

ARTICULO ORIGINAL

## Producción y caracterización de un anticuerpo monoclonal que reconoce el fragmento 28-30 kDa de la proteína MSP-1 de *Plasmodium falciparum*

Nina M. Muñoz<sup>1</sup>, Sandra L. Martínez<sup>1</sup>, Enrique Winograd<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Biología Celular, Instituto Nacional de Salud, Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia

<sup>2</sup> Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia

Los merozoítos del parásito *Plasmodium falciparum* contienen en su superficie los fragmentos producidos por el primer procesamiento proteolítico de la proteína MSP-1 (*merozoite surface protein-1*). Dichos fragmentos tienen pesos moleculares relativos aproximados de 83, 42, 38 y 28-30 kDa, respectivamente. En este estudio se describe la producción y caracterización de un anticuerpo monoclonal, denominado 8F4, que reconoce la proteína MSP-1 dadas las siguientes características del antígeno: 1) localización subcelular, 2) peso molecular relativo, 3) período de expresión durante el ciclo eritrocítico, 4) tipo de asociación con la membrana plasmática del parásito y 5) presencia de epítopes compartidos con MSP-1. Adicionalmente, se estableció que 8F4 reconoce el fragmento de 28-30 kDa, producto del primer procesamiento proteolítico de MSP-1. Los análisis realizados permiten confirmar que MSP-1<sub>28-30</sub> no permanece en la superficie del merozoito después de ocurrida la invasión, lo cual sugiere que hace parte del complejo de polipéptidos que es liberado por el merozoito previamente al evento de la invasión. 8F4 es el primer anticuerpo monoclonal reportado hasta el momento que reconoce específicamente este fragmento.

**Palabras clave:** malaria, *Plasmodium falciparum*, MSP-1, anticuerpo monoclonal.

### Production and characterization of a monoclonal antibody that recognizes the fragment of 28-30 kDa of the protein MSP-1 from *Plasmodium falciparum*

Merozoites of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* have on their surface proteolytic processed fragments of MSP-1 (*merozoite surface protein-1*). These fragments have relative molecular weights of approximately 83, 42, 38, 28-30 kDa, respectively. In this study we describe the characterization of a monoclonal antibody, denominated 8F4, that recognizes MSP-1 based upon the following characteristics: 1) subcellular location of the antigen, 2) relative molecular weight, 3) time of expression during the asexual life cycle of the parasite, 4) the association of the protein with the plasma membrane and 5) epitopes shared with MSP-1. In addition, it was found that 8F4 recognizes the 28-30 kDa fragment that arises as a consequence of the first proteolytic processing of MSP-1. The study confirms that such fragment is excluded from the merozoite surface during invasion, suggesting that it makes part of a complex of polypeptides which is released from the merozoite before the invasion process takes place. This is the first report of a monoclonal antibody which specifically recognizes this polypeptide.

**Key Words:** malaria, *Plasmodium falciparum*, MSP-1, monoclonal antibody.

Hace siglos, la malaria fue reconocida como una de las enfermedades parasitarias más importantes

que afectan al género humano y pese a la introducción de programas de control en muchas partes del mundo durante las décadas pasadas, el impacto de esta enfermedad sobre las poblaciones humanas continúa incrementándose. Las estadísticas de la Organización Mundial de la Salud señalan que la malaria es un problema de salud pública en más de 90 países, los cuales

Correspondencia:

E. Winograd, Laboratorio Biología Celular, Instituto Nacional de Salud, Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia.  
email: ewinograd@hemagogus.ins.gov.co.

Recibido: 24/02/00; aceptado: 24/05/00

están habitados por un total de 2.400'000.000 de personas, el 40% de la población mundial. Así mismo, señalan que la prevalencia mundial de la enfermedad se estima en 300 a 500 millones de casos al año y que la mortalidad supera el millón de muertes cada año. La mayoría de tales muertes ocurre en África y afecta especialmente a la población infantil y a las mujeres embarazadas (1).

La proteína de *Plasmodium falciparum*, conocida como MSP-1 (*merozoite surface protein-1*), es una proteína polimórfica cuyo peso molecular relativo varía según las distintas cepas del parásito, desde 185 hasta 205 kDa. MSP-1 es una glicoproteína que se sintetiza durante los estadios tardíos del desarrollo intraeritrocitario del parásito (después de 36 horas); se encuentra en la membrana plasmática de los estadios maduros y en la superficie de los merozoítos liberados después de la ruptura de la célula infectada. Debido a que MSP-1 es una proteína integral de la membrana plasmática del parásito, expuesta completamente al medio extracelular y anclada a la membrana mediante una molécula de GPI, su extracción requiere el uso de detergentes (2,3).

