

Artículos Originales //

Antígenos de *Plasmodium falciparum*, blancos de la respuesta inmunitaria humoral en pacientes tratados con cloroquina

Antigens of Plasmodium falciparum, target of humoral immune response in patients treated with chloroquine

Albina Wide*¹⁻², María Rangel², Jacinta Capaldo², Gabriela Certad³, Rosalba Pabón², Carlos Vásquez⁴, Neuro Galbán⁴, Noraida Zerpa⁵, Irma Rodríguez⁶, Magda Magris⁶ & Oscar Noya¹⁻²

RESUMEN

Se planteó identificar antígenos que pudieran ser reconocidos por los anticuerpos IgG₁ e IgG₃, descritos como protectores en la infección malárica, en personas con respuesta clínica adecuada (RCA) o falla al tratamiento (FT) antimalárico, provenientes de localidades con diferentes grados de endemividad. Se evaluaron por Immunoblotting muestras de sueros de individuos provenientes de tres localidades del Edo. Amazonas (Venezuela): Puerto Ayacucho (Atures), San Juan de Manapiare (Manapiare) y Platanal (Alto Orinoco). La reactividad de IgG, IgG₁ e IgG₃ frente a componentes antigénicos del extracto de *P. falciparum* (FCB₂), permitió identificar un mayor número de moléculas específicas en los pacientes con RCA que en los pacientes con FT. La frecuencia de reconocimiento de polipéptidos fue baja en las tres localidades, algunas moléculas con una frecuencia de reconocimiento igual o mayor al 20% pertenecían a sueros de individuos de las localidades de Puerto Ayacucho y Platanal, ambas con exposición permanente a *P. falciparum*. Dado el reconocimiento de polipéptidos por IgG, IgG₁ e IgG₃ en sueros de pacientes con RCA, estos podrían ser considerados como posibles blancos relevantes de la respuesta inmunológica protectora que coadyuven con el tratamiento antimalárico. Esto contribuiría al desarrollo y diseño de vacunas más efectivas, que prevengan la infección malárica y/o potencien la eficacia a la quimioterapia.

Palabras claves: *Plasmodium falciparum*, Inmunoglobulinas IgG, IgG₁, IgG₃, Falla Terapéutica (FT), Respuesta Clínica Adecuada (RCA), Cloroquina.

SUMMARY

Here we studied the presence of antigens recognized by IgG₁ and IgG₃ antibodies, thought as protective, in patients with adequate clinical response (RCA) or treatment failure (FT), living in areas of different degrees of endemicity. Immunoblotting was evaluated from serum samples of individuals from three locations in the State Amazonas (Venezuela): Puerto Ayacucho (Atures), San Juan de Manapiare (Manapiare) and Pantanal (Alto Orinoco). The reactivity of IgG, IgG₁ and IgG₃ against antigenic components of the extract of *P. falciparum* (FCB₂) identified a greater number of specific molecules in patients with RCA in patients with AFT. The frequency of recognition of polypeptides was low in all three locations, with some molecules having a recognition rate of greater than or equal to 20% sera of individuals belonging to the towns of Puerto Ayacucho and Platanal, both with cases of *P. falciparum*. Given the recognition of polypeptides by IgG, IgG₁ and IgG₃ in sera of patients with RCA, they could be considered as possible targets for relevant protective immune responses that contribute to malaria treatment. This would contribute to the development and design of more effective vaccines that prevent malaria infection and/or enhance the efficacy of chemotherapy.

Key words: *Plasmodium falciparum*, Immunoglobulins IgG, IgG₁, IgG₃, Immunoblotting, Therapeutic Failure (TF), Adequate Clinical Response (ACR), Chloroquine.

¹ Cátedra de Parasitología, Escuela de Medicina "Luis Razetti", Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela.

² Centro de Estudios sobre Malaria, Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios Dr. "Arnoldo Gabaldon" - Ministerio del Poder Popular para la Salud, Caracas, Venezuela.

³ Cátedra de Parasitología, Escuela de Medicina "José María Vargas", Universidad Central de Venezuela.

⁴ Ministerio del Poder Popular para la Salud y Protección Social, Venezuela.

⁵ Fundación Instituto Estudios Avanzados. Centro de Biociencias, Venezuela.

⁶ Centro Amazónico de Investigación y Control de Enfermedades Tropicales (CAICET) Puerto Ayacucho, Estado Amazonas, Venezuela.

*Autor de correspondencia: albinawide@yahoo.com

INTRODUCCIÓN

La respuesta inmunológica en malaria es compleja y específica para cada estadio del parásito. El desarrollo de inmunidad protectora puede ser lento y se evidencia sólo después que el individuo ha sido expuesto a infecciones repetidas a través de los años (Bull & Marsh, 2002). Esto puede reflejar infecciones sucesivas por diferentes aislados del parásito expresando variantes antigénicas y/o clones (Riggione *et al.*, 1996; Hommel & Gilles, 1998; Greenwood, 1999) y a la existencia de mecanismos de evasión de la respuesta inmunológica (Good & Doolan, 1999; Nascutiu, 2002). La inmunidad contra el estadio eritrocítico de *Plasmodium falciparum* está asociada con anticuerpos protectores de ciertas clases y subclases (Taylor *et al.*, 1998; Garraud *et al.*, 2003). Hay evidencias del papel de la inmunoglobulina G (IgG) en la protección contra la malaria, específicamente los isotipos IgG₁ e IgG₃ son considerados citofílicos y protectores contra infecciones por *P. falciparum* (Aucan *et al.*, 2000; Garraud *et al.*, 2003). A pesar de que los anticuerpos son esenciales en la inmunidad, niveles elevados de IgG contra un amplio rango de antígenos de estadios sanguíneos de *P. falciparum* han mostrado ser pobres en la protección clínica (Ferreira *et al.*, 1998; Ndungu *et al.*, 2002). Sin embargo, algunos antígenos de los estadios asexuales sanguíneos de *P. falciparum* inducen, preferencialmente, anticuerpos citofílicos. Uno de ellos el MSP-1 (merozoite surface protein-1) que se asocia con la respuesta de IgG₁ e IgG₃, mientras que el MSP-2 está restringido al estímulo de la síntesis de IgG₃ (Ferreira *et al.*, 1998; Aubouy *et al.*, 2007). Se ha encontrado que individuos con malaria aguda por *P. falciparum* y con inmunoglobulinas IgG anti-RESA (Ring-infected erythrocytes) o anti-GLURP (Glutamate-rich protein) respondieron efectivamente al tratamiento antimalárico, soportando la hipótesis de que la inmunidad adquirida aumenta la eficacia clínica de la terapia con drogas (Mayxay *et al.*, 2001; Enevold *et al.*, 2007). El propósito de este trabajo fue evaluar el patrón de la respuesta de anticuerpos citofílicos antimaláricos e identificar antígenos de *P. falciparum* con potencial valor protector, en base al grado de endemicidad en áreas maláricas del estado Amazonas y al reconocimiento diferencial a la quimioterapia con cloroquina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El trabajo fue realizado en 3 municipios del estado Amazonas, Venezuela, con diferentes patrones

