

ARTICULOS ORIGINALES

## ANALISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL A *Plasmodium falciparum* EN PERSONAS PROTEGIDAS Y NO PROTEGIDAS

MARTHA LUCIA MORENO S.\*, LUIS LEONARDO URREA A.\*\* , MOISES WASSERMAN L.\*

En este trabajo se buscaron diferencias en los patrones de reconocimiento de proteínas de *Plasmodium falciparum* por anticuerpos de pacientes con distintos grados de inmunidad protectora. Evaluamos 50 sueros provenientes de un área hiperendémica, de personas que mostraron un grado de protección, 50 sueros de personas no protegidas que sufrían infecciones activas y 30 sueros de personas que nunca tuvieron malaria. Los anticuerpos se estudiaron por los métodos de inmunoprecipitación y de inmunotransferencia, y se buscó presencia o ausencia de cada banda en alguno de los grupos.

Se encontró un nivel de anticuerpos más alto y un patrón de reconocimiento más complejo en los sueros de personas no protegidas. Sólo un anticuerpo, que reconoce una proteína de 99 kDa, y que fue encontrado en el 40% de las personas protegidas parece tener alguna relación (aunque débil) con protección. Nuestros resultados sugieren que la respuesta inmune humoral es más un indicativo de una infección reciente que de un estado de protección.

### INTRODUCCION

Es importante para el conocimiento de la malaria, el estudio de la relación entre respuesta inmune mediada por anticuerpos y el grado de protección en un individuo. Experimentos de transferencia pasiva de IgG de sueros inmunes a individuos infectados que produjeron una fuerte disminución en sus parasitemias, es evidencia concluyente de que hay anticuerpos específicos que juegan un papel importante en la resistencia del hombre al desarrollo del *Plasmodium falciparum* (1).

REESE (2) propone la existencia de dos puntos en el ciclo asexual que son potencialmente atacables por

el sistema inmune humoral: el primer punto es el eritrocito parasitado. Durante la maduración dentro del glóbulo rojo, el *P. falciparum* altera la membrana del eritrocito creando estructuras inmunogénicas a las cuales tanto humanos como monos responden con anticuerpos. El segundo punto por el cual el ciclo asexual eritrocítico puede ser interrumpido por la respuesta inmune es el estadio de merozoíto. Los anticuerpos se unen a la superficie del merozoíto e inhiben la reinvasión.

Para buscar diferencias claras en la respuesta a proteínas antigénicas específicas entre sueros de personas con diferente grado de inmunidad, se utilizaron en este trabajo las técnicas de inmunoprecipitación e inmunotransferencia.

\* Grupo de Bioquímica, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, COLOMBIA.

\*\*Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, COLOMBIA.

## MATERIALES Y METODOS

### 1. Cultivo del parásito

Todo el trabajo experimental se realizó con la cepa colombiana FCB-2 (3). Los parásitos se cultivaron según el método de Trager y Jensen (4, 5) en una suspensión de eritrocitos humanos tipo 0 al 5% v/v en medio RPMI-1640 (SIGMA Co) suplementado con suero humano al 10%, hipoxantina 0.02 mM, glutatión reducido 1 mg/l, HEPES 25 mM, bicarbonato de sodio 32 mM y gentamicina 50 mg/l. El cultivo se mantuvo a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> 5%, O<sub>2</sub> 5% y N<sub>2</sub> 90%.

### 2. Sincronización de cultivo

El cultivo del parásito que crece asincrónicamente se sincronizó con sorbitol al 5% (6) cuando su parasitemia en anillos fue de 3% o más.

### 3. Concentración de esquizontes

Se realizó por el procedimiento descrito por Rivadeneira y Col. (7) cuando el cultivo tuvo una parasitemia en esquizontes superior al 5% utilizando Percoll (PHARMACIA) al 90% en buffer salino pH 7.4 (HBS).

### 4. Obtención de antígeno

Los esquizontes obtenidos se trataron con un volumen igual de saponina al 0.1% en HBS. El antígeno crudo obtenido fue almacenado a -20°C y periódicamente extraído antes de su uso con Triton X-100 al 2% en HBS.

