



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

CITOADHERENCIA EN ERITROCITOS
INFECTADOS CON CEPAS DE
PLASMODIUM FALCIPARUM NATIVAS
DE LA AMAZONÍA PERUANA
PORTADORAS DE DIVERSOS
GENOTIPOS HRP2/HRP3

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOQUÍMICA Y
BIOLOGÍA MOLECULAR

RONALD SIXTO BAUTISTA GOMEZ

LIMA – PERÚ

2013

ASESOR

DRA. DIONICIA BAZILIZA GAMBOA VILELA

CO ASESOR

DR. VICTOR MANUEL NEYRA CHAGUA

JURADO DE TESIS

DRA. CRISTINA GUERRA GIRALDEZ

PRESIDENTE

DR. HOLGER MATA MALPARTIDA

VOCAL

DRA. VANESSA ADAUI SICHERI

SECRETARIA

DEDICATORIA.

A mis padres por sus consejos y constante apoyo.

A mi hermano, por su tolerancia en seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS.

A mis asesores por su guía en el desarrollo del presente trabajo

A mis amigos de la maestría por su apoyo y amistad

FUENTES DE FINANCIAMIENTO.

Centro Internacional de Excelencia de Investigación en Malaria de la Amazonia
(ICEMR, Perú)

DECLARACIÓN DE AUTOR			
FECHA	25	NOVIEMBRE	2012
APELLIDOS Y NOMBRES DEL EGRESADO	BAUTISTA GOMEZ RONALD SIXTO		
PROGRAMA DE POSGRADO	MAESTRÍA EN BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR		
AÑO DE INICIO DE LOS ESTUDIOS	2009		
TITULO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN DE GRADO	CITOADHERENCIA EN ERITROCITOS INFECTADOS CON CEPAS DE <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i> NATIVAS DE LA AMAZONÍA PERUANA PORTADORAS DE DIVERSOS GENOTIPOS HRP2/HRP3		
MODALIDAD DE TRABAJO DE GRADO	TESIS		
Declaración del Autor			
El presente Trabajo de Grado es original y no es el resultado de un trabajo en colaboración con otros, excepto cuando así está citado explícitamente en el texto. No ha sido ni enviado ni sometido a evaluación para la obtención de otro grado o diploma que no sea el presente.			
Teléfono de contacto (fijo / móvil)	990303244		
E-mail	Robago007@hotmail.com		

Firma del Egresado
DNI 41555470



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Los egresados:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES
1.	BAUTISTA GOMEZ RONALD SIXTO

Pertenecientes al programa de la **MAESTRÍA EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**, autores del trabajo titulado: **CITADHERENCIA EN ERITROCITOS INFECTADOS CON CEPAS DE PLASMODIUM FALCIPARUM NATIVAS DE LA AMAZONÍA PERUANA PORTADORES DE DIVERSOS GENOTIPOS HRP2/HRP3**, el cual ha sido elaborado, sustentado y aprobado, según corresponda, para optar por el grado de **MAESTRO EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR** bajo la modalidad de **TESIS**.

En calidad de docentes asesores de la Universidad Peruana Cayetano Heredia:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES DEL DOCENTE	FACULTAD	NIVEL DE ASESORÍA
1.	GAMBOA VILELA DIONICIA BAZILIZA	FACI	ASESOR
2.	NEYRA CHAGUA VICTOR MANUEL	FACI	CO ASESOR

Declaramos que el contenido del presente documento es original y que las citas y referencias a otros autores cumplen con las normas académicas establecidas. En ese sentido, hacemos constar que:

- El documento presenta un porcentaje de similitud de 13%, según el reporte emitido por el software Turnitin® (identificador de entrega: 2G11842GG0; fecha de entrega: 24-03-2026).
- Tras una revisión detallada del reporte y del contenido del trabajo en cuestión, no se han identificado indicios de plagio.
- Se certifica que el documento respeta los principios de integridad académica y cumple con los requisitos institucionales de originalidad.

Lugar y fecha: Lima, 24 de marzo de 2026

Firma del asesor
N° DNI: 07478767
ORCID: 0000-0002-1420-7729

Firma del Co-asesor
N° DNI: 09518881
ORCID: 0000-0003-4654-0718

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	OBJETIVOS.....	6
III.	HIPÓTESIS.....	7
IV.	MARCO TEÓRICO.....	8
V.	METODOLOGÍA.....	23
VI.	RESULTADOS.....	39
VII.	DISCUSIONES.....	54
VIII.	CONCLUSIONES.....	64
IX.	RECOMENDACIONES.....	65
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
XI.	ANEXOS	

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: *Plasmodium falciparum* induce en eritrocitos infectados la capacidad de adherirse a diversos receptores presentes en células endoteliales, lo que conlleva a complicaciones potencialmente mortales en los pacientes con malaria. Este estudio tiene como objetivo determinar la citoadherencia de eritrocitos infectados con cepas de *P. falciparum* nativas provenientes de la Amazonía peruana con deleciones cromosómicas que involucran a los genes *hrp2* y *hrp3*.

MATERIALES Y MÉTODOS: Se presenta un estudio cualitativo, observacional. Se trabajó con cultivos sincronizados de 15 cepas nativas de *P. falciparum* que portan deleciones, tomando como referencia a los genes *hrp2* y *hrp3*. Se realizaron los siguientes ensayos de adhesión: formación de rosetas, adhesión a la proteína CSA y al ICAM-1.

RESULTADOS: Un total de 5 cepas (33.3%) presentaron capacidad de adhesión en alguno de los tres ensayos realizados; de estas, 1 cepa (6.7%) tuvo la propiedad de formar rosetas con un índice de arrosetamiento del 10%, 1 cepa (6.7%) pudo unirse a la proteína CSA, y 3 cepas (20%) pudieron adherirse a las células HUVEC.

CONCLUSIONES: Estos resultados reflejarían la baja capacidad de adhesión que tienen las cepas nativas que circulan en la Amazonía peruana. Las 3 cepas que presentaron adherencia a ICAM-1 fueron aquellas que poseían una deleción que involucraba al gen *hrp2*.

Palabras claves: *Plasmodium falciparum*, *hrp2*, *hrp3*, citoadherencia, rosetas.

ABSTRACT

INTRODUCTION: *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes have the ability to adhere to various receptors present on endothelial cells, causing life-threatening complications in malaria patients. This study aims to determine the cytoadherence of erythrocytes infected with native *P. falciparum* strains from the Peruvian Amazon with chromosomal deletions involving the *hrp2* and *hrp3* genes.

MATERIALS AND METHODS: This is a qualitative, observational study. Synchronized cultures of 15 native strains of *P. falciparum* carrying deletions were used, with the *hrp2* and *hrp3* genes as a reference. Adhesion assays were performed: rosette formation, adhesion to the CSA protein and to ICAM-1.

RESULTS: 5 strains (33.3%) showed adhesion capacity in one of the three tests performed; 1 strain (6.7%) had the property of forming rosettes with an index of 10%, 1 strain (6.7%) was able to bind to the CSA protein, and 3 strains (20%) were able to adhere to HUVEC cells.

CONCLUSIONS: These results indicate the low adhesion capacity of native strains circulating in the Peruvian Amazon. The three strains that adhered to ICAM-1 were those with a deletion involving the *hrp2* gene.

Keywords: *Plasmodium falciparum*, *hrp2*, *hrp3*, cytoadherence, rosettes

I. INTRODUCCIÓN.

En el año 2010 se estimaron 216 millones de casos clínicos de malaria en el mundo, provocando la muerte de al menos 655,000 personas, el 91% de las muertes fue reportado en África y la mayoría de las muertes (86%) ocurrieron en niños menores de 5 años (1). Un aspecto importante de la patogenicidad de la malaria grave producida por *Plasmodium falciparum* es atribuido al secuestro de los eritrocitos infectados a nivel microvascular. El ingreso del parásito al glóbulo rojo (GR) produce una interrupción transitoria y controlada de la organización normal de la membrana. El parásito modifica la permeabilidad y características adhesivas de la célula hospedera, mediante la síntesis de diversas proteínas propias del parásito, que son dirigidas hacia la membrana de la célula hospedera con el fin de promover su propia supervivencia (2).

I.1 ANTECEDENTES

Un estudio realizado en Kenya (3), con 150 aislados de pacientes infectados con *P. falciparum* con síndromes clínicos definidos y 50 aislados de pacientes asintomáticos pertenecientes a la misma comunidad como control. Al cuantificar la unión a receptores endoteliales, que fueron purificados y ensayados *in vitro*, todos los parásitos aislados se unieron a CD36, mientras que la mayoría se unió a ICAM-1, algunos a VCAM y casi ninguno a E-selectina. La unión a ICAM-1 se dio principalmente en pacientes con

malaria cerebral. Además, evidenciaron que la formación de rosetas es un fenotipo asociado con la gravedad de la enfermedad y que esto podría interferir en la unión a un tipo de receptor. La unión a todos los receptores fue reducida en pacientes con anemia, demostrando una asociación entre el grado de unión a ICAM y la enfermedad clínica en los pacientes no anémicos, obtuvieron que la unión del ICAM era elevado en pacientes con malaria cerebral. Aunque un estudio en Malawi (4) realizado en niños con malaria severa y no complicada, evidenció que parásitos aislados de niños con anemia por malaria severa se unían por lo menos a la CD36, mientras que la unión fue baja en niños con malaria cerebral, y no hubo diferencia en la formación de rosetas en los grupos con anemia severa y los de malaria cerebral; en este caso no se halló una asociación positiva entre la adherencia a algunos receptores examinados y la severidad de la enfermedad. La asociación negativa que se encuentra, plantea la posibilidad de que la adhesión a ciertos receptores podría ser un indicador de una infección menos patógena.

En otro estudio realizado en Kenya (5) se cultivaron muestras sanguíneas de 61 niños con malaria severa y 52 niños con malaria leve. La autoaglutinación de los eritrocitos se observó en el 72% de los aislados de los niños con malaria severa, y el porcentaje de células infectadas autoaglutinadas del total de células infectadas fue mayor en las muestras de niños con malaria severa que en las de niños con malaria leve ($p < 0.01$).

Un trabajo realizado en Gambia (6), utilizó 130 aislados de niños con malaria cerebral y malaria no complicada. Todos los aislados de pacientes con malaria cerebral formaron rosetas (24 de 24), pero solo 61 de 106 aislados de niños con malaria no

complicada formaron rosetas. El promedio del porcentaje de formación de rosetas en aislados de niños con malaria cerebral (28.3%) fue significativamente mayor que los aislados de los niños con malaria no complicada (8.5%).

Un estudio realizado por Agbor *et al* (7) demostró que el proteoglicano condroitín sulfato (CSA) está presente en los espacios intervellosos en el segundo y tercer trimestre de embarazo. Sin embargo, esta proteína cambia estructuralmente durante el transcurso del embarazo, el contenido de sulfato se incrementa considerablemente después de las 24 semanas. A pesar de estos cambios los eritrocitos infectados con *P. falciparum* se unen eficientemente a la proteína CSA.

En el Perú, los casos de malaria por *P. falciparum* confirmados a través de microscopia positiva, daban resultados negativos en las pruebas rápidas que detectaban la proteína HRP2. Esto condujo a realizar un estudio en la Amazonía peruana (8), que evidenció la ausencia de los genes *hrp2*, *hrp3* o ambos en algunas cepas de *P. falciparum* y por lo tanto la ausencia de las proteínas HRP2 y HRP3. HRP2 es importante ya que está involucrada en la detección del antígeno para el diagnóstico de *P. falciparum* en las pruebas rápidas. La pérdida de genes puede ser considerada como un evento aleatorio, sin embargo; según los datos que se obtuvieron con muestras en poblaciones de la región amazónica con genes homólogos (*pfhrps*), han demostrado que la pérdida de uno de ellos ejerce una presión de selección en la población de los parásitos amazónicos, pues estos genes se encuentran localizados en cercanía de otros genes de virulencia (región subtelomérica, genes *var*) implicados en las diversas propiedades de

adherencia, lo que podría indicar que estas pérdidas genómicas podrían modular el fenotipo final en las poblaciones naturales.

Dentro de los factores de virulencia de *P. falciparum*, se encuentra la adhesividad que pueda tener a ciertos receptores del hospedero. Los diferentes fenotipos de unión producen el secuestro del parásito en diversos órganos y contribuyen a la manifestación de la enfermedad. Diversos estudios han sugerido que el parásito expresa solo una de las 60 proteínas *PfEMP1* a la vez. Este cambio de expresión del gen *var* y por lo tanto de la proteína, trae como consecuencia el proceso de variación antigénica, por la cual el parásito puede evadir el reconocimiento mediado por la respuesta inmune adaptativa (anticuerpos). Estas variantes de la proteína *PfEMP1* resultan con un alto potencial de unión a diversos receptores del hospedero (9,10).

I.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Se desconoce cuáles son las propiedades de adhesividad que puedan tener los eritrocitos infectados con cepas silvestres de *P. falciparum* que presentan deleciones cromosómicas tomando como referencia a los genes *hrp2* y *hrp3* de aislados de la Amazonia Peruana.

Ante esto se realiza la pregunta de investigación: ¿Cuáles serían las propiedades de adhesión de eritrocitos infectados con cepas nativas de *P. falciparum* que poseen

deleciones cromosómicas provenientes de la Amazonia peruana ante el ICAM-1, CSA y la capacidad de formar rosetas?

I.3 JUSTIFICACIÓN.

A la fecha no existe ningún estudio que muestre la caracterización de las propiedades de adhesividad que puedan tener las cepas silvestres de aislados provenientes de la Amazonia peruana. Este estudio sería un trabajo piloto que permitirá conocer la patogenicidad que presentan actualmente algunas de las cepas silvestres de la Amazonia peruana, mediante el estudio de adherencia a nivel molecular y celular, y su posible relación ante las deleciones que presentan.

El estudio contribuiría en identificar que el bajo número de casos de malaria grave en el Perú, se deba a la ausencia de las diversas propiedades de adhesión que pudieran tener las cepas silvestres actualmente presentes en la región amazónica. Este estudio sería el punto de partida para otros a realizarse que permitirían realizar un monitoreo de las propiedades de adhesión de cepas silvestres que circulan en nuestro país como medida de prevención ante posibles aumentos de casos de malaria severa.

II. OBJETIVOS

II.1. OBJETIVO GENERAL.

- Determinar las propiedades de adhesividad de eritrocitos infectados con cepas silvestres de *P. falciparum* que poseen deleciones cromosómicas que portan diversas combinaciones de los genes *hrp2-3*.

II.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Sincronizar cepas silvestres y referenciales en cultivo. Esto se realizará utilizando el método selectivo de sorbitol al 5%.
- Determinar la capacidad de los glóbulos rojos infectados con cepas silvestres de *P. falciparum* de formar rosetas en cultivos, mediante el uso de naranja de acridina.
- Determinar la propiedad de citoadherencia de los glóbulos rojos infectados con *P. falciparum* a través de los receptores celulares, como ICAM-1 y proteoglicano condroitín sulfato A (CSA).

III. HIPÓTESIS

Si las cepas nativas de *P. falciparum* de la Amazonia peruana presentan deleciones cromosómicas que no solo involucran a los genes *hrp2* y *hrp3* si no porciones genómicas más amplias a nivel subtelomérico, entonces estas estarían alcanzando en algunos de los casos genes de virulencia, involucrados en la adhesividad de los glóbulos rojos infectados a nivel de vasos sanguíneos y de esta manera estarían modulando el fenotipo final del parásito, esto explicaría porque en la Amazonia peruana existen pocos casos de malaria severa. Para corroborar esta hipótesis se propone caracterizar la adhesividad de eritrocitos infectados con cepas nativas de *P. falciparum* con deleciones cromosómicas tomando como referencia los genes *hrp2* y *hrp3* provenientes de la Amazonia peruana.

IV. MARCO TEÓRICO:

IV.1. CICLO BIOLÓGICO DEL *PLASMODIUM*.