de endemicidad a la malaria: 1. En Átures, en la población de Puerto Ayacucho, considerada como una región hipoendémica. 2. Manapiare, en la población de San Juan de Manapiare donde ocurrió un brote epidémico por *P. falciparum* a finales del año 2000. En esta región el muestreo se llevó a cabo después de haberse aplicado las medidas de control antivectorial. 3. En el Alto Orinoco, en la población de Platanal, donde la transmisión de la malaria es hiperendémica y estable con predominio de parasitemias bajas (Marcano *et al.*, 2004).

Población estudiada

Se evaluaron sueros de pacientes sintomáticos, con infección por *P. falciparum* que habitaban en las comunidades endémicas (San Juan de Manapiare, n=20, edad de 2-66 años; Puerto Ayacucho, n=12, rango de edad de 8-44 años; Platanal, n=10 edad de 7-50 años), divididos en dos grupos de acuerdo a su respuesta al esquema de tratamiento con cloroquina establecido en Venezuela hasta diciembre del año 2002 (OMS/OPS, 1998). Un grupo con respuesta clínica adecuada al tratamiento (RCA) y un grupo con falla terapéutica (FT). Los rangos de parasitemia fueron: San Juan de Manapiare de 500 a 7680 parásitos/ μ L de sangre (\bar{x} =1409); Puerto Ayacucho de 576 a 57692 parásitos/ μ L de sangre (\bar{x} = 11351) y Platanal < 500 parásitos/ μ L de sangre.

En San Juan de Manapiare se encontró que el 93 % presentó RCA, en Puerto Ayacucho el 100% presentó FT y en Platanal el 70% presentó RCA y el 30% FT.

También se incluyó como grupo control, personas sin infección ni antecedentes maláricos (determinado por diagnóstico parasitológico), procedentes de Caracas y habitantes de Puerto Ayacucho.

Fuente de antígeno

El antígeno utilizado consistió de un extracto crudo de glóbulos rojos parasitados con *P. falciparum* (GRP) cepa FCB₂ (sensible a la cloroquina), mantenido en cultivo "in vitro" según la metodología de Trager & Jensen (1976). Los parásitos fueron concentrados mediante gradiente de Percoll al 90% (Kramer *et al.*, 1982; Rivadeneira *et al.*, 1983) y tratados con una solución de lisis (1 mM de PMSF, 1 mM de Iodoacetamida, 1 mM de EDTA y SDS 5%

(p/v) y se centrifugó a 21000 g a 4°C por 10 min, utilizando el sobrenadante como fuente de antígeno (Patarroyo & López, 2002). La concentración de proteínas se determinó mediante el método de ácido bincinonínico (Smith *et al.*, 1985). Se incluyó como control, un extracto de glóbulos rojos sanos (GRS), correspondiente al mismo lote utilizado en el cultivo de *P. falciparum*, a una concentración de 35 µg en total para absorber las reacciones específicas del GRS.

Immunoblotting

El patrón de la respuesta de anticuerpos antimaláricos y la identificación de los antígenos de *P. falciparum* con potencial valor protector se evaluó mediante la técnica de inmunodetección de polipéptidos con los sueros de pacientes tratados con cloroquina (Towbin *et al.*, 1979). Las muestras fueron analizadas frente a un mismo lote de antígeno y los mismos controles negativos y positivos. El extracto crudo de *P. falciparum* fue separado por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones disociantes y reductoras (Laemmli, 1970), transferido a papel de nitrocelulosa y bloqueado con leche descremada al 5% (p/v) en PBS-Tween-20. El marcador de peso molecular utilizado fue el mismo en todos los ensayos. Luego, el papel fue cortado en tiras de 2 mm e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente con los sueros humanos a una dilución de 1:100 para la detección de IgG y 1:50 para IgG₁ e IgG₃. Los sueros humanos fueron previamente incubados con 35 µg en total de glóbulos rojos sanos por 1 hora, debido a que los sueros reconocen a componentes moleculares de glóbulos rojos sanos. Después se lavaron las tiras (3X) con PBS Tween 20 y se incubaron con el anticuerpo antihumano marcado con peroxidasa, IgG dilución de 1:20.000 (Sigma, St. Louis, MO, A-0170), IgG₁ dilución 1:1500 (The binding site, AP006), IgG₃ dilución 1:2000 (The binding site, AP008). Las reacciones fueron reveladas con solución de Luminol (Amersham Life Sciences, UK) y expuestas a una placa fotográfica (ECL-Hyperfilm).

Análisis de datos

La determinación de los pesos moleculares de los polipéptidos se realizó mediante el software Kodak Digital Science™. Para determinar la frecuencia de reconocimiento de los diferentes polipéptidos por las inmunoglobulinas se utilizó el método estadístico de frecuencia relativa porcentual (Camel, 1972).

Consideraciones éticas

Las muestras evaluadas en el estudio se tomaron previo consentimiento informado y antes de iniciar el tratamiento.

RESULTADOS

Patrón de reconocimiento de componentes polipeptídicos de *P. falciparum* por las clases y subclases de inmunoglobulinas (IgG, IgG₁ e IgG₃) de sueros de pacientes provenientes de las localidades de Puerto Ayacucho, San Juan de Manapiare y Platanal.