### 5. Marcación de cultivo

Se preparó un medio libre de metionina, el cual después de ser evaluado en cultivo se utilizó suplementado con suero humano al 10%, bicarbonato de sodio 32 mM, glutatión 1 mg/l y <sup>35</sup>S-metionina (25 μCi/ml, actividad específica 1300 Ci/mmol) sobre cultivo sincronizado permitiéndose la marcación durante todo el ciclo del parásito. Los esquizontes fueron concentrados con Percoll al 90%, lisados con saponina y extraídos con Triton X-100 al 2% en HBS.

### 6. Clasificación de sueros

Los sueros fueron clasificados de acuerdo con su historia clínica, así:

- a) sueros de pacientes protegidos (P): De personas residentes en un área endémica (Tumaco e Industrias PROPAL) que tienen anticuerpos contra *P. falciparum* y que en el último año no han sufrido la enfermedad, y sueros de *Aotus trivirgatus* que fueron inmunizados en el laboratorio con merozoítos y posteriormente resistieron un reto.
- b) Sueros de pacientes no protegidos (NP): En general de personas que han sido remitidas al INS con síntomas de la enfermedad y con presencia de parásitos en sangre periférica.
- c. Sueros controles (C): de personas que no han estado nunca enfermas de malaria.

### 7. Electroforesis

Se realizaron en geles de poliacrilamida de 1.5 mm de espesor. El gel separador fue de T= 7.5% y C= 2.7%, en buffer Tris-HCl 0.37 M pH 8.8, SDS 0.1%; y el gel concentrador de T= 4% y C= 2.7% en buffer Tris-HCl 0.12 M pH 6.8, SDS 0.1%. Se empleó como buffer de corrida Tris 0.025 M/0.2 M de glicina y SDS 0.1%.

Las muestras fueron tratadas previamente con buffer Tris-HCl 0.12 M pH 6.8, 4% SDS, 10% β-mercaptoetanol y glicerol al 20% a 45°C durante 15 minutos y posteriormente a 92°C durante 5 minutos.

Las electroforesis se corrieron a 20 mA hasta que las muestras sobrepasaron el gel concentrador y a 60 mA durante 3 horas.

Con excepción de los geles que se transfirieron, la tinción se realizó sumergiendo el gel en una solución al 0.03% de azul de Comassie en ácido acético 10% e isopropanol 10% durante la noche, decolorando posteriormente en la misma solución sin colorante y secando por calor y vacío sobre papel whatman 3 mm.

### 8. Inmunotransferencia

El antígeno no marcado fue separado por PAGE-SDS y transferido a membrana de nitrocelulosa durante 3 horas a 0.5 A.

La membrana fue bloqueada para prevenir uniones no específicas de proteínas del suero con PBS-Tween 20 0.5% y albúmina bovina 2 mg/ml durante 1 hora

a 37°C e incubada con los sueros de interés en dilución 1:200 en PBS-Tween 20 0.5% Triton X-100, SDS 0.02% y albúmina bovina 1 mg/ml con agitación a 4°C durante la noche. Las membranas se lavaron con PBS-Tween-Triton durante 15 minutos (3 veces) después de lo cual fueron incubadas con IgG de cabra anti-IgG humano conjugada con fosfatasa alcalina en dilución 1:2000 4 horas a 4°C (en PBS-Tween-Triton X-100). El complejo fue revelado con Azul de nitrotetrazolium (NBT) y 5-bromo, 4-cloro 3-indolilfosfato (BCIP).

### 9. Inmunoprecipitación

Una cantidad de antígeno marcado equivalente a  $4 \times 10^6$  dpm fue incubada con 10  $\mu$ l de suero en 0.4 ml de HBS durante 30 minutos a temperatura ambiente y toda la noche a 4°C. Se agregaron 35  $\mu$ l de inmunoprecipitina 10% (BRL) y se incubó 30 minutos a 37°C.

Se hicieron entonces 3 lavados con 10 ml de buffer Tris-HCl pH 8.3 centrifugando a 500xg. El precipitado fue tratado posteriormente con 50  $\mu$ l de buffer muestra para PAGE-SDS.

Una vez corrida la electroforesis y fijadas las proteínas el gel fue incubado con ENHANCER (AMERSHAM) por dos horas a temperatura ambiente, se secó por calor y vacío y se dejó expuesto en fluorografía con película Hyperfilm- $\beta$ max durante 5 días.

### RESULTADOS

Se llevaron a cabo inmunotransferencias (figura 1) e inmunoprecipitaciones (figura 2) para 30 sueros controles, 51 de pacientes que tienen anticuerpos contra la malaria pero no están protegidos y 47 de individuos que tienen evidencias de estar protegidos (ver clasificación de sueros en Materiales y Métodos).