Los plasmodios pertenecen al filum *Apicomplexa* (11), que incluye parásitos que presentan formas invasivas denominadas “zoítos”, que a su vez transcurren por tres fases invasivas: merozoítos, oocinetos y esporozoítos. En su extremo apical cuentan con organelos (roptrias, micronemas y gránulos densos) (12) de secreción esenciales en los procesos de motilidad, invasión, biogénesis de la membrana parasitófora y remodelamiento de la célula hospedera. Dada su participación en procesos esenciales del parásito, las proteínas de estos organelos se consideran como moléculas blancas principales para la producción de vacunas antimaláricas (13). Como otros apicomplexa, *Plasmodium* tiene proteosoma y apicoplasto. El proteosoma consiste en proteasas multiméricas autocompartimentalizadas cuya actividad principal es el control de calidad de las proteínas, la traducción de señales y la regulación del ciclo celular. El apicoplasto es un organelo plastídico no fotosintético que participa en la síntesis de ácidos grasos, isoprenoides y el grupo hemo (14). El ciclo de vida de *Plasmodium* incluye dos hospederos, el vertebrado y el mosquito. Durante su desarrollo, *Plasmodium* expresa proteínas específicas para sobrevivir y desarrollarse en dos ambientes distintos, el intracelular y el extracelular, invadir varios tipos celulares y evadir la respuesta inmunitaria de ambos hospederos (15). Cuando el mosquito se alimenta con la sangre del hospedero vertebrado, inyecta esporozoítos, los cuales

alcanzan el hígado, invaden los hepatocitos y se convierten en esquizontes y después en merozoítos, la siguiente fase invasiva, dotada de organelos secretores que les permiten invadir eritrocitos. Dentro del eritrocito, los parásitos se encuentran en una vacuola parasitófora donde pueden seguir dos vías de desarrollo: crecer y diferenciarse en esquizontes productores de nuevos merozoítos, que invaden a otros eritrocitos, o producir formas sexuales: gametocitos macho y hembra. Cuando un mosquito susceptible toma los gametocitos, tiene lugar otra etapa del ciclo evolutivo del parásito durante la cual se diferencian en gametos macho y hembra, que al fecundarse originan cigotos; estos últimos acaban por transformarse en oocinetos móviles.

Los oocinetos invaden el epitelio intestinal del mosquito hasta alcanzar la lámina basal, donde se convierten en ooquistes y producen miles de esporozoítos. Los esporozoítos se liberan a la hemolinfa, por medio de la cual se distribuyen en todo el cuerpo del mosquito e invaden las glándulas salivales; es desde estas glándulas que son inoculados en el hospedero cuando el mosquito se alimenta y de esa manera se reinicia el ciclo (15) (Figura 1).

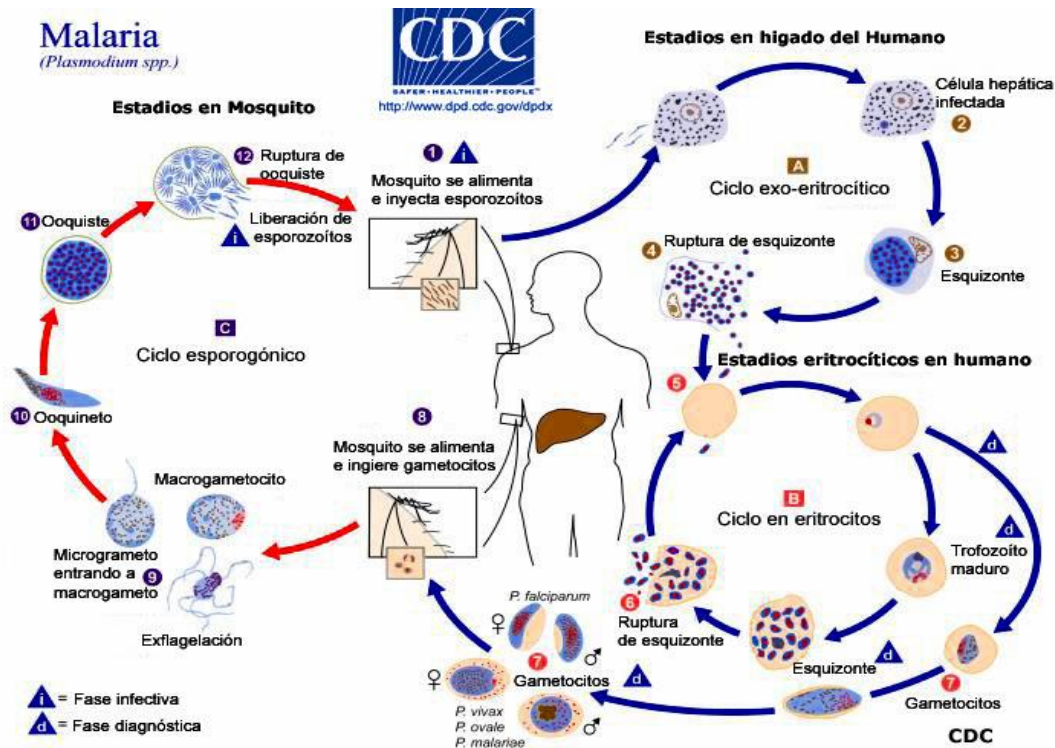


Figura N° 1. Ciclo Biológico del *Plasmodium*. Reproducido del Centro de Enfermedades y Prevención, División de Enfermedades parasitarias, 2008.

IV.2. RECOMBINACIÓN GENÉTICA EN EL CICLO DE VIDA DEL *PLASMODIUM*.

La recombinación genética es el principal mecanismo para generar formas de un organismo con nuevos genotipos. En los eucariotes, la recombinación se presenta principalmente en la meiosis, y en proporción menor en la mitosis. Durante la mayor parte de su ciclo de vida, la cual transcurre en el humano, *Plasmodium* presenta estadios biológicos haploides y la replicación ocurre mediante división mitótica (16). En el mosquito vector, el cigoto formado por la unión de los gametos representa la única fase diploide de su ciclo de vida, y en este estadio se presenta la meiosis, la cual es de

importancia crítica para la generación de diversidad, ya que la recombinación genética trae como consecuencia la redistribución de genes ubicados en diferentes cromosomas, así como de eventos de entrecruzamiento entre genes ligados en el mismo cromosoma y, más raramente, dentro del mismo gen (17).

IV.3. LA MALARIA SEVERA.

Casi todas las formas graves y muertes por malaria se producen por *P. falciparum*. En raras ocasiones, *Plasmodium vivax* o *Plasmodium ovale* producen complicaciones graves, recaídas debilitantes, e incluso la muerte (18). Más del 40% de la población mundial es susceptible de adquirir un episodio de malaria en su vida, con riesgo acentuado en los extremos de edad y la población embarazada, de los cuales el 1% progresan a malaria severa y sus complicaciones. La enfermedad por *P. falciparum* es la principal responsable de la disfunción múltiple de órganos, de los casos fatales y la resistencia a los diversos agentes farmacológicos (19). Las complicaciones que ponen en riesgo la vida son predominantemente cerebrales, renales, hepáticas y hematológicas, en los cuales los eritrocitos infectados se adhieren al endotelio vascular, a eritrocitos sanos y a las plaquetas produciendo obstrucción al flujo microvascular. El cerebro es el órgano que más frecuentemente está involucrado y más del 45% de los capilares cerebrales se ha encontrado ocluidos en exámenes post-mórtem, ya que el endotelio del tejido cerebral expresa mayor proporción de receptores para los eritrocitos infectados, como es el caso de la molécula ICAM-1, que existe una

sobreexpresión a nivel del tejido cerebral (20). Dependiendo del comportamiento de adherencia que puedan tener los GRs parasitados se manifiesta una malaria leve o grave, lo que provoca una alta mortalidad en poblaciones más susceptibles, como niños menores de 5 años, ancianos y gestantes. La malaria severa es considerada la principal causa de muerte con *P. falciparum*, y es responsable de hasta un 10% de los pacientes admitidos en hospitales y el 80% de los casos fatales (1). En 1990, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció los criterios de malaria severa, con el fin de ayudar a los futuros estudios clínicos y epidemiológicos (21). En el 2000 la OMS revisó estos criterios para incluir otras manifestaciones clínicas y valores de laboratorio que presagien un mal pronóstico, dentro de los valores de laboratorio tenemos la aparición de una hiperparasitemia, con más del 2% de eritrocitos parasitados o más de 100 000 parásitos/UI en áreas de baja intensidad de trasmisión, con más del 5% de eritrocitos parasitados o más de 250 000 parásitos/UI en áreas de alta intensidad de trasmisión (22).

IV.3.1. MALARIA CEREBRAL.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) propone la definición de malaria cerebral como un síndrome clínico caracterizado por coma, luego de haber excluido otras causas de encefalopatía y por lo menos una hora después de la terminación de una convulsión o de haber corregido hipoglucemia, con evidencia de formas asexuadas de *P. falciparum* en el examen microscópico. Sus manifestaciones clínicas más frecuentes

comprenden la ausencia de respuesta a estímulos dolorosos, encefalopatía, mirada no conjugada, rigidez extrapiramidal, signos de decorticación o descerebración, incremento de la presión intracraneana, edema cerebral, infartos corticales, trombosis de los senos venosos, hemorragias retinianas y enlentecimiento del electroencefalograma en las regiones temporoparietales. Las convulsiones pueden ser causadas por secuestro de los eritrocitos infectados o toxinas derivadas del parásito, siendo más frecuentes en los niños (23).

IV.3.2. MALARIA EN EL EMBARAZO.

Las mujeres embarazadas tienen una mayor susceptibilidad de desarrollar malaria, con un pico de presentación entre la semana 13 y 16, declinando la incidencia al final. Las parasitemias en las gestantes pueden ser hasta 10 veces más altas que en las no embarazadas, con predisposición para el desarrollo de trastornos hipertensivos del embarazo, aborto, mortinato, parto prematuro e insuficiencia ponderal fetal (24). La mortalidad materna es de 2 a 10 veces superior que en las no embarazadas (25). La muerte fetal es usual en malaria severa, en donde el 5% de los recién nacidos de madres infectadas presenta malaria congénita, lo cual depende directamente de la densidad parasitaria en la placenta y en el torrente circulatorio materno (24).

En las placentas infectadas por *P. falciparum* se han encontrado tres alteraciones específicas en su microestructura, la primera, donde eritrocitos infectados que contienen trofozoitos y esquizontes se acumulan en los espacios intervelllosos, algunas

veces con altas densidades parasitarias; luego de esto ocurre infiltración de monocitos y macrófagos que contiene pigmento malárico (hemozoina), esta última también presente en los depósitos de fibrina que se encuentran en las estructuras lacunares por donde circula la sangre materna generando obstrucción al flujo (26). A diferencia de *P. falciparum*, el *P. vivax* no hace secuestro ni genera cambios estructurales a nivel de la placenta. El proceso de secuestro de los eritrocitos infectados en la placenta difiere de otros órganos como el cerebro, en donde una unión cercana de los eritrocitos infectados con las células endoteliales esta mediado por receptores como el CD 36 e ICAM1: en la placenta los eritrocitos infectados se unen preferiblemente al condroitin sulfato A y ácido hialurónico que se encuentra expresados por el sincitiotrofoblasto en los espacios intervellosos (26, 27).

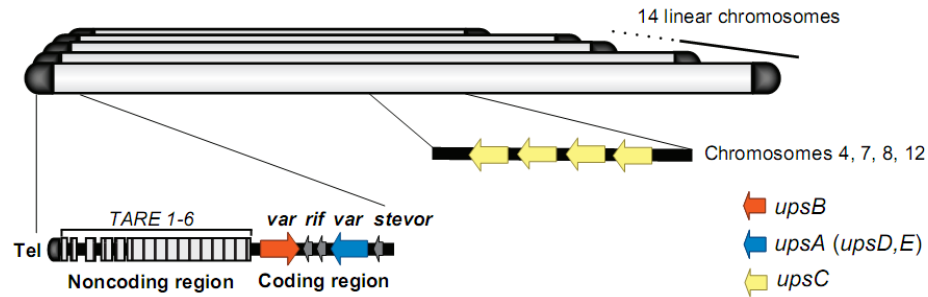
IV.4. PROTEÍNA DE MEMBRANA-1 DE *P. FALCIPARUM* (PfEMP-1) Y SU IMPLICANCIA EN LA ADHERENCIA CELULAR.

La PfEMP1 juega un rol muy importante en la virulencia del parásito, esta presenta dominios extracelulares involucrados en la adhesión del eritrocito. Estos dominios interactúan con receptores de las células endoteliales del hospedero a nivel post capilar de los vasos sanguíneos (vénulas). Esta citoadherencia confiere dos tipos de ventajas en la supervivencia del parásito, primero el medio ambiente microaerófilo a nivel venoso, adecuado para la maduración del parásito, y segundo de evitar la destrucción del eritrocito infectado a nivel del bazo. El resultado de esta adhesión involucra

diversas complicaciones potencialmente mortales como la malaria cerebral y de placenta. Esta proteína PfEMP1 (200- 250 kDa) es codificada por una familia multigénica llamada *var* (son más de 60 genes *var*). Cada parásito produce una sola variante PfEMP1, estas distintas variantes median la adhesión a diversos receptores que incluye; ICAM, CD36, CD31 y de los glucosaminoglicanos como CSA (28).

Aproximadamente el 60% de genes *var* se localizan adyacentes a las regiones no codantes subteloméricas denominados “Elementos Repetitivos Asociados al Telómero” (TARE 1-6). Los genes *var* pueden ser catalogados por la región flanqueante 5’ denominándose *ups*, los genes cuya transcripción está dirigida hacia el centrómero desde la región telomérica del cromosoma se denominan *upsB*, mientras que los genes teloméricos que se transcriben hacia el telómero son la mayoría denominados *upsA*, el otro grupo de genes *var* se encuentra localizado en tándem en la región central del cromosoma, estos genes se denominan *upsC*. La transcripción de estos genes *var* siguen la regla de una expresión mutua, esto quiere decir que solo un gen *var* podrá expresarse mientras los otros estarán inactivos (29).

A.- Organización de los genes *var* de *P. falciparum*.



B.- Características de los genes *var*.

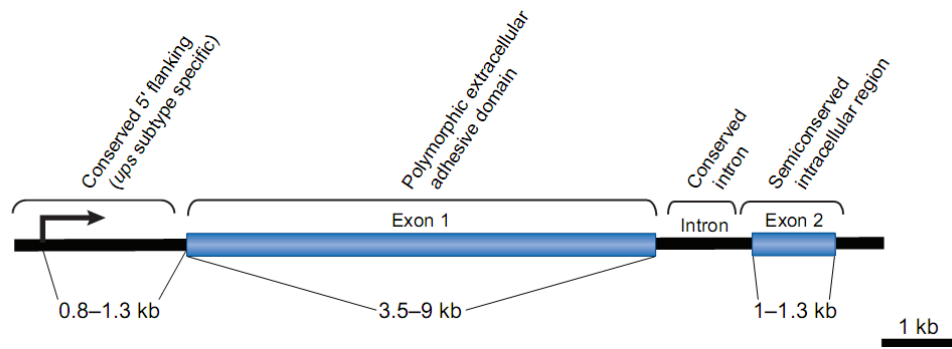


Figura N° 2. Organización genómica y la posición nuclear de los genes *var*. (A) Las regiones subteloméricas de los 14 cromosomas lineales tienen una organización en común, con repeticiones no codantes denominados TARE 1-6. Esta región es seguida por un miembro de la familia de genes *var*, con frecuencia en combinación con otro gen *var* que se transcribe en dirección opuesta (hacia el telómero). Otro grupo de genes *var* se encuentran agrupados ordenadamente en la región central del cromosoma. (B) Características comunes entre los miembros de la familia de genes *var*. Todos los miembros contienen dos exones. El dominio adhesivo extracelular es muy polimórfico (exón 1), mientras que el dominio intracelular (exón 2) es semiconservado. Fuente: Scherf. Antigenic Variation in *Plasmodium falciparum*.

La citoadherencia a receptores en órganos como el hígado o los pulmones parece estar asociada a síntomas menos graves. La unión de eritrocitos infectados a nivel de las células endoteliales de vénula del cerebro o en los sincitiotrofoblastos de la placenta produce eventos patogénicos que conllevan a complicaciones potencialmente mortales como la malaria cerebral o de placenta (29). La severidad de la enfermedad es

consecuencia de la adhesión de los eritrocitos infectados a nivel de los vasos sanguíneos, que provocan eventos como la oclusión del vaso y por ende la falta de irrigación de oxígeno al órgano, provocando la muerte de las zonas afectadas. Además, la unión al endotelio también provoca una respuesta del sistema inmune, con la liberación de citoquinas proinflamatorias que conlleva a un proceso inflamatorio y destrucción del tejido. Esto toma mayor importancia en órganos principales como el cerebro, donde encontramos altos niveles de ICAM-1. Estudios de Graninger *et al* mostraron que ICAM-1 está sobreexpresado en pacientes infectados con *P. falciparum*, probablemente en parte por antígenos del parásito, además de la liberación de citoquinas que estimulan esta sobreexpresión de ICAM-1, esto aumentaría las probabilidades que el parásito se adhiera a nivel del endotelio cerebral, y por ende aumenta la mortalidad en los casos en malaria cerebral. La gravedad de las complicaciones clínicas no siempre está relacionada con el nivel de parasitemia en sangre periférica, particularmente en infecciones con *P. falciparum* en zonas endémicas; es decir, personas con una parasitemias elevadas en sangre, podrían ser asintomáticas, y no presentar alguna dolencia (9,30).

Según la literatura existen 14 receptores de adhesión celular a los cuales los GRs infectados pueden unirse, de estos solo algunos han sido caracterizados en el laboratorio, por la importancia donde estos están localizados a nivel de órganos vitales, estos incluyen el ICAM-1 (endotelio cerebral), CD36 (diversas poblaciones celulares) y el condroitín sulfato A (CSA) (3).

