

ARTICULO GENERAL

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD DE ANTICUERPOS, INTERFERON Y CELULAS INMUNOCOMPETENTES CONTRA PARASITOS INTRACELULARES

Arturo Ferreira V. (MV, PhD), Louis Schofield (PhD)

EVALUATION OF THE ANTI-INTRACELLULAR PARASITES ACTIVITY OF ANTIBODIES, INTERFERON AND IMMUNOCOMPETENT CELLS

In this review the activity of antibodies, interferon and immunocompetent cells against intracellular parasites is discussed under the current concepts of basic immunology by means of an experimental malaria model.

Los interferones (IFNs) fueron descritos por Isaacs y Lindenmann (1957), como un grupo heterogéneo de proteínas y glicoproteínas producidos por ciertas células en respuesta a la infección viral. Estas moléculas mostraron la capacidad de inhibir el crecimiento *in vitro* de una gran variedad de virus.

Durante la década del sesenta se observó que además de inhibir el crecimiento viral, las preparaciones de IFN despliegan otros efectos biológicos, entre los que destacan la regulación del crecimiento celular y, en particular, de la respuesta inmune. Desgraciadamente, la literatura relevante generada durante este período es extremadamente controversial, debido a la impureza y falta de caracterización bioquímica de las preparaciones de interferón usadas. Esta situación ha cambiado drásticamente durante los últimos años como consecuencia del clonamiento y expresión de los genes de IFNs, iniciada en Zurich por Weissmann (1981).

Una parte importante de los investigadores interesados en los IFNs son inmunólogos, atraídos por el hecho que el gamma-interferón (γ -IFN) es una linfoquina inmune, es decir, se genera como consecuencia de estímulos antigénicos. Además, todos los IFNs son componentes importantes del sistema inmune, pues presentan la primera línea de defensa contra invasiones virales, actuando a través de mecanismos que convencionalmente pudieran ser considerados no inmunológicos, pero también reclutando y modulando la función de otras

citoquinas. Tanto es así, que los interferones parecen estar insertos en una red de citoquinas (linfoquinas y monoquinas) implicando por lo menos a los factores de necrosis tumoral e interleuquinas.

La clasificación de los IFNs en α , β y γ , basada en criterios serológicos, se ha visto dramáticamente substanciada por los datos generados a partir de la secuencia de los genes que los codifican, los cuales revelan extensas variaciones que se traducen en importantes diferencias biológicas (Dijkmans y Billeau, 1985).

Un hecho sorprendente, revelado durante los últimos años, lo constituye la gran actividad que el γ -IFN tiene sobre algunos parásitos intracelulares, específicamente aquellos pertenecientes a los géneros *Toxoplasma*, *Chlamydia* y *Plasmodium* (Pfefferkorn, 1984; De la Maza y Cols., 1985; Ferreira y Cols., 1986; Vergara y Cols., 1987; Schofield y Cols., 1987a; Schofield y Cols., 1987b). Aparentemente, el modelo de parasitismo intracelular en que el efecto del γ -IFN ha sido estudiado más exhaustivamente es el de la malaria experimental. Esta revisión se centrará en este modelo, estableciendo algunas relaciones con los modelos de *Chlamydia* y *Toxoplasma* cuando sea pertinente.

Aunque la malaria fue erradicada de Chile, en el año 1945, por el equipo dirigido por el profesor Juan Noé, el problema tiene aún una enorme prevalencia en Latinoamérica y a nivel mundial. En Africa tropical solamente la enfermedad es responsable de la muerte de más de un millón de niños al año. En Latinoamérica los únicos países libres de la enfermedad son Chile y Uruguay. En nuestro país el problema aún tiene vigencia considerando que el artrópodo vector (*Anopheles pseudopunctipennis*) ha reaparecido en el norte y el peligro de

Departamento de Biología Celular y Genética.
Facultad de Medicina.
Universidad de Chile. Independencia 1027. Santiago. Chile.
Department of Medical and Molecular Parasitology.
New York University Medical Center.
New York, N.Y. 10016. U.S.A.

que enfermos maláricos provenientes de Bolivia y Perú crucen la frontera con cierta frecuencia es evidente.

Desde el punto de vista epizootiológico y clínico, la enfermedad tiene importancia veterinaria limitada a animales de zoológico, especialmente antropomorfos. Sin embargo, desde el punto de vista parasitológico básico, el modelo de malaria es posiblemente uno de los más conocidos e indudablemente será de utilidad futura en el diseño de las estrategias a seguir para el estudio de una variedad de parasitismos intracelulares de importancia en medicina humana y veterinaria.

El ciclo biológico de los parásitos protozoarios del género *Plasmodium* implica a un huésped vertebrado y a un vector artrópodo del género *Anopheles*. La picada del vector introduce al torrente circulatorio del huésped vertebrado los esporozoítos, los que, en pocos minutos, invaden los hepatocitos donde se multiplican por mitosis, generándose aproximadamente 10.000 células hijas por cada esporozoíto. Estas células se desarrollan encerradas en una estructura conocida como forma exoeritrocítica (EEF). Al romperse las EEF se liberan miles de merozoítos que invaden los glóbulos rojos, comenzando así el ciclo sanguíneo de la enfermedad. La sintomatología de este ciclo puede variar, desde moderada a devastadora para el huésped, dependiendo de la especie de plasmodio implicada. Parte de los merozoítos sanguíneos pueden transformarse en gametocitos femeninos o masculinos que pueden ser captados por el artrópodo vector durante la picada. En el intestino del vector se transforman en gametos que se fecundan para formar un cigoto móvil, el cual se enquistado en el epitelio intestinal del artrópodo, formando un ooquiste. Después de un período, que varía con la especie de plasmodio, el ooquiste se rompe y los esporozoítos, aún inmaduros, pasan a la hemolinfa para luego migrar a las glándulas salivales del artrópodo. Aquí maduran en el interior de las células glandulares y finalmente pasan a los conductos salivales, desde donde pueden llegar al huésped a través de la picada, completándose así el ciclo biológico del parásito. En resumen el ciclo comprende tres fases: pre-hepatocítica o esporozoítica, hepatocítica y posthepatocítica, sanguínea o eritrocítica. Las dos primeras fases son asintomáticas (Short y Garnham, 1948; Yoeli y Most, 1965).

