

ESTUDIOS DE INVASION DEL PARASITO *Plasmodium falciparum* A FANTASMAS DE ERITROCITOS HUMANOS

Por Moisés Wasserman L.* , Juan A. Crosby G. y
Gladys Arreaza T.

RESUMEN

Se estudió la invasión del parásito *Plasmodium falciparum* a fantasmas de eritrocitos humanos. La invasión disminuyó proporcionalmente a la dilución del contenido citoplasmático, hasta un límite del 20%, por debajo del cual no hay invasión. Este comportamiento es paralelo a la capacidad de los fantasmas de mantener una concentración de ATP superior a 10 μ M. La adición de fosfato, magnesio, y las poliaminas espermina y espermidina no modificó el resultado. La adición de ATP, o de un sistema enzimático regenerador de ATP mejoró la capacidad de las células para ser invadidas por el parásito.

La sustitución del contenido proteico de los fantasmas con citoplasma exógeno, de eritrocitos humanos, causó una restitución de la invasión; mientras que la sustitución con citoplasma proveniente de eritrocitos de pollo sólo restituyó la invasión cuando se aumentó simultáneamente el contenido de ATP. La posible existencia de un factor específico para la invasión, en el citoplasma se descarta; se insinúa la importancia de un sistema enzimático que mantenga un nivel mínimo de ATP.

INTRODUCCION

La malaria es posiblemente la enfermedad parasitaria que causa el mayor impacto en la salud humana en el trópico. La mitad de la población mundial, cerca de 2.500 millones de personas están permanentemente amenazadas; 300 millones de personas son infectadas por año y de éstas, por lo menos 80 millones sufren la enfermedad (1). Se estima que en Africa, mueren un millón de niños al año por ella (1,2). Entre más de 100 especies de

Plasmodium, sólo 4 atacan al hombre *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium ovale*; de éstos, el que causa las infecciones más graves y el más difundido en el mundo es el *Plasmodium falciparum*.

Entre los diferentes ciclos de vida del parásito en sus dos hospederos (mosquito *Anopheles* y hombre), es particularmente interesante el ciclo asexual eritrocítico, que es el causante de las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Durante este ciclo, que dura 48 horas, cambia el parásito dentro del eritrocito, de forma joven (anillo) a formas más maduras (trofozoítos) y finalmente se divide (esquizontes) en 16 a 20 parásitos (merozoítos) que se liberan e invaden nuevas células rojas. El mecanismo molecular de esta invasión es poco conocido, a pesar de que existen descripciones ultraestructurales muy precisas (3,4,5). Hay primero un contacto accidental entre merozoítos libres y eritrocitos, seguido de una unión en el punto de contacto. El eritrocito sufre entonces una rápida deformación que dura 9-15 segundos, el parásito se reorienta con su zona apical directamente opuesta a la membrana de la célula roja, y en ese punto se forma un complejo de unión, que se ve muy denso en microscopía electrónica de transmisión, y que se va moviendo a lo largo del parásito a medida que la célula es penetrada, por invaginación, en un proceso que dura 15 segundos. Finalmente la vacuola, sellada por fusión de la membrana, es interiorizada al eritrocito que después de unos minutos adquiere nuevamente estructura de disco bicóncavo.

La anterior descripción, sugiere la presencia de receptores específicos en las membranas de las dos células involucradas, pero también parece evidente la necesidad de componentes intracelulares que

* Académico Correspondiente. Profesor de Bioquímica - Universidad Nacional. Jefe, Grupo de Bioquímica - Instituto Nacional de Salud.

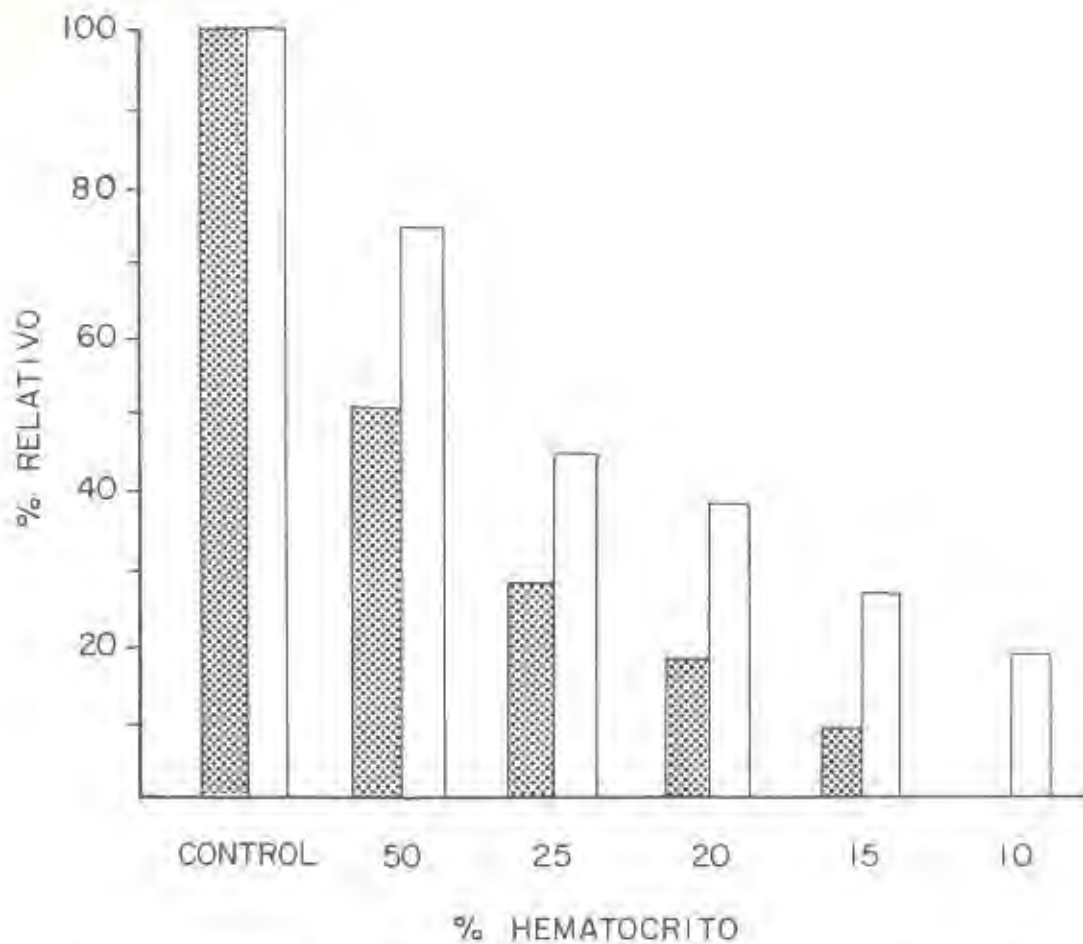


FIGURA 1. Efecto de la dilución del contenido del eritrocito sobre la invasión de fantasmas por *Plasmodium falciparum*. (▨) Invasión; (□) Contenido de proteína.

mediante un proceso de endocitosis muy raro en el eritrocito.