El proteoglicano CSA es la única molécula involucrada en la adhesión de los eritrocitos infectados a la placenta durante el embarazo. Estos parásitos son capaces de adherirse al CSA debido a la síntesis de una proteína que presenta dominios conservados, denominada VAR2CSA la cual puede ser expresada durante el embarazo en pacientes con malaria (31). Esta interacción no solo afecta la salud de la madre si no también del feto, por el daño directo ocasionado hacia él, debido a que una placenta infectada con malaria, presenta eritrocitos infectados adheridos a las vellosidades, provocando degradación del tejido sincitial, aumento de brotes de tejido sincitial en forma de nódulos, fenómenos de neovascularización y más raramente destrucción de villi. La adhesión de los GRs infectados compromete la circulación placentaria, de forma que se altera la implantación del trofoblasto y se produce remodelación de las arterias uterinas, en un proceso similar al que ocurre durante la preeclampsia. Además, la acumulación de eritrocitos infectados y los depósitos de fibrina, disminuyen el flujo placentario de forma mecánica. Todo esto altera el transporte de nutrientes a través de la placenta (31).

En la mujer embarazada, la placenta le provee una nueva oportunidad de adhesión a los GRs infectados, debido a que las gestantes primigrávidas carecen de inmunidad contra los parásitos que se adhieran a la placenta durante el embarazo (32). La adherencia de los GRs infectados a la placenta y la infiltración de las células mononucleares en respuesta a los resultados de la infección, altera la función placentaria, lo cual conduce a un pobre pronóstico del feto y una alta morbilidad y mortalidad materna (33). Sin

embargo, las gestantes durante la infección van adquiriendo una inmunidad específica contra la malaria fetal, mediante la respuesta de anticuerpos capaces de inhibir la adhesión, esto ocurre durante el primer o segundo embarazo (34). Por lo tanto, las primigrávidas tienen un mayor riesgo de presentar malaria placentaria y la susceptibilidad disminuye con el aumento de la gravidez (35).

IV.5. ORGANIZACIÓN DE LOS GENES HRP2 Y HRP3.

El gen *hrp2* de *P. falciparum* se encuentra localizado en el cromosoma 7, este origina la proteína HRP2, la cual contiene numerosas repeticiones de histidina, lo que es aprovechado en el uso de las pruebas rápidas para la detección específica de *P. falciparum* mediante anticuerpos contra estas repeticiones de la proteína. Hasta el momento no se tiene muy claro la función principal de esta proteína, los primeros estudios la involucraban en la detoxificación de la ferroprotoporfirina IX (hematina) del parásito, convirtiendo la hematina (producto de degradación de la hemoglobina) en un complejo menos tóxico para el parásito llamado hemozoina. Posteriormente Jani D. *et al* (2008) descubrieron la proteína HDP (proteína de detoxificación del grupo hemo), con una mayor capacidad de detoxificación. HRP2 puede localizarse en el citosol y membrana del GR y por lo tanto circulando en la sangre del hospedero debido a la lisis del GR que es provocado por el parásito (36).

El gen *hrp3* de *P. falciparum* se encuentra localizado en cromosoma 13 cercano a la región telomérica, esta origina la proteína HRP3, la cual contiene repeticiones de histidina, pero a diferencia de la proteína HRP2, esta se presenta en menor concentración (37).

En un estudio realizado en la Universidad Peruana Cayetano Heredia por Dionicia G. *et al* (8), determinaron que en la población de *P. falciparum* de la Amazonia peruana, presentan pérdidas de segmentos genómicos, que involucran a los genes *hrp2* y *hrp3*, siendo esto muy frecuente en la región, además estos se encuentran localizados cerca a los distintos genes de virulencia como los genes *var*, responsables de la adhesión a los receptores celulares.

Existe otro grupo de proteínas que pertenecen a la familia de los HRP que están asociadas a la formación de los “knobs”, (protuberancias formadas a nivel de la membrana del GR), denominadas KAHRP (proteína rica en histidina asociado a los knobs), es una proteína de 654 aminoácidos con una región rica en histidina, además contiene un péptido señal para su transporte hacia la membrana celular, a nivel de los Knobs se ancla la proteína PfEMP1 responsable de la adhesión celular. KAHRP se encuentra en la cara interior de la membrana plasmática del GR infectado (38). En diversos estudios la delección del gen que origina esta proteína, está asociada a la pérdida de citoadherencia de los GR infectados (39).

IV.6. EPIDEMIOLOGÍA DE LA MALARIA POR *P. FALCIPARUM* EN EL PERÚ.

Según datos epidemiológicos en el año 1999, el Ministerio de Salud del Perú (MINSA) notificó 161,292 casos de malaria en todo el territorio nacional, de los cuales 67,169 fueron debidos a la infección por *P. falciparum*, de los cuales 992 casos de malaria grave y 49 muertes por esta causa (40). Según datos obtenidos de la Dirección General de Epidemiología del MINSA, desde el 2002 los casos de malaria por *P. falciparum* fue disminuyendo, junto a la tasa de mortalidad, como se aprecia en la Figura 3 (41).

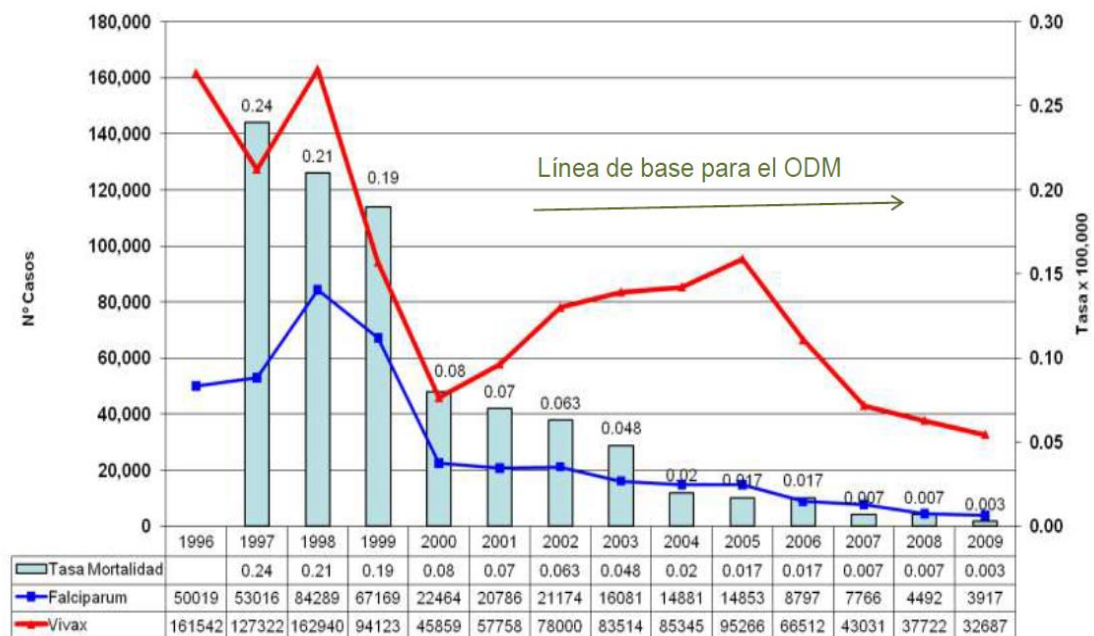


Figura N° 3. Prevalencia de la Malaria en el Perú: 1996-2009. Fuente Dirección General de Epidemiología del MINSA.

Hasta el momento se desconoce la capacidad de adhesión que puedan presentar las cepas silvestres de *P. falciparum* que circulan en la Amazonia peruana. Se sabe que el número de casos producidos por malaria grave es menor que al número de casos producidos en la población africana, en donde la mayoría de las cepas ocasiona casos

de malaria severa, ya que presentan una alta capacidad de adherencia a diversos receptores del hospedero. Este estudio tiene como objetivo principal determinar las propiedades de adherencia de los GR infectados con cepas silvestres a los receptores ICAM-1, CSA y la formación de rosetas, y ver su implicancia ante las deleciones, tomando como referencia a los genes *hrp2* y *hrp3*.

V. METODOLOGIA

V.1. DISEÑO DE ESTUDIO:

Se presenta un estudio cualitativo, observacional.

V.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO:

La población de estudio estuvo conformada por 15 cepas silvestres de *P. falciparum* provenientes del banco de cepas del Laboratorio de Malaria, con diferentes variantes con respecto a la ausencia o presencia de los genes *hrp2* y *hrp3* que se tomarán como referencia a la presencia de la deleción cromosómica a ese nivel. Estos fueron caracterizados mediante técnicas de biología molecular (PCR y microsatélites) en estudios anteriores por los integrantes del Laboratorio de Malaria. No se trabajó con un número mayor de cepas debido a que solo las 15 cepas estaban caracterizadas con los genes *hrp2* y *hrp3*, además de estar genotipificadas a diversos marcadores moleculares.

El estudio se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Parasitología Celular y del Laboratorio de Malaria en los Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID) de la Facultad de Ciencias y Filosofía “Alberto Cazorla Talleri”, y las instalaciones de Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humboldt”, de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

El banco de cepas de *P. falciparum* contiene muestras de sangre de pacientes infectados provenientes de Iquitos, departamento de Loreto, en la región Nor-oriental del Perú. Esta área, junto con la costa norte, presentan los mayores números de incidencias de malaria en el Perú, siendo el departamento de Loreto el que más casos ha notificado en todo el país.

La colección de cepas del Laboratorio de Malaria LID – UPCH se obtuvo gracias al proyecto FIND-WHO (Foundation for Innovative New Diagnostics-World Health Organization) llevado a cabo en el año 2008. La colección de muestras de pacientes se realizó después de obtener todas las aprobaciones éticas correspondientes y después de la firma de un consentimiento informado por parte del paciente. Actualmente el banco de cepas cuenta con 40 cepas silvestres de *P. falciparum* acondicionadas a cultivo, y 10 cepas referenciales de *P. falciparum*, utilizadas en diversos estudios como controles en ensayos de quimiosensibilidad, resistencias a drogas e invasión.

Del número total de 15 cepas, se formó 4 grupos con las siguientes combinaciones: 4 cepas *hrp2* (+) y *hrp3* (-); 6 cepas *hrp2* (-) y *hrp3* (-); 3 cepas *hrp2* (+) y *hrp3* (+) y 2 cepas *hrp2* (-) y *hrp3* (+) (Ver Tabla N° 1). Además, se utilizaron cepas referenciales para estandarizar y validar los ensayos realizados en el laboratorio: la cepa CS2 proporcionada por el Dr. John Barwell del CDC, y la cepa ITG-2F4 (MRA-327, MR4, ATCC Manassas Virginia), proporcionada por el organismo internacional MR4

(Centro de Recursos de Investigación en Malaria y Referencia de Reactivos). Otra cepa utilizada es AFR, aislado de un paciente infectado en Costa de Marfil, por una cepa de *P. falciparum* de origen africano. Estas tres cepas fueron elegidas debido a las características de adhesividad ya establecidas en cada una de ellas, en la capacidad de unirse a un receptor específico.

Tabla N° 1. Total de cepas silvestres de *P. falciparum* utilizadas en el estudio.

Forman 4 grupos las diversas combinaciones de los genes *hrp2* y *hrp3*.

hrp2	hrp3	Nº cepas
(-)	(-)	6
(+)	(-)	4
(-)	(+)	2
(+)	(+)	3

V.3 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES:

Nombre de la Variable	Definición conceptual	Definición Operacional	Escala de Medición	Categoría	Instrumento
Citoadherencia	Unión de GR infectados a receptores celulares del hospedero	Unión de GR infectados con <i>P. falciparum</i> a receptores de células endoteliales (ICAM), proteína de placenta (CSA) y con GR no infectados (rosetas).	Nominal	-CSA: Unión de GR infectados unido a CSA por mm ² . -ICAM-1: Unión del nº de GR infectados unidos a 200 cel. -% Rosetas: Conteo del nº de	Ficha de Laboratorio (Ver Anexo N°03)

				GR infectados unidos a 100 GR sanos.	
Glóbulos rojos infectados	Glóbulos rojos que contienen al parásito en su interior	Glóbulos rojos infectados con un estadio maduro de <i>P. falciparum</i>	Nominal	-GR infectado con trofozoito maduro -GR infectado con esquizonte.	Ficha de Laboratorio
Genotipo	Información genética contenida en los cromosomas de un organismo	Información genética de las cepas de <i>P. falciparum</i> provenientes de un aislado humano de la amazonia peruana con la presencia o ausencia de los genes <i>hrp2</i> y <i>hrp3</i> .	Nominal	<i>hrp2</i> (+) y <i>hrp3</i> (-) <i>hrp2</i> (+) y <i>hrp3</i> (+) <i>hrp2</i> (-) y <i>hrp3</i> (-) <i>hrp2</i> (-) y <i>hrp3</i> (+)	Ficha de Laboratorio

V.4. PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS:

Se muestra un esquema general del procesamiento de las cepas de *P. falciparum* (Ver Anexo N° 01) y se describe a continuación cada uno de los ensayos utilizados para el estudio con las modificaciones realizadas en el laboratorio.

V.4.1. CULTIVO DE *P. FALCIPARUM*.

El cultivo de parásitos se realizó de acuerdo al método descrito por Trager – Jensen (42) y optimizado para nuestro laboratorio. Brevemente, las muestras fueron descongeladas en baño maría a 37°C, por 2 min, luego fueron procesadas añadiendo 200 µL de solución salina al 12% por 1 Ml de muestra, se incubó la muestra por 5 min., luego se añadió un volumen de 10 ml de solución salina al 1.6%, la mezcla fue centrifugada a 2,100 rpm por 5 min., el paquete celular fue resuspendido en 10 Ml de solución salina al 0.9% con 0.2% de dextrosa, se centrifugó a 2,100 rpm, por 5 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el paquete globular en 10 Ml de medio RPMI-1640 suplementado con 20% de suero humano (RMPI-C), al 5% de hematocrito, Los frascos de cultivo fueron incubados a 37°C, en presencia de una mezcla de gases conteniendo 5% de CO₂, 5% de O₂ y balanceado con 90% de N₂. El medio de cultivo fue cambiado diariamente, a la semana de cultivo se le añadió 200 UI de glóbulos rojos del tipo O Rh (+) frescos, de un donante voluntario, del sexo masculino, con una edad de 29 años, que nunca tuvo contacto con el parásito ni ha viajado a alguna zona endémica, sería quien proporcionaría permanentemente los volúmenes de sangre venosa para mantener el porcentaje celular en suspensión. El crecimiento parasitario fue seguido a diario mediante extendidos teñidos con Giemsa (10% v/v).

V.4.2. ESTANDARIZACIÓN DEL ENSAYO DE SINCRONIZACIÓN DE CULTIVOS DE CEPAS REFERENCIALES Y SILVESTRES DE *P. FALCIPARUM* MEDIANTE EL TRATAMIENTO CON SORBITOL AL 5%.

La sincronización de los cultivos fue obtenida por la destrucción selectiva de los estadios maduros del parásito durante el tratamiento con sorbitol. La fragilidad osmótica de los eritrocitos infectados con *Plasmodium* se incrementa durante el desarrollo del parásito, siendo provocada la lisis de las formas maduras por el sorbitol.

Se estandarizó el tiempo adecuado de exposición al sorbitol con el cultivo, con la finalidad de obtener una sincronización con un mayor número de parásitos, sin que el sorbitol pueda afectar la integridad la membrana del glóbulo rojo, pues un tiempo muy prolongado podría resultar tóxico a la célula. Se elaboró un esquema de trabajo (Ver Anexo N° 02), que permitió estandarizar el ensayo de sincronización con sorbitol al 5%.

Las cepas con las que se trabajó fueron una referencial CS2, y 5 cepas silvestres. Esto permitió determinar el comportamiento de las cepas silvestres después del tratamiento con sorbitol para la sincronización de los cultivos, que son necesarios para realizar los siguientes ensayos.

Se obtuvo el promedio de la parasitemia de las cepas silvestres controladas cada 24 horas, hasta 120 horas de cultivo, y se comparó con la cepa referencial CS2. Además, se realizó la lectura microscópica por triplicado, obteniéndose una desviación estándar para cada lectura por tiempo de cultivo. Los tiempos de exposición a probar fueron de 5, 3 y 1 minuto, más un control sin exposición de sorbitol.

Se siguió las pautas del MR4 (43) con algunas modificaciones realizadas por el laboratorio. Se realizó una metodología previa antes de enfrentar el cultivo al sorbitol, debido a la lisis que provocaría el sorbitol a los GRs infectados con estadios maduros del parásito (trofozoito maduro y esquizonte), es necesario tener inicialmente una gran población de trofozoitos jóvenes (anillos) antes de enfrentarlo al sorbitol, pues si no ocasionaría la destrucción de la mayoría de GR infectados y disminuiría la parasitemia. Para lograr que la mayoría de la población del cultivo sean anillos, un día anterior al sorbitol, el estadio predominante tiene que ser esquizonte. Teniendo en cuenta esto, el cultivo se dividirá en dos nuevos frascos con la mitad de volumen (5 mL), y se completará a 10 ML, con GR sanos con un hematocrito al 50%, esto permitirá obtener un cultivo con una mayor cantidad de anillos para procesarlo con el sorbitol.