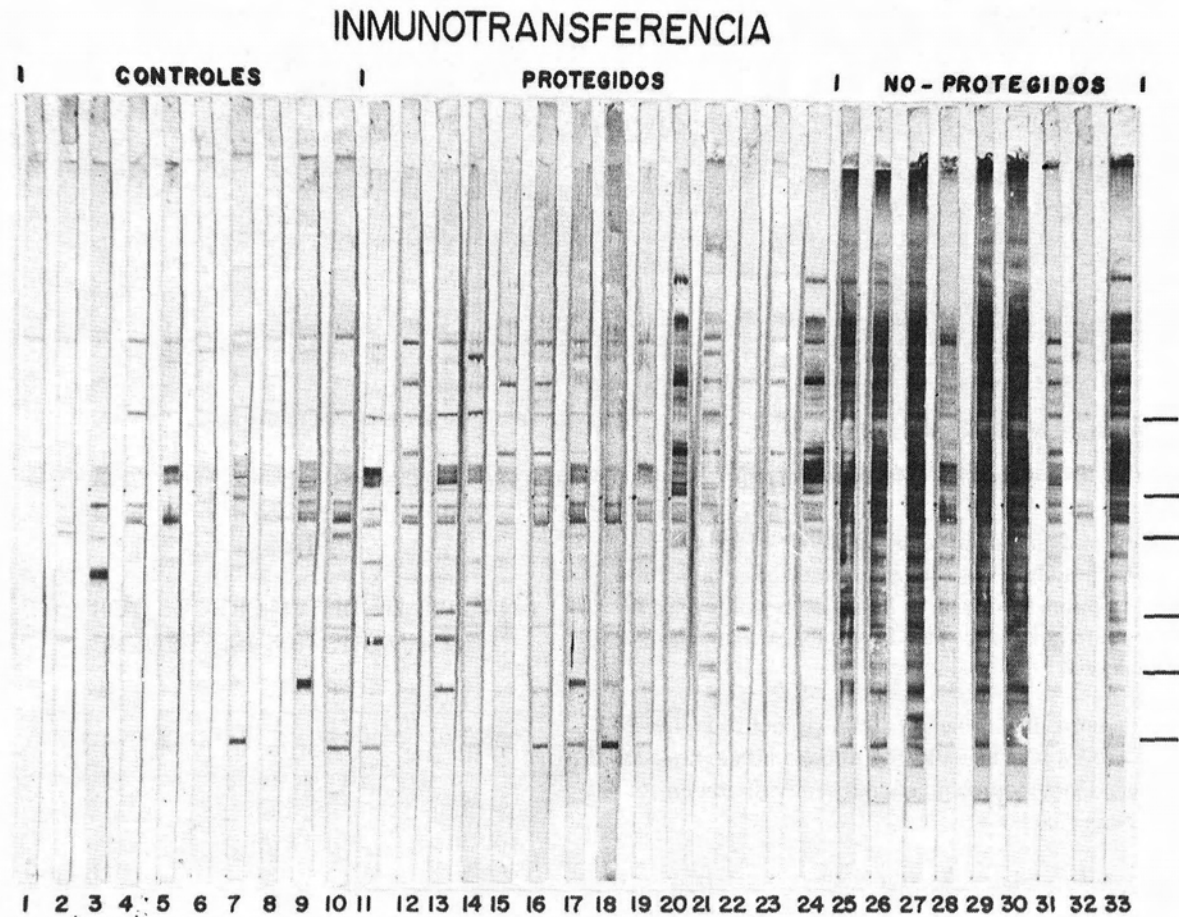


Figura 1. Inmunotransferencia de sueros representativos de los 3 grupos (controles, protegidos y no protegidos).

