

RESPUESTA INMUNITARIA CONTRA ANTÍGENOS DEFINIDOS DE LA PROTEÍNA RESA DE *Plasmodium falciparum* EN INDIVIDUOS INFECTADOS EN EL SURESTE DE VENEZUELA

INMUNE RESPONSE AGAINST THE ANTIGEN DEFINED RESA PROTEIN OF *Plasmodium falciparum* IN INFECTED INDIVIDUALS IN SOUTHEASTERN VENEZUELA

Hilda A Pérez¹, Carmen Bracho¹, Mercedes de la Rosa¹, Lizet García¹, José Domingo Medina²,
Maribel Navarro² y Jaime Torres³

¹Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Centro de Microbiología y Biología Celular, Hilda A Pérez, IVIC, Apdo 20632, Caracas 1020-A, Venezuela, e-mail: hperez@ivic.ve, ²Centro de Química y ³Universidad Central de Venezuela, Instituto de Medicina Tropical, Caracas, Venezuela

Este artículo fue invitado por la Profesora Leidi Herrera para conformar el número 2 del Vol. 26 de ABV dedicado al Dr. Servio Urdaneta, Profesor de Parasitología de la Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

RESUMEN

A la periferia de los eritrocitos infectados con los anillos (trofozoitos) de *Plasmodium falciparum* se asocia un prominente antígeno parasitario (RESA), una proteína de 155 kDa (Pf155) procedente de los gránulos densos de los merozoitos. Según investigaciones realizadas en regiones palúdicas de África, los anticuerpos contra RESA intervienen en la reducción de la parasitemia y de la morbilidad. Por lo tanto, se ha promovido la inclusión de RESA en una vacuna contra los estadios eritrocíticos de *P. falciparum*. Investigamos los anticuerpos IgG a RESA en las muestras plasmáticas de dos cohortes, A y CI, de adultos infectados con *P. falciparum* en el sur-este de Venezuela. La cohorte A, individuos clínicamente agudos, mineros de tránsito en las minas auríferas del estado Bolívar y la CI, Amerindios residentes en zonas de alta transmisión del estado Amazonas, asintomáticos, mas portadores de infecciones sub-microscópicas (cripticas???) (subpatentes???) identificadas por diagnóstico molecular. La pesquisa de anticuerpos fue con la prueba de ELISA y los péptidos (EENV)₆, (EENVEHDA)₂, y DDEHVVEPTVA emuladores de los tres epítopos B principales de RESA, que referiremos como RESA4, RESA8 y RESA11, respectivamente. Adicionalmente, se incluyó la valoración de anticuerpos a los estadios asexuales eritrocíticos de *P. falciparum* mediante inmunofluorescencia indirecta. La totalidad de los CI y 94% de A, mostró anticuerpos a los estadios eritrocíticos del parásito. Hubo, sin embargo, variación considerable en la respuesta a los péptidos RESA. En la cohorte CI predominó la prevalencia de los anticuerpos a RESA4, mientras que en la cohorte A, la supremacía fue para RESA11. Los resultados sugieren que RESA11 es muy inmunogénico y provoca una seroconversión rápida en los individuos que recién se exponen a la malaria por *falciparum*, mientras que los anticuerpos a RESA4, posiblemente interesan a la inmunidad protectora mediada por RESA, pues aquellos con alta prevalencia de anticuerpos a RESA4 fueron los menos proclives a mostrarse con una parasitemia sintomática.

ABSTRACT

Merozoites of *Plasmodium falciparum* release the ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA) inside the red cell on entry. Antibodies against repeat-sequences of RESA have been shown to correlate with reduced parasitaemia and clinical immunity in several African malaria areas. Therefore, RESA has been considered for inclusion in a vaccine against the blood stages of *P. falciparum*. Nevertheless, few studies on immune responses to RESA have been made in Latin American countries with *falciparum* transmission. The IgG antibody response to synthetic peptides reproducing the 3 major B-cell epitopes of RESA (EENV)₆, (EENVEHDA)₂, and DDEHVVEPTVA, RESA4, 8 and 11 respectively, was assayed in sera from *P. falciparum* infected adult subjects of different clinical status. Donors were clinically acute (A) individuals with *P. falciparum* malaria and clinically immune (CI) Amerindians. The former were miners visiting jungle areas of Bolívar State. The CI Amerindians were long-term residents of high malaria transmission areas in the Venezuelan Amazon, showing asymptomatic parasitaemias undetectable by conventional microscopy but identified by molecular diagnosis. Prevalence of antibodies against the asexual blood stages of *P. falciparum* as determined by indirect immunofluorescence was 100, 94% in the CI and A groups, respectively. However, there was considerable variation in the responses to RESA peptides between the groups. Prevalence of antibodies against RESA4 was very high in the CI group and relatively low in the A group for which highest prevalence was related to RESA11. It seems therefore that RESA11 is very immunogenic and that individuals exposed to *falciparum* malaria rapidly develop antibodies to this RESA epitope. Results also suggest that those having a high prevalence of the antibody response to RESA4 were less likely to bear a symptomatic parasitaemia at the time of the survey.