Se colocó la suspensión del cultivo en un tubo de centrifuga de 15 ml, se centrifugó a 2,500 rpm por 5 min. Se descartó el sobrenadante, dejando el pellet de glóbulos rojos (aprox. 500 UI). Se resuspendió el paquete celular con 2.5 ML de D-sorbitol al 5% por los tiempos a probar, a temperatura ambiente. Se centrifugó la suspensión a 2,500 rpm por 5 min. Se descartó el sobrenadante por aspiración con una pipeta Pasteur, el paquete celular fue lavado con medio RPMI 1640 incompleto (RMPI-I) y centrifugado a 2,500 rpm por 5 min. Se descartó el sobrenadante, el paquete celular (aprox. 500UI) fue resuspendido en un volumen igual con medio RPMI-C para obtener un hematocrito de 50%, esta suspensión fue agregado a un frasco de cultivo conteniendo 1 mL de glóbulos rojos lavados con un hematocrito de 50% y 8 mL de medio completo.

V.4.3. ESTANDARIZACIÓN DEL ENSAYO DE ARROSETAMIENTO DE CULTIVOS DE *P. FALCIPARUM* MEDIANTE LA TINCIÓN NARANJA DE ACRIDINA.

El arrosetamiento es definido como la aglutinación de eritrocitos no infectados alrededor de un eritrocito parasitado. Eritrocitos infectados o parasitados con *P. falciparum in vitro* pueden formar rosetas, esta adherencia se da con dos o más eritrocitos no infectados a un eritrocito conteniendo al parásito en estadio maduro. Para estandarizar este ensayo se utilizó distintas concentraciones de naranja de acridina, volúmenes de suero fetal bovino y diversas suspensiones de glóbulos rojos parasitados.

Naranja de acridina:

Es una molécula con capacidad fluorescente de naturaleza catiónica, muy selectiva ya que interactúa con el ADN y ARN, mediante intercalación con las hebras de ADN o por atracción electrostática. Cuando la naranja de acridina se asocia con el ADN, es espectralmente similar a la fluoresceína, presentando un máximo de excitación a 502 nm y de emisión a 525 nm (en la región verde), reconociendo los estadios maduros del parásito, debido a que estos se encuentran en división dentro del glóbulo rojo. Mediante este método se puede identificar los glóbulos rojos infectados y su capacidad de adhesión con otros glóbulos rojos no parasitados.

Se utilizó distintas concentraciones de naranja de acridina: 0.2%, 0.1%, 0.01% y 0.001%, se tomaron todas las medidas de bioseguridad para la preparación del reactivo, debido que esta molécula es mutagénica, pudiendo producir desplazamiento en el marco de lectura de los genes. La naranja de acridina en polvo se disolvió en Dimetil Sulfoxido (DMSO), para la obtención de las distintas concentraciones.

Suero bovino fetal:

Este actúa como un diluyente de la suspensión de los glóbulos rojos parasitados, y no interfiere en la visualización del parásito, el suero fue esterilizado y filtrado. Se utilizó distintos volúmenes, que permitió obtener una suspensión de los glóbulos rojos, para no originar una superposición de estos y de esta manera confundir una alta concentración de glóbulos rojos con rosetas.

Requerimientos del cultivo:

El cultivo tuvo que estar sincronizado en un estadio maduro (trofozoito maduro o esquizonte), con una parasitemia entre 4-5%.

El cultivo se homogenizó suavemente y se tomó 10ul de este. Se mezcló con 7ul de suero bovino fetal, dos veces suavemente con la micropipeta. Se añadió 4 ul de naranja de acridina a las concentraciones indicadas, y se mezcló suavemente dos veces con la micropipeta. Se tomó 10ul de esta suspensión y se colocó en una lámina portaobjeto,

distribuyéndolo uniformemente, se colocó el cubreobjeto, cuyos bordes fueron untados finamente con vaselina. Se observó en un microscopio de inmunofluorescencia 100X.

Se realizó el conteo de 100 glóbulos rojos parasitados, el número de glóbulos rojos parasitados formando rosetas fueron contados y expresados en porcentajes. Se obtuvo el recuento del número de glóbulos rojos parasitados que tienen 2 o más de 2 glóbulos rojos no infectados unidos. Se utilizó como controles glóbulos rojos no infectados (control negativo) además de la cepa FCR3 la cual no presenta adhesión a ningún receptor celular y la cepa AFR (control positivo). Todos los ensayos fueron llevados a cabo por triplicado por cada cepa.

V.4.4. ENSAYO DE ADHERENCIA DE GRS INFECTADOS CON LA PROTEÍNA CSA.

Para este ensayo de adherencia se utilizará la proteína condroitín sulfato A (CSA), esta proteína se obtuvo gracias a la donación del organismo MR4 (MRA-768, MR4, ATCC Manassas Virginia), esta llegó en una presentación de un vial de 125ul con una concentración de 0.75 ug/ul, disuelto en PBS a pH 7.4. Esta proteína proviene del tejido de placenta humano, el método de purificación fue en múltiples pasos, mediante cromatografía con sefarosa y bromuro de cesio.

V.4.5. ESTANDARIZACIÓN DEL ENSAYO DE ADHERENCIA DE GR INFECTADOS CON LA PROTEÍNA CSA.

En el esquema (Ver Anexo N° 04) se presenta la metodología que se realizó para obtener distintas concentraciones de la proteína CSA, que va desde 3750 ng/ml hasta 1.8 ng/ml, esto se logró mediante diluciones seriadas de la proteína en una placa especial que no permita la adherencia de la proteína en la placa a preparar las diluciones, pues las placas de poliestireno de ELISA, hace que la proteína se adhiera a estas en un determinado tiempo. La proteína fue alicuotada según la recomendación del fabricante en 3 viales de 40 ul.

En el primer ensayo realizado con la proteína se realizó estas diluciones sobre una placa petri de 120 mm por 15 mm. Para separar las distintas concentraciones se procedió a trazar un cuadrado dentro de la placa y trazar dentro de ella varias líneas con la finalidad de dibujar cuadrados más pequeños que limiten los distintos pozos que se utilizó en el ensayo con distintas concentraciones de la proteína.

Se colocó 15 ul de la solución de CSA purificado en PBS, Ph 7.2; en un punto circular de 4 mm de diámetro en una placa Petri de plástico de 150x15 mm, dejándolo cubierto por toda la noche a 4°C. Las manchas circulares fueron bloqueadas con 20 ul de BSA al 2%, por 2 horas a temperatura ambiente. Las manchas cubiertas solamente con PBS (control), fueron similarmente bloqueadas con BSA. Después de aspirar el BSA, se

agregó 15 ul del 2% de la suspensión del cultivo de parásitos en PBS o medio RPMI, Ph 7.2 (50-70% parasitemia), fue colocado en cada punto, e incubado a temperatura ambiente. Glóbulos rojos no infectados fueron colocados sobre el plato cubierto con CSA, estos fueron utilizados como controles negativos. Después de 40 min de incubación, las placas fueron lavados con PBS Ph 7.2 tres veces, las células unidas fueron fijadas con glutaraldehído al 2% y fueron teñidas con Giemsa por 10 min. Los glóbulos rojos fueron contados por microscopia de luz y fotografiados, todos los ensayos fueron llevados a cabo por triplicado.

V.4.6. ENSAYO PARA LA CONCENTRACIÓN DE PARÁSITOS.

Para realizar el ensayo de adherencia con la proteína CSA, se necesitó tener una parasitemia de 50 a 70%, la cual es difícil o casi imposible obtener en los cultivos mediante el cambio de medios, pues según los datos que se tiene del laboratorio, la cepa referencial, aquella mejor acondicionada al cultivo, puede crecer hasta un 10%, y a partir de allí empieza aparecer el estadio de gametocitos por la cantidad de parásitos presentes y la escasez de nutrientes, pues el cambio de medio es el mismo volumen todos los días. Por tal motivo se buscó una metodología que permitió obtener una alta concentración solo de GR infectados, y de esta manera alcanzar dicha parasitemia para el ensayo de adherencia.

Fundamento de la técnica del Percoll- glucosa:

El Percoll es una suspensión de polivinilpirolidona que presenta la ventaja de ser osmóticamente neutra, no causa daños a las células y no modifica la infectividad de los parásitos. Por lo tanto, es el medio de elección para preparar suspensiones de densidad determinada para la separación de glóbulos infectados por acción de una centrifuga, según el estadio de desarrollo del parásito.

V.4.7. CULTIVO DE CÉLULAS ENDOTELIALES DE VENA UMBILICAL HUMANO (HUVEC).

Pasaje de cultivo celular:

Se siguió los procedimientos del Manual del MR4 (43) y algunas modificaciones realizadas en el laboratorio. Se aspiró el medio antiguo del cultivo, se lavó las células con medio M199, luego se agregó 5 ml de tripsina-EDTA, se dejó las células por 5 minutos, se agitó el frasco fuertemente y se observó al microscopio invertido para evidenciar que las células se hayan despegados del frasco, se agregó 10 ml de medio fresco, para luego mezclarlo y transferirlo la suspensión a un tubo Falcon de 50 ml y se centrifugó la suspensión a 100 g por 5 minutos, fue removido el sobrenadante por aspiración y resuspendido el pellet en 1 ml de medio de cultivo. Se determinó el número de células en una cámara de Neubauer. Luego se agregó 5 ml de medio de cultivo a un frasco de 25 cm² para luego agregar aproximadamente 10⁵ células. Se incubó las células

a 37° C en CO₂ al 5%. La tapa del frasco tiene que estar suelto para realizar el intercambio de gases del cultivo.

V.4.8. ENSAYO DE CITOADHERENCIA CON HUVEC.

Se siguió las pautas dadas en el manual del MR4 (43) con algunas modificaciones realizadas en el laboratorio. Se colocaron los cubreobjetos para cultivos celulares, con la parte superior del lado tratado en las placas de 24 pozos, se agrega 1 ml de medio de cultivo adecuado para las células a cada pozo. Se siguió el protocolo de pasaje celular anteriormente mencionado, en vez de colocarlo a un nuevo frasco, se colocó 50×10^3 células en cada pozo con el cubreobjeto, se dejó que las células se unan al cubreobjeto en la incubadora por toda la noche (37° C, 5% CO₂). Posteriormente se inspeccionó que las células se hayan adherido al cubreobjeto, cada célula debió estar separado de otra para una mejor lectura de la adherencia. Se centrifugó el cultivo a 100 g por 5 minutos a temperatura ambiente. Se lavó las células 3 veces y se resuspendió con el mismo medio hasta obtener un hematocrito de 2%. Luego se aspiró el medio de los cubreobjetos de la placa de los 24 pozos, y se lavó una vez con el mismo medio, con cuidado de no dejar el cubreobjeto con las células adheridas que se vayan a secar. Se agregó 500 ul de la suspensión del cultivo sobre cada cubreobjeto. Se incubó las células a 37° C por 60 minutos, moviéndolo suavemente la placa cada 15 minutos (no se debe usar la incubadora de CO₂). Se verificó la unión de GRs infectados a las células mediante el uso de un microscopio invertido, se lavó aquellos GRs que no se hayan

adherido sumergiéndolos cuidadosamente en pequeñas placas Petri que contenían medio RPMI 1640. Se fijó los cubreobjetos con glutaraldehído al 1% por 60 minutos o por toda la noche, alternativamente se puede fijar en metanol al 1% por 30 minutos. Se lavó los cubreobjetos con agua destilada y se coloreó con Giemsa al 1% por 30 minutos, después de la coloración se lavó con agua y se dejó secar. Luego se montó los cubreobjetos en láminas de vidrio. Se examinó la lámina bajo un microscopio (1000x con aceite) y se contó 300 células, se calculó el promedio de GRs unidos por célula.

CONSIDERACIONES ETICAS

Esta investigación no involucró directamente la participación de seres humanos en su realización. Las muestras de sangre de donantes sanos y sin antecedentes de viaje a zonas endémicas para malaria fueron utilizadas para los ensayos de cultivos, se pidió el consentimiento informado a cada uno de los donantes voluntarios. Este consentimiento fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, que corresponde al Centro de Excelencia en Malaria. Este estudio fue realizado netamente en el laboratorio, bajo las medidas de seguridad necesarias en el manejo y procesamiento de fluidos biológicos humanos. Por otro lado, el trabajo no presenta riesgo ambiental alguno, ya que solo se trabajó en el cultivo y con técnicas de biología celular, no involucrando de ninguna manera al vector mosquito *Anopheles darlingi*, responsable de la diseminación de la enfermedad.

PLAN DE ANÁLISIS

Para el análisis de datos se utilizó el software SPSS (paquete estadístico para las Ciencias Sociales), se realizó la distribución de frecuencias. Los datos son presentados mediante tablas e histogramas. Cada experimento de adhesión se realizó por triplicado y se calculó la media. Los resultados se muestran como la media de tres experimentos independientes \pm SD. La significación estadística se calculó mediante la prueba estadística T de Student, la cual compara las medias, más las desviaciones estándares de los grupos controles y las de analizar. Además, se utilizó como instrumento una Ficha de Laboratorio (Ver ANEXO N° 03), la cual fue elaborada para la recolección de datos de los ensayos.

VI. RESULTADOS

VI.1- ESTANDARIZACIÓN DEL ENSAYO DE SINCRONIZACIÓN DE CULTIVOS DE CEPAS REFERENCIALES Y SILVESTRES DE *P. FALCIPARUM* MEDIANTE EL TRATAMIENTO CON SORBITOL AL 5%.

Con la cepa referencial CS2 a los 5 minutos de exposición se obtuvo a las 24 horas un 100% de trofozoitos maduros; siendo el tiempo adecuado de exposición del sorbitol, conforme se prolonga el tiempo en cultivo, la sincronización va disminuyendo (Ver Figura N° 4).

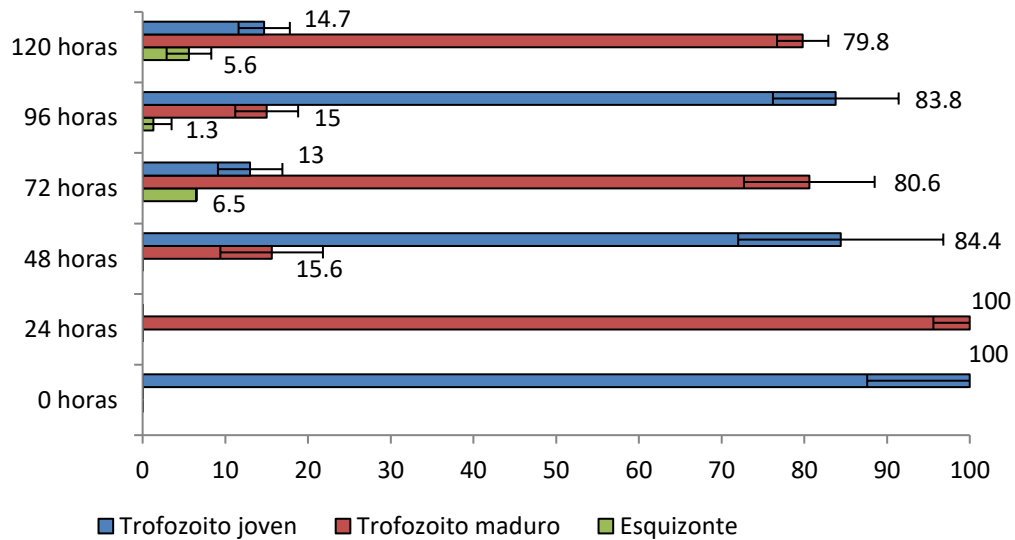


Figura N° 4. Sincronización de la cepa referencial CS2 durante 120 horas de cultivo, después de la exposición al sorbitol por 5 min. (Distribución porcentual relativa de cada estadio parasitario en intervalos de 24 horas, cada ensayo fue realizado por triplicado y obtenido un promedio, +/- 1DS).

Se obtuvo los porcentajes de estadios parasitarios con las cepas silvestres por cada 24 horas hasta un total de 120 horas de cultivo. De los 3 tiempos de exposición de los cultivos con el sorbitol (1, 3 y 5 min), el tiempo adecuado se obtuvo a los 5 minutos de exposición, en este tiempo se obtuvo a las 24 horas un 100% de trofozoitos maduros; conforme pasa más tiempo en cultivo disminuye la sincronización (Ver Figura N° 5). De la misma manera para los demás tiempos (1 y 3 min) a las 24 horas se obtuvieron la mayor cantidad de trofozoitos maduros, pero en menor porcentaje que los expuestos a los 5 min.