Se ha reportado que durante o inmediatamente después de la liberación de los merozoítos, la MSP-1 es procesada por la acción de una proteasa específica dependiente de serina que genera un complejo de polipéptidos asociados entre sí de forma no covalente (4,5). Dichos fragmentos, se encuentran en la superficie de los merozoítos liberados y tienen pesos moleculares relativos aproximados de 83, 42, 38 y 28-30 kDa, respectivamente. Posteriormente, el extremo C-terminal (MSP-1<sub>42</sub>), sufre un segundo proceso proteolítico para generar dos fragmentos denominados MSP-1<sub>33</sub> y MSP-1<sub>19</sub>. Dentro de su estructura primaria, el fragmento de 19 kDa contiene motivos similares al factor de crecimiento epidérmico (EGF) y debido a que algunas proteínas con estos motivos estructurales actúan como receptores en la interacción de células o participan en fenómenos de adhesión o señalización (4,5), se ha sugerido que MSP-1<sub>19</sub> podría actuar como un receptor y que la función de la proteólisis es exponer un dominio que se requiere para la invasión de nuevos glóbulos rojos.

MSP-1 ha sido ampliamente estudiado debido a que es un antígeno del parásito ampliamente reconocido por pacientes con malaria, lo cual indica que gran parte de la respuesta inmune está dirigida hacia este antígeno y los diversos fragmentos que se generan a partir de éste (5-7). Adicionalmente, se ha comprobado que los anticuerpos dirigidos contra uno de sus fragmentos, MSP-1<sub>19</sub>, son capaces de inhibir la invasión de los eritrocitos *in vitro* (8), reafirmando así la importancia del papel desempeñado por dicho fragmento en el proceso de invasión de los eritrocitos (9-11).

En este estudio se caracterizó un anticuerpo monoclonal que reconoce MSP-1 y uno de sus fragmentos conocido como MSP-1<sub>28-30</sub>. Mediante la evidencia obtenida en este trabajo, fue posible confirmar que tal fragmento no permanece en la superficie del merozoíto después de ocurrir la invasión y que posiblemente hace parte del complejo de polipéptidos que es liberado del merozoíto al medio extracelular antes que el parásito penetre la célula hospedera.

## Materiales y métodos

### **Cultivo de parásitos y producción del anticuerpo monoclonal 8F4**

Se cultivaron parásitos de la cepa colombiana FCB-1 de *P. falciparum* según el método de Trager y Jensen (12). El cultivo se sincronizó mediante flotación en gelatina (13), seguido por lisis osmótica de las formas maduras de los parásitos por exposición a una solución 5% D-sorbitol (14). La producción del anticuerpo monoclonal se realizó de acuerdo con la descripción realizada por Winograd y Sherman (15). Se aisló la línea de hibridomas denominada 8F4 y se determinó que el isotipo del anticuerpo por estas células es IgM al utilizar un estuche de isotipificación (Gibco/BRL).

### **Inmunofluorescencia indirecta**

Los ensayos de inmunofluorescencia indirecta para determinar la localización subcelular de la proteína reconocida por el anticuerpo 8F4, así como su período de expresión durante el ciclo eritrocítico de *P. falciparum*, se realizaron en láminas multipozos *Cell-Line*. 20µl de una suspensión al

0,5% (v/v) de eritrocitos infectados en medio de cultivo se colocaron en cada uno de los pozos de una lámina; después de cinco minutos, el exceso de líquido se retiró y las láminas se secaron en cámara de flujo laminar durante dos horas. La muestra de cada pozo se incubó con 15  $\mu$ l de sobrenadante de cultivo de hibridomas durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las láminas se lavaron tres veces con PBS y, posteriormente, las muestras se incubaron con una antiinmoglobulina de ratón (contra cadena pesada y liviana) conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Gibco/BRL). Después de 30 minutos de incubación, las láminas se lavaron de la forma ya descrita y se montaron con glicerol al 90% para ser observadas bajo un microscopio Zeiss de fluorescencia.