Palabras clave: paludismo, *P. falciparum*, Venezuela, anticuerpos, RESA
Keywords: malaria, *P. falciparum*, Venezuela, antibodies, RESA

INTRODUCCIÓN

A la periferia de los eritrocitos infectados con los anillos de *Plasmodium falciparum* se asocia un prominente antígeno parasitario (Ring-infected Erythrocyte Surface Antigen, RESA, por sus siglas en inglés), identificado como una proteína de 155 kDa (Pf155) procedente de los gránulos densos de los merozoitos (Brown y col., 1985; Aikawa y col., 1990; Culvenor y col., 1991). Tras la invasión del eritrocito, RESA es secretada en la vacuola parasitofórica y transportada hasta la membrana plasmática del eritrocito, donde una vez fosforilada, se une a la espectrina (Foley y col., 1990; 1991). La interacción entre RESA y espectrina, presumiblemente, transforma al eritrocito infectado con los anillos inmaduros, en una célula más resistente al estrés térmico producido por las crisis febriles, menos deformable, particularmente bajo las temperaturas febriles, y menos vulnerable a la invasión de nuevos merozoitos (Silva y col., 2005; Mills y col., 2007; Pei y col., 2007).

El análisis de la estructura de RESA muestra dos regiones conservadas, conformadas por dos bloques extensos de secuencias repetidas de aminoácidos, uno en el extremo N- que comprende cinco repeticiones del octámero EENVEHDA y cerca de 35 del tetrámero EENV y hacia el extremo C-, siete repeticiones de la secuencia DDEHVEEPTVA (Favaloro y col., 1986). RESA ha sido objeto de numerosas prospecciones en relación a su importancia en la inmunidad contra la malaria por *P. falciparum* (Berzins y col., 1986, 1991; Collins y col., 1986; Chizzolini y col., 1989; Riley y col., 1991), sucintamente: en las zonas de alta transmisión se ha observado reciprocidad entre la inmunidad clínica a *P. falciparum* y el tenor de anticuerpos a RESA, especialmente contra la secuencia EENV; los anticuerpos específicos de RESA bloquean, *in vitro*, la incursión del merozoito en el eritrocito y confieren inmunidad pasiva al desafío con formas sanguíneas; la vacunación experimental con recombinantes de RESA surte efectos protectivos. Resultados, que en conjunto alentaron su postulación como vacuna contra los estadios eritrocíticos de *P. falciparum*. La vacunación de voluntarios humanos demostró las cualidades inmunogénicas de RESA (Saul y col., 1999) y las pruebas clínicas de vacunación antipalúdica con una formulación que combina RESA y otras proteínas periféricas del merozoito (MSP/RESA), indican efectos protectivos imputables a la reducción de la parasitemia (Genton y col., 2003; Graves y Gelband, 2006).

La mayoría de la investigación pertinente a la inmunoepidemiología de RESA se ha efectuado en

regiones de África con alta transmisión de *P. falciparum* y son pocos los estudios acometidos en otras regiones del mundo afectadas por la enfermedad. En este trabajo investigamos la respuesta de anticuerpos a las secuencias de RESA (EENV)₆, (EENVEHDA)₂ y DDEHVEEPTVA en adultos expuestos a la transmisión de malaria por *P. falciparum* en el sur-este de Venezuela. Unos, Amerindios nativos del estado Amazonas y otros, sujetos de tránsito en las regiones mineras del estado Bolívar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diagnóstico de malaria. Se realizaron dos pruebas de diagnóstico, la convencional basada en el examen microscópico de la gota gruesa (GG) y extendido de sangre teñidos con colorante de Giemsa, y una prueba molecular por PCR basada en la pesquisa de secuencias específicas de género y especie presentes en los genes ribosomales de los parásitos *Plasmodium* (Snounou y col., 1993; Postigo y col., 1998). El diagnóstico por microscopía estuvo a cargo del personal del Ministerio de Salud y todos los individuos con un diagnóstico de malaria recibieron tratamiento conforme a las pautas nacionales para el tratamiento antipalúdico.

Muestras de estudio. Se obtuvieron muestras de plasma de 57 adultos masculinos de 20 a 45 años de edad; 37 criollos y 20 Amerindios. Los criollos fueron sujetos con malaria por *P. falciparum* diagnosticados y atendidos en el Servicio de Endemias Rurales, Zona X, del Ministerio de Salud en la ciudad de Caracas. Ellos tenían su residencia permanente en la ciudad de Caracas, pero habían contraído malaria tras visitar por periodos de 6-18 meses, algunas zonas selváticas del estado Bolívar, en el sur-este de Venezuela, mientras se ocupaban de la minería aurífera. Los Amerindios pertenecían a la etnia Yanomami y fueron examinados durante una faena de pesquisa y control de la enfermedad a cargo de personal del Instituto de Medicina Tropical y del Ministerio de Salud, en el Alto Orinoco, estado Amazonas. En todos los casos, y previo consentimiento informado, se colectaron tres a cinco mililitros de sangre venosa en tubos vacutainers con EDTA, el plasma fue separado por centrifugación y guardado a -70C hasta su uso.