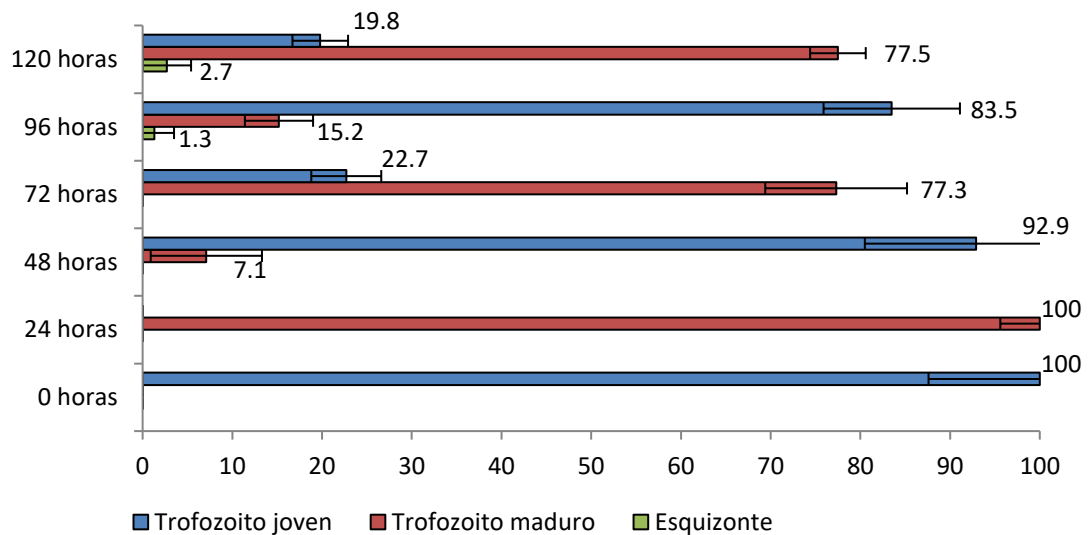


Figura N° 5. Desarrollo de la sincronización de las cepas silvestres durante 120 horas de cultivo, después de la exposición al sorbitol por 5 min. (Distribución porcentual relativa de cada estadio parasitario en intervalos de 24 horas, cada valor es el promedio de 5 cepas, +/- 1DS).

El porcentaje de parasitemia que se obtuvo mediante el recuento en frotis de GR infectados en ambos grupos (cepas silvestres y referenciales), durante los 3 tiempos de exposición al sorbitol más el control sin exposición del sorbitol. (Ver Figura N° 6 y Figura N° 7).

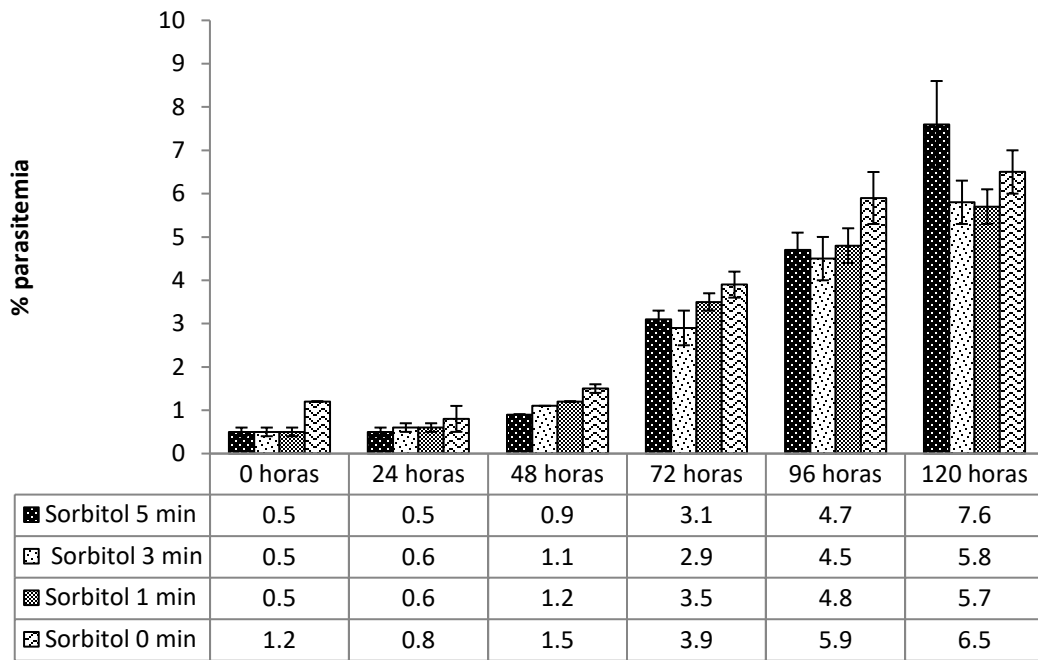


Figura N° 6. Porcentaje de parasitemia de la cepa referencial CS2, después de la sincronización con sorbitol al 5%. (Cada ensayo fue realizado por triplicado y obtenido un promedio, +/-1 DS).

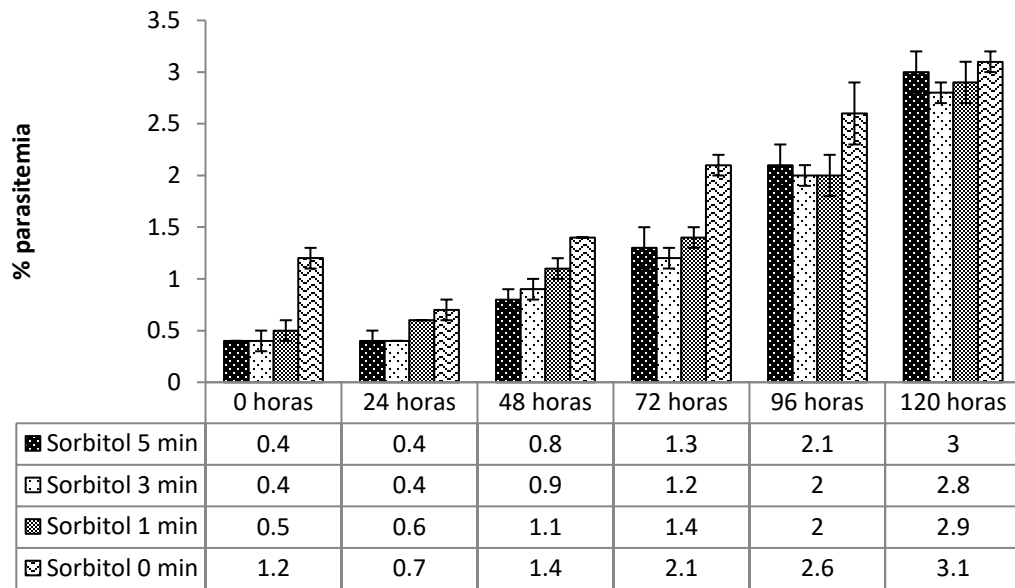


Figura N° 7. Porcentaje de parasitemia de las cepas silvestres, después de la sincronización con sorbitol al 5%. (Cada valor es el promedio de 5 cepas, +/- 1DS).

VI.2- ESTANDARIZACIÓN DEL ENSAYO DE ARROSETAMIENTO DE LOS CULTIVOS DE *P. FALCIPARUM* MEDIANTE LA TINCIÓN DE NARANJA DE ACRIDINA.

De las cuatro concentraciones y diversos volúmenes del colorante utilizado, se obtuvo lo siguiente, una mayor concentración del colorante (0.2% y 0.1%) dificultaba la observación del parásito, debido a que este originaba un mayor ruido de fondo, ocasionando una fluorescencia de todo el campo visual, mientras que a una menor concentración (0.001%), no se aprecia la fluorescencia de las formas maduras del parásito, de esta manera se obtuvo una mejor observación con 4 ul de naranja de acridina al 0.01%, con 7 ul de suero bovino fetal y con 10 ul del cultivo; de esta

suspensión se tomo 10 ul para la observación (Ver Figura N° 8). La naranja de acridina al 0.01%, obtuvo una mejor observación de los trofozoitos maduros, pero todavía existe un ruido de fondo, que dificultaba la observación de los glóbulos rojos sanos. Por este motivo se cambió los volúmenes tanto de la naranja de acridina (3 ul), como del suero bovino fetal (8 ul), también se disminuyó el volumen de la suspensión de glóbulos rojos del cultivo (8 ul), para asegurar que no exista una superposición de los glóbulos rojos que podrían ser observados como falsas rosetas, debido a una alta concentración de eritrocitos (Ver Figura N° 09).

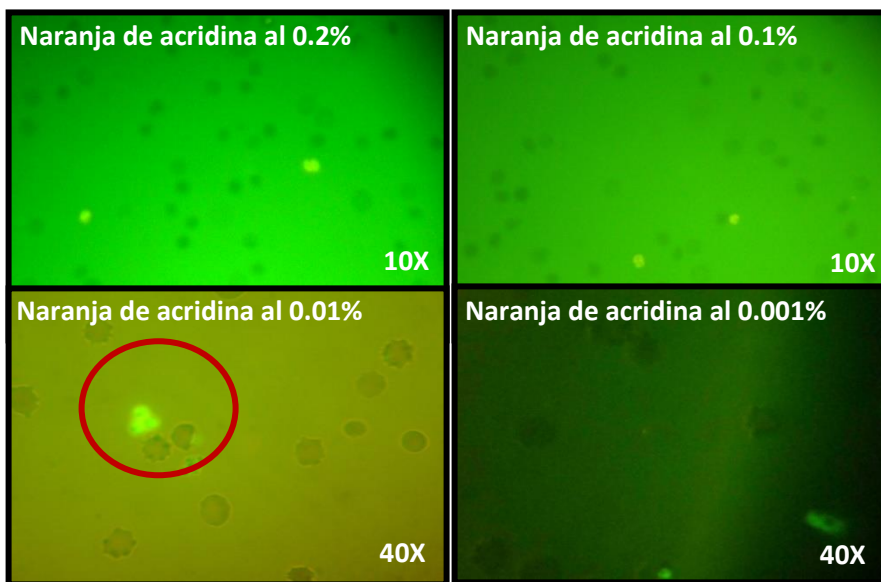


Figura N° 8. Observación microscópica de las suspensiones de GRs infectados, teñidos con naranja de acridina en distintas concentraciones. En el círculo rojo se puede observar la presencia de un eritrocito infectado con un estadio maduro del parásito.

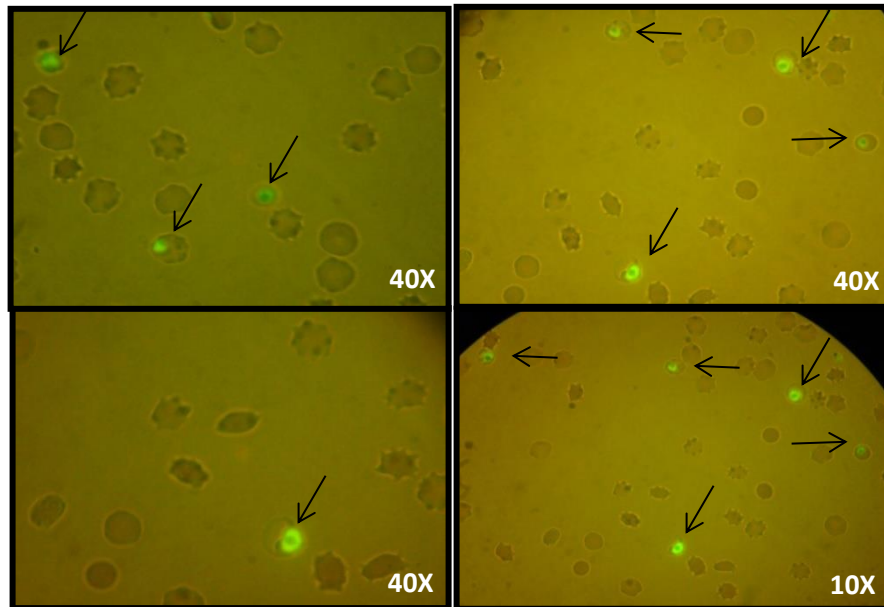


Figura N° 9. Observación microscópica de las suspensiones de GR infectados teñidos con naranja de acridina al 0.01%. Las flechas negras indican la presencia de eritrocitos infectados con un estadio maduro del parásito.

VI.3- DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE ADHERENCIA DE GRS INFECTADOS CON LA PROTEÍNA CSA.

Se utilizaron distintas concentraciones seriadas de la proteína CSA, y se enfrentó a una suspensión de GRs del cultivo de la cepa CS2, obteniéndose de esta manera un número de GRs infectados adheridos a la placa por mm² (Ver Tabla N° 2). Con los datos obtenidos se realizó una gráfica para determinar la concentración adecuada de CSA que permitiría la adherencia de una máxima cantidad de GRs infectados, durante el ensayo que se realizaría con las cepas silvestres (Ver Figura N° 10). Se determinó una concentración adecuada de la proteína para los ensayos de 2000 ng/ml. Este fue el valor

recomendado por el MR4, y fue confirmado realizando la metodología aplicada en el laboratorio.

Tabla N° 2. Concentraciones de la proteína CSA utilizadas para obtener el número de GRs infectados adheridos por mm² (El ensayo fue realizado por triplicado, obteniéndose un promedio, +/- 1DS).

CSA (ng/ml)	GRs infectados/mm ² +/- 1DS
2	183 ±5.0
3	222 ±12.0
6	391 ±7.0
12	943 ±13.7
25	1866 ±21.5
50	3371 ±15.3
100	4551 ±16.9
200	5136 ±11.5
400	5184 ±5.1
800	5080 ±15.1
1600	5159 ±16.9
3200	5123 ±8.5

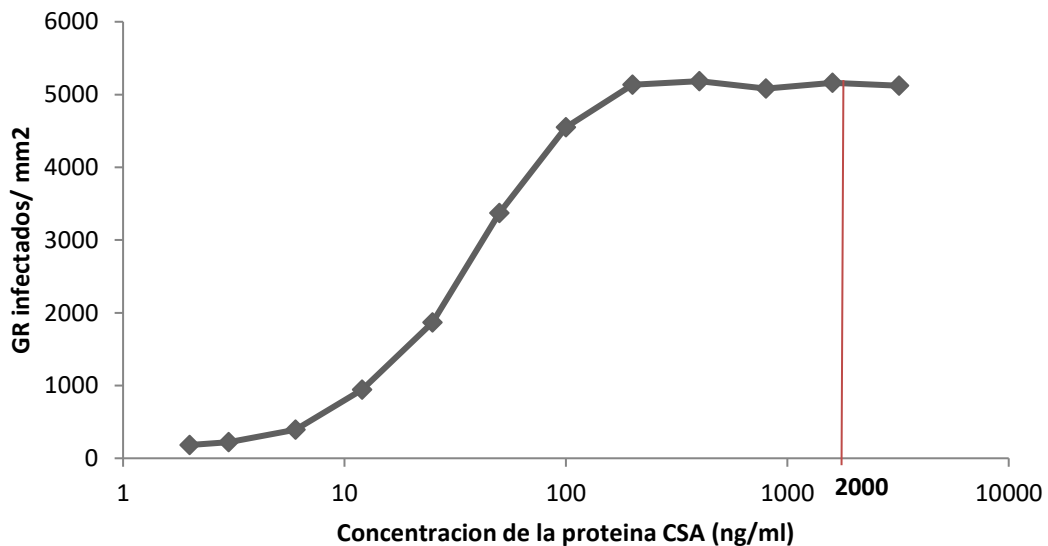


Figura N° 10. Curva de adherencia de GRs infectados con la proteína CSA. Para la determinación de la concentración adecuada de proteína a utilizarse en los ensayos con las cepas silvestres.

VI.4- CONCENTRACIÓN DE LOS GRS INFECTADOS DEL CULTIVO MEDIANTE EL MÉTODO DE PERCOLL- GLUCOSA:

Mediante esta técnica se obtuvo una alta concentración de GRs infectados, hasta un 90% de parasitemia de estadios maduros; se trabajó con el cultivo ya sincronizado por el sorbitol. Esto se evidenció con el conteo de la parasitemia en el frotis, realizado a la interfase obtenida de la separación con el Percoll (Ver Figura N° 11).