#### **Extracción e identificación de antígenos del parásito**

La fracción enriquecida de eritrocitos infectados con parásitos maduros, producto de la separación en gelatina, se lavó tres veces con PBSi (10 mM de solución amortiguadora de fosfatos de sodio, pH 7,40, 0,145 M NaCl e inhibidores de proteasas: 0,5  $\mu$ g/ml de leupeptina, 0,5 M EDTA, 0,2  $\mu$ g/ml de pepstatina A, 200  $\mu$ M PMSF a 4 °C). Posteriormente, los eritrocitos se lisaron con 20 volúmenes de la solución hipotónica 5P8i (5 mM solución amortiguadora de fosfatos de sodio, pH 8,0 con inhibidores de proteasas) durante cinco minutos a 4 °C. Después de centrifugar la muestra a 30.000 g por 20 minutos, el sobrenadante se removió y el sedimento se dividió en cuatro fracciones, cada una de las cuales se sometió a extracción con una de las siguientes soluciones: 1) 1% Tritón X-100 en PBS, pH 7,40, 2) 3 M KCl en PBS, pH 7,40, 3) solución acuosa 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 11,5. Las extracciones se realizaron a 4 °C en presencia de inhibidores de proteasas en las concentraciones anteriormente indicadas. Después de 30 minutos de extracción, las muestras se centrifugaron a 30.000 g por 30 minutos y tanto el sedimento como el sobrenadante se trataron con solución muestra de Laemmli (16) y, finalmente, se sometieron a ebullición durante cinco minutos. Los polipéptidos se resolvieron en geles de poliácridamida del 8% y se transfirieron electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa. La

detección de los antígenos solubles e insolubles en cada uno de los tratamientos de extracción se realizó mediante la reacción inmunológica con el anticuerpo monoclonal 8F4. Como control, se emplearon muestras de eritrocitos no infectados que se procesaron de manera idéntica.

#### **Expresión del antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal 8F4 durante el ciclo eritrocítico del parásito**

Para determinar el período de expresión del antígeno reconocido por el monoclonal 8F4 durante el ciclo eritrocítico o asexual del parásito, se obtuvo una fracción enriquecida con eritrocitos infectados con parásitos maduros mediante flotación en gelatina. Dichos parásitos se cultivaron en condiciones normales; después de seis horas, las formas maduras que aún permanecían en el cultivo se lisaron por exposición a sorbitol. Se tomaron muestras de los parásitos sincrónicos en diferentes etapas del desarrollo: anillos de 0-6 h, anillos de 12-18 h, trofozoítos de 24-30 h, trofozoítos de 32-38 h, esquizontes de 40-46 h y anillos de 0-6 h del siguiente ciclo; la reactividad de los antígenos presentes en cada una de estas fases se probó con el anticuerpo 8F4 mediante *immunoblot* e inmunofluorescencia indirecta.

#### **Inmunoprecipitación**

Con el objeto de determinar si el monoclonal 8F4 reconoce epitopes presentes en la proteína MSP-1 de *P. falciparum*, se realizaron experimentos de inmunoprecipitación. Se lisaron osmóticamente eritrocitos infectados con parásitos altamente sincrónicos, de 38 a 42 horas de edad, y se trataron con una solución 1% Tritón X-100 en PBSi como se explicó con anterioridad. Dicho extracto se utilizó en una reacción de inmunoprecipitación con el anticuerpo monoclonal 8F4 o con un suero polivalente de conejo contra MSP-1, facilitado amablemente por el doctor Anthony Holder, del *National Institute of Medical Research*, Mill Hill, Londres.

Como control de la inmunoprecipitación con el monoclonal 8F4, se utilizó una muestra de líquido ascítico del clón NS-1 (Sigma), que corresponde a un fluido ascítico de ratones Balb/c portadores de mielomas de la línea NS-1. Como control negativo de la inmunoprecipitación con el suero

polivalente anti-MSP-1, se empleó un suero de conejo no inmunizado.

Los antígenos inmunoprecipitados se identificaron mediante *immunoblots*, utilizando el anticuerpo monoclonal 8F4 o, alternativamente, el suero policlonal contra MSP-1.