Puerto Ayacucho

El patrón de reconocimiento de bandas polipeptídicas específicas en el extracto de GRP por IgG consistió de 80 polipéptidos con pesos moleculares entre 11 y 227 kDa, siendo los de 11, 12, 13, 15, 16, 25, 30, 41, 46, 53, 62, 72, 86, 93 y 99 kDa (Fig. 1) los que presentaron una frecuencia de reconocimiento $\geq 20\%$ (Tabla I). La IgG₁ reconoció 44 polipéptidos entre 14 y 233 kDa. Los polipéptidos de 15, 43, 52, 58, 72, 97 y 113 kDa presentaron una frecuencia del 20% (Tabla I). La IgG₃ de los sueros de los pacientes reconoció 47 polipéptidos entre 13 y 118 kDa. Las moléculas de 15, 27, 58, 66, 74 y 99 kDa presentaron una frecuencia $\geq 20\%$ (Tabla I).

Fig. 1. Reconocimiento por Immunoblotting de polipéptidos de *P. falciparum* FCB₂ por IgG₁ de sueros de pacientes, con FT, provenientes de Puerto Ayacucho. cp= Control positivo cn= control negativo cc= Control de conjugado FT= Falla terapéutica.

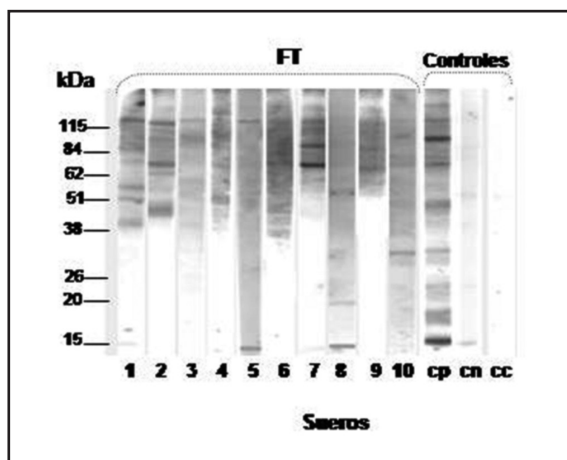
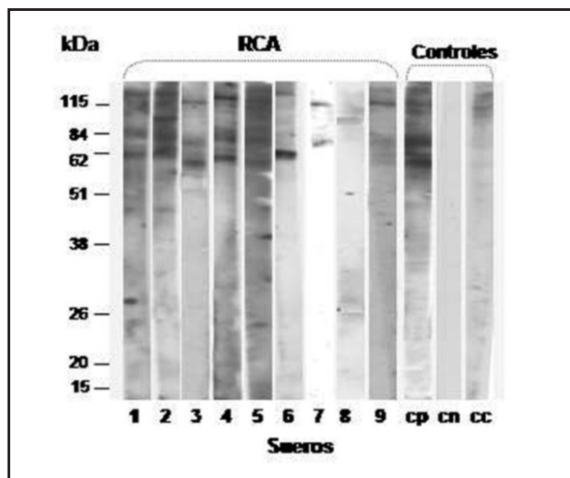


Tabla I. Moléculas polipeptídicas de *P. falciparum* según su peso molecular, reconocidas por IgG, IgG₁ e IgG₃ de sueros de pacientes provenientes de tres localidades del estado Amazonas, Venezuela y según su respuesta al tratamiento (FT y RCA).

		≥ 20 %						≥ 10 %							
		PA		SJM		P		FT		RCA					
IgG	11	48	93	11	48	93	11	48	93	11	48	93	11	48	93
	12	49	97	12	49	97	12	49	97	12	49	97	12	49	97
	13	50	98	13	50	98	13	50	98	13	50	98	13	50	98
	14	52	99	14	52	99	14	52	99	14	52	99	14	52	99
	15	53	100	15	53	100	15	53	100	15	53	100	15	53	100
	16	55	115	16	55	115	16	55	115	16	55	115	16	55	115
	25	61	117	25	61	117	25	61	117	25	61	117	25	61	117
	30	62	122	30	62	122	30	62	122	30	62	122	30	62	122
	38	64	124	38	64	124	38	64	124	38	64	124	38	64	124
	41	66	127	41	66	127	41	66	127	41	66	127	41	66	127
	42	69	130	42	69	130	42	69	130	42	69	130	42	69	130
	43	72	131	43	72	131	43	72	131	43	72	131	43	72	131
	44	77	137	44	77	137	44	77	137	44	77	137	44	77	137
	45	78	138	45	78	138	45	78	138	45	78	138	45	78	138
	46	80	144	46	80	144	46	80	144	46	80	144	46	80	144
47	86	153	47	86	153	47	86	153	47	86	153	47	86	153	
IgG1	15	72	114	15	72	114	15	72	114	15	72	114	15	72	114
	19	73	116	19	73	116	19	73	116	19	73	116	19	73	116
	20	78	119	20	78	119	20	78	119	20	78	119	20	78	119
	43	88	121	43	88	121	43	88	121	43	88	121	43	88	121
	46	97	122	46	97	122	46	97	122	46	97	122	46	97	122
	47	98	123	47	98	123	47	98	123	47	98	123	47	98	123
	52	99	125	52	99	125	52	99	125	52	99	125	52	99	125
	56	101	136	56	101	136	56	101	136	56	101	136	56	101	136
58	110	144	58	110	140	58	110	140	58	110	140	58	110	140	
64	113		64	113		64	113		64	113		64	113		
IgG3	15	35	66	15	35	66	15	35	66	15	35	66	15	35	66
	21	41	74	21	41	74	21	41	74	21	41	74	21	41	74
	24	48	93	24	48	93	24	48	93	24	48	93	24	48	93
	27	58	99	27	58	99	27	58	99	27	58	99	27	58	99
	34			34			34			34			34		

PA: Puerto Ayacucho; SJM: San Juan de Manaoiare; P: Platanal. FT: Falla Terapéutica; RCA: Respuesta Clínica Adecuada al tratamiento.
 Nota: Los números en negrilla indican las moléculas específicas reconocidas por los pacientes.