Varios grupos han tratado de identificar el receptor; se ha sugerido que la glicoforina A es el receptor del merozoito (6,8). Sin embargo, hay autores que presentan evidencias de que también la glicoforina B (9,10) y la glicoforina C (11) están involucradas en el proceso, pues compiten con la invasión, y porque células rojas genéticamente deficientes en ellas tienen grados diversos de resistencia a la invasión. Un grupo afirma que el receptor es la banda 3 del eritrocito (12,13) basado en la inhibición a la invasión causada por esta proteína insertada en liposomas. En contraste con la gran cantidad de trabajo que se ha hecho para caracterizar los receptores, es muy poco lo que sabe acerca de los procesos intracelulares durante la invasión. Esto se debe seguramente a las dificultades físicas que presenta el problema de analizar factores intracelulares en un proceso que no puede ser reconstruido en ausencia de las células completas. Una solución posible a estas dificultades es el uso de fantasmas de eritrocito, que son membranas que conservan el tamaño, forma y características de la célula original (14), pero cuyo contenido interno puede ser modificado, incluyendo en ellas moléculas pequeñas y macromoléculas (15).

Este trabajo, pretendió hacer uso de fantasmas resellados de eritrocitos, para evaluar el papel de

algunos componentes intracelulares de la célula hospedera en la invasión del merozoito de *Plasmodium falciparum*.

MATERIALES Y METODOS

Cultivo del parásito

Se usó la cepa colombiana FCB-2 de *Plasmodium falciparum* (16), mantenida en cultivo continuo según el método de Trager & Jensen (17), en una suspensión de eritrocitos humanos O(+) al 5% (v/v) en medio RPMI-1640 (GIBCO Grand Island, N. Y.) suplementado con 10% de suero humano de donante O(+), hipoxantina 0,2mM, glutatión reducido 1ug/ml, buffer HEPES (Ácido N-2-Hidroxiethyl-piperazin-N'-2-etanosulfónico) 25mM, bicarbonato de sodio 32mM, y gentamicina 50ug/ml. El cultivo se mantuvo a 37°C en cámaras de incubación herméticas con una atmósfera de CO₂ 5%, O₂ 5% y N₂ 90%. El medio se cambió diariamente y se hizo dilución con eritrocitos frescos cada cuatro días. La parasitemia en el cultivo y en los experimentos se evaluó por conteo de parásitos, en extendidos coloreados con Giemsa y se expresó como porcentaje.

Sincronización del cultivo

El cultivo se sincronizó de acuerdo al método descrito por Lambros y Vanderberg (18). Después

de un lavado (750xg, 5 minutos) en una solución de NaCl 160mM, HEPES 20mM pH 7.4 (BHS), se incubaron las células a 37°C durante 5 minutos en una solución de sorbitol al 5%. Los eritrocitos se recuperaron por centrifugación, se lavaron con BHS y se resuspendieron en medio de cultivo.

Separación y concentración de esquizontes

La separación y concentración de esquizontes se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Rivadeneira, Wasserman y Espinal (19). El cultivo con un porcentaje de esquizontes entre uno y dos se centrifugó a 750xg durante 5 minutos para separar las células. A un volumen de células se adicionaron 3 volúmenes de BHS. Un mililitro de esta suspensión se adicionó a una mezcla de 9.9ml Percoll (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala-Sweden) y 1.1 ml de BHS concentrado x 10 (HEPES 200mM, NaCl 1.6M pH 7.4) y se centrifugó a 26.000 xg a 4°C durante 30 minutos. La fracción superior del gradiente que contenía los esquizontes se lavó con BHS y se resuspendió en medio del cultivo para experimentación.

Preparación de Fantasmas

Los fantasmas de eritrocitos fueron preparados según el método descrito por Wasserman y colaboradores (15). Se usaron eritrocitos frescos tipo O(+). Las células rojas fueron lavadas 3 veces con una solución NaCl 20mM, KCl, 140mM, TES (Acido N-tris-hidroximetil-2-aminoetano-sulfónico) 20mM, pH 7.4 (solución isotónica), se descartó la capa superior de células blancas y se resuspendieron en solución isotónica al hematocrito deseado y con las adiciones de cada experimento. Un volumen de esa mezcla se transfirió a una bolsa de diálisis y se sometió a diálisis contra 100 volúmenes de una solución NaCl 5mM, KCl 35mM, TES 5mM, pH 7.4 (solución hipotónica), a 4°C por 2 horas. Después de la diálisis se llevó la suspensión a iso-osmolaridad añadiendo 0.1 volumen de solución, NaCl 0,2M, KCl 1,4M, TES 0,2M pH 7.4 y MgSO₄ 20mM, (solución hipertónica) e incubando a 37°C durante 30 minutos. Los fantasmas resellados se recuperaron por centrifugación a 10.000 xg a 4°C por 15 minutos se lavaron dos veces en las mismas condiciones con solución isotónica, y finalmente