Tanto la fase pre como la posthepatocítica han sido objeto de numerosos estudios tendientes a definir antígenos característicos de los parásitos implicados, al clonamiento de los genes que los codifican y al desarrollo de vacunas basadas en antígenos recombinantes o en péptidos elaborados en base a la secuencia del ADN de los genes respectivos.

Hasta la fecha, los resultados de la inmunización experimental con estos productos, si bien son alentadores, indican que la protección con participación de anticuerpos contra estos antígenos no es completa. Se requiere de la participación de otros componentes del sistema inmune entre los cuales destacan subpoblaciones de células T y del γ -IFN.

El desarrollo de vacunas u otros agentes antiesporozoíticos o antiformas parasitarias hepáticas requiere de métodos precisos que permitan evaluar la infectividad resultante. Clásicamente esta infectividad ha sido medida estimando los períodos de patencia o tiempo transcurrido entre la infección esporozoítica y la aparición de parásitos en frotis de sangre periférica. Aunque los períodos de prepatencia están inversamente relacionados con el tamaño del *inoculum*, las curvas que relacionan el número de esporozoítos inoculados con el grado de parasitemia son poco pronunciadas, de acuerdo a datos obtenidos por Schmidt y Cols. (1982), al inocular numerosos monos rhesus con dosis variables de esporozoítos de *Plasmodium cynomolgi*. Por ejemplo, el desafío con 10^4 ó 10^7 esporozoítos condujo a períodos prepatentes de $11,3 \pm 2,0$ y $10,6 \pm 1,1$ (media y desviación estándar, respectivamente). En este trabajo no se hizo mención si la diferencia entre las medias era estadísticamente significativa.

Otro método para medir la infectividad de los esporozoítos consiste en enumerar las EEF. Esto se puede lograr mediante examen microscópico de secciones hepáticas. A pesar de que este enfoque ha sido útil para estudios del desarrollo intrahepatocítico, la cuantificación ha sido difícil.

En la mayor parte de los estudios que se presentarán en esta revisión hemos usado una sonda, obtenida por clonamiento y traducción de un segmento repetitivo de ADN. Usando esta sonda hemos estudiado algunos de los factores que influyen en el número de EEF, tales como la presencia de anticuerpos antiesporozoítos, la función del γ -IFN y de algunas subpoblaciones de células inmunocompetentes.

I. Estandarización del uso de una sonda de ADN para medir la infectividad de esporozoítos de *Plasmodium berghei* (Ferreira y Cols., 1986)

Esporozoítos de *P. berghei* (cepa NK65) fueron mantenidos por pasaje cíclico del parásito a través de zancudos (*Anopheles stephensi*) y hamsters. Los parásitos se obtuvieron por disección de las glándulas salivales de los zancudos.

En la mayoría de los experimentos se usaron ratas Norway Brown (*Rattus norvegicus*) o ratones

A/J (*Mus musculus*). En un experimento se usaron chimpancés (*Pan troglodytes*).

La sonda (2,3 kilobases de ADN) fue aislada de una librería genómica de *P. berghei* preparada en el plasmidio vector pBR322. Este segmento de ADN es representativo de una familia bien conservada de secuencias repetidas que representan aproximadamente el 3% del genoma del parásito. La marcación de esta sonda con P³² (Kelly y Cols., 1970), la purificación de ADN total de hígado de ratas normales e infectadas y de parásitos sanguíneos y los ensayos de hibridización se hicieron en condiciones estándar (Maniatis y Cols., 1982).

La sonda fue probada en ensayos de hibridización contra varias cantidades de ADN purificado de parásitos sanguíneos. Se obtuvo una relación lineal entre la cantidad de ADN de parásito inmovilizado en los filtros de nitrocelulosa y la radiactividad asociada a los mismos. El límite inferior de sensibilidad del ensayo fue de 100 pg de ADN parasitario, lo que equivale aproximadamente a 1.000 núcleos haploides (Dame y McCutcham, 1983). Curvas estándar similares a ésta fueron construidas para calcular la cantidad de ADN de parásito en hígados de animales experimentales.

El tejido hepático de las ratas Norway Brown es muy receptivo a los esporozoítos de *P. berghei* (Meis y Cols., 1983; Meis y Cols., 1981), razón por la cual esta especie fue elegida como modelo animal para la mayoría de los estudios descritos en esta revisión.

Para estudiar la proliferación de los parásitos hepáticos se inocularon ratas intravenosamente (iv) con $3,4 \times 10^5$ esporozoítos de *P. berghei* por animal. Los hígados y bazos fueron extraídos 25, 30, 35, 44 y 54 horas postinfección. El ADN de estos órganos fue purificado, inmovilizado en filtros de nitrocelulosa e hibridizado con la sonda radiactiva. Las cantidades de ADN de parásito detectadas por hígado fueron de 94, 850, 2.500, 9.000 y 7.000 ng, respectivamente. El máximo de proliferación de ADN parasitario en el hígado fue a las 44 horas (9 μ g de ADN de parásito o 9×10^7 núcleos parasitarios). Sólo a las 54 horas se detectó una pequeña señal esplénica (50 ng de ADN parasitario), lo que probablemente se debe a contaminación de este tejido o captura por el mismo de merozoítos recientemente liberados del hígado.

La relación entre el número de esporozoítos inyectados y la cantidad de ADN parasitario resultante por hígado, al momento de proliferación máxima (44 horas postinfección), fue estudiada inoculando grupos de ratas con 10^4 , 4×10^4 , $1,6 \times 10^5$ y $6,4 \times 10^5$ esporozoítos iv. A las 44 horas postinfección, las cantidades de ADN parasi-

tario por hígado fueron 680, 3.200, 6.000 y 9.600 ng. Curiosamente, la proporción de esporozoítos que prolifera exitosamente a EEF maduro disminuye con dosis mayores de 40.000 esporozoítos. Este resultado es inesperado si se considera que, ciertamente, hay un gran exceso de hepatocitos que pueden actuar como blancos para la penetración parasitaria. Este hecho será retomado más adelante.