Ensayo de inmunofluorescencia. Se utilizó un ensayo convencional de inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre monocapas de eritrocitos humanos infectados con *P. falciparum* (Bracho y Pérez, 1992). Las células parasitadas provenientes de cultivos asincrónicos de la cepa FCB2 de *P. falciparum*, fueron dispensadas en los pozuelos de láminas porta objeto para microscopía de fluorescencia (Erie Scientific, Estados Unidos). Las

células fueron desecadas al aire y fijadas durante veinte minutos con acetona fría. Posteriormente se dispensó en los pozuelos 20 μ L de la dilución de la muestra a ensayar o correspondiente a los controles negativo y positivo de referencia. El primero un "pool" negativo obtenido a partir de 15 sueros de sujetos sin antecedentes de paludismo y negativos a la prueba de IFI para anticuerpos antipalúdicos y el positivo, un suero hiper-inmune a *P. falciparum*. La dilución de reconocimiento fue 1:40 y el anticuerpo secundario IgG de cabra específica de IgG, IgM e IgA humanas (anti-IgGAM) marcada con fluoresceína (Cappel, Estados Unidos). Los períodos de incubación fueron de 30 minutos a 37°C, los lavados con tampón fosfato salina 0,15 M, pH 7,3 (PBS) suplementado con 0,2% gelatina y la solución de montaje glicerol al 70% en PBS. Las muestras fueron examinadas bajo microscopia de epifluorescencia (Microscopio Zeiss, modelo Axioskop 2 plus) y la intensidad de fluorescencia comparada con los patrones de referencia. Todas las muestras positivas a la dilución 1:40 fueron diluidas seriadamente (factor 4) para establecer el título correspondiente (dilución máxima con una lectura positiva franca).

Ensayo de ELISA. Los péptidos (EENV)₆, (EENVEHDA)₂ y DDEHVVEPTVA, que referiremos de ahora en adelante como RESA4, RESA8 y RESA11, respectivamente, fueron sintetizados en fase sólida con química F-moc y purificados por HPLC (IVIC, Centro de Química). La respuesta de anticuerpos a los péptidos fue medida mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), sobre placas Maxisorp (Nunc, Estados Unidos).

Previamente se establecieron las condiciones óptimas de absorción de los péptidos, dilución de los sueros y tiempos de reacción. A cada pozuelo se añadieron 100 L de la solución del péptido correspondiente (50 g/ml) diluido en tampón de carbonato de sodio pH 9,6 durante 18 horas, a 4°C. El bloqueo fue con PBS suplementado con leche descremada al 5% (p/v) y 0,01% Tween 20 (PBS-L-T), durante 1 hora a temperatura ambiente. La solución de lavado fue PBS-T. Las muestras de suero fueron diluidas a 1:100 en PBS-L-T y enfrentadas al péptido correspondiente. El anticuerpo secundario fue una preparación comercial de IgG caprina específica de IgG humana, conjugada a peroxidasa (Amersham/Bioscience, GE Healthcare-Bioscience Ltd., Estados Unidos) y el sustrato [ácido cítrico 0,1M; fosfato disódico 0,2M; peróxido de hidrógeno al 0,01% y azinodietilbenzotiazol-sulfonato (ABTS)], (KPL, Estados Unidos).

Las lecturas de densidad óptica a 405nm (DO₄₀₅) procedieron con un espectrofotómetro para microplacas (Titertek Multiskan, Flow Laboratory, Reino Unido). Treinta muestras de plasma de donantes de la planta de derivados sanguíneos del IVIC (QUIMBIOTEC). Sujetos sin historia palúdica ni anticuerpos a los estadios eritrocíticos de *P. falciparum*, según la prueba de IFI, fueron utilizados para estimar el límite superior de negatividad o valor de referencia, enfrentándolos a cada péptido y determinando la DO₄₀₅ promedio de las 30 muestras negativas más tres desvíos estándar (media + 3 DE). Valores que fueron 0,27; 0,36 y 0,37 para RESA8, RESA11 y RESA4, respectivamente. Los resultados se expresan en función de la seroprevalencia (porcentaje de muestras con valores significativos) o el promedio de la DO₄₀₅ determinada para cada péptido. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante la prueba exacta de Fisher y la de *t* de Student.

RESULTADOS

Las muestras analizadas tuvieron su origen en personas adultas con marcadas diferencias en sus antecedentes epidemiológicos de exposición a la malaria. Los 37 mineros, fueron sujetos que contrajeron paludismo en la vida adulta, como visitantes de tránsito en zonas selváticas del estado Bolívar, sin inmunidad antipalúdica, clínicamente agudos (A) y con diagnóstico microscópico de infección solamente por *P. falciparum*, confirmado en la prueba de diagnóstico molecular. Sin embargo, según sus antecedentes de infección por *P. falciparum*, 24 de los A padecían malaria por primera vez (Agudos Primoinfectados, AP) y 13 contaban un promedio de tres (rango 2-8) episodios previos (Agudos Reinfectedos, AR) por *P. falciparum*. En tanto los 20 Amerindios Yanomami, eran inmunes clínicamente (IC) al paludismo. Residentes de una región con alta transmisión de malaria, asintomáticos y negativos al examen microscópico de la GG, aunque portadores de infecciones sub-microscópicas de *P. falciparum* detectadas mediante las pruebas de PCR.