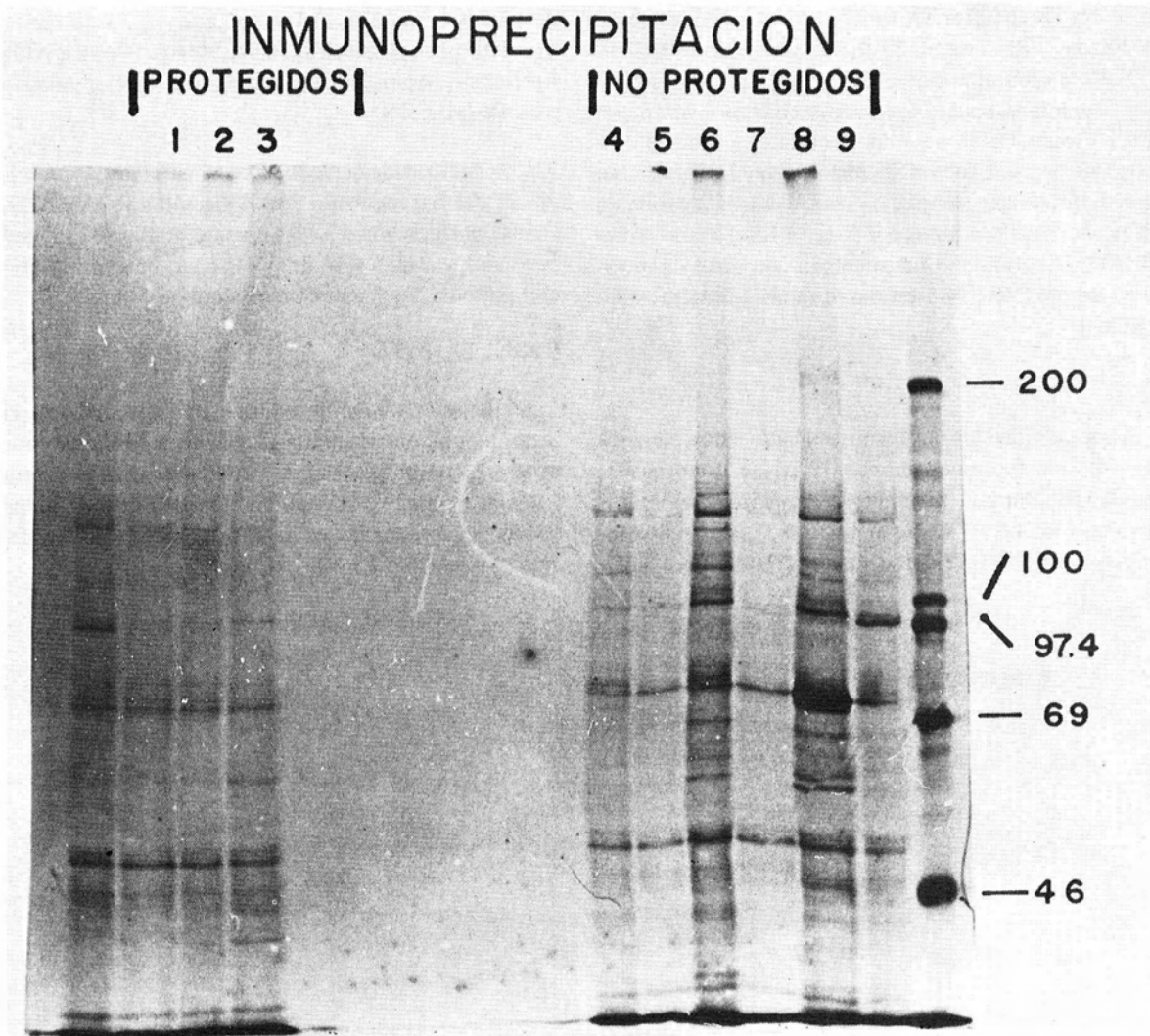


Figura 2. Inmunoprecipitación de sueros representativos de los 3 grupos (controles, protegidos y no protegidos).

Para cada uno de los experimentos se hizo una gráfica de movilidad vs. logaritmo del peso molecular de los patrones utilizados. Sobre estas gráficas se hicieron interpolaciones para las bandas reconocidas por cada suero.

Se analizó la desviación estándar para cada uno de los patrones y de acuerdo con esto las inmunotransferencias e inmunoprecipitaciones se dividieron en cuatro zonas (Tablas 1 y 2).

A cada banda se le asignó un valor relativo de acuerdo a su intensidad: 1 para baja intensidad, 2 para media intensidad y 3 alta intensidad.