#### **Obtención de merozoítos libres**

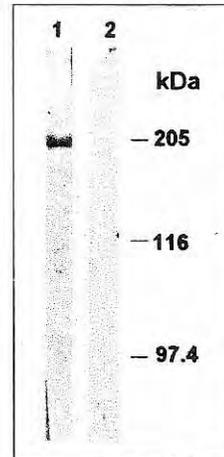
Para establecer si el anticuerpo 8F4 puede reconocer algún antígeno presente en merozoítos libres, se obtuvieron dichas formas del parásito mediante modificación del método expuesto por Freeman y Holder en 1983 (17).

El método consiste en tratar los eritrocitos con tripsina con el fin de degradar los receptores necesarios para la interacción eritrocito-merozoíto previa a la invasión; de esa forma, los merozoítos que permanecen extracelularmente se aíslan del sobrenadante libres de los eritrocitos no infectados. En este caso, los eritrocitos se incubaron con diez volúmenes de una solución de 1mg/ml de tripsina en RPMI 1640 + 5% NaHCO<sub>3</sub>, durante una hora a 37 °C. Posteriormente, se lavaron tres veces con RPMI 1640 + 5% NaHCO<sub>3</sub> y se adicionaron a parásitos altamente sincrónicos. En cuanto comenzó la liberación de los merozoítos, el cultivo se centrifugó a 550 g por cinco minutos con el objeto de remover tanto eritrocitos infectados como los no infectados; el sobrenadante que contenía los merozoítos libres se removió y centrifugó a 3.000 g por diez minutos. Los merozoítos se prepararon para la electroforesis como se describió anteriormente. Los antígenos reconocidos por el anticuerpo 8F4 se detectaron mediante *immunoblot*.

### **Resultados**

#### **Especificidad del anticuerpo monoclonal 8F4**

Mediante *immunoblots* realizados con extractos de proteínas de eritrocitos infectados, se estableció que el anticuerpo monoclonal reconoce un antígeno de 200 kDa, aproximadamente, presente en las muestras que contienen eritrocitos infectados con trofozoítos maduros y esquizontes (figura 1, carril 1). El hecho que 8F4 no reconozca ninguna proteína en muestras de eritrocitos no infectados sugiere que el antígeno de 200 kDa es de origen parasitario (figura 1, carril 2).



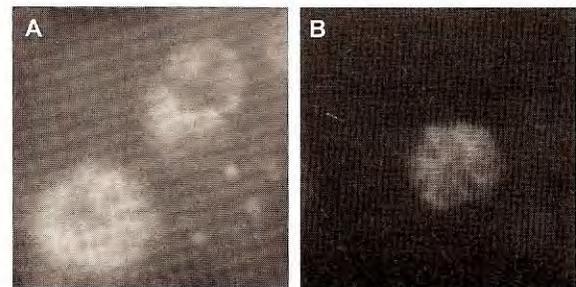
**Figura 1.** Especificidad del anticuerpo monoclonal 8F4; en las muestras con trofozoítos maduros y esquizontes (carril 1), el anticuerpo reconoce una proteína de 200 kDa; en los extractos de eritrocitos normales, 8F4 no reconoce ningún polipéptido (carril 2); se señalan los marcadores de peso molecular.

#### **Localización subcelular del antígeno reconocido por 8F4**

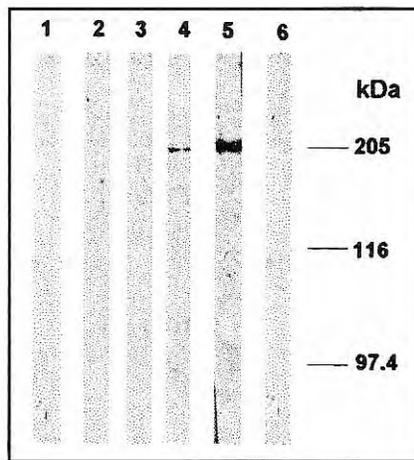
Las pruebas de inmunofluorescencia indirecta permitieron determinar que el antígeno reconocido por el anticuerpo 8F4 se encuentra localizado en la membrana plasmática del parásito cuando éste se encuentra en la fase de trofozoíto maduro (figura 2A). Una vez ocurre el proceso de esquizogonia (después de 40 horas de desarrollo), el antígeno se localiza en la membrana plasmática de cada uno de los merozoítos (figura 2B). El antígeno permanece en la membrana de los merozoítos cuando éstos son liberados (figura 2A) y desaparece en los anillos del siguiente ciclo.