Fig. 2. Reconocimiento por Inmunoblotting de polipéptidos de *P. falciparum* FCB₂ por IgG₃ de sueros de pacientes, con RCA, provenientes de San Juan de Manapiare. cp= Control positivo, cn= control negativo, cc= Control de conjugado.



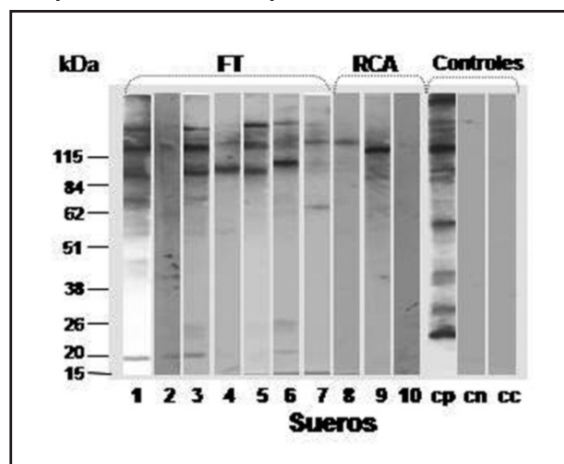
San Juan de Manapiare

El patrón de reconocimiento en el extracto de GRP por IgG consistió de 81 bandas polipeptídicas específicas con pesos moleculares entre 11 y 222 kDa, siendo los de 23, 35, 37, 42, 46, 47, 53, 57, 61, 62, 68, 69, 78, 90, 116 y 148 kDa los que presentaron una frecuencia de reconocimiento $\geq 10\%$ (Fig. 2). Las moléculas de 47 y 78 kDa presentaron frecuencias $\geq 20\%$ (Tabla I). IgG₁ reconoció 61 polipéptidos entre 17 y 176 kDa. Los polipéptidos de 24, 40, 55, 58, 63, 64, 72, 78, 85, 98, 100, 105, 110, 114, 119, 123, 125, 139, 140 y 176 kDa, presentaron una frecuencia $\geq 10\%$, sólo la molécula de 78 kDa tuvo una frecuencia de reconocimiento $\geq 20\%$ (Tabla I). IgG₃ de los sueros de los pacientes reconoció 61 polipéptidos entre 15 y 150 kDa. Las moléculas de 23, 28, 40, 89, 116, 128, 129, 134 y 138 kDa presentaron una frecuencia $\geq 10\%$, ninguna molécula presentó un reconocimiento $\geq 20\%$ (Tabla I).

Platanal

El patrón de reconocimiento de bandas polipeptídicas específicas en el extracto de GRP por IgG consistió de 48 polipéptidos con pesos moleculares entre 17 y 145 kDa, siendo los de 41, 42, 45, 48, 49, 50, 52, 64, 66, 78, 93, 122, 137, 138 y 144 kDa (Fig. 3) los que presentaron una frecuencia de reconocimiento $\geq 20\%$ (Tabla I). IgG₁ reconoció 31 polipéptidos entre 15 y 139 kDa. Los polipéptidos de 15, 19, 56, 73, 98, 99, 101, 121 y

Fig. 3. Reconocimiento por Inmunoblotting de polipéptidos de *P. falciparum* FCB₂ por IgG₁ de sueros de pacientes, con RCA ó FT, provenientes de Platanal. cp= Control positivo, cn= control negativo, cc= Control de conjugado, F.T= Falla terapéutica, RCA= Respuesta Clínica Adecuada.



122 kDa presentaron una frecuencia $\geq 20\%$ (Tabla I). IgG₃ de los sueros de los pacientes reconoció 34 polipéptidos entre 14 y 245 kDa. Las moléculas de 24, 27, 34 y 35 kDa presentaron una frecuencia $\geq 20\%$ (Tabla I).

No se encontraron antígenos con frecuencias de reconocimiento iguales o mayores a 20% que estuviesen presentes en las tres localidades evaluadas. Sólo dos moléculas fueron reconocidas por los sueros provenientes de las comunidades de Puerto Ayacucho y Platanal con una frecuencia de reconocimiento igual o mayor a 20% y correspondieron a los pesos moleculares 41 y 93 kDa (Tabla I).

Patrón de reconocimiento de componentes polipeptídicos de *P. falciparum* por las clases y subclases de inmuoglobulinas (IgG, IgG₁ e IgG₃) de sueros de pacientes con diferentes respuestas al tratamiento con cloroquina.

Se identificaron varios antígenos asociados a la respuesta clínica adecuada (RCA) y a la falla terapéutica (FT) al tratamiento con cloroquina.

En pacientes con respuesta clínica adecuada

La IgG de los sueros de pacientes reconoció 21 polipéptidos específicos con pesos moleculares entre 14 y 153 kDa. La IgG₁ reaccionó con 15 polipéptidos específicos de pesos moleculares entre 20 y 140 kDa.

La IgG₃ reconoció 4 polipéptidos específicos de 21, 24, 48 y 93 kDa. Solo se reportaron aquellos polipéptidos cuya frecuencia de reconocimiento en todos los casos fue mayor al 10% (Tabla II).

En pacientes con falla terapéutica

En los sueros de pacientes con falla terapéutica a la cloroquina se encontró que las inmunoglobulinas reconocieron un número menor de polipéptidos. La IgG reaccionó con 4 polipéptidos específicos con pesos moleculares entre 11 y 44 kDa. La IgG₁ reaccionó con 2 polipéptidos específicos de pesos moleculares 46 y 77 kDa. La IgG₃ reconoció sólo 1 polipéptido específico de 41kDa. Al igual que los pacientes con RCA sólo se tomaron en cuenta aquellos polipéptidos cuyo reconocimiento fue igual o superior al 10%. En ambos grupos de pacientes (FT y RCA) se observó un mayor número de antígenos reconocidos por las inmunoglobulinas IgG e IgG₁ con respecto a IgG₃ (Tabla I). En algunos casos se observó reconocimiento de algunos polipéptidos de GRS por los anticuerpos presentes en los sueros controles negativos (sin episodios maláricos previos), provenientes de las áreas endémicas.