El método basado en el uso de la sonda permite la detección de 100 pg de ADN de parásito, lo que equivale a 1.000 núcleos haploides, asumiendo que cada núcleo contiene 0,1 pg de ADN (Dame y McCutcham, 1983). Como es posible inmovilizar 200 μ g de ADN por filtro de nitrocelulosa y, de acuerdo a nuestras mediciones, un hígado de rata contiene $12,5 \pm 1,63$ mg de ADN ($n = 50$), el número mínimo de parásitos detectable por hígado es de 62.500. Esto representa la progenie de 6-7 esporozoítos, medida en el punto máximo de proliferación (44 horas), ya que cada esporozoíto puede generar aproximadamente 10^4 núcleos aploides después de 13 divisiones mitóticas (Killick-Kendrick, 1974). Por lo tanto, este ensayo es idealmente adecuado para medir no sólo el efecto de agentes antiesporozoítos, sino también de agentes antiformas hepatocíticas del parásito. Entre estos últimos está el γ -IFN, tema central de esta revisión.

II. Uso de la sonda de ADN para medir la neutralización de esporozoítos de *P. berghei* por un anticuerpo monoclonal (Ferreira y Cols., 1987)

Los experimentos a describir en esta sección ilustran básicamente que anticuerpos dirigidos contra los esporozoítos no son suficientes para conferir inmunidad estéril a animales de experimentación.

La proteína circunsporozoítica (CS) de los esporozoítos de *P. berghei* cubre toda la superficie del parásito. Una parte importante de la molécula consiste de repeticiones de secuencias aminoacídicas. Si anticuerpos monoclonales dirigidos contra estas regiones se hacen reaccionar con esporozoítos infectantes, la infectividad (estimada por prepatencia) de éstos disminuye drásticamente. Actualmente se desarrollan vacunas usando como inmunógeno epítomos repetidos sintéticos o proteína CS completa obtenida por métodos de ADN recombinante. Estas vacunas son los mejores candidatos para la inmunoprofilaxis de la malaria.

Usando la sonda de ADN fue posible, por primera vez, medir el efecto de anticuerpos monoclonales (3D11) dirigidos contra la porción repetida de proteína CS (Potocnjak y Cols., 1980;

Yoshida y Cols., 1980). Esporozoítos de *P. berghei*, a una concentración de 10^5 /ml, fueron incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente, con concentraciones variables de anticuerpos monoclonales 3D11 o con medio solo, como control negativo. Luego se inocularon ratas con $1,5 \times 10^5$ esporozoítos tratados y los hígados fueron removidos a las 44 horas postinfección. La purificación de ADN, hibridización con la sonda y los cálculos de la carga parasitaria hepática se realizaron de acuerdo a metodología descrita (Ferreira y Cols., 1987).

Concentraciones de $1,2 \mu\text{g}$ de 3D11/ml fueron suficientes para neutralizar la infectividad del 90% de los esporozoítos inoculados. Con concentraciones más altas de 3D11, se obtuvieron sólo señales marginales desde el tejido hepático.

Sorprendentemente y a pesar de que la capacidad neutralizante de los anticuerpos 3D11 es muy alta, las cinco ratas inoculadas con $1,5 \times 10^5$ esporozoítos, tratados con $250 \mu\text{g}/\text{ml}$ de 3D11, desarrollaron parasitemia a los 7 días postinfección. Las ratas inoculadas con esporozoítos normales se hicieron patentes a los 3 días postinfección. El número de esporozoítos que escapó a la acción de los anticuerpos debe haber sido del orden de 10, basados en los cálculos descritos en la sección I.

Debe hacerse notar que la concentración de 3D11 usada ($250 \mu\text{g}/\text{ml}$) está en el rango de la cantidad de anticuerpos específicos que podría esperarse en un buen suero hiperinmune. Por lo tanto, este experimento ilustra la posibilidad de que unos pocos parásitos escapen a la acción de los anticuerpos y sean capaces de establecer la enfermedad. El *inoculum* de $1,5 \times 10^5$ esporozoítos a primera vista parece elevado. Sin embargo, es posible que en un área endémica un individuo sea picado por cientos de zancudos infectados en pocas horas. Se estima que en cada picada pueden inocularse del orden de 2.000 esporozoítos. Además es posible que la infectividad de estos esporozoítos sea muy superior a aquellos obtenidos por disección de la glándula salival.

La posibilidad que los esporozoítos que escapan a la acción de los anticuerpos sean genéticamente resistentes fue investigada en una serie de experimentos descritos a continuación (Ferreira y Cols., 1987). Si existiese una resistencia genética al efecto neutralizante de 3D11, debería ser posible aumentar la proporción de esporozoítos resistentes simplemente seleccionándolos en presencia de anticuerpos. Con este propósito se incubaron $1,5 \times 10^5$ esporozoítos, a temperatura ambiente, con $150 \mu\text{g}$ de anticuerpos 3D11 y se procedió a inocularlos en ratas. Cuando la parasitemia llegó a un 2%, se procedió a alimentar zancudos no infectados en estos animales; 20 días más tarde se

obtuvo esporozoítos de las glándulas salivales de estos insectos. Los parásitos ($1,5 \times 10^5$) se incubaron nuevamente con los anticuerpos 3D11 y fueron inoculados a ratas. El ciclo fue repetido cuatro veces. Los esporozoítos originados del cuarto ciclo de selección fueron comparados con una población no seleccionada, demostrándose que ambas poblaciones son igualmente sensibles al efecto de los anticuerpos monoclonales. Así, cuando las poblaciones "seleccionadas" y no seleccionadas fueron expuestas a diferentes concentraciones de 3D11, las curvas de neutralización fueron prácticamente superponibles.