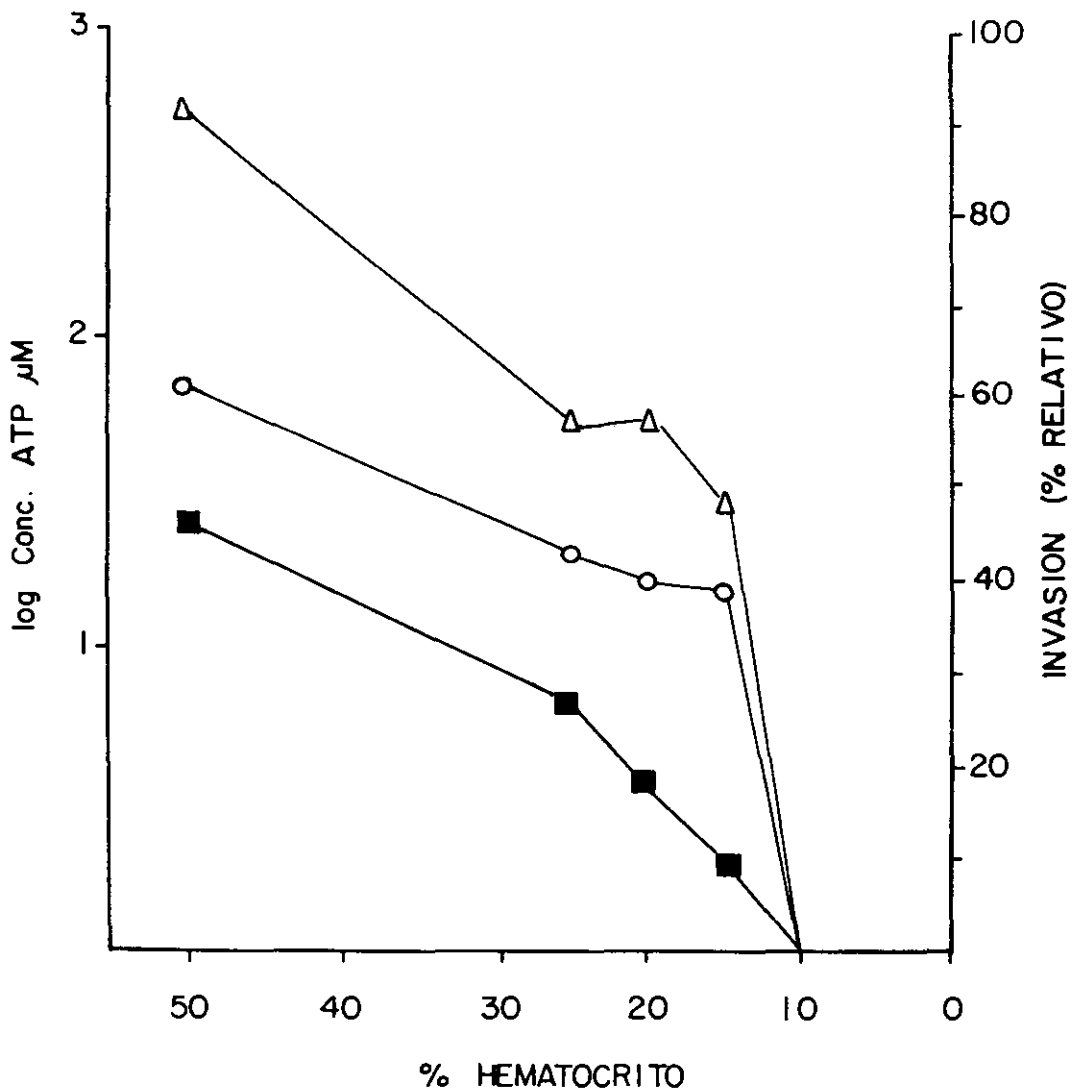


FIGURA 2. Concentración intracelular de ATP e invasión de fantasmas por *Plasmodium falciparum*. (\circ) ATP inicial; (\triangle) ATP final (después de incubar los fantasmas a 37°C en medio completo durante 12 horas); (\blacksquare) invasión.

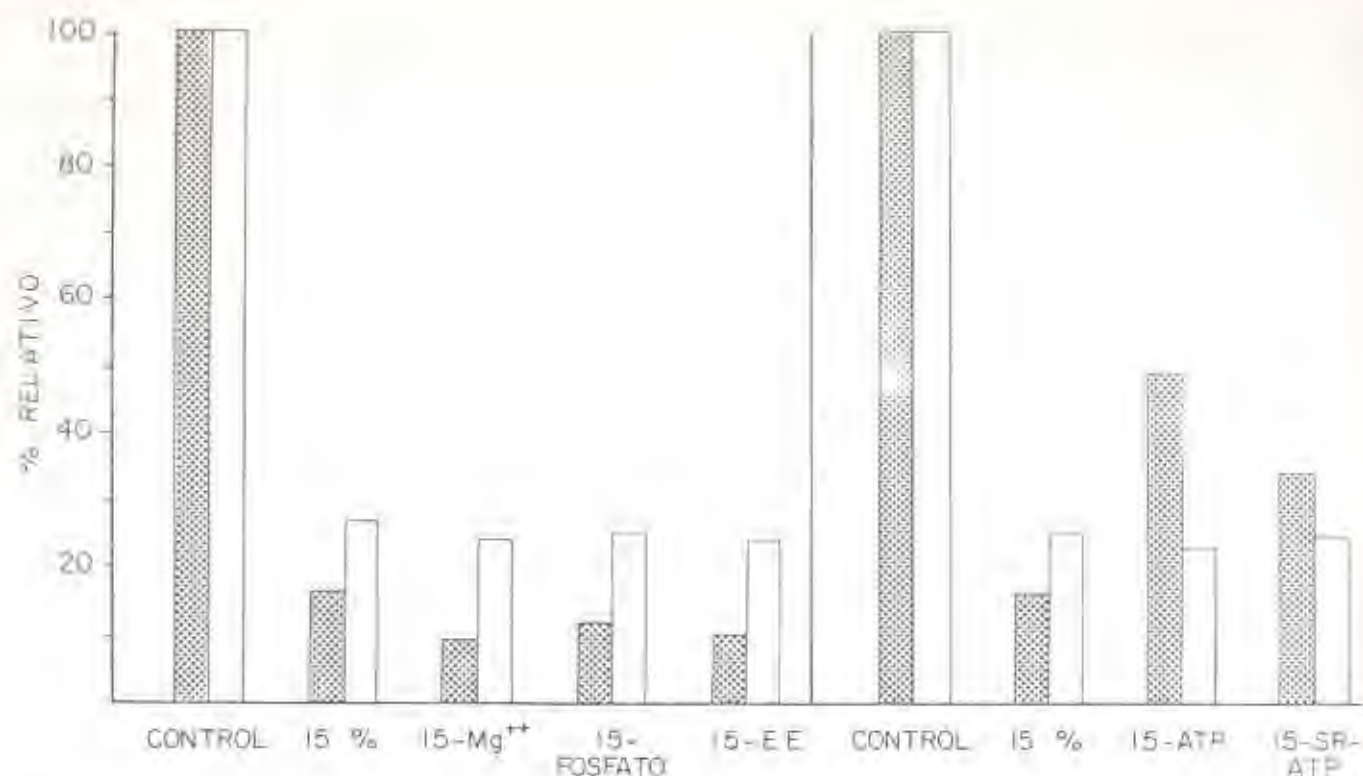


FIGURA 3. Efecto de varias sustancias sobre la invasión de fantasma por *Plasmodium falciparum*. (▨) Invasión; (□) Contenido de proteína; E. E. = Espermidina; SR-ATP O Sistema Regenerador de ATP.

se resuspendieron al 10% en medio de cultivo completo.

Determinación del contenido de ATP

Se llevó a cabo según lo descrito por Stanley y Williams (20). A las células se adicionó 1,5 ml de agua bidestilada en ebullición y se siguió calentando a 92°C por 10 minutos. La suspensión se centrifugó a 1,000xg durante 5 minutos y el sobrenadante se separó y conservó a -20°C hasta el momento de la determinación. Para la medición de ATP se adicionó a 1,0ml de una dilución apropiada de la muestra, 1,0ml de un buffer de arsenato de sodio 0,1M pH 7,4, 1,0 ml de buffer fosfato 0,01M pH 7,4 y 0,1ml de una solución de sulfato de magnesio 0,4M. Inmediatamente antes de efectuar la lectura se adicionó 0,05ml de una suspensión de luciferina y luciferasa (Sigma Chemical Co. St Louis Mo). El centelleo se midió en un contador (Packard Tri-Carb modelo 3020) ajustando la ganancia al 10%, la ventana totalmente abierta y desconectando el circuito de coincidencia. Los valores obtenidos se interpolaron en una curva patrón preparada con el mismo método.