#### **Expresión del antígeno durante el ciclo eritrocítico del parásito**

Con el objeto de evaluar la expresión del antígeno durante el ciclo asexual del parásito, se emplearon



**Figura 2.** Ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI). Localización subcelular de la proteína de *P. falciparum* reconocida por el anticuerpo monoclonal 8F4. A) La proteína se encuentra en la membrana plasmática de los trofozoítos y de merozoítos libres; B) en el esquizonte se localiza en la membrana de cada uno de los merozoítos que lo componen.

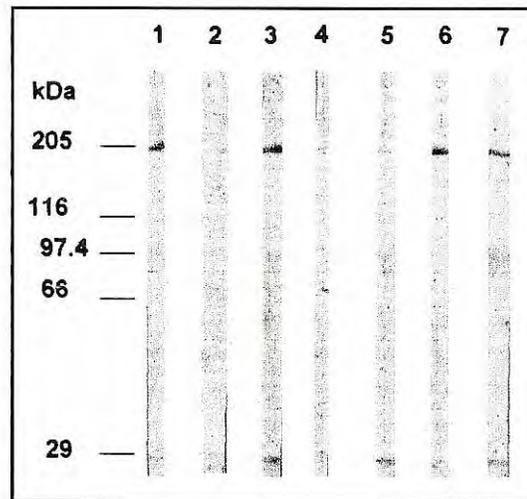


**Figura 3.** Expresión de la proteína reconocida por el anticuerpo monoclonal 8F4 durante el ciclo eritrocítico de *P. falciparum*: carril 1, anillos de 0-6 h; carril 2, anillos de 12-18 h; carril 3, trofozoítos de 24-30 h; carril 4, trofozoítos de 32-38 h; carril 5, esquizontes de 40-46 h; carril 6, anillos de 0-6 h del siguiente ciclo; se encuentran señalados los marcadores de peso molecular.

muestras de parásitos en diferentes fases de desarrollo. Los resultados (figura 3) muestran que la proteína reconocida por 8F4 se expresa desde las 32 horas de desarrollo intraeritrocítico del parásito (carril 4), que tiene una máxima expresión durante la esquizogonia (carril 5) y que el antígeno no está presente en los anillos del siguiente ciclo asexual (carril 6). De tal forma, se logró establecer que la proteína reconocida por 8F4 sólo se expresa en etapas tardías del desarrollo intraeritrocítico del parásito.

**Solubilidad del antígeno**

Se utilizaron varios tratamientos para establecer el tipo de interacciones que intervienen en la asociación del antígeno con la superficie del parásito. Como se observa en la figura 4, se encontró que el antígeno es altamente insoluble bajo condiciones de alta fuerza iónica (3 M KCl, carriles 1 y 2) o en una solución con un pH altamente alcalino (0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 11,5, carriles 3 y 4); sin embargo, el antígeno puede ser extraído cuantitativamente cuando el tratamiento se realiza con una solución de 1% Tritón X-100 en PBS, pH 7,40 (carriles 5 y 6). Estos resultados en conjunto indican que el antígeno reconocido por 8F4 se



**Figura 4.** Solubilidad de la proteína reconocida por el anticuerpo monoclonal 8F4 en distintas soluciones; extracción con 3 M KCl en PBS, pH 7,4: carril 1, sedimento; carril 2, sobrenadante; extracción con 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 11,5: carril 3, sedimento; carril 4, sobrenadante; extracción con 1% Tritón X-100 en PBS, pH 7,40; carril 5, sedimento; carril 6, sobrenadante; carril 7, control, eritrocitos infectados con esquizontes sin tratamiento de extracción. Se encuentran señalados los marcadores de peso molecular.

comporta como una proteína integral de la membrana.

Los resultados anteriores sugieren que el anticuerpo monoclonal 8F4 reconoce la proteína de *P. falciparum* denominada MSP-1. Esta suposición está basada en que MSP-1 es una proteína de 185-205 kDa que se expresa después de 36 horas de desarrollo y que se encuentra anclada a la membrana plasmática del parásito mediante una molécula de GPI (2,3).

Considerando lo anterior, se realizó un experimento de inmunoprecipitación con el objeto de determinar si la proteína reconocida por 8F4 y MSP-1 están inmunológicamente relacionadas.

