



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
ZARAGOZA

DETERMINACION DE FACTORES INMUNOSUPRESORES Y SU
ESPECIFICIDAD, EN SUERO DE RATONES INFECTADOS -
CON Plasmodium berghei yoelii.

T E S I S

Que para obtener el Título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

Presenta n

ALEJANDRA ANGULO MARTINEZ
SILVIA GIL RAMIREZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

I. INTRODUCCION	1
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
III. FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA	5
IV. OBJETIVOS	7
V. HIPOTESIS	8
VI. MATERIALES Y METODOS	9
VII. RESULTADOS	22
VIII. ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS	41
IX. CONCLUSIONES	44
BIBLIOGRAFIA	45

I. INTRODUCCION

La malaria o paludismo es una enfermedad parasitaria producida por protozoarios del género *Plasmodium* y transmitida principalmente por el mosquito -- hembra del género *Anopheles*, aunque también se puede transmitir por transfusiones de donadores palúdicos, material quirúrgico contaminado y excepcionalmente por placenta, (1-4). Este padecimiento es de tipo endémico en territorios tropicales y subtropicales, afectando cerca del 90% de la población en zonas hiperendémicas como África, (5). Se caracteriza por paroxismos periódicos de fiebre, escalofríos y sudoraciones, asociados con anemia, esplenomegalia y recaídas de curso crónico, (1 y 3).

Los principales agentes etiológicos del paludismo en el hombre son *P. vivax* y *P. falciparum*; en menor proporción: *P. ovale* y *P. malariae*. Excepcionalmente se han reportado casos de malaria producida por *P. cynomolgi* que es un agente etiológico de antropoides, (3).

Los agentes etiológicos mas comunes en roedores son: *P. berghei*, *P. yoelii*, *P. berghei yoelii*, *P. yoelii yoelii*, *P. knowlesi*, *P. chabaudi* y *P. inui*, (7 y 8).

Los periodos de incubación son variables dependiendo de la especie: *P. vivax* y *P. falciparum* de 10 a 15 días; *P. ovale* de 11 a 16 días; *P. malariae* de 28 a 37 días.

El ciclo vital del parásito se lleva a cabo en dos fases:

Sexuada o esporogónica

Se desarrolla en el mosquito. Comienza por la picadura a un sujeto parasitado, de donde absorbe los micro y macrogametocitos. Estos pasan al estómago; el microgametocito exflagela para fecundar al macrogameto y formar el huevo ó cigoto. Este madura formando el oocineto que migra y se anida en la pared del estómago, transformándose en ooquiste u occisto. Por un proceso de esporogo--

nia, Este último da lugar a los esporozoítos, los cuales, al liberarse migran a las glándulas salivales donde sufren un proceso de maduración. (Esta etapa se realiza entre 10 y 17 días).

Asexuada o esquizogónica

Se desarrolla en el hombre en diferentes etapas. La etapa preeritrocítica se inicia cuando el mosquito inyecta los esporozoítos maduros que duran en -- circulación de media hora a dos horas, pasando a las células parenquimatosas del hígado, dando inicio al ciclo hepático. Una vez dentro de las células, -- los esporozoítos sufren un proceso esquizogónico formando los criptozoítos -- que al liberarse dan lugar a los merozoítos. Estos pueden tomar tres rutas:

- Continuar con el ciclo hepático. (Este proceso dura de 6 a 10 días).
- Madurar para producir gametocitos que permanecen en circulación.
- Pasar al eritrocito para iniciar la etapa eritrocítica.

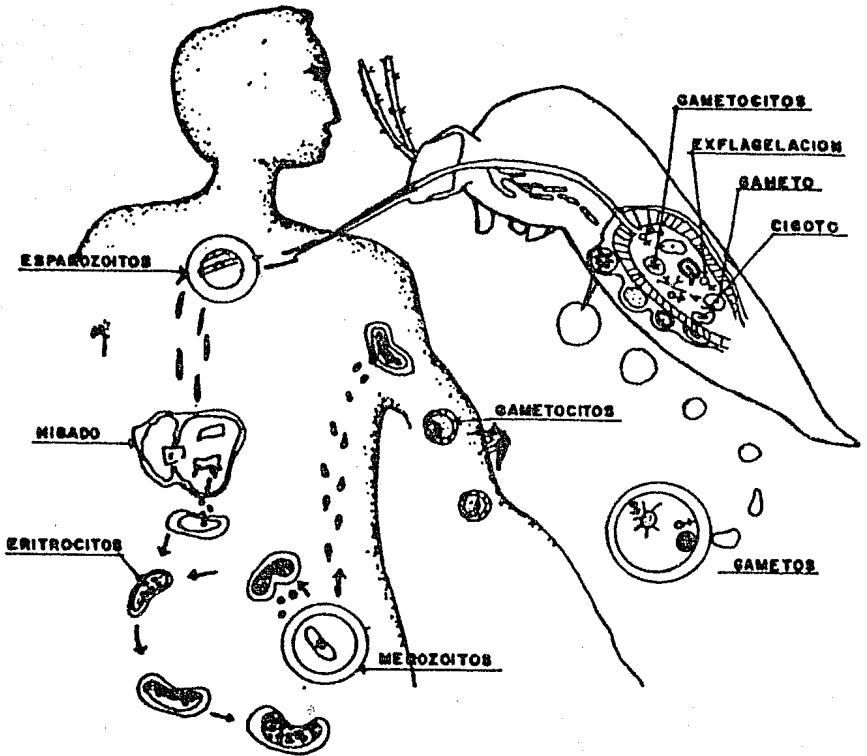
Al penetrar el merozoíto en el eritrocito adquiere una forma anular, tras formándose en trofozoíto. Este por esquizogonia da lugar al esquizonte, el -- cual madura y libera a los merozoítos, que pueden, nuevamente, tomar las tres rutas mencionadas. Los paroxismos febriles se asocian con la duración de esta etapa, que varía dependiendo de la especie: P. vivax y P. ovale, 48 h.; P. malariae, 72 h. y P. falciparum de 24 a 48 h. ,(6,9 y 10) (Ver figura anexa).