La interpretación más simple de estos resultados es que la resistencia a anticuerpos es mediada por variaciones fenotípicas sin base genética. Podría proponerse, por ejemplo, que los esporozoítos resistentes expresan menos proteína CS y, por lo tanto, sufrirían menos un efecto mecánico, entorpecedor de la movilidad, producido por la unión de los anticuerpos. Evidentemente, esto implicaría que la proteína CS no es necesariamente un ligando para un receptor putativo presente en la superficie del hepatocito.

En las secciones que siguen se presentarán resultados experimentales que indican que por lo menos en los mamíferos, existen mecanismos complementarios que permiten controlar la infección parasitaria a nivel intracelular. Estos mecanismos pueden ser efectivos contra parásitos que escapan a la primera barrera defensiva representada por los anticuerpos.

III. Inhibición del desarrollo de las formas intrahepatocíticas (EEF) de los agentes de la malaria por el γ -IFN.

(Ferreira y Cols., 1986)

Como los hepatocitos infectados por plasmodios no exponen moléculas derivadas de los parásitos u otros neoantígenos sobre sus membranas, las EEF están protegidas del ataque directo de los anticuerpos. Sin embargo, la administración de inductores de interferón α y β , tales como virus de Newcastle y ARN de doble cadena, reducen la severidad de infecciones inducidas en ratones por esporozoítos de *Plasmodium berghei*, presumiblemente afectando a las EEF (Jahiel y Cols., 1968a; Jahiel y Cols., 1968b; Jahiel y Cols., 1969).

La disponibilidad de γ -IFN recombinante puro de rata nos ha permitido estudiar el efecto directo del γ IFN sobre malaria inducida por esporozoítos. Nuestro razonamiento se basó en que en los experimentos con inductores de IFN no sólo es difícil precisar el tipo de IFN que actúa sino que, además, es imposible precisar en qué parte del ciclo se produce esta acción y definir si otras

citoquinas están involucradas en el efecto antiparasitario.

El γ -IFN es producido por linfocitos T activados cuando éstos contactan con el antígeno. Por esto, se le define como IFN inmune y es probable que su participación en la resistencia adquirida a parásitos intracelulares sea más importante que aquella de los interferones α y β .

El potente efecto del γ -IFN contra plasmodios intrahepatocíticos es substanciado por experimentos en los cuales la proliferación hepática de los esporozoítos en hígado de ratas Norway Brown fue estimada con la sonda de ADN (Sección I).

El γ -IFN recombinante de rata (Dijkema y Cols., 1985) fue inoculado a los animales en diferentes tiempos después del desafío con 10^5 esporozoítos (tiempo 0). La cantidad de ADN de parásito fue medida a las 44 horas postdesafío. El Cuadro 1 resume los resultados obtenidos. El γ -IFN inhibió fuertemente el desarrollo de los EEF, particularmente cuando se administró a las -5 horas. En dos experimentos, 150 U de γ -IFN (con una actividad específica de 5×10^7 U/mg proteína) inhibieron alrededor de un 25-30% del desarrollo de EFF. Con 6×10^4 U se logró una inhibición cercana al 90%. El efecto fue completamente revertido al incubar la linfoquina con dos dosis neutralizantes de un anticuerpo monoespecífico policlonal anti γ -IFN.

La inhibición fue menos pronunciada al inocular el γ -IFN 18 horas antes o 20 horas después del desafío. Por ejemplo, el porcentaje de inhibición logrado con 5×10^5 U de γ -IFN, administrado a las +5 horas (72 ± 10), no fue significativamente diferente (prueba de t de dos colas) de aquel obtenido con $1,5 \times 10^4$ U, administrado a las -5 horas (73 ± 10). Sin embargo, se observó una inhibición significativa, incluso cuando el γ -IFN fue inyectado 20 horas después del desafío, cuando el parásito ya había sufrido varios ciclos de divisiones nucleares en el hepatocito (Ferreira y Cols., 1986).

A pesar de que para lograr 90% o más de inhibición se necesitaron dosis bajas de γ -IFN ($1,25 \times 10^5$ U o 250 ng, administrados a las -5 horas), la eliminación completa de los parásitos se logró sólo cuando se administró 5×10^5 U ($1 \mu\text{g}$) de γ -IFN a las -18, -5 y +24 horas (cuadro 1).

En un esfuerzo por proyectar este estudio a mamíferos superiores y a una especie de plasmodio patógena para el hombre, dos chimpancés (*Pan troglodytes*) recibieron dosis diarias de 5×10^6 U ($10 \mu\text{g}$) de γ -IFN recombinante humano (donado por Genentech Inc. California, U.S.A.), comenzando 5 horas antes de ser desafiados con 10^5 esporozoítos de *Plasmodium vivax*. El día +7, éstos y otros dos chimpancés, infectados pero no

CUADRO 1

INHIBICION MEDIADA POR γ -IFN
DEL DESARROLLO DE EEF DE *P. berghei*
EN EL HIGADO DE RATAS NORWAY BROWN

Unidades de γ -IFN inoculadas iv ($\times 10^{-5}$)	Tiempo de administración del γ -IFN ¹	Inhibición del desarrollo de EEF ² (%)
5,0		45 + 15
1,0	-18	47 + 20
0,2		5 + 2
5,0		90 + 11
5,0		82 + 13
2,5		89 + 16
1,5		90 + 14
1,25	-5	92 + 13
0,62		88 + 10
0,15		73 + 10
0,05		47 + 12
0,0015		25 + 15
0,0015		27 + 17
5,0	+5	72 + 10
5,0	+20	49 + 11
0,1	-5	0
(+ anti IFN)		
5,0	-18, -5, +24	100

¹ Tiempo 0: administración intravenosa de 10^5 esporozoítos.