Las moléculas de 11, 38, 41 y 46 kDa fueron reconocidas sólo en el grupo con falla terapéutica. El polipéptido de 38 kDa presentó la mayor frecuencia de reconocimiento (27,27%). Esta molécula resultó específica del parásito al no ser reconocida en el extracto de glóbulos rojos sanos utilizado como control.

Los antígenos de importancia en este estudio son los específicos del glóbulo rojo parasitado con *P. falciparum*, es decir que no están presentes en el glóbulo rojo sano utilizado como control. El patrón de reconocimiento de componentes antigénicos de *P. falciparum* por inmunoglobulinas de sueros de personas con RCA o FT, mediante Immunoblotting se muestra en las Fig. 1, 2 y 3.

DISCUSION

Esta investigación es una de las primeras realizadas en el país enfocadas a identificar antígenos blancos de la respuesta inmunitaria humoral protectora en la infección malárica, que pudieran participar como coadyuvantes en la respuesta al tratamiento y que además pudieran asociarse con el grado de

endemicidad en las diferentes localidades del foco malárico meridional de Venezuela. Aunque la falla terapéutica es multifactorial y depende de la biología del parásito, presencia de genes de resistencia, constitución genética de la población, estacionalidad de la transmisión, del metabolismo y absorción de la droga (Wellems & Plowe, 2001). También se ha determinado que una respuesta inmunitaria protectora preexistente, es uno de los factores fundamentales en la eficacia de la terapia antimalárica (White, 2004). De acuerdo a las regiones evaluadas del Edo. Amazonas, resulta interesante que en este estudio se encontraron diferencias en el patrón y frecuencia de reconocimiento de polipéptidos en el extracto antigénico de una cepa de referencia internacional por las diferentes inmunoglobulinas presentes en los sueros de los pacientes según su proveniencia. Dichas diferencias podrían ser explicadas entre otros factores, por las condiciones epidemiológicas de estas áreas, la constitución genética de la población y por la presencia de diferentes aislados de plasmidios circulando en cada una de estas localidades (lo cual fue confirmado por PCR y secuenciación, datos no publicados). Con respecto a las diferencias poblacionales entre las áreas de estudio, Puerto Ayacucho y San Juan de Manapiare son poblaciones multiétnicas, mientras que la de Platanal está constituida principalmente por la etnia Yanomami. Por otra parte, debido a sus condiciones de vida, la población de Platanal está expuesta a un mayor número de picadas de anofelinos infectados, lo cual aumenta la probabilidad de transmisión de diferentes aislados del parásito en comparación con las otras dos áreas (Magris, 2004; Magris *et al.*, 2007). No obstante, otras investigaciones han revelado que la población de *P. falciparum* del Alto Orinoco tiene poca variabilidad genética (Lasserson *et al.*, 1999; Tami-Hirsch, 1999) En cuanto a las diferencias de la transmisión malárica que pudieran presentarse entre comunidades diferentes, es importante mencionar que algunos autores han planteado que hay variación en los títulos de anticuerpos contra *P. falciparum* de acuerdo con la estacionalidad (Riggione *et al.*, 1996; Perraut *et al.*, 2000). Específicamente, en relación al tipo de malaria que se presenta en las zonas estudiadas, en las regiones de Puerto Ayacucho y San Juan de Manapiare existe una marcada estacionalidad por lo cual la transmisión malárica no es constante. En Platanal la transmisión de paludismo es estable, ocurre durante todo el año debido a la alta pluviosidad en esa región, siendo esta zona holoendémica o hiperendémica según la definición de Bruce-Chwatt (1986). De acuerdo a

esta clasificación, los pobladores de regiones donde ocurre una transmisión perenne desarrollan un considerable grado de respuesta inmunitaria, lo que conlleva a una reducción de la prevalencia malarica y de la morbilidad. Por otro lado, la región de Puerto Ayacucho correspondería a una zona hipoendémica, ya que la transmisión tiene una intensidad variable de acuerdo a las circunstancias de la localidad. Es importante resaltar que estas localidades no se enmarcan estrictamente a las definiciones propuestas por Bruce-Chwatt (1986) (Marcano *et al.*, 2004). Adicionalmente, es fundamental destacar que en la localidad de San Juan de Manapiare se producen circunstancias especiales que lo convierten en una zona de transmisión malarica inestable ya que el momento de toma de las primeras muestras (2001), coincidió con una situación de epidemia por *P. falciparum*, inusual en esa comunidad, puesto que hasta ese momento había venido predominando la infección por *P. vivax*. A partir de esa epidemia se aplicaron medidas anti-vectoriales y tratamiento a la población infectada, lográndose que la transmisión permaneciera esporádica y con una prevalencia muy baja. Este período correspondió con la toma de las restantes muestras de sueros (Certad *et al.*, 2005). Esto contribuiría a explicar el hecho de que la frecuencia de reconocimiento por IgG fuera mayor en los casos de Platanal y Puerto Ayacucho en comparación con la de San Juan de Manapiare ya que como se mencionó anteriormente la adquisición de inmunidad toma años, lo cual ocurre bajo un continuo contacto con el parásito (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 2003). En algunos casos la respuesta inmunológica no sólo se relaciona a un efecto acumulativo asociado a la exposición, sino también a la edad de las personas. En evaluaciones anteriores realizadas por nuestro grupo con las muestras provenientes de San Juan de Manapiare y Puerto Ayacucho, utilizando la técnica de MABA (Noya & Alarcón de Noya, 1998), se encontró que la frecuencia de seropositividad de IgG₃ fue estadísticamente significativa en individuos mayores de 12 años (datos no publicados). Así mismo, en esta investigación se encontraron diferencias en el patrón de respuesta inmunitaria de acuerdo a la respuesta al tratamiento antimalárico. Un mayor número de moléculas antigénicas fueron reconocidas por los pacientes con RCA. Los polipéptidos de 114 -116, 123 - 125 kDa fueron reconocidos tanto por IgG como por IgG₁, siendo los de 124 y 125 kDa equivalentes al peso molecular de la proteína serine repeat antigen (SERA). Igualmente fueron reconocidos polipéptidos de 55-58 kDa que podrían ser equivalentes al fragmento de 56

kDa de la proteína SERA que es conservado entre los aislados y cepas de *P. falciparum*.