Ensayos de Invasión

En todos los experimentos se mezcló 250ul de suspensión de fantasmas con 250ul de suspensión de esquizontes. La mezcla se colocó en placas para cultivo de 24 pozos (Costar, Cambridge MA) y se incubaron a 37°C durante 12 horas en las condiciones del cultivo. El grado de invasión se evaluó por el porcentaje de células parasitadas con anillos.

Los controles fueron células rojas intactas sometidas a los mismos tratamientos que los fantasmas, con excepción de la exposición a la solución hipotónica.

RESULTADOS

Invasión en fantasmas con diferente contenido de proteína citoplasmática

Se prepararon fantasmas con diferente contenido de proteína, llevando a cabo el choque hipotónico con suspensiones de eritrocitos de diferente hematocrito. En la figura 1 (barras blancas) se ve que el contenido de proteína disminuye proporcionalmente al hematocrito, siendo el porcentaje de proteína retenida aproximadamente el doble del porcentaje de hematocrito durante la diálisis. La invasión disminuye también proporcionalmente al contenido de proteína de los fantasmas. Es apenas un 9% del control con fantasmas que tienen un contenido de proteína del 30%; por debajo del 20% la invasión no ocurre. Al evaluar las concentraciones de ATP de estos fantasmas (figura 2) antes de someterlos a la invasión, y después de 12 horas de incubación en medio de cultivo a 37°C se observó que hay también una relación directa entre el contenido intracelular de ATP y la invasión. Aquellos que presentan invasión son los que poseen concentraciones iniciales de ATP superiores a 10uM y que conservan la capacidad de mantener, e incluso aumentar ese nivel. Aquellos que muestran niveles muy bajos de ATP (menos de 3uM), no son capaces de mantener esta concentración intracelular, y no son invadidos.

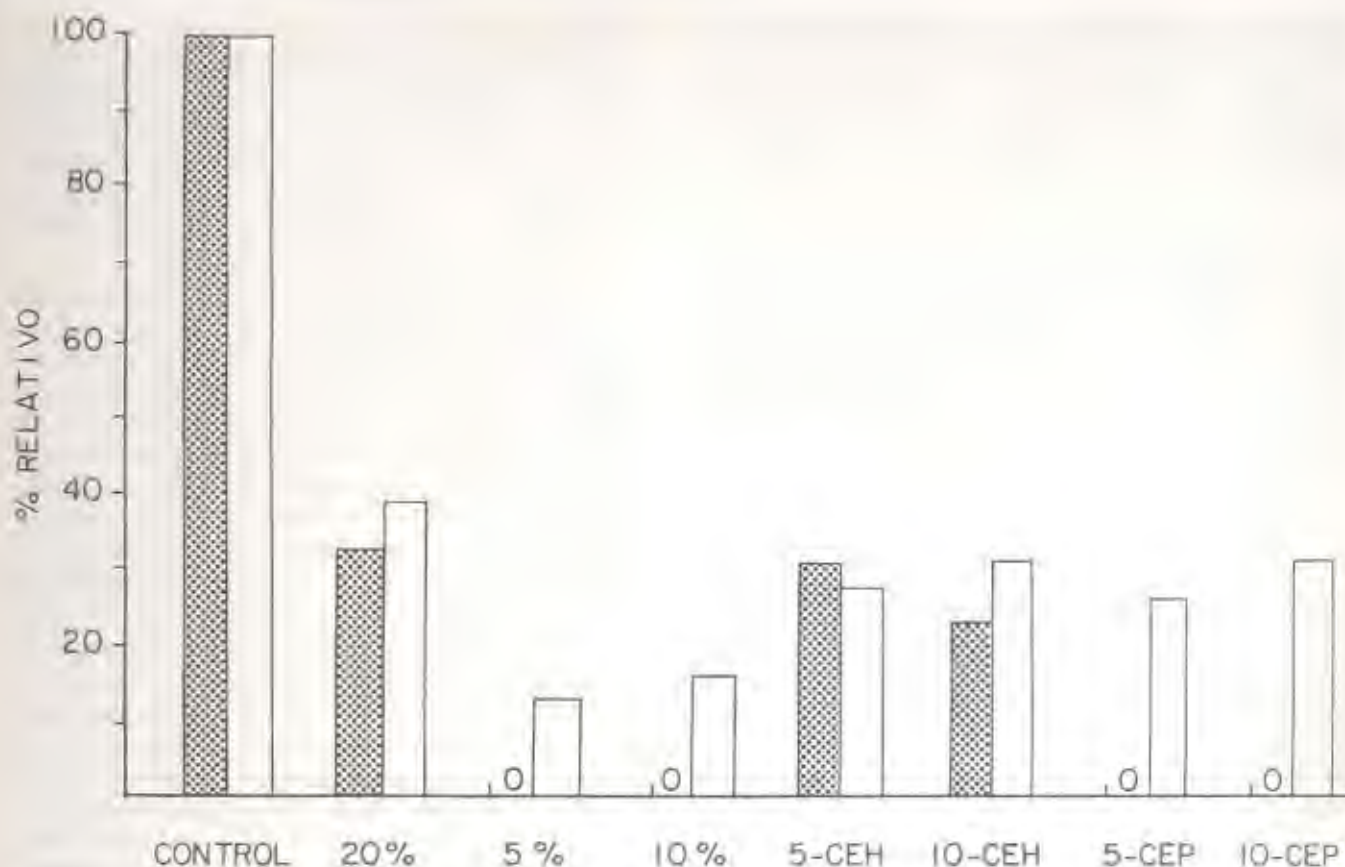


FIGURA 4. Efecto de la proteína exógena atrapada en los fantasmas sobre la invasión por *Plasmodium falciparum*. (▨) Invasión; (□) Contenido de proteína. CEH = Citoplasma de eritrocitos humanos; CEP = Citoplasma de eritrocitos de pollo.