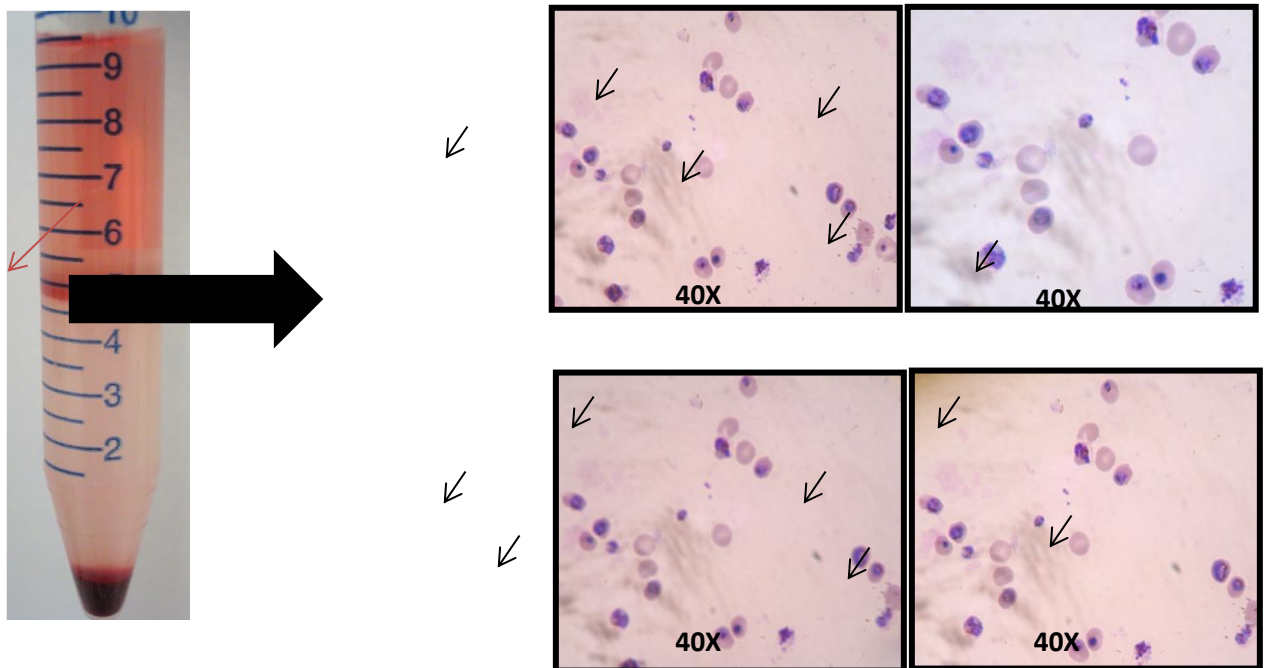


Figura N° 11. Concentración de GRs infectados del cultivo mediante la técnica Percoll-Glucosa. La fecha roja indica la interfase obtenida después de la centrifugación del cultivo con Percoll. En el lado izquierdo se muestran fotografías del frotis realizado con una alícuota de la interfase. Las fechas pequeñas de color negro indican algunos de los GRs infectados con los estadios maduros del parásito.

VI.5- ENSAYO DE FORMACIÓN DE ROSETAS EN CULTIVOS DE *P. FALCIPARUM* CON NARANJA DE ACRIDINA.

Ninguna cepa de los tres grupos que tiene la combinación *hrp2* (+) *hrp3* (+); *hrp2* (+) *hrp3* (-); *hrp2* (-) *hrp3* (+) tuvieron la capacidad de formar rosetas. Del grupo de cepas que tiene la combinación *hrp2* (-) *hrp3* (-) solo la PE02F06, tuvo un índice de formar rosetas del 10% (Ver Figura N° 12).

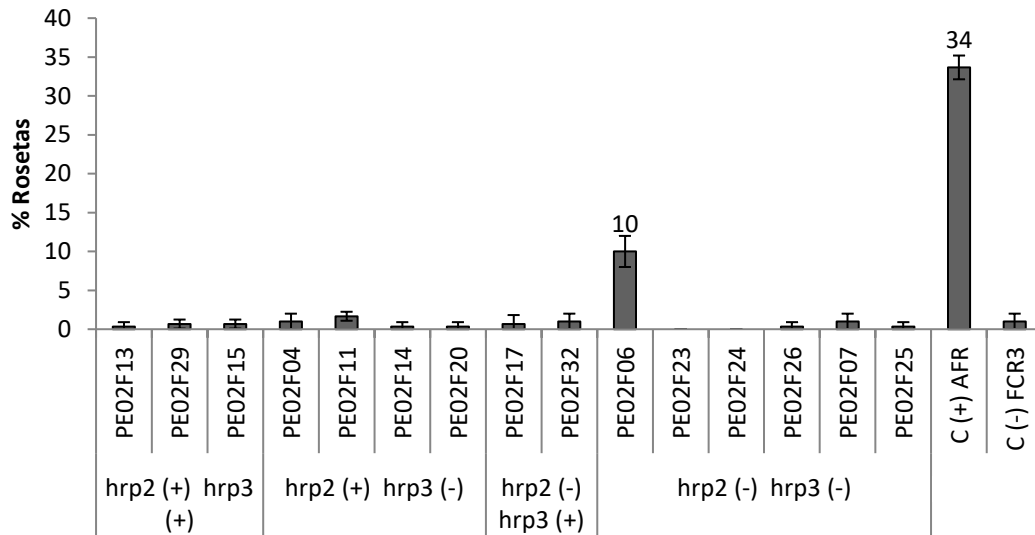


Figura N° 12. Porcentaje de formación de rosetas de cepas silvestres. El ensayo fue realizado por triplicado y se obtuvo el promedio +/- 1DS.

VI.6- ADHERENCIA DE GR INFECTADOS CON LA PROTEÍNA CSA.

Ninguna cepa de los tres grupos con la combinación *hrp2* (-) *hrp3* (+); *hrp2* (+) *hrp3* (-) y *hrp2* (-) *hrp3* (-) tuvieron la capacidad de adherirse a la proteína CSA. Del grupo de cepas con la combinación *hrp2* (+) *hrp3* (+), solo la cepa PE02F13 tuvo la capacidad de adherirse a la proteína CSA, obteniéndose 1039 GRs infectados por mm². (Ver Figura N° 13 y 14).

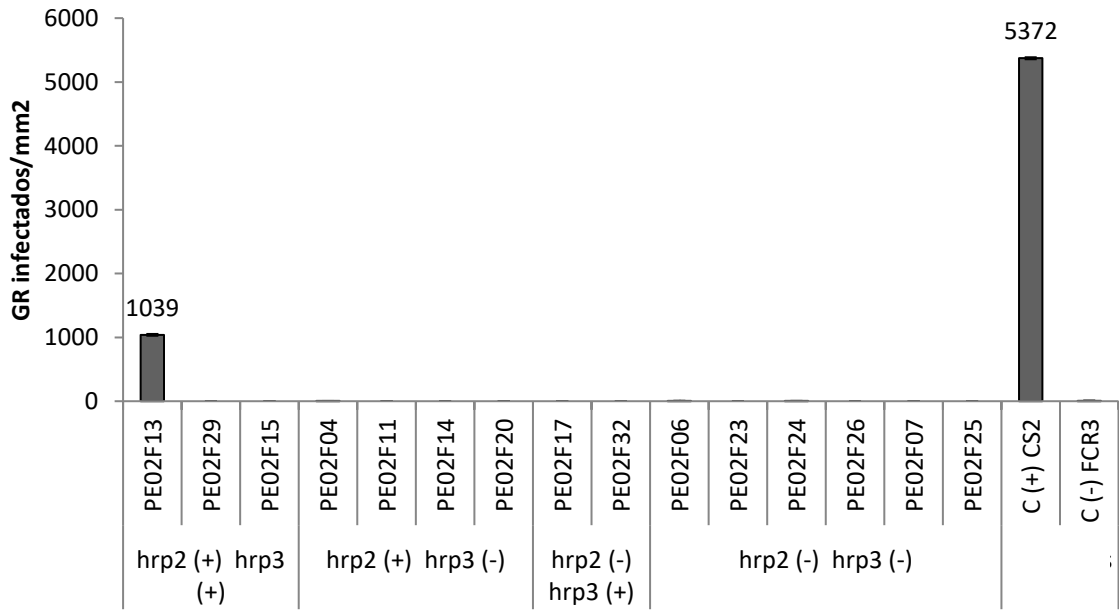


Figura N° 13. Adhesión de las Cepas Silvestres a la proteína CSA de placenta (Cada ensayo fue realizado por triplicado y se obtuvo el promedio +/- 1DS).

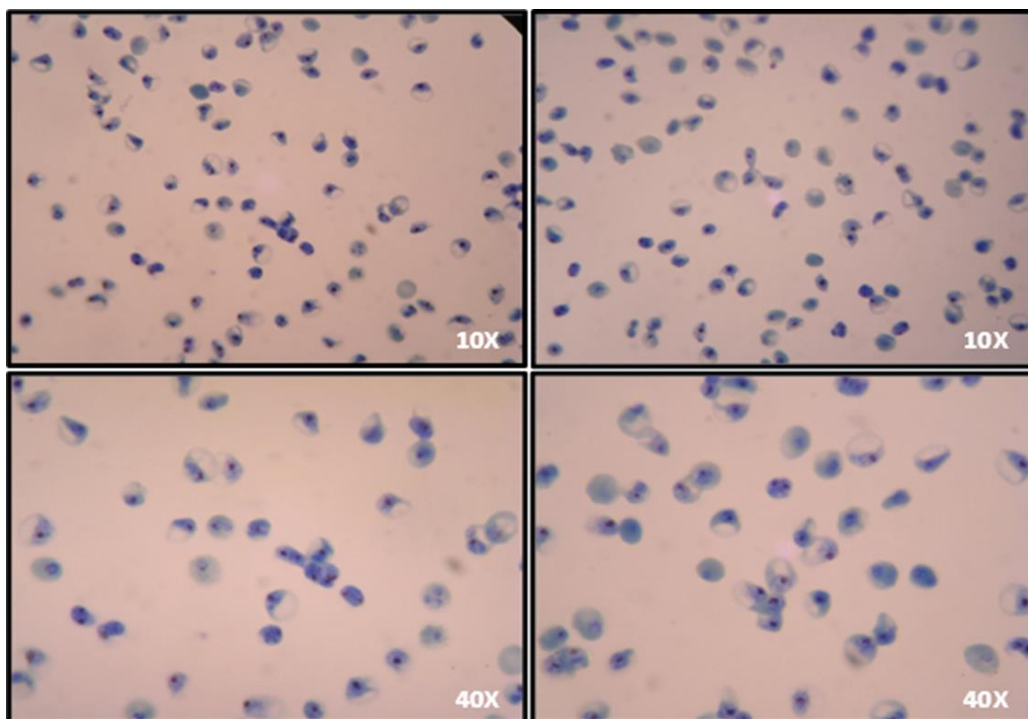


Figura N° 14. Adhesión de GRs infectados a la placa conteniendo CSA. Coloración Giemsa (10x, 40x).

VI.7- RESULTADOS DEL ENSAYO DE CITOADHERENCIA CON HUVEC.

Ninguna cepa con combinación *hrp2* (+) *hrp3* (+) y *hrp2* (+) *hrp3* (-) tuvo la capacidad de adherirse a las HUVEC. Del grupo de cepas con la combinación *hrp2* (-) *hrp3* (+), solo la PE02F17 tuvo la capacidad de adherirse a las HUVEC, obteniéndose 111 GRs infectados por 100 células. Del grupo de cepas con la combinación *hrp2* (-) *hrp3* (-) solo las cepas PE02F23 y PE02F07 tuvieron la capacidad de adherirse a las HUVEC, obteniéndose 122 y 105 GRs infectados por 100 células blanco, respectivamente (Ver Figura N° 15, 16 y 17).

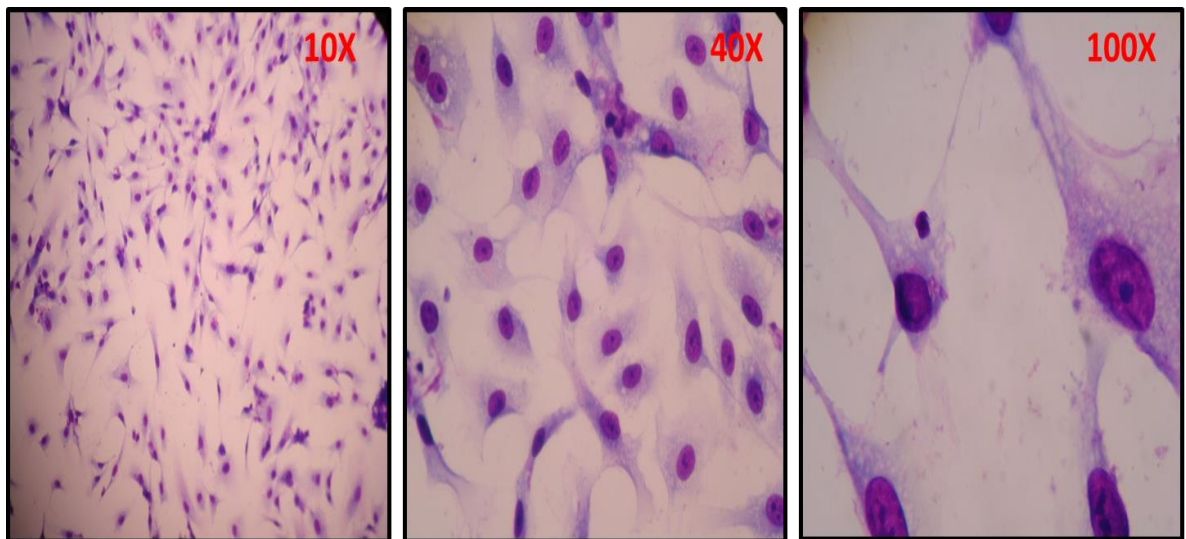


Figura 15. Las HUVEC adheridos al cubreobjeto de vidrio a distintos aumentos. Se observan las células a una distancia adecuada entre ellas que permitirá el conteo de GRs infectados que se adhieran a ellas.

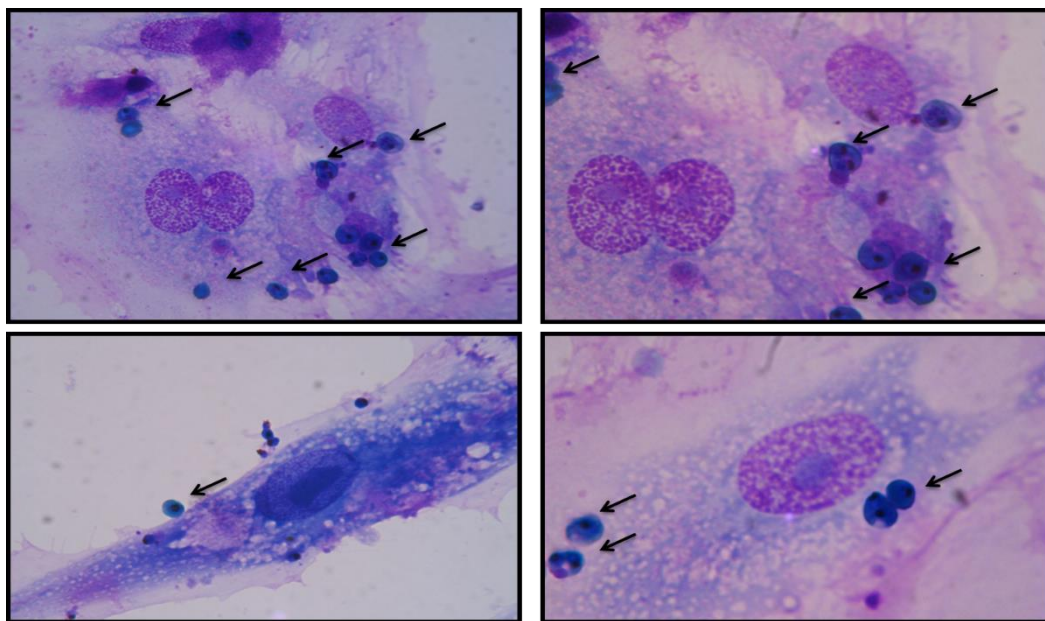


Figura N° 16. Adhesión de GRs infectados a las HUVEC. Las flechas oscuras indican los GRs infectados, dentro de ellas el núcleo del parásito de color oscuro. Coloración Giemsa (100x).

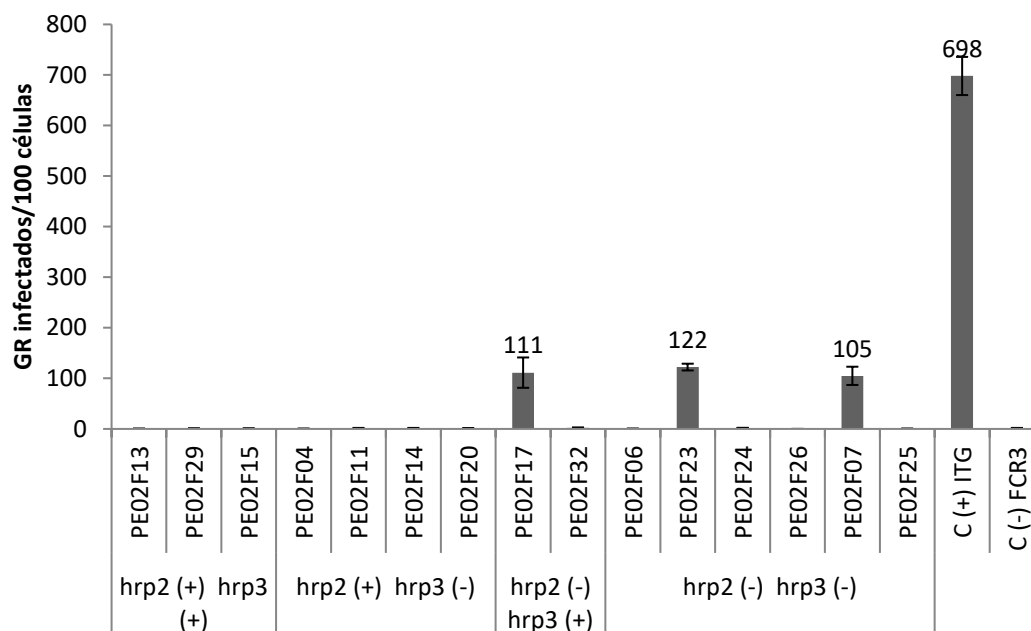


Figura N° 17. Citoadherencia de GRs infectados de cepas silvestres con las HUVEC (Cada ensayo fue realizado por triplicado y se obtuvo el promedio +/- 1DS).