Diferentes estudios han descrito que la inmunidad adquirida puede contribuir con la respuesta terapéutica. En Gambia se encontró en un área de alta prevalencia de resistencia a drogas que los anticuerpos anti-MSP-1, estaban asociados con la mejoría clínica y control de la parasitemia en niños con malaria no complicada que habían recibido tratamiento (Pinder *et al.*, 2006). En un estudio realizado en Tanzania se encontró que en niños infectados con *P. falciparum* y con respuesta al tratamiento antimalárico, la prevalencia de anticuerpos IgG anti glutamate rich protein (GLURP) G era significativamente más elevada que en el caso de los niños con falla al tratamiento (Enevold, 2007). Sin embargo, en este estudio las frecuencias de reconocimiento de polipéptidos específicos fueron bajas (aproximadamente 10%), y el número de antígenos con mayor frecuencia de reactividad con las IgG₁ e IgG₃ presentes en los sueros de los pacientes con RCA fue relativamente equivalente a hallazgos anteriores del laboratorio en los cuales no se encontró una asociación significativa entre pacientes con RCA y los anticuerpos protectores IgG₁ e IgG₃ (Wide *et al.*, 2004).

La frecuencia de reconocimiento $\geq 20\%$ de los componentes antigénicos de *P. falciparum* (cepa FCB2), por las inmunoglobulinas asociadas a protección (IgG₁ e IgG₃), pareciera indicar o reafirmar que la protección viene dada por la sumatoria de mecanismos celulares y humorales contra distintos antígenos y no contra un grupo reducido de moléculas. Es decir, que la respuesta exitosa al tratamiento no sólo depende de la respuesta inmunológica humoral sino también de otras vías que involucran al TNF, óxido nítrico y otros radicales libres de manera de contribuir a la eliminación de este protozoario intracelular (Hommel & Gilles, 1998).

En general, la cantidad de polipéptidos reconocidos por IgG₃ fue menor, probablemente debido a la baja avidéz de este isotipo hacia los componentes polipeptídicos presentes en el extracto crudo del plasmodio utilizado (cepa FCB₂), o a las diferencias entre la composición antigénica del aislado responsable de la infección con respecto al antígeno utilizado en el ensayo. Estos resultados podrían también estar influenciados por el tiempo que transcurrió entre el momento en que comenzó la infección, el diagnóstico

y la toma de la muestra de suero, dada la vida media de estos anticuerpos (Nguer *et al.*, 1997).

En general, en esta investigación se encontró un bajo número de polipéptidos reconocidos por las inmunoglobulinas evaluadas. Una posible explicación sería que la expresión de los antígenos maláricos pudiera ser modulada por la variación antigénica de *P. falciparum*, por lo tanto dichos antígenos pueden encontrarse en abundancia en algunas variantes y ausentes en otras (Perraut *et al.*, 2000). Adicionalmente, algunos de los antígenos con bajas frecuencias o ausencia de reconocimiento por las Igs, podrían estar formando complejos inmunes circulantes lo cual impide su detección. Tal es el caso de un fragmento de 11 kDa de PFMSP1, uno de los candidatos para vacunas (Pizarro *et al.*, 2002), de SERA o de EBA175 (Sam-Yellowe, 1993; Jhaveri *et al.*, 1997; Sim, 1998). También el bajo número de polipéptidos reconocidos, pudiera deberse a que algunas moléculas al ser tratadas bajo condiciones reductoras y disociantes hayan perdido su conformación epitópica dejando de ser reconocidas por los anticuerpos.

El reconocimiento inespecífico de algunas moléculas tanto en el extracto de glóbulos rojos parasitados como en el de glóbulos rojos sanos por los diferentes isotipos de inmunoglobulinas de sueros negativos sin episodios maláricos, se explicaría por fenómenos de reactividad cruzada entre moléculas similares a los antígenos de *Plasmodium*, presentes en otros agentes patógenos e incluso entre los anofelinos y los plasmodios, por eventos de autoinmunidad cuya trascendencia es desconocida, ya que se ha observado la presencia de anticuerpos antinucleares en población aparentemente sana (Tan *et al.*, 1997; Daniel-Ribeiro, 2000) o también por un mecanismo de inmunidad innata que sería responsable de inducción de anticuerpos anti-glóbulos rojos sanos (Stevenson & Ridley, 2004), o la presencia de anticuerpos anti-banda 3 oxidada que aparece en los eritrocitos envejecidos y garantizan su eliminación a nivel esplénico (Arese *et al.*, 1991).

Las vacunas antimaláricas en estudio han sido cuestionadas por el hecho de que la adquisición de inmunidad toma muchos años (Noya *et al.*, 1994; Alonso *et al.* 2004; Bermúdez *et al.*, 2007; Lozano & Patarroyo, 2007), lo cual se espera debido a un continuo contacto con el parásito como ocurre en las áreas holo e hiperendémicas. Por otra parte, hay autores que

señalan que esta inmunidad es parcial (no estéril) y de vida corta si el estímulo parasitario no está presente (Carvalho *et al.*, 2002). Sin embargo, aún siendo así, si se indujera una inmunidad parcial que coadyuvara con la quimioterapia, podría minimizarse el problema creciente de la quimioresistencia.

Estos resultados permiten hacer algunas inferencias acerca del patrón de inmunoglobulinas y su posible participación en la respuesta inmunitaria protectora en pacientes tratados con drogas antimaláricas. Asimismo, es necesario ampliar estos estudios tanto en relación al número de pacientes como el tipo de localidades, para confirmar si es sólo el factor endemidad el que condiciona los diferentes patrones de reconocimiento. Obviamente, es necesario llevar a cabo investigaciones dirigidas a la búsqueda de antígenos que actúen como blancos de la respuesta inmunitaria e identificar posibles candidatos que no sólo prevengan la infección sino también que potencien el efecto de los medicamentos antimaláricos. Estas estrategias metodológicas podrían permitir identificar antígenos que, incluidos en una vacuna multi-epitópica, induzcan una inmunidad parcial y coadyuve con la eficacia del tratamiento antimalárico para controlar la infección aún con parásitos resistentes a la quimioterapia en uso.