TABLA 1

ANALISIS DE DESVIACION ESTANDAR EN INMUNOTRANSFERENCIA

Zona (Kd)	Desv. Est. (Kd)	Ventana (Kd)
> 100	± 1.50	3.0
100-50	± 0.75	1.5
50-30	± 0.50	1.0
< 30	± 1.50	3.0



**TABLA 2**  
**ANALISIS DE DESVIACION ESTANDAR EN INMUNOPRECIPITACION**

Zona (Kd)	Desv. Est. (Kd)	Ventana (Kd)
> 100	± 2.0	4.0
100-85	± 0.75	1.5
85-65	± 0.50	1.0
< 65	± 0.75	1.5

Con estos datos fue alimentado un microprocesador y con un programa de análisis de datos se obtuvo la frecuencia con la que aparece cada banda con una determinada intensidad en los tres grupos.

Para analizar si las diferencias en presencia o en intensidad de una determinada banda son debidas a la diferencia en estatus inmune o si se puede atribuir al azar se recurrió a la prueba estadística chi cuadrado.

Se consideraron cuatro hipótesis, de acuerdo con el diagrama de la figura 3:

1. Hay reacción cruzada si los tres grupos son estadísticamente iguales en cuanto a presencia con una certeza dada (90 ó 95%).
2. Se trata de una respuesta irrelevante si habiendo diferencias en presencia o en intensidad entre los tres grupos, los grupos de individuos protegidos y no protegidos son estadísticamente iguales en cuanto a presencia e intensidad.