² Medido en referencia a control no tratado con γ -IFN (media \pm DS).

tratados con γ -IFN, fueron esplenectomizados para permitir la detección de fases sanguíneas. A partir del día +8, se procedió a examinar frotis sanguíneos en búsqueda de parásitos. Los períodos de prepatencia en los animales controles fueron de 10 y 12 días y, en los experimentales, 16 días. Las parasitemias en los animales tratados con γ -IFN fueron drásticamente reducidas hasta el día +16, momento en que, por razones humanitarias reglamentarias, el experimento terminó y se comenzó un tratamiento de todos los animales con primaquina y cloroquina. Clínicamente, los animales no tratados con γ -IFN desarrollaron rápidamente sintomatología clásica malarica (fiebre, inapetencia, indiferencia, etc), durante un período de 4 días en que los animales tratados no mostraron síntomas de la enfermedad.

Los experimentos realizados en ratas ilustran la posibilidad, descrita por primera vez, de medir *in vivo* y en forma precisa la actividad antimalárica del γ -IFN. Esta actividad se centra en el hígado, específicamente en las EEF. En estos experimentos $6,2 \times 10^5$ unidades de γ -IFN ($1,24 \mu\text{g}$) produ-

jeron alrededor de un 90% de inhibición del desarrollo de las EEF. Sin embargo, un efecto significativo (alrededor de un 30% de inhibición) fue observado con dosis de 150 U, equivalentes a unos pocos ng de la linfoquina. De acuerdo a nuestro conocimiento, esta notoria actividad contra parásitos intracelulares de esta pequeñísima cantidad de γ -IFN no tiene precedentes *in vivo*.

La actividad de γ -IFN fue muy superior cuando fue inoculado unas pocas horas antes del desafío con esporozoítos. Esto contrasta con observaciones previas (Jahiel y Cols., 1968a, b; 1969) que indican que inductores de IFN (por ejemplo el virus de Newcastle) protegen a los ratones contra la malaria si se suministran 20 horas después de la inoculación esporozoítica. Es probable que los efectos de estos inductores sean mediados por α , β y γ -IFN, los cuales podrían inhibir a las EEF a través de rutas metabólicas diferentes. Si este punto de vista es correcto, es posible que la combinación de α , β y γ -IFN actúe sinérgicamente para prevenir el desarrollo de las EEF.

IV. El γ -IFN inhibe del desarrollo intrahepatocítico in vitro de parásitos productores de malaria. (Schofield y Cols., 1987)

Además del papel protector de los anticuerpos, varios hallazgos indican que mecanismos efectores mediados por células son importantes en la generación, establecimiento y mantención de la inmunidad protectora contra parásitos intracelulares, tales como aquellos productores de malaria. Así, la transferencia pasiva de anticuerpos séricos de ratones inmunes no fue eficaz para proteger huéspedes no inmunes contra un desafío esporozoítico (Spitalny y Nussenzweig, 1973). Por otra parte, se ha detectado protección completa en ratones vacunados, cuya producción de anticuerpos fue suprimida al nacimiento mediante la inoculación de anticuerpos contra la cadena μ de inmunoglobulinas. (Chen y Cols., 1977). Además, la transferencia adoptiva de células T, si se acompaña de una inoculación de esporozoítos irradiados, puede proteger contra un desafío en ausencia de anticuerpos antiesporozoítos (Verhave y Cols., 1978). Por lo tanto, la participación de las células T en la inmunidad protectora parece incluir un mecanismo efector y un papel ayudante en la producción de anticuerpos. El primer mecanismo podría estar mediado por la producción de γ -IFN.

Sin embargo, el mecanismo mediante el cual el γ -IFN ejerce su efecto antimalárico requiere de experimentos *in vitro*, ya que los resultados *in vivo* descritos anteriormente podrían deberse a diversos mecanismos, incluyendo: 1) Inducción de atrapa-

miento y destrucción de esporozoítos circulantes. 2) Inhibición de la invasión de los hepatocitos por los esporozoítos. 3) Activación de las células de Kupffer para destruir los esporozoítos invasores. 4) Detención del crecimiento intrahepatocítico de las EEF por efecto directo sobre las células infectadas. Cada una de estas posibilidades ciertamente tiene implicaciones importantes para definir la función del γ -IFN endógeno y la explotación de su actividad en el diseño molecular de una vacuna.

Los experimentos que siguen aclaran las observaciones *in vivo*. Usamos un sistema *in vitro* para examinar la acción del γ -IFN recombinante contra las EEF, en ausencia de células efectoras inmunes. Las células huéspedes pertenecían a una línea celular de hepatoma humano. Dos variables fueron estudiadas: el efecto de un amplio rango de concentraciones de γ -IFN y el efecto del momento de la incorporación del γ -IFN al sistema, en relación a la etapa del desarrollo parasitario intrahepatocítico. Todos los cultivos celulares fueron procesados en el momento de máxima proliferación de ADN parasitario. En experimentos pilotos se concluyó que esto ocurre 52 horas después de agregar esporozoítos de *P. berghei* a las células de hepatoma humano (HEPG2). La detección de ADN parasitario se realizó con la sonda de ADN descrita en la Sección I.

Cuando las células de hepatoma fueron tratadas con 10^2 U/ml de γ -IFN, 6 horas antes de incubarlos con esporozoítos, la multiplicación parasitaria fue suprimida completamente. A concentraciones más bajas, la inhibición del crecimiento fue parcial (55% a una concentración de 0,1 U/ml y 17% de inhibición a una concentración de 10^{-3} U/ml).

El γ -IFN ejerció un efecto antiparasitario, incluso cuando se aplicó después que se completó la invasión esporozoítica, por ejemplo, 3 horas post-infección (Hollingdale y Cols., 1983). Sin embargo, cuando el γ -IFN se agregó 28 horas después de la infección, o sea, cuando las células hepáticas contenían EEF en estados avanzados de desarrollo, incluso las concentraciones más altas de γ -IFN (10^5 U/ml) no afectaron la cantidad de ADN detectada a las 52 horas.

El γ -IFN mata al *Toxoplasma gondii* en cultivos de fibroblastos, ya que induce a estas células a degradar al triptófano (Pfefferkorn, 1984). Este efecto es reversible si en el medio de cultivo se eleva la concentración de triptófano exógeno. Para investigar si un mecanismo similar es responsable del efecto antimalárico del γ -IFN, se aumentó la concentración de triptófano de 10 a 80 mg/ml en el medio de los cultivos tratados con la linfoquina. Este aumento en ocho veces de la concentración normal de triptófano no revirtió el efecto parasiti-

cida del γ -IFN, incluso cuando éste fue probado en un amplio rango de concentraciones.