**Inmunoprecipitación**

Siguiendo el procedimiento expuesto en la sección de materiales y métodos, se realizó un experimento de inmunoprecipitación utilizando el monoclonal 8F4 y la reactividad de los antígenos resultantes con el suero polivalente contra MSP-1, se evaluó mediante un *immunoblot*.

De forma similar, se realizó una inmunoprecipitación con el suero polivalente contra MSP-1,

y se realizó un *immunoblot* con el anticuerpo monoclonal 8F4.

Como se observa en el carril 1 de la figura 5, una proteína de 200 kDa es reconocida por el suero inmune contra MSP-1, cuando la inmunoprecipitación se efectúa con el anticuerpo monoclonal 8F4. De manera análoga (carril 2), la proteína de alto peso molecular inmunoprecipitada por el suero anti-MSP-1 es reconocida por el monoclonal 8F4. En los carriles 3 y 4 (figura 5) se muestran los controles positivos para este experimento: en el carril 3 se observa que la proteína de 200 kDa inmunoprecipitada por el anticuerpo monoclonal 8F4 es reconocida por el mismo en el *immunoblot*. Por otro lado, en el carril 4 se observa que la proteína MSP-1 inmunoprecipitada por el suero es reconocida por el mismo en el *immunoblot*. En los carriles 5 y 6 se aprecian los controles negativos: en el carril 5 se demuestra que el anticuerpo monoclonal 8F4 no reconoce proteínas de 200 kDa cuando la inmunoprecipitación se realiza con el fluido ascítico control; y, en el carril 6, que el suero anti-MSP-1 no reconoce antígenos de 200 kDa cuando las proteínas son inmunoprecipitadas con suero de un conejo no inmunizado.

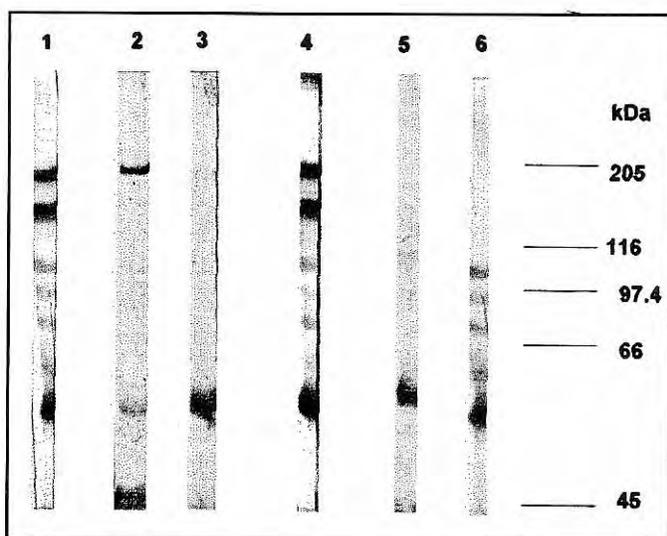
De esta manera, se comprobó que el suero contra MSP-1 reconoce la proteína inmunoprecipitada por 8F4 y que el anticuerpo monoclonal 8F4 reconoce la proteína inmunoprecipitada por el suero.

Hay que resaltar que la mayor intensidad en las reacciones con el suero polivalente contra MSP-1 (figura 5, carriles 1, 4 y 6) se puede deber a que el suero utilizado, siendo una preparación policlonal, reconoce un mayor número de epítopes dando lugar a una mayor afinidad por MSP-1 con respecto al hibridoma. Por otra parte, hay que anotar que las bandas con pesos inferiores a 190 kDa pueden corresponder a las cadenas livianas y pesadas de las inmunoglobulinas utilizadas en el proceso de inmunoprecipitación, las cuales son reconocidas por el anticuerpo secundario que se emplea para detectar la reacción en el *immunoblot*.

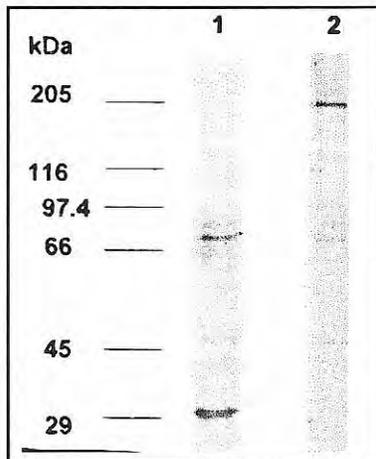
Teniendo en cuenta que MSP-1 sufre un procesamiento proteolítico después de ocurrida la liberación de los merozoítos (2,3), se diseñó el siguiente experimento con el objeto de determinar cuál de estos fragmentos es reconocido por el anticuerpo monoclonal 8F4.

