, M.J.A. (1983). Erythrocyte membrane structure and function. En: Malaria and the red cell. Pitman, London (Ciba Foundation Symposium 94) pp. 3.

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

164.- Taylor, D.W., Parra, M. y Stearns, S.M.E. (1987). *Plasmodium falciparum*: fine structural changes in the cytoskeletons of infected erythrocytes. Exp. Parasitol. 64: 178.

165.- Terzakis, J.A., Vanderberg, J.P., Foley, D., y Shustak, S. (1979). Exoerythrocytic merozoites of *Plasmodium berghei* in rat hepatic Kupffer cells. J. Protozool. 26: 385.

166.- Towbin, H.T., Stachelin, T. y Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Nat. Acad. Sc.(USA). 76: 4350.

167.- Trager, W. y Jensen J.B. (1976). Human malaria parasites in continuous culture. Science 193 : 673.

167 a.- Trigg, P.I. (1988). Membranes of malaria parasites and host cells: structure and function. En: Wernsdorfer, W.H., Mc Gregor, Sir. I. Malaria principles and practice of malariology. Volume I. Churchill Livingstone, Edinburgh. pp. 132.

168.- Troye-Blomberg, M., Andersson, G., Stoczkowska, M., Shabo, R., Romero, P., Patarroyo, E., Wigzell, H. y Perlmann, P. (1985). Production of IL-2 and IFN γ by T cells from malaria patients in response to *Plasmodium falciparum* or erythrocyte antigens in vitro. J. Immunol. 135: 3498.

169.- Udagama, P.V., David, P.H., Peiris, J.S.M., Ariyaratne, Y.G., Perera, J.L.R.L. y Mendis, K.N. (1987). Demonstration of antigenic polymorphism in *Plasmodium vivax* malaria with a panel of 30 monoclonal antibodies. Infect. Immun. 55: 2604.

170.- Udagama, P.V., Atkinson, C.T., Peiris, J.S.M., David, P.H., Mendis, K.N. y Aikawa, M. (1988). Immunoelectron microscopy of Schüffner's dots in *Plasmodium vivax* infected human erythrocytes. Am. J. Pathol. 131: 48 .

171.- Udagama, P.V., Gamage-Mendis, A.C., David, P.H., Peiris, J.S.M., Perera, K.L.R.L., Mendis, K.N. y Carter, R. (1990). Genetic complexity of *Plasmodium vivax* parasites in individual human infections analyzed with monoclonal antibodies against variant epitopes on a single parasite protein. Am. J. Trop. Med. Hyg. 42 (2): 104.

- 172.- Voller, A. (1976). Enzyme immunoassays for parasitic diseases. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 70: 98.
- 173.- Voller, A. (1976). Serodiagnosis of malaria. En: Cohen. S. y Sadun, E. *Immunology of Parasitic Infections*. Oxford, Blackwell Scientific Publ.
- 174.- Wahlgren, M., Berzins, K., Perlmann, P. y Bjorkman, A. (1983). Characterization of the humoral immune response in *Plasmodium falciparum* malaria. Estimation of antibodies to *Plasmodium falciparum* of human erythrocytes by means of micro ELISA. *Clin. Exp. Immunol.* 54: 127.
- 175.- Walliker, D., Quakyi, I.A., Wellems, T.E., Mc Cutchan, T.F., Szarfman, A., London, W.T., Corcoran, L.M., Burkot, T.R. y Carter, R. (1987). Genetic analysis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science.* 236: 1661.
- 176.- Webster, H.K., Thaithong, S., Pavanand, K., Yongvanitchit, K., Pinswasdi, C. y Boudreau, E.F. (1985). Cloning and characterization of mefloquine resistant *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34: 1022.
- 177.- Weiss, W.R., Sedegan, M., Beaudoin, R.L., Miller, L.H. y Good, M.F. (1988). CD8+T cells (cytotoxic/suppressors) are required for protection in mice immunised with malaria sporozoites. *Proc. Nat. Acad. Sc.(USA).* 85: 573.

178.- Well, R.A., Pavanand, K, Zolyomi, S., Perm-Panich, B. y Mac Dermott, R.P. (1980). Anti-lymphocytotoxic antibodies in sera of Thai adults infected with *Plasmodium falciparum* or *Plasmodium vivax* malaria . Clin. Exp. Immunol. 28: 663.

179.- Wertheimer, S.P. y Barnwell, J.W. (1989). *Plasmodium vivax* interaction with the human Duffy blood group glycoprotein: identification of parasite receptor-like protein. Exp. Parasitol. 69: 340.

180.- Whittle, H.C., Brown, J. y Marsh, K. (1984) T-cell control of Epstein-Barr-virus infected B cells is lost during *Plasmodium falciparum* malaria. Nature. 312: 449.

181.- Wyler, D.J., y Brown, J. (1977) Malaria antigen-specific T-cell responsiveness during infection with *Plasmodium falciparum*. Clin. Exp. Immunol. 29: 401.

182.- Wyler, D.J., (1979). Cellular aspects of immunoregulation in malaria. Bull WHO. 57: 239.

183.- Wyler, D.J. (1990). Immunology of Malaria. En: Modern Parasite Biology Cellular, Immunological, and Molecular Aspects. W.H. Freeman and Company, New York. pp. 157.

184.- Zoulai, M., Druilhe, P., Gentilini, M. y Eyquem, A. (1982). High titres of anti-T antibodies and other haemagglutinins in human malaria. Clin. Exp. Immunol. 50: 86.

185.- Zuckerman, A. (1964). Autoimmunization and other types of indirect damage to host cells as factors in certain protozoan diseases. *Exp. Parasitol.* 15: 138.

186.- Zuckerman, A. (1977). Current status of the immunology of blood and tissue protozoa II. *Plasmodium*. *Exp. Parasitol.* 42: 374.