A la pesquisa de anticuerpos contra los estadios eritrocíticos de *P. falciparum* por IFI, fueron reactivos 100% del grupo IC y 94% de los A. No obstante, la similitud de la prevalencia, la valoración de la concentración de anticuerpos demostró títulos significativamente superiores en los IC, 6.609 vs 1.470, Tabla 1.

De los A; 75,5; 46 y 35% se mostraba con anticuerpos a RESA11, 8 y 4, respectivamente; sólo una

minoría (16%) portaba anticuerpos a los tres péptidos.

La supremacía de RESA11 frente a los otros dos péptidos fue estadísticamente significativa (RESA11 vs RESA8, $p < 0,0166$), (RESA11 vs RESA4, $p < 0,0009$), Figura 1. Entre los IC, la seroprevalencia a los tres péptidos fue muy elevada, 60, 80 y 85% tenía anticuerpos a RESA11, 8 y 4, correspondientemente. Además, casi la mitad (45%) respondió a los tres péptidos, Figura 1.

La comparación de la seroprevalencia a RESA, entre los A y los IC, destacó en estos últimos valores significativamente superiores para los péptidos RESA4 ($p < 0,0001$) y RESA8 ($p < 0,023$). Así mismo, la disparidad en la seroconversión a los tres péptidos, 16% en los A y 45% en los IC, tuvo significación estadística, $p = 0,0279$.

En cuanto a los niveles de anticuerpos según los valores de la DO_{405} determinados para cada péptido, la tendencia observada tanto en los A como en los IC fue: RESA8 > RESA4, RESA11, aunque con significación estadística sólo para los IC, en los cuales la concentración plasmática de anticuerpos a RESA8 tuvo supremacía significativa sobre RESA11 ($p = 0,0002$) y RESA4 ($p = 0,0375$), Figura 2.

El análisis de la respuesta del grupo A contra los péptidos RESA según sus antecedentes de infección por *P. falciparum*, reveló que los AR comparativamente a los AP, mostraban ascenso marcado y significativo ($p < 0,0001$) de la prevalencia de anticuerpos a RESA4: 84,6% (11/13) en los AR y 8% (2/24) en los AP. Una tendencia similar se observó con RESA11, respondedor a este péptido fue 100% (13/13) de los AR y 62,5% (15/24) de los AP. Asimismo, la diferencia observada alcanzó la significación estadística $p < 0,001$. En cuanto a RESA8, la tasa de respondedores fue ligeramente menor entre los AR, aunque fuera de la significación estadística, Figura 3.

DISCUSIÓN

Los antecedentes palúdicos por *P. falciparum* marcaron las diferencias en la respuesta de anticuerpos a secuencias específicas de la proteína RESA de *P. falciparum*. Se evaluaron las muestras procedentes de sujetos de adultos en las que estuvieron representados individuos sin inmunidad, clínicamente agudos cuyo contacto con el parásito fue un evento extraordinario ocurrido en la adultez y otros con inmunidad clínica, adquirida tras largos años de exposición regular a la transmisión de *P. falciparum* en el Alto Orinoco; región donde privan condiciones epidemiológicas favorecedoras de la inmunidad antipalúdica (Marcano

y col., 2004; Magris y col., 2007). Anticuerpos IgG a RESA4, 8 y 11, se hallaron en las dos cohortes, pero con baja prevalencia, especialmente para los dos primeros, en los sujetos no inmunes y elevada en el grupo con inmunidad clínica. Resultados coincidentes con los reportados por Petersen y col., (1989) quienes señalaron una menor prevalencia a los tres péptidos RESA en sujetos agudos.

Entre los sujetos clínicamente inmunes destacó la respuesta a RESA4. Vale comentar que la cohorte con paludismo agudo por *falciparum*, incluyó 24 sujetos que padecían su primer episodio clínico y 13 con un promedio de tres reinfecciones por *falciparum* devenidas en los últimos 18 meses; la respuesta a RESA4, mostró un aumento significativo en los re infectados comparativamente a quienes tenían paludismo por primera vez. Datos que en conjunto sugieren la importancia de los anticuerpos a la secuencia EENV, en el desarrollo de la inmunidad protectora contra *P. falciparum* y conforman observaciones epidemiológicas efectuadas en varias regiones hiperendémicas de África, que subordinan el incremento de los anticuerpos a RESA4 al contacto prolongado con el parásito devenido con la edad (Deloron y col., 1987; Chizzoloni y col., 1989; Deloron y col., 1990; Petersen y col., 1990; Kamol-Ratanakul y col., 1992), anticuerpos que se relacionan con la reducción de la parasitemia y la inmunidad clínica propiciada por RESA (Astagneau y col., 1991; 1994a-1994b; Biswas y col., 1995). Se conoce además que los anticuerpos a RESA4 y RESA8, impiden a los merozoitos de *P. falciparum* invadir a los eritrocitos, *in vitro* (Wählín y col., 1999; Berzins y col., 1986).