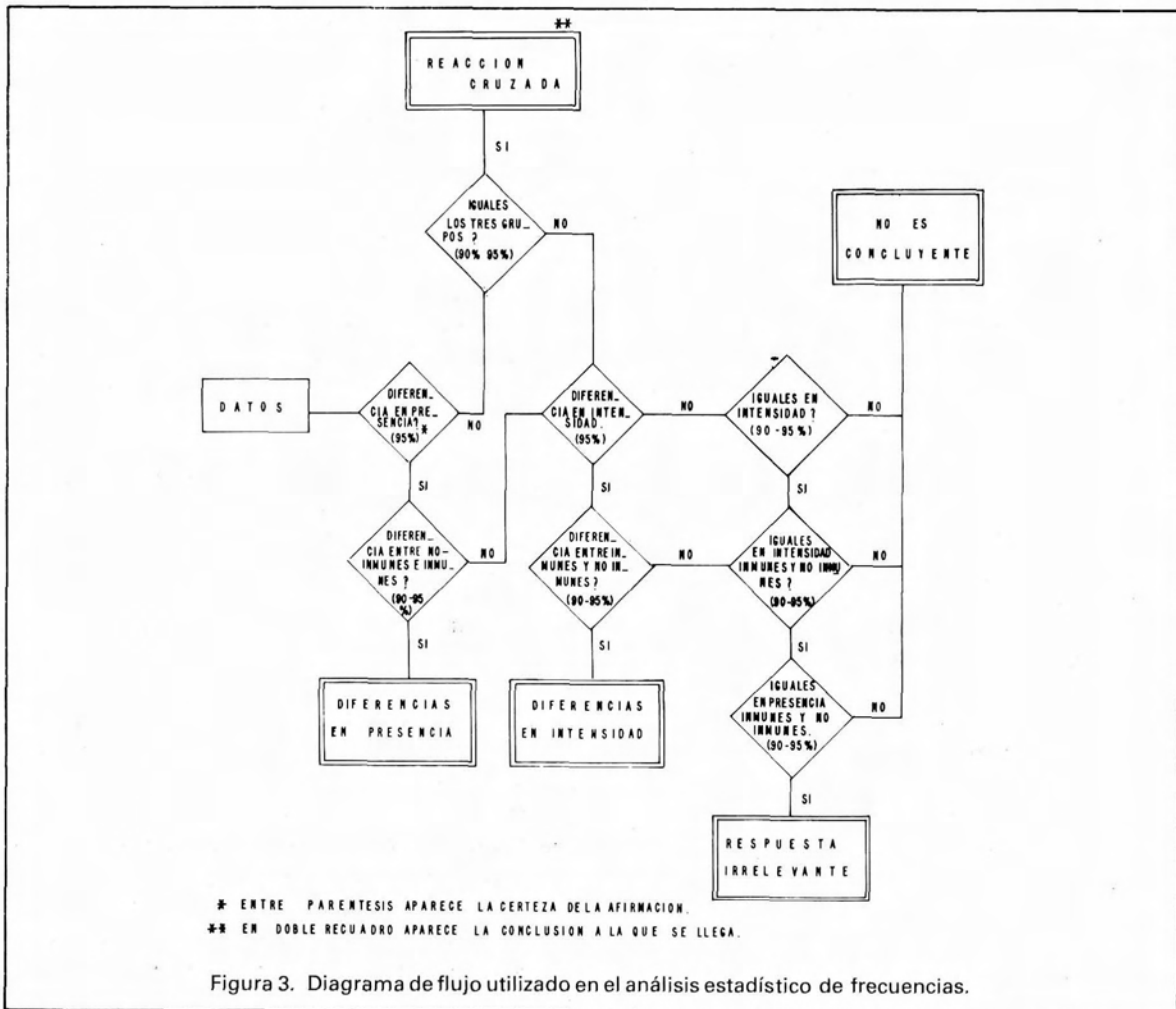


Figura 3. Diagrama de flujo utilizado en el análisis estadístico de frecuencias.

3. Existen diferencias en presencia.

4. Existen diferencias en intensidad.

Este análisis fue aplicado a las bandas que aparecieron con una frecuencia mayor del 60% y del 40%.

En inmunotransferencia aparecen con mayor frecuencia en el grupo de los no protegidos las bandas de 33, 35, 42, 45, 48, 50, 51, 54, 76.5 y 165 Kd y con mayor frecuencia con intensidad alta las de 27, 70.5, 73.5, 111, 114, 117 y 123 Kd. En el 60% o más de estos sueros se encuentran las de 27, 42, 45, 51, 54, 70.5 y 73.5 Kd. Existe tan sólo una banda, las de 99 Kd, con mayor frecuencia en el grupo de los protegidos (habitantes de un área endémica que no han presentado la enfermedad en el último año) que en el grupo de los no protegidos (Tabla 3). Estadísticamente puede afirmarse que esta diferencia es debida al estatus inmune, es decir, está relacionada con la inmunidad protectora. Esta banda estuvo presente en el 42.5% de los sueros de este grupo.

TABLA 3

ANALISIS ESTADISTICO PARA BANDAS CON FRECUENCIA MAYOR DEL 60% EN INMUNOTRANSFERENCIA

Banda	Conclusión	Certeza
27	Aparece con mayor intensidad en el grupo de los no protegidos	95%
42	Aparece con mayor frecuencia en el grupo de los no protegidos	95%
45	Aparece con mayor frecuencia en el grupo de los no protegidos	95%
51	Aparece con mayor frecuencia en el grupo de los no protegidos	95%
54	Aparece con mayor frecuencia en el grupo de los no protegidos	95%
64.5	No concluyente	
70.5	Aparece con mayor intensidad en el grupo de los no protegidos	95%
73.5	Aparece con mayor intensidad en el grupo de los no protegidos	95%
90	No concluyente	
144	No concluyente	

TABLA 4

ANALISIS ESTADISTICO PARA BANDAS CON FRECUENCIA MAYOR DEL 60% EN INMUNOPRECIPITACION

Banda	Conclusión	Certeza
31.5	Artefacto del sistema	
43.5	Aparece con mayor intensidad en el grupo de los no protegidos	95%
48	Artefacto del sistema	95%
49.5	Aparece con mayor frecuencia en el grupo de los no protegidos	95%
58.5	Aparece con mayor frecuencia en el grupo de los no protegidos	95%
75	Artefacto del sistema	
78	Aparece con mayor frecuencia en el grupo de los no protegidos	95%
97.5	Aparece con mayor frecuencia en el grupo de los no protegidos	95%
136	Aparece con mayor frecuencia en el grupo de los no protegidos	95%

Por la técnica de inmunoprecipitación se detectan con mayor frecuencia en el grupo de los no protegidos las bandas de 33, 39, 49.5, 58.5, 71, 78, 97.5, 108, 136 y 144 Kd, y con mayor frecuencia con intensidad alta la banda de 43.5 Kd. Las bandas 43.5, 49.5, 58.5, 78, 97.5 y 136 Kd estuvieron en el 60% o más (Tabla 4).

Mediante esta técnica no fue posible detectar anticuerpos relacionables con inmunidad protectora.

DISCUSION

Los resultados del análisis de sueros por inmunotransferencia muestran en forma contundente una mayor respuesta de anticuerpos en aquellos individuos catalogados como no protegidos (habitantes de un área endémica que presentan la infección). Este resultado está de acuerdo con lo encontrado por autores como Abele et al, (8, 9) que muestran que las infecciones con *P. falciparum* causan un marcado incremento en la concentración de inmunoglobulinas del suero. Cohen et al, (1) encuentran que en individuos que habitan en un área holoendémica la velocidad con que se sintetiza IgG es siete veces mayor que en individuos sanos.