#### **Reacción del anticuerpo monoclonal 8F4 con proteínas de los merozoítos libres**

Realizada la recolección de los merozoítos libres mediante la tripsinización de los eritrocitos del cultivo, se determinó, por medio de *immunoblot*, que el anticuerpo 8F4 reconoce en los merozoítos un fragmento cuyo peso molecular relativo fue estimado en 30 kDa, aproximadamente (figura 6, carril 1). Se observó también una reacción débil con fragmentos de mayor peso molecular que



**Figura 5.** Inmunoprecipitación de proteínas de *P. falciparum* empleando el anticuerpo monoclonal 8F4 y un suero polivalente específico contra MSP-1: carril 1: la proteína de 200 kDa precipitada por el anticuerpo monoclonal 8F4 es reconocida en el *immunoblot* por el suero contra MSP-1; carril 2: MSP-1, precipitada por el suero, es reconocida por 8F4 en el *immunoblot*; carril 3: proteína inmunoprecipitada por 8F4 reconocida en el *blot* por el mismo 8F4; carril 4: MSP-1, precipitada por el suero; reconocida en el *immunoblot* por el mismo suero; carril 5: proteínas inmunoprecipitadas por el fluido ascítico control, en reacción con 8F4 en el *immunoblot*; carril 6: proteínas inmunoprecipitadas por el suero de conejo no inmunizado en reacción con el suero en el *immunoblot*. Los marcadores de peso molecular se encuentran señalados.



**Figura 6.** Reacción del anticuerpo monoclonal 8F4 con proteínas del merozoito de *P. falciparum*; carril 1: en un extracto de proteínas totales de merozoito, el anticuerpo 8F4 reconoce un fragmento de 28-30 kDa; este fragmento es producto de la proteólisis que sufre MSP-1 durante o después de la liberación de los merozoitos; carril 2: control: en un extracto de proteínas de esquizontes a partir de los cuales se obtuvieron los merozoitos libres, el monoclonal 8F4 reconoce el precursor de 200 kDa. Los marcadores de peso molecular se encuentran señalados.

posiblemente correspondan a fragmentos intermedios del procesamiento del precursor de 200 kDa.

### Discusión

En este estudio se caracterizó un anticuerpo monoclonal que reconoce una proteína de 200 kDa presente en eritrocitos infectados con *P. falciparum*. Con el objeto de establecer la identidad del antígeno, se realizaron pruebas para determinar la localización subcelular, el peso molecular relativo y el período del ciclo eritrocítico durante el cual se expresa.

Características tales como el patrón de fluorescencia limitado a la membrana plasmática de los trofozoitos maduros así como de los merozoitos; el peso molecular relativo de 200 kDa, aproximadamente, y el hecho de ser una proteína integral de la membrana del parásito, llevaron a plantear que la proteína reconocida por el anticuerpo monoclonal 8F4 posiblemente correspondiera a la proteína de *P. falciparum* conocida como MSP-1.

Considerando que las propiedades de las dos proteínas son similares, se realizaron inmunoprecipitaciones con el anticuerpo 8F4 y con un suero polivalente específico contra MSP-1. En estos ensayos, se encontró que las dos proteínas comparten epítopes y, por tanto, están relacionadas inmunológicamente.

Para determinar con mayor certeza que 8F4 reconoce MSP-1 fue necesario investigar si el antígeno reconocido por 8F4 sufre un procesamiento similar al de MSP-1 y, además, establecer cuál de los fragmentos producto de la proteólisis del precursor de 200 kDa es reconocido por el anticuerpo monoclonal. Los *immunoblots* realizados con las muestras de proteínas de los merozoitos mostraron que el anticuerpo 8F4 reconoce un fragmento de 28-30 kDa descrito en la literatura como producto del primer proceso proteolítico que sufre el precursor de alto peso molecular.

También se demostró mediante pruebas de inmunofluorescencia e *immunoblots*, que el fragmento conocido como MSP-1<sub>28-30</sub>, efectivamente es liberado de la superficie del merozoito después de la invasión del eritrocito ya que no es detectado por el anticuerpo 8F4 en eritrocitos infectados con formas jóvenes del parásito.