En los individuos sin inmunidad que habían contraído malaria por *P. falciparum* durante la vida adulta, predominó la respuesta a RESA11, posiblemente porque es un epitopo inmunodominante de RESA. Se ha encontrado una correlación positiva entre un episodio reciente de malaria y los anticuerpos a RESA11 (Astagneau y col., 1991). Entre los individuos de varios grupos de edad residentes de una región africana con malaria estacional, Chumpitazi y col., (1991) encontraron aumento de los anticuerpos a RESA11 durante el periodo de transmisión, aunque solo en los niños, pues no hubo cambios en los adultos. Es de hacer notar que aunque RESA11 es al parecer muy inmunogénico (Chopra y col., 2000), tiene poco o ningún valor vacunal (Collins y col., 1991). Posiblemente, la respuesta a RESA11 es más bien un marcador de exposición a la transmisión.

La pesquisa de anticuerpos a péptidos sintéticos o recombinantes emuladores de antígenos relevantes a

la inmunidad antipalúdica, conforman una poderosa herramienta en la epidemiología del paludismo, todavía desaprovechada en los países con transmisión de la enfermedad. Por ejemplo la pesquisa de anticuerpos a RESA8 ha sido utilizada para denotar cambios en la transmisión de *P. falciparum* (Roy y col., 1995; 2000). Asimismo, el nivel de anticuerpos a RESA4 se encontró interesante para la predicción de la inmunidad protectora (Astagneau y col., 1995). Sin embargo, Malafronte y col., (1994) no encontraron variaciones estacionales significativas, en la respuesta de anticuerpos a los péptidos RESA en tres poblados de Brasil. Otros autores confirmaron la utilidad de la pesquisa de anticuerpos a los péptidos RESA, como indicadores de la eficacia de medidas de control basadas en el uso de mosquiteros impregnados con permetrina (Sutanto y col., 2003).

El presente estudio, es uno de los pocos que

sobre la seroepidemiología de RESA se ha realizado en países de la región Latinoamericana, con transmisión de *P. falciparum*; confirma la inmunogenicidad de epitopos de la proteína RESA de *P. falciparum* en individuos infectados naturalmente, proveniente de regiones selváticas del sur-este de Venezuela y aporta evidencia sobre la utilidad diagnóstica de los anticuerpos a secuencias específicas de RESA, en la vigilancia epidemiológica del paludismo por *P. falciparum*.

AGRADECIMIENTOS

El estudio recibió financiamiento de BID-CONICIT (BTS-80), FONACIT S1-2000000633 y de Científica Industrial de Venezuela (en el marco de los aportes LOCTI 2006). Se agradece el apoyo del Ministerio del Poder Popular para la Salud (Servicio de Endemias Rurales, Zona X, Caracas).

Tabla 1. Anticuerpos* a los estadios eritrocíticos de *P. falciparum* en individuos infectados en el sureste de Venezuela

Cohorte	MG(DEM)	Prevalencia (EE)
Agudos	1.470(5,8)	94 (4,0)
Inmunes clínicamente	6.609(2,82)	100

*Determinados por IFI, MG: media geométrica del título; DEM: desvío de la media; EE: error estándar

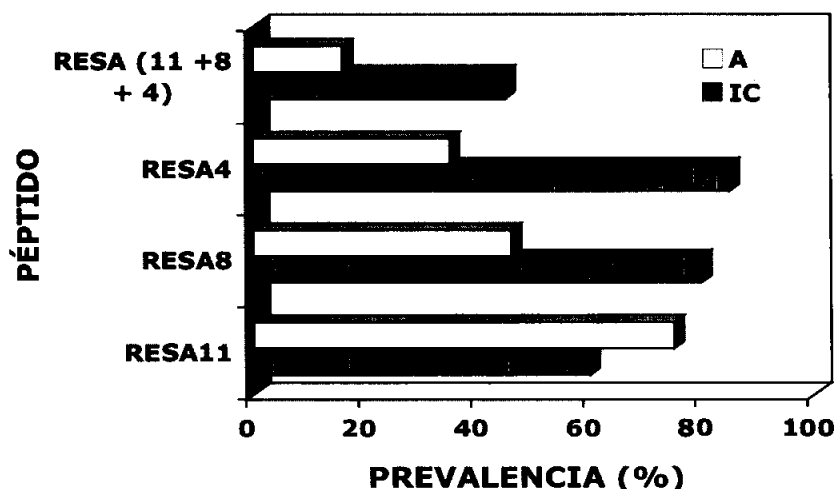


Figura 1. Prevalencia de anticuerpos a RESA en sujetos con diferentes grados de exposición a *P. falciparum*, infectados en el sureste de Venezuela. A, agudos e IC, inmunes clínicamente. Reactividad a los péptidos RESA11 RESA8 y RESA4