Efecto de Mg^{++} , fosfato, poliaminas y ATP en la invasión de los fantasmas

Se prepararon fantasmas por diálisis de eritrocitos a un hematocrito del 15% de forma que el contenido de proteína es aproximadamente un 30% del de eritrocitos normales. Esto permite la invasión, aunque reducida a menos del 20% del control. Cuando se adiciona a los fantasmas durante la preparación diversas sustancias (para que sean atrapadas en ellos), se puede ver qué efecto causan éstas sobre la invasión. En la figura 3 se ve que el Mg^{++} 2mM, el fosfato 10mM y una mezcla de las poliaminas espermina 1mM y espermidina 1mM no aumentan la capacidad de invasión de los fantasmas, por el contrario en todos ellos hay una pequeña disminución, posiblemente no significativa. Sin embargo, la adición de ATP 1mM, o de un sistema regenerador de ATP (fosfocreatina 20mM, ADP 1mM, fosfocreatina quinasa 100U/ml) causan un aumento de la invasión a 49% y 34% respectivamente. El contenido de proteína en todos estos fantasmas es equivalente: no así las concentraciones de ATP, que para los fantasmas sin ninguna adición y con Mg^{++} , fosfato y espermina-espermidina, varían de 13-16 μ M al iniciar el experimento hasta 18-25 μ M después de 12 horas de incubación, mientras que los fantasmas suplementados con ATP mostraron niveles de 19 μ M al iniciar la incubación de 12 horas y 122 μ M al terminar, y los suplementados con el sistema regenerador 808 μ M de ATP al iniciar y

187 μ M al terminar la incubación. Los eritrocitos control mostraron un nivel inicial de 1500 μ M y un nivel final de 1800 μ M.

Ensayos de invasión en fantasmas con contenido citoplasmático exógeno

Se usó citoplasma de eritrocito humano iodinado con ^{125}I (21) para medir el atrapamiento de citoplasma exógeno en fantasmas preparados con eritrocitos a diferentes hematocritos, en presencia de varias concentraciones del preparado iodinado. Así se estableció que fantasmas preparados a partir de suspensiones al 5% y al 10% de eritrocitos, en presencia de una solución 35mg/ml de citoplasma exógeno, tiene una cantidad de proteína propia menor al 20%, que no permitiría la invasión, y una cantidad de proteína total (propia más exógena) superior al 40% lo que sí la permitiría, si el citoplasma exógeno fuera equivalente al endógeno.

En la figura 4 se observa que fantasmas preparados en la forma descrita, tienen un contenido de proteína de 30-35% y cuando el contenido total de proteína es logrado con citoplasma exógeno de origen humano, soportan la invasión en forma parecida a fantasmas control. Sin embargo, fantasmas en los cuales se logra un contenido de proteína total similar, pero usando citoplasma exógeno, de pollo (especie que no soporta la invasión de *Plasmodium falciparum*) la invasión es nula. La concentración intracelular de ATP en estos fantasmas es

también nula, mientras que en los fantasmas control preparados con hematocrito del 20% varió de 19 μ M. a 45 μ M, y en los fantasmas con citoplasma humano exógeno varió de 13-22 μ M a 40-49 μ M desde el principio de la incubación hasta 12 horas después (figura 5).

La figura 6 muestra, que al añadir ATP o un sistema regenerador de ATP, a fantasmas del 5% o del 10% que contienen citoplasma exógeno de pollo, éstos soportan un grado de invasión similar al de fantasmas control preparados con un 20% de hematocrito. El nivel inicial de ATP en estos fantasmas fue de 57 μ M, pero después de 12 horas descendió a niveles no cuantificables.

Desarrollo del parásito en fantasmas

La figura 7 muestra microfotografías del cultivo control, el cultivo sincronizado y la invasión en varios fantasmas. Las microfotografías K y L muestran respectivamente el desarrollo de los parásitos en eritrocitos control y en fantasmas preparados con una suspensión de eritrocitos del 5% y que atraparón citoplasma exógeno de origen humano. En estos fantasmas maduran aproximadamente el 50% de los parásitos que logran invadir.

DISCUSION

La disminución de los índices de invasión, paralela a la dilución del contenido del eritrocito, parece

indicar que la invasión en los fantasmas está regulada por la concentración intracelular de un constituyente citoplasmático del eritrocito. La adición de iones como Magnesio y Fosfato no produce efectos apreciables, de manera que puede descartarse la dilución, o la pérdida de capacidad para el transporte de estos iones como la causa de la disminución en la susceptibilidad a la invasión.

El aumento de los índices de invasión en fantasmas, mediante la adición de ATP durante su preparación ya había sido reportado (22-25), se mencionó igualmente, aunque sin detalles experimentales ni resultados exactos, el efecto, reportado acá, de la dilución del contenido del eritrocito sobre la incapacidad de los fantasmas para conservar los niveles iniciales de ATP (25). Nuestras observaciones, que muestran un mínimo efecto del ATP agregado a fantasmas con muy bajo contenido citoplasmático (10% hematocrito) sobre la invasión, podrían estar de acuerdo con las conclusiones de Dłuzewski y colaboradores (23) que proponen la existencia de un "factor", que estando por debajo de una concentración límite no permite la restitución de la invasión ni siquiera aumentando la concentración de ATP. Nuestros resultados parecen sugerir más bien que es necesario conservar la capacidad para sintetizar ATP y mantener cierto nivel del mismo. Aparentemente esta función dependería de una concentración crítica de las proteínas citoplasmáticas del eritrocito. Se ha reportado un aumento de