Aunque la función exacta de MSP-1 y su procesamiento es desconocida, anticuerpos altamente específicos, como el anticuerpo monoclonal 8F4, podrían ser de gran valor para elucidar la importancia de esta molécula en la biología del parásito o en la interacción de éste con la célula hospedera. Por ejemplo, se sabe que el suero de pacientes con malaria contiene inmunoglobulinas que pueden inhibir la dispersión de merozoitos a través de la interacción con diferentes regiones de MSP-1 (18). Sería importante evaluar si el anticuerpo monoclonal reportado en este estudio tiene la capacidad de interferir con la infección de eritrocitos mediante la formación de complejos inmunes de merozoitos.

### Agradecimientos

Este estudio fue financiado por el Instituto Nacional de Salud, el BID y por Colciencias (proyecto código 2104-05-018-97).

## Referencias

1. WHO Information, 1998. <http://www.who.int/inf-fs/en/fact094.html>
2. **Holder A, Blackman M, Burghaus P, Chappel J, Ling I, McCallum N, et al.** A malaria merozoite surface protein (MSP-1)-structure, processing and function. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 1992;87(Suppl. III):31-42.
3. **Blackman M, Heidrich H, Donachie S, McBride J, Holder A.** A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is target of invasion-inhibiting antibodies. J Exp Med 1990;172:379-82.
4. **Blackman M, Ling I, Nicholls S, Holder A.** Proteolytic processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 produces a membrane-bound fragment containing two epidermal growth factor-like domains. Mol Biochem Parasitol 1992;49:29-34.
5. **Morgan W, Birdsall B, Frenkiel T, Gradwell M, Burghaus P, Syed S, et al.** Solution structure of an EFG module pair from the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1. J Mol Biol 1999;289:113-22.
6. **Holder A, Freeman R.** Biosynthesis and processing of a *Plasmodium falciparum* schizont antigen recognized by immune serum and a monoclonal antibody. J Exp Med 1982;156:1528-38.
7. **Holder A, Freeman R.** The three major antigens on the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites are derived from a single high molecular weight precursor. J Exp Med 1984;160:624-9.
8. **Chang S, Gibson H, Lee-Ng C, Barr P, Hui G.** A carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* gp195 expressed by recombinant Baculovirus induces antibodies that completely inhibit parasite growth. J Immunol 1992;149:548-55.
9. **Chappel J, Holder A.** Monoclonal antibodies that inhibit *Plasmodium falciparum* invasion *in vitro* recognize the first growth factor-like domain of merozoite surface protein-1. Mol Biochem Parasitol 1993;60:803-11.
10. **Shai S, Blackman M, Holder A.** Epitopes in the 19kDa fragment of the *Plasmodium falciparum* major merozoite surface protein-1 (PfMSP-1<sub>19</sub>) recognized by human antibodies. Parasite Immunol 1995;17:269-75.
11. **Patiño J, Holder A, McBride J, Blackman M.** Antibodies that inhibit malaria merozoite surface protein-1 processing and erythrocyte invasion are blocked by naturally acquired human antibodies. J Exp Med 1997;186:1689-99.
12. **Trager W, Jensen J.** Human malaria parasites in continuous culture. Science 1975;193:673-5.
13. **Jensen J.** Concentration from continuous culture of erythrocytes infected with trophozoites and schizonts of *Plasmodium falciparum*. Am J Trop Med Hyg 1978;27:1274-6.
14. **Lambros C, Vandenberg J.** Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. J Parasitol 1979;65:418-20.
15. **Winograd E, Sherman I.** Characterization of a modified red cell membrane protein expressed on erythrocytes infected with the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: possible role as a cytoadherent mediating protein. J Cell Biol 1989;108:23-30.
16. **Laemmli U.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-5.
17. **Freeman R, Holder A.** Surface antigens of malaria merozoites. A high molecular weight precursor is processed to an 83,000 mol wt form expressed on the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites. J Exp Med 1983;158:1647-53.
18. **Lyon J, Carter J, Thomas A, Chulay J.** Merozoite surface protein-1 epitopes recognized by antibodies that inhibit *Plasmodium falciparum* merozoite dispersal. Mol Biochem Parasitol 1997; 90: 223-34.