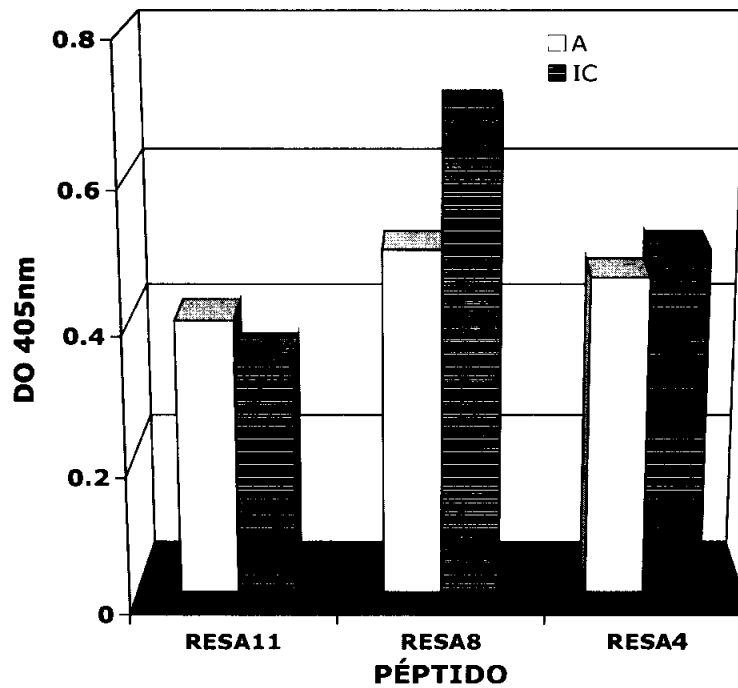


Figura 2. Niveles de anticuerpos a RESA en sujetos con diferentes grados de exposición a *P. falciparum*, infectados en el sureste de Venezuela. A, agudos e IC, inmunes clínicamente. El valor negativo de referencia (media + 3DEM) fue 0,36; 0,27 y 0,37 para RESA11, RESA8 y RESA4, respectivamente.

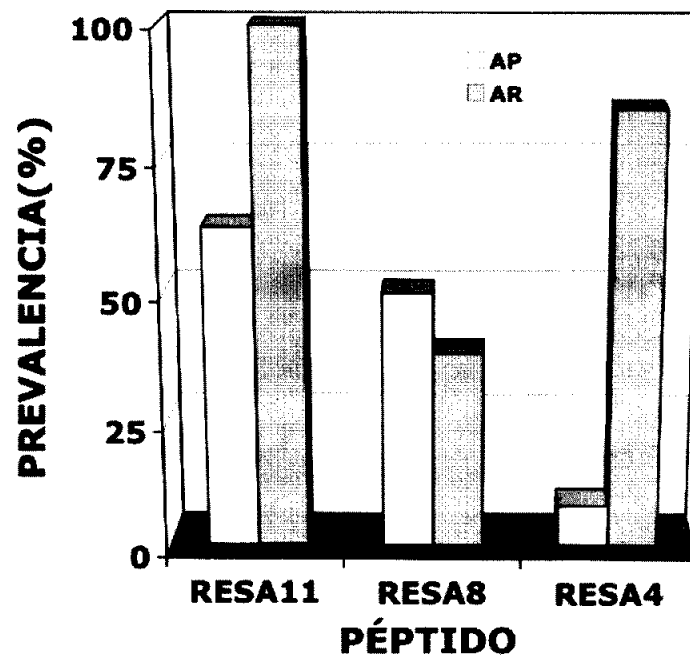


Figura 3. Prevalencia de anticuerpos a RESA en sujetos con malaria aguda por *P. falciparum* infectados en el sureste de Venezuela. AP, primoinfectados y AR, reinfectados con un promedio de tres ataques previos de malaria por *P. falciparum*.