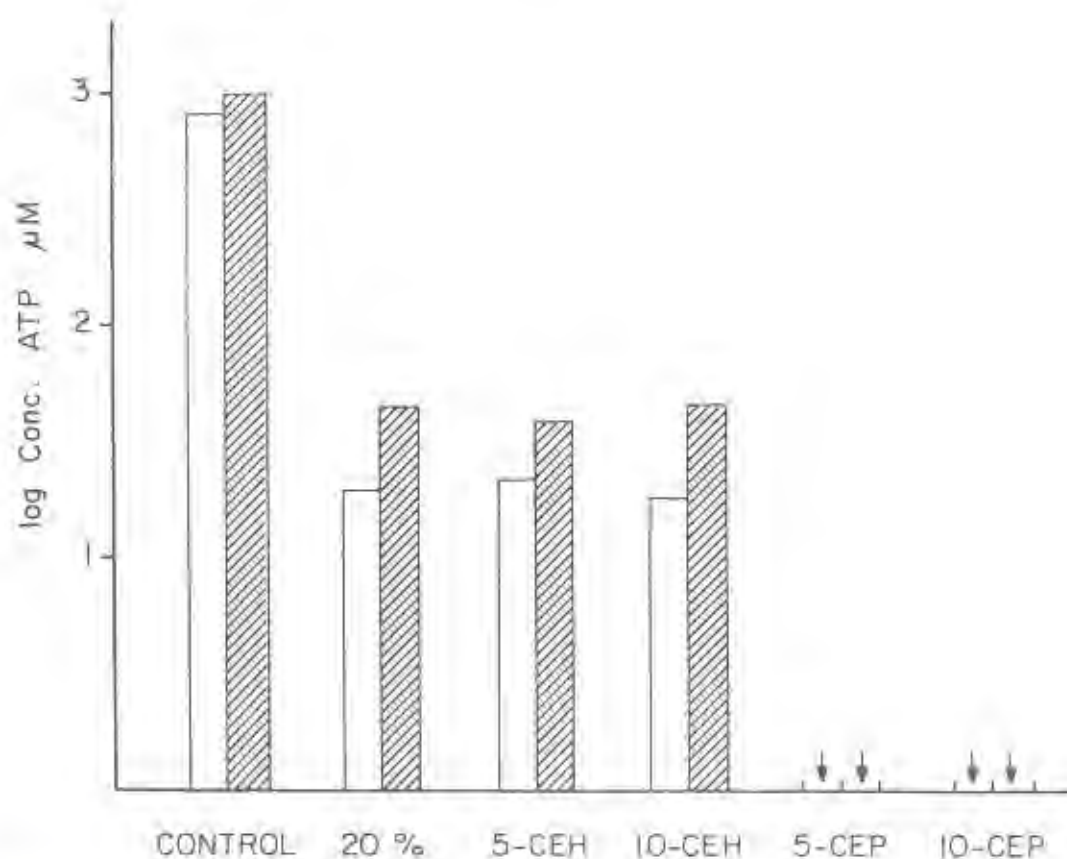


FIGURA 5. Concentración intracelular de ATP en fantasmas que atraparón citoplasma de eritrocitos humanos y de eritrocitos de pollo: (\square) ATP inicial; (▨) ATP final (después de incubar los fantasmas a 37°C en medio completo durante 12 horas).

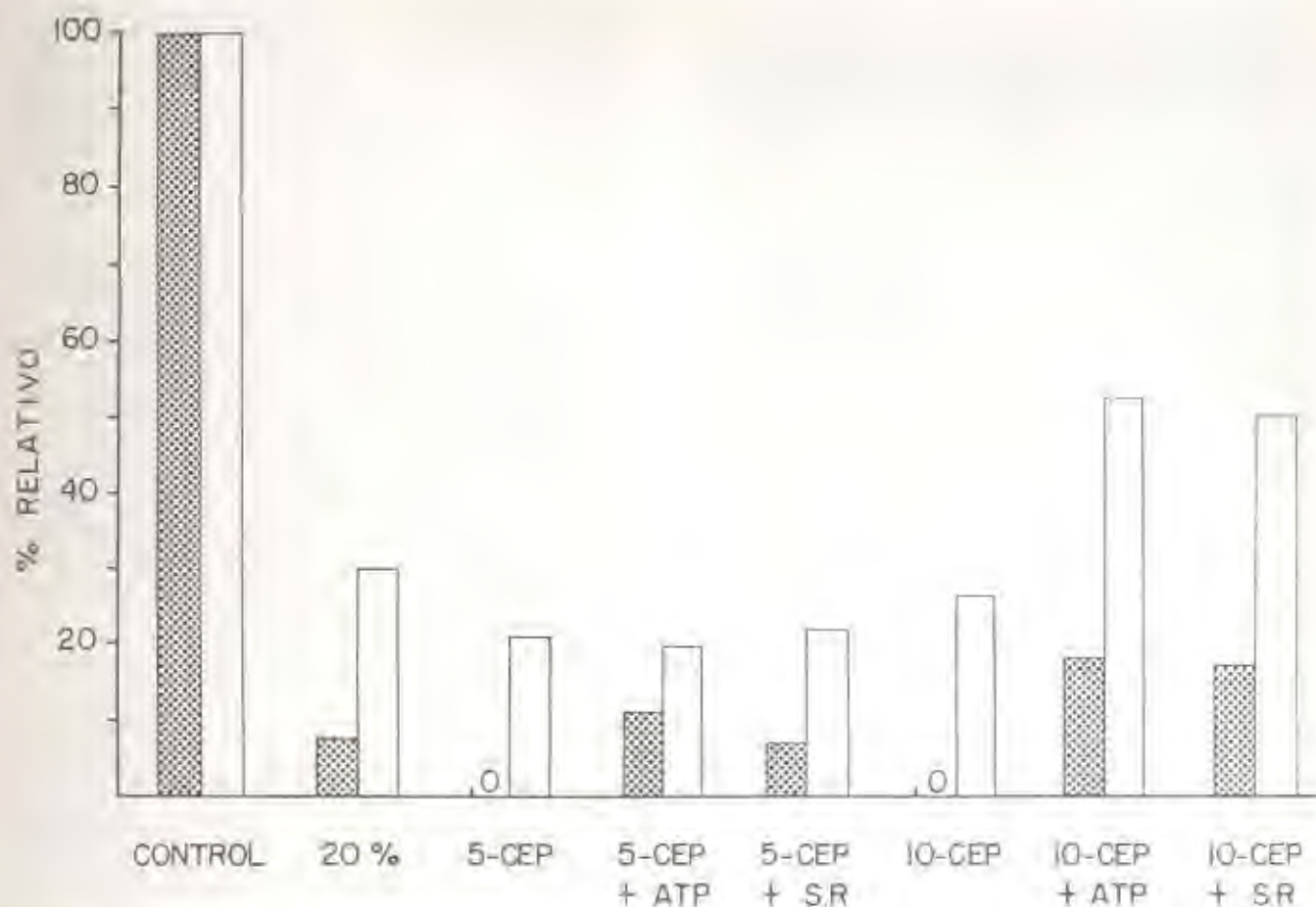


FIGURA 6. Invasión por *Plasmodium falciparum*, de fantasmas que atraparon citoplasma de eritrocitos de pollo suplementado con ATP o sistema Regenerador de ATP, (▨) Invasión; (□) Contenido de proteína.

la movilidad de las proteínas transmembranales causado por el ATP debido a su carácter de polifosfato, mientras que compuestos de carga positiva, como las poliaminas espermina y espermidina, reducen la movilidad de dichas proteínas (26). Nuestros resultados señalan que la concentración relativamente alta de ATP aportada por el sistema regenerador no produce efectos mayores sobre la susceptibilidad a la invasión, y una mezcla de espermina y espermidina causan sólo un descenso muy bajo en ésta. Recientemente se reportó un descenso similar como si fuera apreciable (27) pero, en nuestro concepto, la variabilidad del sistema biológico usado no permite sustentar tal afirmación.

Es probable que el ATP esté implicado en un proceso de fosforilación del citoesqueleto del eritrocito, al tiempo que ocurre la invasión. Ciertamente se ha encontrado fosforilación de una proteína del citoesqueleto de eritrocitos de ratón, aparentemente la actina, luego de ser invadidos por el *Plasmodium berghei* (28). Por otra parte se ha reportado que la adición a los fantasmas, de un análogo hidrolizable del ATP, la adenosina 5'-0-(3-trifosfato), el cual puede ser utilizado por enzimas quinasas produce un efecto similar al ATP, mientras que el uso de un análogo no-hidrolizable (adeninil-imidofosfato) no tiene ningún efecto. Además, la introducción en los fantasmas de adenosina como inhibidor de fosforilación ocasiona una disminución en la invasión (23).