En otro experimento (Schofield y Cols., 1987), determinamos que el γ -IFN radiactivo se une con alta afinidad ($K_d = 1,32 \times 10^{-9}$ M) a receptores presentes en cantidad promedio de 44.000 por cada célula HEPG2.

Estos experimentos *in vitro* nos indican que el efecto protector de γ -IFN en roedores y chimpancés (Ferreira y Cols., 1986) se debe, por lo menos en parte, a la unión de la linfoquina a los hepatocitos del huésped.

En el sistema *in vitro*, el aumento del ADN de parásito fue de aproximadamente 32 veces, a las 52 horas. Si se asume que sólo entre el 5 y 10% de los esporozoítos son infectantes (Hollingdale y Cols., 1986; Ferreira y Cols., 1983), los parásitos sufrieron por lo menos siete divisiones mitóticas en la EEF. Los datos obtenidos con hígados de ratas y la sonda de ADN muestran un aumento mucho mayor en el ADN parasitario durante 44 horas de desarrollo intracelular (Ferreira y Cols., 1986). Sin embargo, y sorpresivamente, el *P. berghei*, a pesar de ser un parásito de roedores, no sólo infecta a una línea hepática tumoral humana *in vitro*, sino que madura suficientemente como para liberar merozoítos capaces de infectar los glóbulos rojos de roedores. Por lo tanto, el sistema *P. berghei*/hepatoma humano es el modelo experimental de elección para investigar el mecanismo de acción de agentes que interfieren con el desarrollo intracelular e infectividad de las EEF.

En un primer intento, para estudiar el mecanismo de acción del γ -IFN, exploramos la proposición Pfefferkorn (1984) en el sentido de que es probable que las actividades antiparasitarias del γ -IFN resulten de mecanismos diferentes de aquellos responsables de la actividad antiviral. En el caso del parásito intracelular *T. gondii*, la actividad del γ -IFN se debe a la inducción de una degradación aumentada del triptófano. En nuestras manos este no es el caso con *P. berghei* ni tampoco el del efecto antichlamidia del γ -IFN (De la Maza y Cols., 1985).

V. γ -IFN, células CD8⁺ y anticuerpos específicos son necesarios para la inmunidad contra esporozoítos productores de malaria.
(Schofield y Cols., 1987b)

En los experimentos descritos a continuación probamos la hipótesis que el γ -IFN, liberado de células T sensibilizadas durante el desafío esporozoítico, inhibe el desarrollo de las EEF y es requerido para la inmunidad estéril. También

investigamos si se requieren células T citotóxicas para la inmunidad contra el desafío esporozoítico.

Las ratas inmunizadas con cuatro dosis de 10^5 esporozoítos irradiados fueron desafiadas con diferentes dosis de esporozoítos de *P. berghei*. Luego, los animales recibieron un anticuerpo monoclonal (DB-1), que neutraliza γ -IFN de rata y ratón, o un anticuerpo monoclonal de especificidad irrelevante. De acuerdo a lo esperado, los animales inmunizados que recibieron el anticuerpo irrelevante no mostraron niveles detectables de ADN parasitario, medido con la sonda descrita en la Sección I. Sin embargo, los animales inmunizados que recibieron el DB-1, mostraron niveles substanciales de desarrollo de EEF, o sea, 43,5% de los niveles de los controles, con un *inoculum* de $2,5 \times 10^4$ o con 5×10^4 esporozoítos. Una proporción similar de EEF fue salvada de la destrucción por parte del γ -IFN endógeno, en huéspedes inmunes, cuando DB-1 fue administrado 2,5 horas después del desafío, lo que indica que los blancos del γ -IFN endógeno son los estados intrahepatocíticos en desarrollo de los parásitos (EEF).

Nuestros experimentos fueron extendidos para determinar si la neutralización *in vivo* del γ -IFN, o la eliminación *in vivo* de células T inmunes podría revertir la inmunidad estéril y permitir el desarrollo de la fase sanguínea de los parásitos.

Los ratones que habían sido inmunizados con esporozoítos irradiados, permanecieron protegidos cuando fueron desafiados con 5×10^3 esporozoítos, seguido por inoculación de 1 mg de anticuerpo monoclonal irrelevante. Sin embargo, la infección sanguínea se desarrolló en animales inmunizados que recibieron 1 mg de anticuerpo DB-1, ya sea inmediatamente o 2,5 horas postdesafío.

El γ -IFN puede ser producido por células T ayudantes o supresoras/citotóxicas. Para determinar si ambos tipos de células están implicados en la mediación de la protección, grupos de ratones inmunizados con esporozoítos irradiados recibieron anticuerpos monoclonales con actividad lítica (mediada por complemento) contra células T CD4⁺ y CD8⁺. El cuadro 2 resume los resultados obtenidos. La eliminación de las células T CD8⁺ en animales completamente inmunes los hace susceptibles al desafío con 5×10^3 esporozoítos. La destrucción de las células CD4⁺ no revirtió la inmunidad de los huéspedes. El grado de eliminación de las células CD4⁺ o CD8⁺ fue verificado en ensayos de inmunofluorescencia de superficie realizadas en linfocitos esplénicos provenientes de grupos paralelos de animales experimentales y controles (92% y 94% de eliminación de células CD8⁺ y CD4⁺, respectivamente).