LITERATURA CITADA

- Aikawa, M., M. Torii, A. Sjolander, K. Berzins, P. Perlmann y L.H. Millar. 1990. Pf155/RESA antigen is localized in dense granules of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Exp. Parasitol.*, 71:326-329.
- Astagneau, P., J.P. Lepers, C. Chougnet, C. Gaudebout, M.D. Andriamangantiana -Rason, B. Larouze y P. Deloron. 1991. Assessment of the protective value of antibodies to the *Plasmodium falciparum* ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA): an epidemiologic study in Madagascar. *Am. J. Epidemiol.*, 133:177-184.
- Astagneau, P., C. Chougnet, J.P. Lepers, M. Danielle, M.D. Andriamangantiana- Rason y P. Deloron. 1994a. Antibodies to the 4-mer repeat of the ring-infected erythrocyte surface antigen (Pf155/RESA) protect against *Plasmodium falciparum* malaria. *Int. J. Epidemiol.*, 23:169-175.
- Astagneau, P., R.W. Steketee, J.J. Wirima, C.O. Khoromana y P. Mollet. 1994b. Antibodies to ring-infected erythrocyte surface antigen (Pf155/RESA) protect against *P. falciparum* parasitemia in highly exposed multigravidas women in Malawi. *Acta Trop.*, 57:317-325.
- Astagneau, P., J.M. Roberts, R.W. Steketee, J.J. Wirima, J.P. Lepers y P. Deloron. 1995. Antibodies to a *Plasmodium falciparum* blood-stage antigen as a tool for predicting the protection levels of two malaria-exposed populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 53:23-28.
- Berzins, K., H. Perlmann, B. Wählin, J. Carlsson, M. Wahlgren, R. Udomsangpetch, A. Bjorkman, M.E. Patarroyo y P. Perlmann. 1986. Rabbit and human antibodies to repeated aminoacid sequence of a *Plasmodium falciparum* antigen Pf155, react with the native protein and inhibit merozoite invasion. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 83: 1065-1069.
- Berzins, K., H. Perlmann, B. Wählin, H.P. Ekre, B. Høgh, E. Petersen, B. Wellde, M. Schoenbecher, J. Williams, J. Chulay y P. Perlmann. 1991. Passive immunization of Aotus monkeys with human antibodies to the *Plasmodium falciparum* antigen Pf155/RESA. *Infect. Immun.*, 59:1500-1506.
- Biswas, S., D.N. Rao, A. Roy, R.P. Yadav, S.K. Ghosh y L. Kabilan. 1995. Humoral immune responses to the *Plasmodium falciparum* antigen Pf155 RESA in adults with differential clinical conditions from an Indian zone where malaria is endemic. Southeast Asian. *J. Trop. Med. Public. Health*, 26: 219-227.
- Bracho, C. y H. Pérez. 1992. An immunocytochemical test for the diagnosis of antibodies to *Plasmodium vivax*. *Parasite Immunol.*, 14: 481-487.
- Brown, G. V., J.G. Culvenor, P.E. Crewther, A.E. Bianco, R.L. Coppel, R.B. Saint, H.D. Stahl, D.J. Kemp y R. F. Anders. 1985. Localization of the ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA) of *Plasmodium falciparum* in merozoites and ring-infected erythrocytes. *J. Exp. Med.*, 162: 774-779.
- Chizzolini, C., E. Delaporte, M.H. Kaufmann, J.P. Akue, A.S. Verdini, A. Pessi y G. Del Giudice. 1989. Age-related prevalence of antibody response against three different, defined *Plasmodium falciparum* antigens in children from the Haut-Ogooue province in Gabon. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 83: 147-151.
- Chopra, N., S. Biswas, B. Thomas, L. Sabhnan y D.N. Rao. 2000. Inducing protective antibodies against ring-infected erythrocyte surface peptide antigen of *Plasmodium falciparum* using immunostimulant complex (ISCOMs) delivery. *Med. Microbial. Immunol.*, 189: 75-83.
- Chumpitazi, B.F., P. Deloron, F. Peyron, C. Boudin, S. Picot y P. Ambroise-Thomas. 1991. Relationships between clinical protection and antibodies to *Plasmodium falciparum* RESA (ring-infected erythrocyte surface antigen) peptides. *Int. J. Parasitol.*, 21: 271-274.
- Collins, W.E., R.F. Anders, M. Pappaioanou, G.H. Campbell, G.V. Brown, D.J. Kemp, R.L. Coppel, J.C. Skinner, P.M. Andrysiak, J.M. Favaloro, L.M. Corcoran, J.R. Broderick, G.F. Mitchell y C.C. Campbell. 1986. Immunization of Aotus monkeys with recombinant proteins of an erythrocyte surface antigen of *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 323: 259-262.
- Collins, W.E., R.F. Anders, T.K. Ruebush, D.J. Kemp, G.C. Woodrow, G.H. Campbell, G.V. Brown, D.O. Irving, N. Goss, V.K. Filipowski, R.L. Copel, J.R.

- Broderson, L.M. Thomas, D. Pye D, J.C. Skinner, C. Wilso, P.S. Stanfill y P.M. Procell. 1991. Immunization of owl monkeys with the ring-infected erythrocyte surface antigen of *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 44: 34-41.
- Culvenor, J. G., K.P. Day y R. F. Ander. 1991. *Plasmodium falciparum* ring-infected erythrocyte surface antigen is released from merozoite dense granules after erythrocyte invasion. *Infect. Immun.*, 59: 1183-1187.
- Deloron, P., J. Le Bras, J. Savel y J.P. Coulaud. 1987. Antibodies to the PF155 antigen of *Plasmodium falciparum*: measurement by cell-ELISA and correlation with expected immune protection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 37: 22-26.
- Deloron, P. y M. Cot. 1990. Antibodies to the ring-infected erythrocyte surface antigen and the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* in a rural community from Burkina Faso. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 84: 191-195.
- Favaloro, J.M., R.L. Coppel, L.M. Corcoran, S.J. Foote, G.V. Brown, R.F. Anders y D.J. Kemp. 1986. Structure of the RESA gene of *Plasmodium falciparum*. *Nucleic Acids Res.*, 14: 8265-8277.
- Foley, M., Murray L.J. y R. F. Anders. 1990. The ring-infected erythrocyte surface antigen protein of *Plasmodium falciparum* is phosphorylated upon association with the host cell membrane. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 38: 69-75.
- Foley, M., L. Tilley, W.H. Sawyer y R.F. Anders. 1991. The ring-infected erythrocyte surface antigen of *Plasmodium falciparum* associates with spectrin in the erythrocyte membrane. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 46: 137-147.
- Genton, B., F. Al-Yaman, I. Betuela, F.R. Anders, A. Saul, K. Baea, M. Mellombo, J. Taraika, G.V. Brown, D. Pye D, D.O. Irving, I. Felger, H.P. Beck, T.A. Smith y M.P. Alpers. 2003. Safety and immunogenicity of a three-component blood-stage malaria vaccine (MSP1, MSP2, RESA) against *Plasmodium falciparum* in Papua New Guinean children. *Vaccine*, 22: 3041.
- Graves, P. y H. Gelband. 2006. Vaccines for preventing malaria (blood stage). *Cochrane Database Syst. Rev.*, 4: Art. No.: CD006199.
- Kamol-Ratanakul, P., N. Chirakalwasarn, S. Lertmaharit, B. Dhanamun, T. Seublinwong, R. Udomsangpetch, H. Perlmann, P. Perlmann y S. Thaithong 1992. Seroepidemiologic studies of humoral immune response to the *Plasmodium falciparum* antigens in Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 47: 554-561.
- Magris, M., Y. Rubio-Palis, C. Menares y L. Villegas. 2007. Vector bionomics and malaria transmission in the Upper Orinoco River, Southern Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 102:303-311.
- Malafronte, R.S., J.L. Valdivia, C.R. Nakaie y J.K. Kloetzel. 1994. Seasonal variation of anti-RESA/Pf155 *Plasmodium falciparum* antibodies in three localities from the state of Amapa, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 36: 237-243.
- Marcano, T.J., A. Morgano A, C.E. Tosta y J. Rodrigues Coura. 2004. Cross-sectional study defines difference in malaria morbidity in two Yanomami communities on Amazonian boundary between Brazil and Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 99: 369-376.
- Mills, J.P., M. Diez-Silva, D.J. Quinn, M. Dao, M.J. Lang, K.S. Tan, C.T. Lim, G. Milon, P.H. David, O. Mercereau-Pujalon, S. Bonnefoy y S. Zurres. 2007. Effect of plasmodial RESA protein on deformability of human red blood cell harboring *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 104: 9213-9217.
- Pei, X., X. Guo X, R. Coppel, S. Bhattacharjee, K. Haldar, W. Gratzer, N. Mohandas y X. An. 2007. The ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA) of *Plasmodium falciparum* stabilizes spectrin tetramers and suppresses further invasion. *Blood*, 110: 1036-1042.
- Petersen, E., B. Hogh, H. Perlmann, L. Kabilan, M. Troye-Blomberg, N.T. Marbiah, A.P. Hanson, A. Bjorkman y P. Perlmann. 1989. An epidemiological study of humoral and cell-mediated immune response to the *Plasmodium falciparum* antigen PF155/RESA in adult Liberians. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 41: 386-394.
- Petersen, E., B. Hogh, N.T. Marbiah, H. Perlmann, M. Willcox, E. Dolopaie, A.P. Hanson, A. Bjorkman y P. Perlmann. 1990. A longitudinal study of antibodies to the *Plasmodium falciparum* antigen Pf155/RESA and immunity to malaria infection in adult Liberians. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 84: 339-345.