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a las comunidades de Puerto Ayacucho, San Juan de Manapiare y de Platanal. A los microscopistas Aníbal Carrasquel, Margarita Rodríguez (CAICET-Puerto Ayacucho), Leonel Díaz y Jhon Camico (Zona de Malariología, Región 19, San Juan de Manapiare-Edo. Amazonas). Esta Investigación fue subvencionada por la Gerencia de Investigación Orientada, Agenda Salud, FONACIT, Proyecto N° 98003203 y por el Consejo de Desarrollo Científico Humanístico (CDCH)-(UCV), Proyecto PI-09-00-6470-2006. La presentación de resultados en Congresos nacionales e internacionales fue apoyado por el CDCH-UCV.

REFERENCIAS

Alonso P. L., Sacarlal J., Aponte J. J., Leach A., Macete E., Milman J., et al. (2004). Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet*. **364** (9443): 1411-1420.

- Arese P., Turrini F., Bussolino F., Lutz H. U., Chiu D., Zuo L., *et al.* (1991). Recognition signal for phagocytic removal of falciparum malaria-infected and sickled erythrocytes. *Adv. Exp. Med. Biol.* **307**: 317-327.
- Artavanis-Tsakonas K., Tongren J. E. & Ridley E. M. (2003). The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clin. Exp. Immunol.* **133**: 145-152.
- Aubouy A., Migot-Nabias F. & Deloron P. (2007). Correlations between treatment outcome and both anti-MSP1(19) antibody response and erythrocyte-related genetic factors in *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect. Genet. Evol.* **7**: 147-154.
- Aucan C., Traore Y., Tall F., Nacro B., Traore-Leroux T., Fumoux F. & Rihet P. (2000). High Immunoglobulin G₂ (IgG₂) and low IgG₄ levels are Associated with Resistance to *Plasmodium falciparum*. *Malaria. Infect. Imm.* **68**: 1252-1258.
- Bermúdez A., Reyes C., Guzmán F., Vanegas M., Rosas J., Amador R., *et al.* (2007). Synthetic vaccine update: applying lessons learned from recent SPf66 malarial vaccine physicochemical, structural and immunological characterization. *Vaccine.* **25**: 4487-4501.
- Bruce-Chwatt L. J. (1986). *Essential Malariology*. Chapter 7 pp. 127- 48. 2nd Ed. William Heinemann Medical Book, Ltd. London, U.K.
- Bull P. C. & Marsh K. (2002). The role of antibodies to *Plasmodium falciparum* - infected erythrocyte surface antigens in naturally acquired immunity to malaria. *Trends Microbiol.* **10**: 55-58.
- Camel V. F. (1972). *Estadística Médica*. pp. 131-132. Tomo I. Edit. Consejo de Publicaciones de la Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela.
- Carvalho L. J. M., Daniel – Ribeiro C. T. & Goto H. (2002). Malaria vaccine: candidate antigens, mechanisms, constraints and prospects. *Scand. J. Immunol.* **56**: 327- 343.
- Certad G., Wide A., Rodríguez I., Capaldo J., Zárate M., Galbán N., *et al.* (2005). Respuesta terapéutica y parasitemia en pacientes con malaria por *Plasmodium falciparum* en diferentes comunidades del estado Amazonas, Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* **45**: 19-25.
- Daniel-Ribeiro C. T. (2000). Is there a role for autoimmunity in immune protection against malaria? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **95**: 199 – 207.
- Enevold A., Nkya W. M. M. M., Theisen M., Vestergaard L. S., Jensen A. T. R., Staalsoe T., *et al.* (2007). Potential impact of host immunity on malaria treatment outcome in Tanzanian children infected with *Plasmodium falciparum*. *Malar. J.* **6**: 153.
- Ferreira M. U., Kimura E. A. S. & Katzin A. M. (1998). The IgG subclass distribution of naturally acquired antibodies to *Plasmodium falciparum* in relation to malaria exposure and severity. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **92**: 245- 256.
- Garraud O., Mahanty S. & Perraut R. (2003). Malaria-specific antibody subclasses in immune individuals: a key source of information for vaccine design. *Trends Immunol.* **24**: 30-35.
- Good M. F. & Doolan D. L. (1999). Immune effector mechanisms in malaria. *Curr. Opin. Immunol.* **11**: 412- 419.
- Greenwood B. (1999). What can the residents of malaria endemic countries do to protect themselves? *Parassitologia.* **41**: 295-299.
- Hommel M. & Gilles M. (1998). Malaria. Chapter 20. pp 361-409. En: *Topley and Wilson's. Microbiology and microbial infections. Volumen V: Parasitology*. Cox F. E., Kreier J. P. and Wakelin D. Eds. London, U.K.
- Jhaveri K. N., Ghosh K., Mohanty D., Parmar B. D., Surati R. R., Camoens H. M., Joshi S. H., Iyer Y. S., Desai A. & Badakere S. S. (1997). Autoantibodies, immunoglobulins, complement and circulating immune complexes in acute malaria. *Natl. Med. J. India.* **10**: 5-7.
- Kramer K. L., Kan S. Ch. & Siddiqui W. A. (1982). Concentration of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes by density gradient centrifugation in Percoll. *J. Parasitol.* **68**: 336-337.