CUADRO 2

EFFECTO DE LA ELIMINACION DE CELULAS
T CD⁴ Y CD8⁺ EN LA INMUNIDAD
CONTRA ESPOROZOITOS DE *P. berghei*

Estado inmune	No infectado total	Día medio de patencia (rango)
Inmunizado sin tratar	0/10	—
Inmunizado, CD4 elim.	0/5	—
Inmunizado, IFN elim.	4/5	5,23 (5-6)
Inmunizado, CD8 elim.	5/5	4,44 (4-5)
Virgen	5/5	4,8 (4-5)

Finalmente, se realizaron experimentos para aclarar las contribuciones relativas de los mecanismos humorales y celulares en la inmunidad protectora. Ratones vírgenes recibieron IgG purificada o linfocitos T esplénicos provenientes de donantes inmunes o vírgenes, o una combinación de IgG y células T inmunes. Los ratones que recibieron IgG no inmune o linfocitos T de ratones vírgenes, desarrollaron parasitemia rápidamente. Los que recibieron IgG inmune, o linfocitos T inmunes, fueron protegidos parcialmente contra la infección, o sea, los períodos prepatentes se prolongaron significativamente; lo que indica una reducción substancial en la infectividad de los esporozoítos o en el desarrollo de las EEF. Los ratones que recibieron IgG inmune y linfocitos T inmunes mostraron el grado de protección más alto (60%). Esta inmunidad transferida fue revertida por la administración de anticuerpos DB-1 a los huéspedes ($p < 0,001$, prueba de t de dos colas).

Las células CD8⁺ pueden ejercer su efecto en dos formas: 1) Ellas pueden responder a la presentación de antígenos parasitarios en el contexto de los antígenos de histocompatibilidad de Clase I, produciendo γ -IFN que actúa luego, como una hormona, contra las EEF. La unión de la linfoquina a los receptores de superficie de los hepatocitos infectados destruye las EEF *in vitro*, sin la participación de las células efectoras inmunes (Schofield y Cols., 1987). Apoyando este hecho están los experimentos que demuestran que la protección lograda por la transferencia de células T esplénicas es revertida por los anticuerpos DB-1 (anti- γ -IFN). 2) Además, es posible que las células T CD8⁺ sean directamente citotóxicas para los hepatocitos infectados que presenten antígenos procesados originados de los esporozoítos o de las EEF.

A pesar que algunos esporozoítos pueden evadir la acción de anticuerpos específicos (Ferreira y Cols., 1987; Schofield y Cols., 1987) y estable-

cerse en el hígado, el γ -IFN por sí solo tampoco parece ser suficiente para proporcionar inmunidad estéril, ya que se requieren niveles muy altos para erradicar las EEF (Ferreira y Cols., 1986). Sin embargo, es posible que estos dos componentes, γ -IFN y anticuerpos específicos, actuando aditivamente, puedan proporcionar protección completa. Por lo tanto, la contribución relativa de los mecanismos humorales y celulares en la inmunidad antiesporozoíto y anti-EEF, depende de la interacción de por lo menos tres variables: 1) título de anticuerpos neutralizantes, 2) grado y tipo de respuesta celular al antígeno y 3) tamaño de la dosis de desafío.

La destrucción *in vivo* de las células T CD4⁺ no afectó la inmunidad del huésped y los animales CD4⁺ intactos, cuya población de células CD8⁺ fue eliminada, fueron susceptibles al desafío. Por lo tanto, los epítomos, restringidos por antígenos de Clase II, para células T ayudantes, requeridos para la producción de anticuerpos contra la proteína CS, no son suficientes para sensibilizar las células T e inducir la protección mediada por γ -IFN. Las células CD8⁺ reconocen epítomos restringidos por antígenos de histocompatibilidad de Clase I, que pueden ser estructuralmente diferentes.

En resumen, los resultados discutidos en esta revisión sugieren que una vacuna humana efectiva, basada en esporozoítos, requerirá de la incorporación de péptidos sintéticos (o de la proteína recombinante) capaces de inducir altos títulos de anticuerpos neutralizantes contra la proteína CS y de sensibilizar poblaciones de células T. Estas células deberán responder a antígenos parasitarios, presentados durante el desafío natural, con la producción de γ -IFN, el que actuará contra aquellos parásitos que escapen a la acción de los anticuerpos.

Es probable que el modelo de parasitismo intracelular presentado aquí incluya estrategias desarrolladas por el huésped y por el parásito durante millones de años de evolución. Es posible que, al menos parte de estas estrategias, sean comunes a otros modelos de parasitismo intracelular (*Toxoplasma*, *Chlamydia*, *Babesia*, *Trypanosoma*, etc.). El modelo de malaria señala que el accionar del inmunólogo para proporcionar inmunógenos (vacunas) antiparásitos intracelulares, de importancia en medicina humana y veterinaria, deberá sustentarse en el conocimiento inmunológico básico que le permita manipular y desviar estas estrategias en beneficio del huésped.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los Dres. Víctor Nussenzweig y Ruth Nussenzweig por su apoyo esencial, a John Alocco, Hi Ni Wang y M. Lorena Ferreira

por su excelente ayuda técnica y a María E. Aranguren por la preparación del texto.

Las investigaciones presentadas han sido apoyadas por las siguientes organizaciones: Agency for International Development, National Institutes of Health y Mc Arthur Foundation.