La mayor frecuencia e intensidad de bandas en suero de individuos no protegidos se explicaría por las siguientes consideraciones: existe una activación de anticuerpos específicos contra proteínas internas y externas del parásito que sin embargo, no conlleva protección. Hay además una activación policlonal general, es decir, una alta producción de anticuerpos con una baja especificidad que induce un estado inmune de baja responsividad (10, 11, 12). En inmunotransferencia, lo anterior se ve reforzado por el hecho de que los antígenos transferidos están expuestos directamente a todos los anticuerpos del suero, lo que facilita la detección de reacciones cruzadas y de otras de baja afinidad.

En inmunoprecipitación, aunque se observa el mismo comportamiento, la cantidad de bandas es menor posiblemente debido a que, por las características mismas de la técnica, sólo reacciones inmunológicas estables son reconocidas. Además, la marcación se hace con <sup>35</sup>S-metionina por la detección de cada una de las bandas depende de su contenido en este aminoácido.

Dentro del grupo de los protegidos se encuentran cuatro sueros de *Aotus trivirgatus* inmunizados en laboratorio. La inmunización se logra después de varios retos con el parásito en los cuales se llega a parasitemias relativamente altas (cerca del 30%). Tales parasitemias inducen respuestas inmunes masivas de las cuales puede decirse que contienen anticuerpos relevantes en protección. Esto explica que su patrón de anticuerpos sea diferente al de sueros de individuos protegidos y no protegidos. Una observación interesante es que la banda de 99 Kd, que parece estar relacionada con protección, se encuentra en todos ellos.

En este tipo de análisis debe hacerse las siguientes consideraciones:

a) No hay información sobre la cepa o cepas de *P. falciparum* que causaron la infección en los individuos examinados. La variación en los organismos infectantes podría explicar parcialmente la variabilidad de la respuesta inmune. No obstante, es de anotar que muchos autores han coincidido en afirmar que la inmunidad protectora trasciende tanto la variación fenotípica como la diversidad genotípica del parásito (2, 9). La experiencia misma nos

muestra que, a pesar de que en un área holoendémica existan distintas cepas, los individuos inmunes lo son a todas ellas.

Hasta el momento la naturaleza de esta inmunidad trascendente no ha sido explicada. En cualquier caso, existen componentes inmunológicos importantes que hacen parte de todas las cepas y son capaces de inducir protección (2).

b) No es posible saber en qué punto del desarrollo de la infección fueron tomadas las muestras ni especular sobre el fin de ésta si los pacientes no hubiesen sido tratados. Esto constituye una incertidumbre al hacer comparaciones entre los patrones de anticuerpos de diferentes sueros.

c) La reacción de un antígeno con un anticuerpo no garantiza que el anticuerpo sea funcional (ya que la interacción puede ser con un determinante irrelevante), ni que el anticuerpo esté dirigido contra dicho antígeno porque pueden ocurrir fenómenos de coprecipitación y de reacción cruzada.

d) Por las características mismas de las técnicas sólo las inmunoglobulinas de tipo G son detectadas y, a pesar de que éstas tienen la propiedad de inhibir el crecimiento *in vitro* del parásito y que son las más importantes en la respuesta inmune, otras inmunoglobulinas podrían jugar algún papel en la protección hasta ahora no definido.

De cualquier manera, a partir de estos resultados se puede afirmar que en serología el nivel de anticuerpos indica, más que el grado de protección del individuo, que tan reciente ha sido la infección. Se puede afirmar también que hay una diferencia clara entre inmunidad humoral y protección. Así, en los individuos considerados como no protegidos hay una alta respuesta de este tipo pero ésta obviamente es irrelevante para la protección.

Druihe & Khusmith (13), Celada et al. (33), Brown et al. (9) y Perrin & Dayal (10), entre otros, han mostrado la importancia de la inmunidad mediada por células en la protección y relación con anticuerpos específicos que reconocerían a los eritrocitos infectados y a los merozoítos que serán luego fagocitados por monocitos y macrófagos. Estos anticuerpos podrían estar enmascarados por respuestas más intensas de los anticuerpos señalados acá.