- Postigo, M., A. Mendoza-León y H.A. Pérez. 1998. Malaria diagnosis by the polymerase chain reaction: a field study in south-eastern Venezuela. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 92: 509-511.
- Riley, E.M., S.J. Allen, M. Troye-Blomberg, S. Bennett, H. Perlmann, G. Andersson, L. Smedman, P. Perlmann y B.M. Greenwood. 1991. Association between immune recognition of the malaria vaccine candidate antigen Pf155/RESA and resistance to clinical disease: a prospective study in a malaria-endemic region of West Africa. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 85: 436-443.
- Roy, A., S. Biswas S, L. Kabilan y V.P. Sharma. 1995. Application of simple peptide ELISA for stratification of malaria endemicity. *Indian J. Malariol.*, 32: 164-173.
- Roy, A., P. Tyagi y S. Biswas. 2000. Serological investigation of malaria outbreak in Thar desert of Rajasthan. *J. Común. Dis.*, 32: 123-128.
- Saul, A., G. Lawrence, A. Smillie, C.M. Rzepczyk, C. Reed, D. Taylor, K. Anderson, A. Stowers, R. Kemp, A. Allworth, R.F. Anders, G.V. Brown, D. Pye, P. Schoofs, D.O. Irving, S.L. Dyer, G.C. Woodrow, W.R. Riggs, R. Reber y D. Sturchler. 1999. Human phase I vaccine trials of 3 recombinant asexual stage malaria antigens with Montanide ISA720 adjuvant. *Vaccine*, 17: 3145-3159.
- Silva, M.D., B.M. Cooke, M. Guillotte, D.W. Buckingham, J.P. Sauzet, C. Le Scanf, H. Contaminh, P. David, O. Mercereau-Puijalon y S. Bonnefoy. 2005. A role for the *Plasmodium falciparum* RESA protein in resistance against heat shock demonstrated using gene disruption. *Mol. Microbiol.*, 56: 990-1009.
- Snounou, G., S. Viriyakosol, W. Jarra, S. Thaihong y K.N. Brown. 1993. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of high prevalence of mixed infections. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 58: 283-292.
- Sutanto, I., W. Pribadi, A.L. Richards, Purnomo, H.J. Freisleben, S. Atmoesoedjono, R. Bandi y P. Deloron. 2003. Efficacy of permethrin-impregnated bed nets on malaria control in a hyperendemic area in Irian Jaya, Indonesia III. Antibodies to circumsporozoite protein and ring-infected erythrocyte surface antigen. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health*, 34: 62-71.
- Wählin Flyg, B., A.B. Siddique, P. Perlmann, F. Esposito y K. Berzins. 1999. Inhibition of in vitro growth of *Plasmodium falciparum* field isolates mediated by human antibodies to Pf155/RESA and Pf332. *Parasite Immunol.*, 21: 331-33