VI.8- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se realizó una regresión binomial negativa (Tabla N° 3).

Tabla N° 3. Análisis estadísticos de los distintos genotipos a la unión del ICAM-1.

	ref	gen1	h2(+)h3(+)		
ICAM	Coef.	Std.Err.	z	P> z	[95% Conf.Interval]
h2(+)h3(-)	1.004	1.105	0.910	0.363	-1.161 3.169
h2(-)h3(+)	5.348	1.192	4.490	0.000	3.011 7.685
h2(-)h3(-)	5.003	1.025	4.880	0.000	2.993 7.013
rep2	0.529	0.791	0.670	0.503	-1.021 2.079
rep3	-0.228	0.751	-0.300	0.762	-1.700 1.244
const	-1.430	1.057	-1.350	0.176	-3.501 0.641
Inalpha	1.266	0.244			0.788 1.744
alpha	3.547	0.864			2.200 5.718

Likelihood-ratio test of alpha=0: $\chi^2(01) = 1745.92$ Prob>= $\chi^2 = 0.000$

Se cruzan datos entre los 4 genotipos con respecto a la adhesión al ICAM-1, obteniéndose una diferencia estadística del grupo *hrp2* (+) *hrp3* (+) con los grupos *hrp2* (-) *hrp3* (+) y *hrp2* (-) *hrp3* (-), esto sugería que el ICAM-1 podría discriminar entre los genotipos *hrp2* (-) de los *hrp2* (+), por tal motivo se realizó un nuevo análisis (Tabla N° 4).

Tabla N° 4. Tabla del análisis de los genotipos con ausencia o presencia del gen *hrp2*, mediante una regresión binomial negativo con respecto al ensayo de adhesión al ICAM-1.

	ref	gen1	h2(-)			
ICAM	Coef.	Std.Err.	z	P> z	[95% Conf.Interval]	
h2(+)	-4.251	0.674	-6.310	0.000	-5.571	-2.931
const	3.758	0.395	9.510	0.000	2.984	4.533
lnalpha	1.314	0.248			0.8289442	1.799384
alpha	3.722	0.921			2.290899	6.045922
Likelihood-ratio test of alpha=0: chibar2(01) = 1795.94 Prob>=chibar2 = 0.000						

En la Tabla N° 4 se observa que existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) cuando existe la ausencia del gen *hrp2*, con la adhesión al ICAM-1.

VI.9- DATOS OBTENIDOS DE LOS PACIENTES DE DONDE SE AISLARON LAS CEPAS PARA EL ESTUDIO.

En la Tabla N° 5, se recaba los datos de cada paciente de donde se aislaron las 15 cepas que se trabajaron en los ensayos de adhesión, las 5 cepas sombreadas son aquellas que tuvieron la capacidad de adherirse durante los ensayos realizados de la tesis, de estas tenemos que, según la edad del paciente, el menor tuvo 23 años siendo del sexo masculino, y la mayor de 65 años siendo del sexo femenino, con un promedio de 45 años. Según el género, la mayoría fue del sexo masculino (60%). Según la localidad

solo dos de ellos provinieron del mismo origen (Maynas-San Juan), además todos los pacientes presentaban una parasitemia alta en sangre. Los datos recabados con respecto a la sintomatología, todos presentaron fiebre, escalofríos y dolor de cabeza, excepto dos de ellos que no presentaron sudoración, pero ambos tuvieron la capacidad de adhesión en distintos ensayos. Estos síntomas son característicos en episodios de malaria.

Tabla N° 5. Datos obtenidos de los pacientes que se les aislaron las cepas para el estudio.

Cepas	Rosetas	Proteína CSA	ICAM-1 HUVEC	Edad	Sexo	Localidad	Parasitemia (parásitos/ul)	Sintomatología			
								Fiebre	Escalofríos	Sudoración	Dolor de cabeza
PE02F06	+	-	-	63	F	Maynas-Urcomiraño	3680.65	SI	SI	SI	SI
PE02F13	-	+	-	36	M	Maynas-San Juan	3850.63	SI	SI	NO	SI
PE02F17	-	-	+	40	M	Maynas-Ex petroleros	4449.87	SI	SI	NO	SI
PE02F23	-	-	+	23	M	Arabela-Curaray river	7755.24	SI	SI	SI	SI
PE02F07	-	-	+	65	F	Maynas-San Juan	5291.55	SI	SI	SI	SI
PE02F29	-	-	-	41	F	Maynas-Ex petroleros	10152.5	SI	SI	SI	SI
PE02F15	-	-	-	18	F	Curaray-Napo River	4933.25	SI	SI	SI	SI
PE02F04	-	-	-	48	F	Maynas-Mazan	16114.28	SI	SI	SI	SI
PE02F11	-	-	-	42	F	Maynas-San Juan	10624.24	SI	SI	SI	SI
PE02F14	-	-	-	23	F	Maynas-San Juan	61185.83	SI	SI	SI	SI
PE02F20	-	-	-	23	M	Arabela-Curaray river	7755.24	SI	SI	SI	SI
PE02F32	-	-	-	56	F	Maynas-San Juan	21794.11	SI	SI	SI	SI
PE02F24	-	-	-	25	M	Momon river	6093.71	SI	SI	SI	SI
PE02F26	-	-	-	52	F	Maynas-San Juan	11152.28	SI	SI	SI	SI
PE02F25	-	-	-	29	M	Nucuray-Marañon River	27375.6	SI	SI	SI	SI

VII.- DISCUSIONES

En este estudio se pudo determinar las propiedades de adhesividad de eritrocitos infectados con cepas nativas de *P. falciparum* provenientes de la Amazonia peruana que poseen deleciones cromosómicas portando diversas combinaciones de los genes *hrp2-3*. La caracterización de las cepas fue a través de los ensayos de adhesión como; el ensayo de adhesión a la CSA, ensayo de adhesión a las HUVEC y la capacidad de GRs infectados de formar rosetas. Esta caracterización se pudo lograr mediante la sincronización de las cepas silvestres y referenciales en cultivo *in vitro* utilizando el método selectivo de sorbitol al 5%. La mayoría de las cepas no tuvo una capacidad de adhesión a los receptores estudiados, solo cuatro de ellas pudo unirse a uno de los ensayos realizados.

Para la realización de las pruebas de adhesión, se tomaron las primeras generaciones los parásitos después de haber sido adaptadas al cultivo en el laboratorio, para evitar la pérdida de su capacidad patogénica, pues un estudio realizado por Udeinya *et al* (44); encontró que el efecto del tiempo prolongado de un cultivo continuo podría afectar la capacidad de adherencia de algunas cepas. De un total de 9 aislados, encontró que 4 de ellos perdieron la capacidad de adhesión después de permanecer entre 26 y 46 días en cultivo continuo, uno de ellos al inicio del estudio presentaba una capacidad de adhesión de 680 GRs infectados por 100 células blanco, pero después de estar 37 días en cultivo disminuyó su capacidad a 18 GRs infectados por 100 células blanco. En

nuestro estudio la primera generación de parásitos se obtuvo después de la adaptación al cultivo entre 7 a 14 días, para asegurarnos que no se perdiera la capacidad patogénica de las cepas.

Se obtuvo una mayor sincronización de los cultivos, con un tiempo de 5 minutos de exposición al sorbitol, esto permitió la realización de los ensayos de adhesión, debido que se requería la mayoría de estadios de trofozoítos maduros quienes expresan la proteína *PfEMPI*, responsables de la adhesión a nivel post capilar (28). La sincronización disminuye conforme pasan los días en cultivo; pero, para el propósito del estudio se logró obtener el estadio de trofozoíto maduro a las 24 después de exponer los cultivos al sorbitol. Existen otras técnicas de sincronización como la utilización de columnas magnéticas la cual permite separar los estadios del parásito por afinidad de la hemozoina a un campo magnético, un estudio realizado por Ribaut *et al* (45), en la que realizó la concentración y purificación de los estadios eritrocitarios del *Plasmodium* utilizando dichas columnas, obtuvo suspensiones de GR infectados con una parasitemia mayor al 90% en distintas cepas con presencia o ausencia de “knobs”, además aisló esquizontes y gametocitos de sangre periférica de pacientes, de otras especies no *falciparum* debido a la dificultad de realizar cultivos de ellos. En este trabajo el uso del sorbitol no causó alguna disminución considerable en la parasitemia de los cultivos posterior a la sincronización, esto demostraría que el sorbitol durante el tiempo de exposición empleado no afectaría la membrana del eritrocito infectado, permitiendo continuar con el ciclo evolutivo del parásito.

En nuestro estudio se encontró que, del total de 15 cepas, solo 1 (6.7%) tuvo la propiedad de producir rosetas, con una capacidad 3 veces menor al control positivo del ensayo de adhesión. En un estudio realizado por Wahlgren *et al* (46), utilizando 75 muestras frescas aisladas de pacientes provenientes de África, Sudamérica (Colombia) y Asia (Tailandia), con la mayoría de estos pacientes presentando formas severas de malaria, encontró que la capacidad de formar rosetas estaba presente en el 49% de los aislados. Además, la frecuencia de los aislados que forman rosetas fue mucho mayor en el África (55%) que en los pacientes proveniente de Sudamérica (38%); los índices de formación de rosetas variaban desde menor, de 1% hasta 75% en ambos grupos; en los pacientes de África se obtuvo un promedio del índice de arrosetamiento de 11.6%, y para los pacientes de Sudamérica el promedio del índice de arrosetamiento fue de 16.2%. En nuestro estudio, la cepa silvestre positiva a rosetas tuvo un índice de arrosetamiento de 10%, menor al encontrado en los aislados de Sudamérica del estudio anterior, que también encontró que en los sueros de los pacientes que no formaban rosetas tenían la capacidad de bloquear la formación de rosetas con una cepa positiva. En nuestro estudio no fue posible realizar dicho ensayo por carecer de los sueros de los pacientes de las cepas aisladas, pero sería importante evaluar sueros de pacientes infectados con *P. falciparum* de zonas endémicas. Hasta hoy en día no se conoce cuál es el mecanismo molecular para la formación de rosetas, pero sí se ha evidenciado que está relacionado a la severidad de la forma clínica de la malaria (47).

Del total de 15 cepas solo 1 (6.7%) pudo adherirse a la proteína CSA, con una capacidad de adhesión 5 veces menor que la del control positivo del ensayo de adhesión. En un estudio realizado por Rogerson *et al* (4), se encontró que de 148 aislados el 27% se unía a la proteína CSA. Los parásitos capaces de unirse a la proteína condroitín sulfato, presentaban un determinado tipo de *PfEMP1* denominado VAR2CSA, cuya composición consiste en 6 dominios de unión a Duffy (DBL) y dos regiones interdominios (ID), la ID1 entre DBL1x y DBL2x, y la ID2 entre DBL2x y DBL3x. En áreas endémicas, la prevalencia de la infección por *P. falciparum* en mujeres gestantes se produce entre las semanas 13 y 20 de gestación, y disminuye gradualmente (7). Un estudio realizado por Agbor Enoh *et al* (7), encontró que la proteína CSA se encuentra presente a lo largo del segundo y tercer trimestre de gestación, y que las gestantes primigrávidas serían las más afectadas, debido a la inexistencia de anticuerpos que pudieran reconocer dicha proteína, conforme aumenta la gravidez disminuye las probabilidades de la infección. Es importante mencionar que la cepa silvestre aislada en nuestro estudio, no provenía de un gestante, por la cual es muy importante determinar esta capacidad que pudieran tener las cepas nativas, pues esto podría involucrar la existencia de casos de malaria gestacional en dicha zona.

Del total de 15 cepas solo 3 (20%) pudieron adherirse a las HUVEC y las capacidades de adhesión de las tres eran 6 veces menor que el control positivo al ensayo de adhesión ITG. El uso de células endoteliales en el ensayo es una ventaja, debido a que esta adhesión podría reflejar condiciones *in vivo*. Dentro de los receptores que se puede

encontrar en las células HUVEC están ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina, todos ellos involucrados en la adherencia de GRs infectados, para confirmar la unión específica al ICAM, se utilizó anticuerpos dirigidos contra este receptor y la inhibición de la adhesión evidenciaría la unión específica. En un estudio realizado en niños de África (4), se encontró que de 136 aislados el 55.9% era capaz de unirse al ICAM, en nuestro estudio no se encontró una asociación entre la unión al ICAM-1 y la severidad de la enfermedad debido a la ausencia de una ficha clínica.

En nuestro estudio de un total de 15 cepas se encontró que 5 (33.3%) presentaban capacidad de adherencia en alguno de los tres tipos de ensayo. Ninguna presentó más de un tipo de adherencia. En el estudio realizado por Udomsangpetch *et al* (48) encontraron que dos de los aislados, tenían tanto la capacidad la de formar rosetas como la de adherirse a las células endoteliales, en forma simultánea. Esto podría deberse a que estos dos aislados utilizados pudieran ser heterogéneos, y por ende contener diversas poblaciones de parásitos, con distintas características para formar rosetas o unirse a otra célula blanco. En nuestro estudio se aseguró que todas las cepas provinieran de una sola clona, previamente genotipificadas con diversos marcadores moleculares.

En nuestro estudio no se pudo relacionar las capacidades de adherencia de las cepas con un cuadro clínico o la gravedad de la enfermedad, pues no se tiene dichos datos, debido a que estas cepas fueron obtenidas por anteriores proyectos cuyo objetivo no

fue obtener dicha información. Esta información pudo haber dado una visión si esta capacidad del parásito podría estar provocando un cuadro clínico severo en estos pacientes, aunque los casos de malaria severa en nuestro país son bajos, pero estas capacidades podrían ser moduladas por el hospedero.

Con el análisis estadístico de los resultados obtenidos, se encontró que el ICAM-1, permite separar entre los genotipos que no poseen el gen *hrp2* de aquellos que si lo tienen, independientemente de la ausencia o presencia del gen *hrp3* ($p < 0.05$), pues de las 3 cepas en total que tuvieron esa capacidad de unirse al ICAM-1, uno pertenecía al genotipo *hrp2*(-)/ *hrp3*(+), y dos al genotipo *hrp2*(-)/ *hrp3*(-). La ausencia de este gen podría predisponer la unión al ICAM-1, para respaldar dichos datos, se recomienda realizar el ensayo con un mayor número de cepas, para corroborar dicha afirmación.

Se obtuvieron algunos datos disponibles de los estudios de las cuales se obtuvieron las cepas como el sexo, edad y algunos síntomas, para determinar la existencia de alguna predisposición de los pacientes de donde se aislaron las cepas. La cepa PE02F06, positiva al ensayo de rosetas, se aisló de un paciente que presentó los cuatro síntomas (fiebre, sudoración, escalofríos y dolor de cabeza) indicadas en la Tabla N° 5. La formación de rosetas está relacionada a la malaria cerebral, pero el paciente no llegó a desarrollar dicha complicación. Esto podría indicar que existen también otros factores por parte del hospedero que permiten el desarrollo de la forma severa, no solo bastaría la capacidad patogénica del parásito, si no otros factores como la respuesta inmune,

etc. Datos referentes a la interacción de *PfEMP1* con el sistema inmune humano son limitados. En el estudio realizado por Urban *et al* (49), indica que *PfEMP1* puede jugar un papel doble, como un inhibidor y estimulante a la vez en la respuesta inmune, pues al unirse a los receptores CD36 en las células dendríticas, *PfEMP1* puede desencadenar el proceso de apoptosis e inhibir la presentación de antígenos. Otros datos mencionan que *PfEMP1* pudiera unirse a ciertos linfocitos B, y estimular la secreción de inmunoglobulinas no inmune tipo M.

Solo la cepa PE02F13, de un varón de 36 años, fue positiva a la proteína CSA. Este tipo de adhesión está implicado en la malaria placentaria, es muy interesante que a pesar de que el parásito no tenga las condiciones para provocar malaria placentaria, pueda tener la capacidad de adherirse a la proteína de placenta. Esto podría indicar que el parásito no necesariamente necesite las condiciones dentro del hospedero para ser capaz de adherirse a la proteína de placenta, además podría ser un riesgo dentro de la población cercana, pues esta cepa podría ser transmitida a una gestante para desarrollar la forma severa de malaria.

Las cepas PE02F17, PE02F23 y PE02F07 son positivas de adhesión a las células del endotelio (HUVEC). Este tipo de adhesión es también relacionado a la malaria cerebral en algunos casos, de estos tres, solo uno de ellos no presentó sudoración dentro de los síntomas recabados. Del total, diez cepas no tuvieron capacidad de adhesión en los ensayos realizados, no se encontró alguna diferencia con respecto a los datos

sintomatológicos recabados, pues todos mostraron los mismos síntomas característicos de malaria.