## CONCLUSIONES

Durante la infección con *P. falciparum*, hay una activación policlonal general de baja responsividad que se manifiesta en una mayor respuesta de anticuerpos en individuos no protegidos.

En inmunotransferencia se revela una banda de 99 Kd que podría relacionarse con inmunidad protectora. Esta banda se observa también en el suero de los cuatro *Aotus trivirgatus* inmunizados.

Por inmunoprecipitación no fue posible detectar anticuerpos relacionables con inmunidad protectora.

Los resultados están subordinados a factores como selectividad de los sistemas de inmunosorción y revelado, variaciones antigénicas debidas a cultivo in vitro por largo tiempo o a la variabilidad fenotípica y genotípica propia del parásito, y fenómenos concomitantes como reacciones cruzadas, uniones inespecíficas, etc.

El nivel de anticuerpos indica, más que el grado de protección del individuo, qué tan reciente ha sido la infección.

En estos experimentos no se observa una relación directa entre inmunidad humoral y protección.

La protección podría estar relacionada más directamente con la inmunidad celular.

## SUMMARY

We searched for differences in the pattern of recognition of *Plasmodium falciparum* proteins in sera from patients with diverse immunity degrees. We evaluated both by immunoprecipitation and by immunoblotting 50 sera from an endemic area, obtained from persons showing some degree of protection; 50 sera from infected individuals and 30 sera from persons who were never exposed to malaria.

A higher level of antibodies and a more complex pattern of recognitions was found with sera from unprotected patients.

Only one antibody, which recognized a 99 kDa protein and which was present in 40% of the protected persons was related with protection (although only mildly). Our results suggest that the humoral immune response against malaria is an indicative of a recent infection rather than of a protective immune state.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por JICA (Japan International Cooperation Agency) y por el Fondo Colombiano de Investigaciones Científicas "Francisco José de Caldas" COLCIENCIAS. Los autores agradecen al doctor Sócrates Herrera de la Universidad del Valle por el suministro de sueros provenientes de un área endémica (Tumaco e Industrias Propal).

## BIBLIOGRAFIA

1. Cohen S, Mcgregor I, Carrington S. Gammaglobulin and acquired immunity to human malaria. *Nature* 1961; 192: 733-737.
2. Reese R. et al. Reaction of immune sera with components of the human malarial parasite, *P. falciparum* *Am J Trop Med Hyg.* 1981; 30 (6): 1168-1178.
3. Espinal C, Moreno E, Guerra P, De la Vega P. Aislamiento y caracterización de cepas colombianas de *Plasmodium falciparum* *Biomédica*, 2, 1982; 118-128.
4. Trager W, Jensen JB. Cultivation of malarial parasites. *Nature*, 1978; 273, 621-622.
5. Trager W, Jensen JB. Cultivation of malarial parasites in continuous culture. *Science*. 1976; 193, 673-675.
6. Lambros & Vanderberg. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol*, 1979; 65, 418-420.
7. Rivadeneira E, Wasserman M. & Espinal C. Separation and concentration of schizonts of *Plasmodium falciparum* by Percoll gradients. *J Parasitol* 1983; 30, 37-370.
8. Abele et al. Alterations in serum proteins and 19S antibody production during the course of induced malarial infections in man. *Am J Trop Med Hyg* 1965; 14: 191-197.
9. Brown K, Berzins K, Jarra W, Schetters T. Immune responses to erythrocytic malaria. *Clin Immunol Aller*, 1986; (6), 1: 227-249.
10. Perrin L, Dayal R. Immunity to asexual erythrocytic stages of *P. falciparum*. Role of defined antibodies in the humoral response. *Immunol Rev* 1982; 61: 245-269.
11. Salaman MH, Wedderburn N. The immunodepressive effects of murine *Plasmodium* and its interactions with murine oncogenic viruses. *J Gen Microbiol* 1969; 59: 383.
12. Wyler DJ. Cellular aspects of immunoregulation in malaria. *Bull. WHO.* 1979; 57 (suppl. 1) 239.
13. Druilhe P, Khusmith S. Epidemiological correlation between levels of antibodies promoting merozoite phagocytosis of *P. falciparum* and malaria immune status. *Infect Immun* 1987; 55, 4 888-891.
14. Celada A, et al. Phagocytosis of *Plasmodium falciparum* parasitized erythrocytes by human polymorphonuclear leukocytes. *J Parasitol.* 1983; 69, 1: 49-53.