Habiendo observado que la dilución del contenido citoplasmático era la causa de la disminución de la susceptibilidad de los fantasmas a ser invadidos, se examinó la posibilidad de que los factores citoplasmáticos retirados, fueran exclusivos del eritrocito humano o se hallaran presentes en eritrocitos de otras especies. Para esto se utilizaron fantasmas que conservaron una cantidad de proteína propia equivalente a la de fantasmas que no soportan la invasión y a los cuales se introdujeron adicionalmente proteínas provenientes de un lisado de eritrocitos de pollo. La proporción de proteína propia retenida en los fantasmas debía ser bastante baja de manera que los efectos producidos pudieran ser atribuidos a la proteína exógena introducida, ésta debía hacerlos equivalentes a fantasmas que soportan la invasión.

Se escogieron los eritrocitos de pollo por tratarse de células que aunque realizan básicamente una misma función (transporte de O_2 y CO_2 hacia y desde diferentes tejidos), en otros aspectos son metabólicamente y filogenéticamente diferentes. Al tiempo que se utilizaban proteínas de un lisado de eritrocitos de pollo, se hizo lo mismo con proteínas de eritrocitos humanos, no sólo como un control, sino también con el objeto de determinar si los factores que fijan el éxito de la invasión ciertamente se encontraban en el citoplasma de la célula roja.

Es claro que el método utilizado permite el intercambio de cantidades apreciables de proteína.

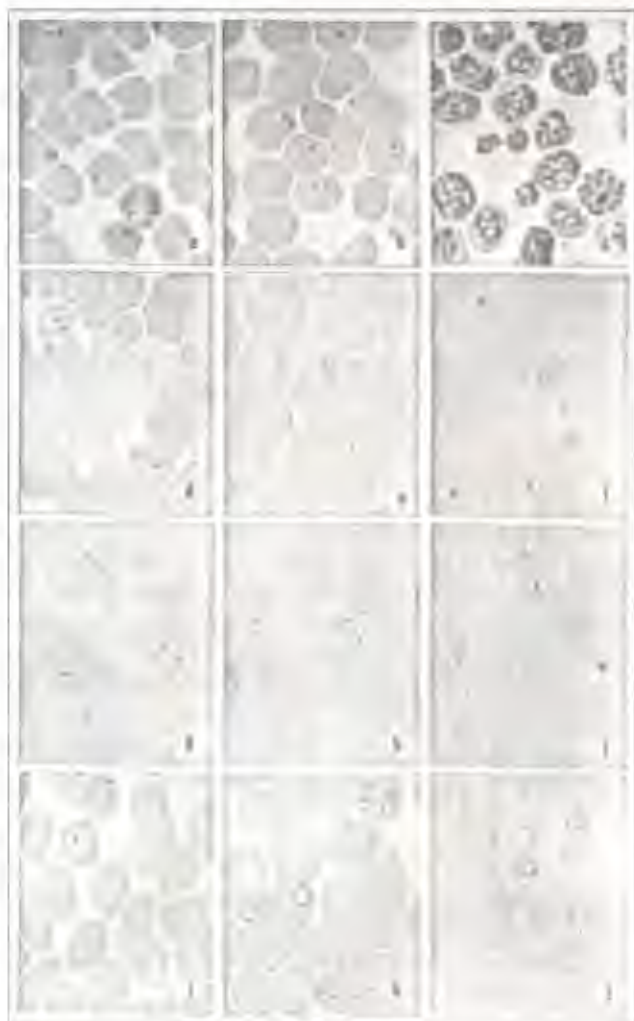


FIGURA 7. Microfotografías de eritrocitos y fantasmas de eritrocitos parasitados con *Plasmodium falciparum*. Coloración Giemsa ($\times 1000$).

- a) Cultivo asincrónico.
- b) Cultivo sincrónico.
- c) Esquizontes concentrados en gradiente isopícnico de Percoll.
- d) Invasión en fantasmas preparados a hematocrito de 50%.
- e) Invasión en fantasmas preparados a hematocrito de 20%.
- f) Invasión en fantasmas preparados a hematocrito de 15%.
- g) Invasión en fantasmas preparados al 15% suplementados con ATP.
- h) Invasión en fantasmas preparados al 10% que atraparon citoplasma de eritrocitos humanos.
- i) Invasión en fantasmas preparados al 5% que atraparon citoplasma de eritrocitos de pollo, suplementado con ATP.
- j) Invasión en eritrocitos control.
- k) Desarrollo de los parásitos en eritrocitos control.
- l) Desarrollo de los parásitos en fantasmas preparados al 5% que atraparon citoplasma de eritrocitos humanos.

Las diferencias en cuanto a proteína total en los fantasmas y a porcentaje de intercambio, pueden deberse a las variaciones de viscosidad y presión osmótica producidas por las distintas concentraciones de proteína en el medio, las cuales estarían limitando al tamaño de los poros en la membrana, el tiempo que permanecerían abiertos y la velocidad de difusión de las proteínas en ambas direcciones. De otro lado se observa que la preparación de hematocrito 10% conserva una cantidad de

proteína propia que no permitiría por sí sola la invasión; lo mismo la preparación de hematocrito 5% que conserva una cantidad de proteína propia por debajo de los fantasmas preparados a un hematocrito de 15%. Las dos preparaciones han atrapado una cantidad de proteína equivalente a la de fantasmas que pueden soportar la invasión. (figura 4).

Los fantasmas que atraparon proteína proveniente de eritrocitos humanos presentaron invasión y mostraron capacidad para sintetizar ATP; en todos los experimentos realizados se observó que los fantasmas preparados a un hematocrito de 5% presentaron mayores índices de invasión, lo cual coincide con el hecho de que estas células conservaron una mayor proporción de su proteína original. Esto parece indicar que el factor responsable de la susceptibilidad a la invasión es retenido bien sea en mayor proporción o en mejor estado en estos fantasmas y que éste se encuentra en el lisado, ya que se restituye la susceptibilidad.

Los fantasmas que atraparon proteína del citoplasma de eritrocitos de pollo no soportan la invasión; las proteínas propias de los eritrocitos de pollo no permiten a los fantasmas la síntesis ni el mantenimiento de ATP, el cual como ya se mostró es indispensable para que la invasión tenga lugar. Teniendo en cuenta que los fantasmas que atraparon proteína de eritrocitos de pollo no fueron invadidos y sin embargo contenían una cantidad de proteínas similar a la de las preparaciones que atraparon proteínas de eritrocitos humanos, se puede afirmar que el contenido de proteína dentro de los fantasmas, por sí solo, no determina la susceptibilidad a la invasión.