Del total de cepas, una fue aislada de una mujer en estado de gestación, correspondiente a la cepa PE02F14, pero en los ensayos realizados con la proteína CSA, no hubo interacción con ella. Los datos recabados del estudio que permitió coleccionar las cepas, no incluyen más síntomas que los mostrados ni algún documento o ficha clínica propia de su historia, que confirme que hizo malaria severa, con compromiso del feto, pues no era el objetivo del estudio en ese momento, se tiene solo el testimonio del personal que coleccionó la muestra, que indica la hospitalización y gravedad de la paciente; cabe destacar que su parasitemia en sangre fue la más elevada (61 185.8 parásitos/uL) en comparación al resto de pacientes con los que se trabajó. Según los criterios de la OMS dados en la publicación del año 2000, para catalogar un paciente con malaria severa debe cumplir con uno o más de las características clínicas o hallazgos del laboratorio, en este último indican que una hiperparasitemia es diagnóstico de malaria severa, > 2% equivalente a 100.000 parásitos/uL en áreas de baja intensidad de transmisión o >5% equivalente a 250.000 parásitos/uL en áreas de alta intensidad de transmisión en las parasitemias obtenidas de los pacientes. Ninguno de ellos cumplía este criterio, de lo que no se puede confirmar si cumplía alguno de los otros criterios clínicos, no se tiene esa información.

Según estos últimos datos se podría decir que las características patogénicas del parásito no son los únicos factores que serían necesarios para desarrollar las formas severas de malaria, cabe señalar que estos pacientes provienen de una zona endémica, donde existe un equilibrio entre el parásito y el estado de salud de los pobladores. Solo con estos síntomas recabados no se podrían catalogar la condición clínica del paciente y relacionarlo con los episodios graves de malaria por *P. falciparum*, tampoco existe una predisposición por algún grupo etario preferencial ya sea por sexo o edad.

En un estudio paralelo, realizado en el Laboratorio de Malaria (datos no publicados), con seis cepas nativas (PE02F06, PE02F04, PE02F13, PE02F14, PE02F23 y PE02F32) de *P. falciparum*, que también fueron caracterizadas en nuestro estudio, se observó que el nivel de expresión de los genes relacionados con virulencia, mostraban una conservación de una alta expresión de un grupo de genes conformado por: *pf332*, *pfmahrp* (encargados de ubicar de forma correcta *PfEMP1*) y *PF10_0161* (tiene similar función a *pfkhrp*, como soporte de la *PfEMP1*), de estas seis cepas la mitad de ellas (PE02F06, PE02F13 y PE02F23) presentaban una alta expresión con respecto a ciertos genes, cuyas proteínas intervienen en el transporte y soporte de la proteína *PfEMP1*, esto respalda el fenotipo de adherencia a los receptores estudiados.

Ante la baja capacidad de adherencia que tuvieron las cepas silvestres frente a los receptores utilizados para la adhesión, se podría utilizar otros receptores que también se han visto involucrados con la adherencia de GRs infectados, por este motivo no

podría descartarse que las cepas silvestres puedan unirse a otros tipos de receptores celulares.

VIII.- CONCLUSIONES

El uso del sorbitol al 5% permitió realizar la sincronización de los cultivos tanto de las cepas silvestres y de las cepas referenciales, obteniéndose una mayor sincronización con 5 minutos de exposición al sorbitol, permitiendo de esta manera obtener una mayor cantidad de trofozoítos maduros que expresan las proteínas responsables de la adhesión, sin afectar la integridad de la membrana del parásito y por lo tanto tampoco con la parasitemia del cultivo.

El bajo número de cepas capaces de formar rosetas, adherirse a la proteína CSA y a las HUVEC, podría indicar la baja capacidad de adherencia que tienen las cepas nativas que circulan en la región amazónica peruana, a los receptores estudiados, las que están relacionados a formas severas de la enfermedad, esto tendría relación con la baja incidencia de casos de malaria severa en nuestro territorio.

La adhesión al I-CAM1 permite separar los genotipos que no poseen el gen *hrp2* de los que, si tienen el gen *hrp2*, aunque es necesario utilizar el mismo marcador, pero con un mayor número de muestras para confirmar esta relación.

IX.- RECOMENDACIONES

Podría evaluarse la presencia de anticuerpos antirosetas en los sueros de pacientes infectados con *P. falciparum* de zonas endémicas, pues se ha relacionado la presencia de estos anticuerpos en pacientes cuyos GRs infectados no poseen la capacidad de formar rosetas *in vitro*.

Es importante determinar periódicamente las características de adhesión de las cepas de *P. falciparum* que circulan en nuestro territorio, debido a que estas propiedades podrían ocasionar formas severas de malaria, por lo que el tratamiento es distinto (15).

En posteriores estudios se podrían utilizar otros receptores que permitan confirmar la capacidad de adhesión de las cepas estudiadas, como CD36 quien está ampliamente distribuida en poblaciones celulares, además de incrementar el número de muestras.

X. – REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. World Malaria Report 2011. Geneva: World Health Organization; 2011.
2. Cooke BM, Mohandas N, Coppel RL. The malaria-infected red blood cell: structural and functional changes. *Adv Parasitol* 2001; 50:1–86.
3. Newbold C, Warn P, Black G, Berendt A, Craig A, Snow B, et al. Receptor-specific adhesion and clinical disease in *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 57(4):389–98.
4. Rogerson SJ, Tembenu R, Dobaño C, Plitt S, Taylor TE, Molyneux ME. Cytoadherence characteristics of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes from Malawian children with severe and uncomplicated malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61(3):467–72.
5. Roberts DJ, Pain A, Kai O, Kortok M, Marsh K. Autoagglutination of malaria-infected red blood cells and malaria severity. *Lancet*. 2000, 22; 355(9213):1427-8.
6. Treutiger CJ, Hedlund I, Helmby H, Carlson J, Jepson A, Twumasi P, et al. Rosette formation in *Plasmodium falciparum* isolates and anti-rosette activity of sera from Gambians with cerebral or uncomplicated malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 1992; 46(5):503-10.
7. Agbor-Enoh ST, Achur RN, Valiyaveetil M, Leke R, Taylor DW, Gowda DC. Chondroitin Sulfate Proteoglycan Expression and Binding of *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes in the Human Placenta during Pregnancy. *Infect Immun*. 2003; 71(5):2455-61.

8. Gamboa D, Ho MF, Bendezu J, Torres K, Chiodini PL, Barnwell JW, et al. A large proportion of *P. falciparum* isolates in the Amazon region of Peru lack pflhrp2 and pflhrp3: implications for malaria rapid diagnostic tests. PLoS One. 2010 Jan 25; 5(1): e8091.
9. Graninger W, Prada J, Neifer S, Zotter G, Thalhammer F, Kremsner PG. Upregulation of ICAM-I by Plasmodium falciparum: in vitro and in vivo studies. J Clin Pathol. 1994 Jul;47(7):653-6.
10. Treutiger CJ, Hedlund I, Helmby H, Carlson J, Jepson A, Twumasi P, et al. Rosette formation in *Plasmodium falciparum* isolates and anti-rosette activity of sera from Gambians with cerebral or uncomplicated malaria. Am J Trop Med Hyg. 1992; 46(5):503-10.
11. Levine ND. En: Hammond DM, Long PL (eds.): The Coccidia Eimeria, Isospora, Toxoplasma and related Genera. University Park Press: Baltimore, USA 1973:1-22.
12. Dubremetz JF, Garcia-Reguet N, Conseil V, Fourmaux MN. Apical organelles and host-cell invasion by apicomplexa. Int J Parasitol 1998; 28:1007-1013.
13. Gille C, Goede A, Schloetelburg C, Preissner R, Kloetzel PM, Gobel UB, et al. A comprehensive view on proteasomal sequences: implications for the evolution of the proteasome. J Mol Biol 2003; 326:1437-1448.
14. Fichera ME, Roos DS. A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. Nature 1997; 390:407-409.

15. Foth BJ, McFadden GI. The apicoplast: a plastid in *Plasmodium falciparum* and other apicomplexan parasites. *Int Rev Cytol* 2003; 224:57-110.
16. Walliker D, Carter R, Sanderson A. Genetic studies on *Plasmodium chabaudi*: recombination between enzyme markers. *Parasitology* 1975; 70:19-24.
17. Sinden RE, Hartley RH. Identification of meiotic division of malarial parasites. *J Protozool* 1985; 32:742-4.
18. Svenson JE, MacLean JD, Gyorkos TW, Keystone J: Imported malaria. Clinical presentation and examination of symptomatic travelers. *Arch Intern Med* 1995, 155:861-868.
19. Sahu S, Mohanty N K, Rath J, Patnaik S B. Spectrum of malaria complications in an intensive care unit. *Singapore Med J* 2010; 51(3): 226.
20. Silamut K, Phu NH, Whitty C, et al. A quantitative analysis of the microvascular sequestration of malaria parasites in the human brain. *Am J Pathol* 1999; 155: 395-410.
21. World Health Organization: Severe and complicated malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990, 84(suppl 2): S1-S65.
22. World Health Organization: Severe falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000, 94(suppl 1): S1-S90.
23. Brewster DR, Kwiatkowski D, White NJ: Neurological sequelae of cerebral malaria in children. *Lancet* 1990, 336:1039-1043.
24. Rogerson S, Mwapasa V, Meshnick S. Malaria in Pregnancy: Linking Immunity and pathogenesis to Prevention. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 2007; 77(Suppl 6): 14-22.

25. World Health Organization. Guideline for the treatment of malaria, Second Edition 2010.
26. Brabin BJ, Romagosa C, Abdelgalil S, Menendez C, Verhoeff, FH, McGready R, et al. The sick placenta-the role of malaria. *Placenta* 2004; 25: 359-78.
27. Kayentao K, Kodio M, Newman RD, Maiga H, Doumtabe D, Ongoiba A, et al. Comparison of intermittent preventive treatment with chemoprophylaxis for the prevention of malaria during pregnancy in Mali. *J Infect Dis* 2005; 191: 109-116.
28. Chakravorty SJ, Hughes KR, Craig AG. Host response to cytoadherence in *Plasmodium falciparum*. *Biochem Soc Trans* 2008; 36(Pt 2):221–8.
29. Kyes SA, Kraemer SM, Smith JD. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*: gene organization and regulation of the *var* multigene family. *Eukaryot Cell* 2007; 6(9):1511–20.
30. Chakravorty SJ, Craig A. The role of ICAM-1 in *Plasmodium falciparum* cytoadherence. *Eur J Cell Biol* 2005; 84(1):15–27.
31. Rogerson SJ, Hviid L, Duffy PE, et al. Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. *Lancet Infect Dis* 2007; 7(2):105–17.
32. Fried M, Duffy PE. Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta. *Science*. 1996, 7; 272(5267):1502-4.
33. Steketee RW, Nahlen BL, Parise ME, Menendez C. The burden of malaria in pregnancy in malaria-endemic areas. *Am J Trop Med Hyg*. 2001; 64(1-2 Suppl):28-35.

34. Ricke CH, Staalsoe T, Koram K, Akanmori BD, Riley EM, Theander TG, et al. Plasma antibodies from malaria-exposed pregnant women recognize variant surface antigens on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in a parity-dependent manner and block parasite adhesion to chondroitin sulfate A. *J Immunol.* 2000, 15; 165(6):3309-16.
35. Menendez C. Malaria during pregnancy: a priority area of malaria research and control. *Parasitol Today.* 1995, 11(5):178-83.
36. Jani D, Nagarkatti R, Beatty W, Angel R, Slebodnick C, Andersen J, et al. HDP-a novel heme detoxification protein from the malaria parasite. *PLoS Pathog.* 2008, 25; 4(4):e1000053.
37. Craig A, Scherf A. Molecules on the surface of the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion. *Mol Biochem Parasitol.* 2001; 115(2):129-43.
38. Rug M, Prescott S, Fernandez K, Cooke B, Cowman A. The role of KAHRP domains in knob formation and cytoadherence of *P. falciparum* infected human erythrocytes. *Blood.* 2006 July 1; 108(1): 370–378.
39. Biggs B, Kemp D, Brown G. Subtelomeric chromosome deletions in field isolates of *Plasmodium falciparum* and their relationship to loss of cytoadherence in vitro. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* Vol.86, pp.2428-2432,1989.
40. MINSA, Informe de Gestión del Programa Nacional de Control de malaria y otras enfermedades metaxénicas, 1999.
41. RENACE, DGE, MINSA Reporte Epidemiológico octubre 2010.

42. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *J Parasitol.* 2005; 91(3):484-6.
43. MR4/ATCC: *Methods in Malaria Research*. 5th edition. Manassas, Virginia; 2008.
44. Udeinya IJ, Graves PM, Carter R, Aikawa M, Miller LH. Plasmodium falciparum: effect of time in continuous culture on binding to human endothelial cells and amelanotic melanoma cells. *Exp Parasitol.* 1983; 56(2):207-14.
45. Ribaut C, Berry A, Chevalley S, Reybier K, Morlais I, Parzy D, et al. Concentration and purification by magnetic separation of the erythrocytic stages of all human Plasmodium species. *Malar J.* 2008; 5, 7:45.
46. Wahlgren M, Carlson J, Ruangjirachuporn W, Conway D, Helmby H, Martinez A, et al. Geographical distribution of Plasmodium falciparum erythrocyte rosetting and frequency of rosetting antibodies in human sera. *Am J Trop Med Hyg.* 1990; 43(4):333-8.
47. Rowe A, Obeiro J, Newbold CI, Marsh K. Plasmodium falciparum rosetting is associated with malaria severity in Kenya. *Infect Immun.* 1995, 63(6):2323-6.
48. Udomsangpetch R, Webster HK, Pattanapanyasat K, Pitchayangkul S, Thaithong S. Cytoadherence characteristics of rosette-forming Plasmodium falciparum. *Infect Immun.* 1992; 60(11):4483-90.
49. Urban BC, Willcox N, Roberts DJ. A role for CD36 in the regulation of dendritic cell function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:87505.

XI. - ANEXOS

ANEXO N° 01

Esquema del procesamiento de las cepas de *P.falciparum*

Banco de Cepas del Laboratorio de Malaria (nitrógeno líquido -196°)

Cepa de *Plasmodium falciparum* criopreservada.



Cultivo de *Plasmodium falciparum*

Descriopreservación y procesamiento según Trager - Jensen y optimizado por el laboratorio.
Control diario de la parasitemia, a través de la observación microscópica (Coloración Giemsa).



RPMI 1640 completo 20%
suero, glóbulos rojos sanos al
50% de hematocrito



Sincronización de los cultivos de *Plasmodium falciparum*

Método del D-Sorbitol al 5%, estandarizado por el laboratorio.
(Destrucción selectiva de estadios maduros)



Ensayo de formación de Rosetas en cultivos de *P. falciparum* con naranja de acridina al 0.01%.

Observación al microscopio de
inmunofluorescencia



Ensayo de Adherencia de GR infectados con la proteína CSA.

Observación microscópica y conteo
de los GR unidos a la placa



Cultivo de células endoteliales de vena umbilical humano (HUVEC). Ensayo de citoadherencia con HUVEC.

Observación microscópica y conteo de GR unidos por célula.

ANEXO N°03

FICHA DE RECOLECCION DE DATOS PARA LOS ENSAYOS DE LABORATORIO

1. Cepa Silvestre:

2. Resultados de PCR:

<i>hrp2</i>	<i>hrp3</i>

3. Datos de Descriopreservación:

Cepa (Madre/Subcultivo)		Fecha criopreservado:	
Parasitemia:		Responsable de la criopreservación:	
Grupo Sanguíneo/ Medio utilizado:		Responsable de la descriopreservación:	
Volumen:		Fecha descriopreservar:	

4. Cultivo: Comportamiento de crecimiento

Dia:	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Anillos														
Trofozoito m.														
Esquizonte														
Gametocitos														
% PARASITEMIA														
Ensayo a realizar N°														

5. Ensayo de formación de rosetas:

	Rosetas									TOTAL			
	No unidos			Unión a 1 GR			Unión a 2 GR				Unión a +2 GR		
N° de Ensayos	1er	2do	3er	1er	2do	3er	1er	2do	3er	1er	2do	3er	
N° de RBC infectados													
N° Rosetas													

TOTAL														
--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

% Rosetas (Total Rosetas x100/total RBC infectados):

6. Ensayo de adherencia de GR infectados a CSA:

Cepa:

Receptor	Conteo		
N° de Ensayos	1er	2do	3er
• Proteína CSA			
• Control (-) (RBC sanos)			
• Control (+) (RBC infectados CS2)			
• Blanco (PBS en vez de la proteina)			

7. Citoadherencia con HUVEC:

	Conteo x 100 HUVEC			X	DS
N° de Ensayos	1er	2do	3er		
HUVEC					