- Laemmli U. K. (1970). Clearance of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.
- Lasserson K. F., Petralanda I., Almera R., Barker R. H., Spielman A., Maguire J. H. & Wirth D. F. (1999). Genetic characterization of an epidemic of *Plasmodium falciparum* malaria among Yanomami amerindians. *J. Infect. Dis.* **180**: 2081-5.
- Lozano J. M. & Patarroyo M. E. (2007). A rational strategy for a malarial vaccine development. *Microbes Infect.* **9**: 751-760.
- Magris M. (2004). *Malaria control trial using lambda-dacyhalohrin treated nets in Yanomami communities in Amazonas State, Venezuela*. [Ph.D dissertation] London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, UK.
- Magris M., Rubio - Palis Y., Menares C. & Villegas L. (2007). Vector bionomics and malaria transmission in the Upper Orinoco River, Southern Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **102**: 303 -311.
- Marcano T. J., Morgado A., Tosta C. E. & Rodrigues Coura J. (2004). Cross - Sectional Study Defines Difference in Malaria Morbidity in Two Yanomami Communities on Amazonian Boundary between Brazil and Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **99**: 369- 376.
- Mayxay M., Chotivanich K., Pukrittayakamee S., Newton P., Looareesuwan S. & White N. J. (2001). Contribution of humoral immunity to the therapeutic response in falciparum malaria. *Am. Soc. Trop. Med. Hyg.* **65**: 918-923.
- Nascutiu A. M. (2002). "Hide-and-see as modus vivendi of malaria parasites. *Roum. Arch. Microbiol. Immunol.* **61**: 301- 314.
- Ndungu F. M., Bull P. C., Ross A., Lowe B. S., Kabiru E & Marsh K. (2002). Naturally acquired immunoglobulin (Ig)G subclass antibodies to crude asexual *Plasmodium falciparum* lysates: evidence for association with protection for IgG₁ and disease for IgG₂. *Parasite Immunol.* **24**: 77- 82.
- Nguer C. M., Diallo T. O., Diouf A., Tall A., Duellie A., Perraut R. & Garuad O. (1997). *Plasmodium falciparum* and Merozoite Surface Protein 1 - Specific antibody isotype balance in immune senegalese adults. *Infect. Immun.* **65**: 4873 - 4876.
- Noya O. & Alarcón de Noya B. (1998). The multiple antigen blot assay (MABA): A simple immunoenzymatic technique for simultaneous screening of multiple antigens. *Immunol. Letters.* **63**: 53-56.
- Noya O., Gabaldón Y., Alarcón de Noya B., Borges R., Zerpa N., Urbáez J. D., et al. (1994). A population-based clinical trial with the SPf66 synthetic *Plasmodium falciparum* malaria vaccine in Venezuela. *J. Infec. Dis.* **170**: 396-402.
- OMS/OPS (1998). *Evaluación de la eficacia terapéutica para el tratamiento de la malaria por Plasmodium falciparum sin complicaciones en las Américas*. OMS/OPS/HC/113/98. Geneva, Switzerland.
- Patarroyo M. E. & López O. (2002). *Preparación de antígeno de Plasmodium falciparum*. Fundación Instituto de Inmunología de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Perraut R., Mercereau-Puijalón O., Diouf B., Tall A., Guillote M., Le Scanf C., et al. (2000). Seasonal fluctuation of antibody levels to *Plasmodium falciparum* parasitized red blood cell-associated antigens in two senegalese villages with different transmission conditions. *Am. Trop. Med. Hyg.* **62**: 746-751.
- Pinder M., Sutherland C. J., Sisay-Joof F., Ismaili J., McCall M. B. B., Ord R., et al. (2006). Immunoglobulin G antibodies to Merozoite Surface Antigens are associated with recovery from chloroquine – resistant *Plasmodium falciparum* in Gambian children. *Infect. Immun.* **74**: 2887-2893.
- Pizarro J. C., Chitarra V., Calvet C., Verger D. & Bentley G. A. (2002). Crystalization and preliminary structural analysis of an antibody complex formed with PfMSP1-19, a malaria vaccine candidate. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **58 (Pt 7)**: 1246-1248.
- Riggione F., Pulido M. & Noya O. (1996). *Plasmodium falciparum*: Surface modifications of infected erythrocytes from clinical isolates.

- Evidence of antigenic diversity using Venezuelan human malaria sera. *Parasitol. Res.* **82**: 490- 496.
- Rivadeneira E. N., Wasserman M. & Espinal C. T. (1983). Separation and concentration of schizonts of *Plasmodium falciparum* by Percoll gradients. *J. Protozool.* **30**: 367- 370.
- Sam-Yellowe T. Y. (1993). *Plasmodium falciparum*: analysis of protein-protein interactions of the 140/130/110-kDa rhoptry protein complex using antibody and mouse erythrocyte binding assays. *Exp. Parasitol.* **77**: 174-194.
- Sim B. K. (1998). Delineation of functional regions on *Plasmodium falciparum* EBA - 175 by antibodies eluted from immune complexes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **95**: 183-192.
- Smith P., Krohn R., Hermanson G., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., et al. (1985). Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.* **150**(1): 76-85. Erratum in: *Anal. Biochem.* (1987). **163**: 279.
- Stevenson M. M. & Ridley E. M. (2004). Innate immunity to malaria. *Nature Rev. Immunol.* **4**: 169 -180.
- Tami-Hirsch A. (1999). *Malaria among Yanomami and Yekuana ethnic groups of the Venezuela Amazon. Epidemiology, risk factors and genetic characterisation of Plasmodium falciparum*. PhD. London School of Hygiene and Tropical Medicine. London.
- Tan E. M., Feltkamp T. E. W., Smolen J. S., Butcher B., Dawkins R., Fritzler M. J., et al. (1997). Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. *Arthritis Rheum.* **40**: 1601-1611.
- Taylor R. R, Allen S. J., Greenwood B. M. & Riley E. M. (1998). IgG₃ antibodies to *Plasmodium falciparum* merozoites surface protein 2 (MSPII): Increasing prevalence with age and association with clinical immunity to malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **58**: 406-413.
- Towbin H., Staehelin T. & Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**: 4350-4354.
- Trager W. & Jensen J. B. (1976). Human malaria parasites in continuous culture. *Science.* **193**: 673 -675.
- Wellems T. E. & Plowe C. V. (2001). Chloroquine-resistant malaria. *J. Infect. Dis.* **184**: 770 -776.
- White N. (2004). Antimalarial drug resistance (review). *J. Clin. Invest.* **113**: 1084-1092.
- Wide A., Certad G., Capaldo J., Romero M., Fernández M., Alfonso R., et al. (2004). *Characterization of humoral immunity and its association with the therapeutic response to chloroquine in P. falciparum infection*. Proceedings of the IX European Multicollloquium of Parasitology. Valencia - Spain, July 18-23.

Recibido el 12/09/2010
Aceptado el 02/08/2011