A esta altura no es posible dilucidar entre dos posibilidades que se presentan: que existen componentes citoplasmáticos en el eritrocito humano que determinan la especificidad de especie, o que es simplemente la deficiencia de ATP lo que impide a los fantasmas soportar la invasión. Sin embargo, la suplementación del lisado de eritrocitos de pollo con ATP o con sistema regenerador de ATP, hace posible que los fantasmas recuperen parcialmente la susceptibilidad a la invasión. Los efectos de ATP o del sistema regenerador junto con las proteínas de eritrocitos de pollo no son equivalentes a los observados en los fantasmas a los que se adicionó sólo ATP o el sistema regenerador, esto se debe a que de todas formas los fantasmas que contenían proteínas de eritrocitos de pollo no recuperan la capacidad para sintetizar ATP. En un ensayo posterior se comprobó que las proteínas de lisado de eritrocitos de pollo poseen una actividad de hidrólisis de ATP muy marcada, la cual competiría con la actividad sintetizadora que pudieran haber conservado los fantasmas.

De acuerdo con lo anterior, se confirma el requerimiento de ATP y queda descartada la posibilidad de la existencia de un factor exclusivo del citoplasma del eritrocito humano como determinante de la especificidad de la interacción entre las células rojas y el *Plasmodium falciparum*.

El sistema descrito en este trabajo, podrá ser utilizado como ensayo para la determinación del efecto que tienen sobre la invasión proteínas purificadas del citoplasma de eritrocito. Posiblemente

por este método se puede caracterizar los "factores críticos" para la invasión, y mejorar así el estado del conocimiento sobre un fenómeno biológico de primera importancia.

BIBLIOGRAFIA

- 1 WERNSDORFER W. H. En "Malaria", Vol. 1. Ed. Julius P. Kreier (1980) pp. 1-93. Academic Press. N. Y.
- 2 Tropical Disease Research "TDR". Seventh programme report. (1985). World Health Organization Geneva.
- 3 HERMENTIN P. & ENDERS B., (1984). Erythrocyte Invasion by Malaria (*Plasmodium falciparum*). Merozoites: Recent advances in the evaluation of receptor sites. Behring Inst. Mitt. 76: 121-141.
- 4 DVORAK, J. A., MILLER, L. H., WHITEHOUSE, E. C. & SHIROISHI, T. (1985). Invasion of erythrocytes by malaria merozoites. Science 187: 748-750.
- 5 AIKAWA M., MILLER L. H., JOHNSON J., & RAB-BEGE, J. (1978). Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. J. Cell. Biol. 77: 72-82.
- 6 PERKINS, M. (1981). Inhibitory effects of erythrocyte membrane proteins on the in vitro invasion of the human malaria parasite (*Plasmodium falciparum*) into its host cell. J. Cell. Biol. 90: 563-567.
- 7 DEANS, J. E. & LEE, L. T. (1981). Competitive inhibition by soluble erythrocyte glycoproteins of penetration by *Plasmodium falciparum*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 30: 1164-1167.
- 8 PASVOL, G., WAINSCOAT, J. S. & WEATHERALL, D. J. (1982) Erythrocytes deficient in glycophorin resist invasion by the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. Nature 297: 64-66.
- 9 PASVOL, G., JUNGERY, M., WEATHERALL, D. J., PARSONS, J. F., ANSTEE D. J. & JANNER, M. A. (1982). Glycophorin as a possible receptor for *Plasmodium falciparum*. Lancet 2: 947-950.
- 10 HOWARD, R. J., HAYNS, J. D., MCGINNISS, M. H. & MILLER, L. H. (1982) Studies on the role of red blood cell glycoproteins as receptors for invasion by *Plasmodium falciparum* merozoite. Mol. Biochem. Parasitol. 6: 303-315.
- 11 FACER, C. A. (1983). Erythrocyte sialoglycoproteins and *Plasmodium falciparum* invasion. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 77: 524-528.
- 12 OKOYE, V. C. & BENNETT, V. (1985). *Plasmodium falciparum* malaria: Band 3 as a possible receptor during invasion of human erythrocytes. Science 227: 169-171.
- 13 FRIEDMAN M. J., FUKUDA, M. & LANE, R. A. (1985). Evidence for a malaria parasite interaction site on the major transmembrane protein of the human erythrocyte. Science 228: 75-77.
- 14 IHLER, G. M., GLEW, R. H. & SCHNURE, F. W. (1973) Enzyme loading of erythrocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70: 2663-2666.
- 15 WASSERMAN, M., ZAKAI, N., LOYTER, A. & KULKA, R. G. (1976). A quantitative study of ultramicroinjection of macromolecules into animal cells. Cell 7: 551-556.
- 16 ESPINAL, C., MORENO, E., GUERRA, P., & DE LA VEGA, P. (1982). Aislamiento y caracterización de cepas colombianas de *Plasmodium falciparum*. Biomédica. 2: 118-128.
- 17 TRAGER, W. & JENSEN, J. B. (1976). Human malaria parasites in continuous culture. Science 193: 673-675.
- 18 LAMBROS, L. & VANDERBERG, J. P. (1979) Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. J. Parasitol 65: 418-420.
- 19 RIVADENEIRA, E.; WASSERMAN, M. & ESPINAL C. (1983) Separation and concentration of schizonts of *Plasmodium falciparum* by percoll gradients. J. Parasitol 30: 367-370.
- 20 STANLEY, P. E.; & WILLIAMS, S. G. (1969) Use of the liquid scintillation spectrometer for determining ATP by the luciferase enzyme. Anal. Biochem 29: 381-392.
- 21 BOLTON, A. E. (1977) Radioiodination techniques Rev. 18 Amersham Int. Plc. Amersham, U. K.
- 22 OLSON, J. A. & KILEJIAN, A. (1982). Involvement of spectrin and ATP in infection of resealed erythrocyte ghosts by the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. J. Cell. Biol. 95: 757-762.
- 23 DLUZEWSKI, A. R.; RANGACHARI, K.; WILSON, R. J. M. & GRATZER, W. B. (1983) A cytoplasmic requirement of red cells for invasion by malarial parasites. Mol. Biochem. Parasitol. 9: 145-160.
- 24 DLUZEWSKI, A. R.; RANGACHARI, K.; WILSON, R. J. M. & GRATZER, W. B. (1983) Properties of red cell ghosts preparations susceptible to invasion by malaria parasites. Parasitol. 87: 429-438.
- 25 DLUZEWSKI, A. R.; RANGACHARI, K.; WILSON, R. J. M. & GRATZER, W. B. (1982) The effect of ATP on the entry of malaria parasites into resealed ghosts of human erythrocytes. J. Protozool. 29: 636.
- 26 SCHINDLER, M.; KOPPEL, D. E. & SHEETZ, M. P. (1980) Modulation of membrane protein lateral mobility by polyphosphates and polyamines. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 1457-1461.
- 27 DLUZEWSKI, A. R.; RANGACHARI, K.; WILSON, R. J. M. & GRATZER, W. B. (1985) Relation of red cell membrane properties to invasion by *Plasmodium falciparum*. Parasitology 91: 273-280.
- 28 CHAIMANEE, P. & YUTHAVONG, Y. (1979). Phosphorylation of membrane proteins from *Plasmodium berghei* - infected red cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 87: 953-959.