REFERENCIAS

- CHEN, D.; R. TIGELAAR, F. WEINBAUM. Immunity to sporozoite-induced malaria infections in mice. I. The effect of immunization of T and B-cell deficient mice. *J. Immunol.* **118**: 1322-1327, 1977.
- DAME, J.B.; T.F. McCUTCHAM. The four ribosomal DNA subunits of the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *J. Biol. Chem.* **258**: 6984-6990, 1983.
- DE LA MAZA, L.M.; E.M. PETERSON, C.W. FENNIE, C.W. CZARNIECKI. The antichlamydial and antiproliferative activities of recombinant murine interferon are not dependent on tryptophan concentration. *J. Immunol.* **135**: 4198-4202, 1985.
- DIJKEMA, R.; P.H. VAN DEN MEIDE, P.H. POWELS, M. CASPERS, M. DUBBELD, H. SCHELLEKENS. Cloning and expression of the chromosomal immune interferon gene of the rat. *E.M.B.O. J.* **4**: 761-766, 1985.
- DIJKMANS, R.; A. BILLIAU. An introduction to the genes of the Interferon System. *In: Interferons. Their Impact in Biology and Medicine.* (ed. J.T. Papadimitriou). Oxford University Press. 1985.
- FERREIRA, A.; V. ENEA, T. MORIMOTO, V. NUSSENZWEIG. Infectivity of *Plasmodium berghei* sporozoites measured with a DNA probe. *Molec. Biochem. Parasitol.* **19**: 103-109, 1986.
- FERREIRA, A.; T. MORIMOTO, R. ALTSZULLER and V. NUSSENZWEIG. Use of a DNA probe to measure the neutralization of *Plasmodium berghei* sporozoites by a monoclonal antibody. *J. Immunol.* **138**: 1256-1259, 1987.
- FERREIRA, A.; L. SCHOFIELD, V. ENEA, H. SCHLEKENS, P. V.D. MEIDE, W. COLLINS, R.S. NUSSENZWEIG, V. NUSSENZWEIG. Inhibition of development of exoerythrocytic forms of malaria parasites by γ -interferon. *Science* **232**: 881-884, 1986.
- HOLLINGDALE, M.R.; P. LELAND, J.L. LEEF and A.L. SCHWARTZ. Entry of *Plasmodium berghei* sporozoites into cultured cells and their transformation into trophozoites. *A., J. Trop. Med. Hyg.* **32**: 685-690, 1983.
- ISAACS, A.; J. LINDENMANN. Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **147**: 258-261, 1957.
- JAHIEL, R.I.; R.S. NUSSENZWEIG, J. VANDERBERG and J. VILCEK. Anti-malarial effect of interferon inducers at different stages of development of *Plasmodium berghei* in the mouse. *Nature* **220**: 710-712, 1968a.
- JAHIEL, R.I.; R.S. NUSSENZWEIG, J. VILCEK, J. VANDERBERG. Protective effect of interferon inducers on *Plasmodium berghei* malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **18**: 823-827, 1969.
- JAHIEL, R.R.; J. VILCEK, R.S. NUSSENZWEIG, J. VANDERBERG. Interferon inducers protect mice against *Plasmodium berghei* malaria. *Science* **161**: 802-805, 1968b.
- KELLY, K.G.; N. COZZARELLI, M.P. DEUTSCHER, I.R. LEHMAN, A. KORNBERG. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* **245**: 39-46, 1970.
- KILLICK-KENDRICK, R. Parasitic protozoa of the blood of rodents: a revision of *Plasmodium berghei*. *Parasitology* **69**: 225-237, 1974.
- MANIATIS, T.; E.F. FRITSCH and J. SAMBROOK. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, N.Y. 1982.
- MEIS, J.F.; G. M., J.P. VERHAVE, F. HESS, J.H.E. TH. MEUWIJSEN. An ultrastructural study of developing stages of exoerythrocytic *Plasmodium berghei* in rat hepatocytes. *Parasitology* **82**: 195-204, 1981.
- MEIS, J.F.; G. M., J.P. VERHAVE, P.H.K. JAP, J.H.E. TH. NEUWIJSEN. A structural study on the role of Kupffer cells in the process of infection by *Plasmodium berghei* sporozoites in rats. *Parasitology* **86**: 231-242, 1983.
- PFEFFERKORN, E.R. Interferon-gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cell to degrade tryptophan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**: 908-911, 1984.
- POTOCNJAK, P.; N. YOSHIDA, R.S. NUSSENZWEIG; V. NUSSENZWEIG. Monovalent fragments (Fab) of monoclonal antibodies to a sporozoite surface antigen (Pb44) protect mice against malarial infection. *J. Exp. Med.* **151**: 1504-1507, 1980.
- SCHMIDT, L.H.; R. TRADKIN, C.S. GANTHER, R.N. ROSSON, W. SQUIRES. I. The characteristics of untreated sporozoite-induced and trophozoite-induced infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **31**: 612-645, 1982.
- SCHOFIELD, L.; A. FERREIRA, R. ALTSZULLER, V. NUSSENZWEIG, R. NUSSENZWEIG. Interferon- γ inhibits the intrahepatocytic development of malaria parasites *in vitro*. *J. Immunol.* **139**: 2020-2025, 1987a.
- SCHOFIELD, L.; J. VILLAQUIRAN, A. FERREIRA, H. SCHELLEKENS, R. NUSSENZWEIG, V. NUSSENZWEIG. γ -interferon, CD8⁺ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites. *Nature* **330**: 664-666, 1987b.
- SHORT, H.E.; P.C.C. GARNHAM, B.B. MALOMOS. The preerythrocytic stage of mammalian malaria. *Br. Med. J.* **1**: 192-195, 1948.
- SPITALNY, G.; R.S. NUSSENZWEIG. *Plasmodium berghei*: Relationship between protective immunity and ant sporozoite (CSP) antibody in mice. *Exp. Parasitol.* **33**: 168-174, 1973.
- VERGARA, U.; A. FERREIRA, H. SCHELLEKENS, V. NUSSENZWEIG. Mechanism of escape of exoerythrocytic forms (EEF) of malaria parasites from the inhibitory effects of interferon- γ . *J. Immunol.* **138**: 4447-4449, 1987.
- VERHAVE, J.; G. STRICKLAND, H. JAFFE, A. AHMAD. Studies on the transfer of protective immunity with lymphoid cells from mice immune to malaria sporozoites. *J. Immunol.* **121**: 1031-1036, 1978.
- WEISSMANN, C. The cloning of interferon and other mistakes. *In: Gresser, Interferon* (ed. I. Gresser) Vol. 3. pp. 101-104. Academic Press, London, 1981.
- YOELI, M.; H. MOST. Studies on sporozoite induced infection of rodent malaria. I. The preerythrocytic tissue stage of *Plasmodium berghei*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **14**: 700-703, 1965.
- YOSHIDA, N.; R.S. NUSSENZWEIG, P. POTOCNJAK, V. NUSSENZWEIG, M. AIKAWA. Hybridoma produces protective antibodies against the sporozoite stage of malaria parasites. *Science* **207**: 71-73.