Inmunidad en la malaria

Debido a la cronicidad de muchas enfermedades parasitarias producidas por agentes persistentes, al parecer inafectados por la respuesta inmune del huésped, se han realizado diversos estudios encaminados a elucidar los procesos -- inmunológicos involucrados, (4).

Por ser el Plasmodium sp un parásito intracelular, se creía que la res-- puesta inmune involucrada principalmente, era de tipo celular, sin embargo, -- estudios realizados han demostrado la ineficiencia de ésta. Algunos autores -- proponen que los macrófagos se encuentran inactivados por sustancias deriv--

CICLO BIOLÓGICO



das del eritrocito infectado o por linfocinas, (11-13). Un experimento que apoya estas deducciones es el referido por Clark, quien activó macrófagos observando que se retardaba la aparición de parásitos en sangre de ratones infectados con P. yoelii, (14). Weinbaum y colaboradores probaron la inactividad del macrófago al sustituir macrófagos de ratones infectados con P. berghei yoelii, por macrófagos de ratones sanos, observando que se reconstitula la respuesta inmune, (8). Además se ha visto una disfunción de los linfocitos T en el pico de la parasitemia, (15 y 16), que tal vez se deba a la presencia de anticuerpos inespecíficos contra dichos linfocitos, (17).

El papel de la respuesta inmune humoral es un tanto incierto, ya que las formas extracelulares, además de ser pocas, desaparecen rápidamente de la circulación, por lo que no hay una buena respuesta por anticuerpos. Sin embargo se han realizado varios estudios con el fin de detectar la presencia de inmunoglobulinas protectoras, encontrándose que éstas son principalmente de tipo IgG independientes del complemento, (18 y 19). Se ha visto que el efecto protector es por inhibición de la entrada de los merozoítos al eritrocito, (20). Otro hecho que apoya la protección por IgG, es la resistencia a la infección en niños de madres palúdicas debido a la inmunidad transmitida durante el embarazo, (19).

En las infecciones producidas por Plasmodium sp se sabe que existe una inmunosupresión generalizada, pero aún no se han definido claramente los mecanismos involucrados, (11, 21 y 22). Entre los que se han propuesto se encuentran los siguientes:

- Formación de autoanticuerpos contra linfocitos, (17) y complemento, (19).
- Isoanticuerpos contra eritrocitos, que bloquean la acción de los anticuerpos dirigidos contra las formas intracelulares del parásito, (23).
- Bajos niveles de complemento, por la formación de complejos inmunes en gran cantidad, (7).

-Activación de células supresoras posiblemente por la producción de un -
mitógeno de origen plasmódico, (11, 24 y 25).

Este último mecanismo es probablemente el responsable de la supresión en
la producción de anticuerpos contra antígenos "T" dependientes, (7 y 11).

En cuanto a las células B, se ha visto que no son susceptibles de inmuno
supresión directa, (24 y 25), por el contrario se propone la existencia de -
un mitógeno de origen plasmódico que actúa sobre ellas, (11 - 13).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el año de 1950 se estableció a nivel mundial una campaña para comba -
tir el paludismo, siendo en el año de 1956, cuando en México se inició la --
Campaña Nacional para la Erradicación del Paludismo, (CNEP), y a consecuencia
de ésta, en 1961 se anunció que en México ya no era causa de muerte, (2 y 3)

Hasta 1984, según reportes del Sector Salud., se tiene conocimiento de -
que este padecimiento no se encuentra dentro de las principales causas de --
morbilidad y mortalidad en nuestro país, sin embargo, ocupa el séptimo lugar
dentro de los padecimientos más frecuentes, (28).

Por otro lado, existen lugares como África, Asia, India y Sudamérica, --
donde sigue ocupando altos índices de mortalidad, (4, 19 y 29).

Recientemente se ha tenido conocimiento de brotes palúdicos en diferen -
tes zonas de la República Mexicana: Sureste, (principalmente Chiapas); Cen -
tro, (Distrito Federal y Estado de México), y Noroeste, (Sinaloa), (30).

Se cree que los brotes por el Sureste podría deberse a la inmigración de
sudamericanos, mientras que en las otras regiones no se sabe exactamente, --
aunque existe la posibilidad de reservorios por aguas estancadas en la zona-

del lago de Xochimilco y el el área correspondiente al antiguo Lago de Texcoco, además de migración interna en el país.

Como se observa, el paludismo sigue siendo un problema latente a nivel mundial y hasta la fecha no se conocen con exactitud los mecanismos involucrados - en la respuesta inmune a esta enfermedad, por lo que nos interesamos en ahondar un poco acerca de dichos mecanismos.

Algunos investigadores han propuesto la presencia de factores solubles de origen plasmódico que bloquean la respuesta inmune, (11, 26 y 31), pero esto no ha sido demostrado claramente. Particularmente consideramos que este punto es muy importante, ya que si se comprobara la existencia de dichos factores y el nivel a que actúan, se podría lograr en un futuro su inactivación y de esta manera se tendría una respuesta adecuada contra el parásito de la malaria.

III. FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA

La erradicación global del paludismo ha fracasado por diferentes causas: - resistencia de los mosquitos a los insecticidas, resistencia del parásito a fármacos e ineficiencia de las vacunas.

Los fármacos más comunmente utilizados en el tratamiento de la malaria son derivados de la quinina, pero se han presentado problemas a causa de los efectos secundarios y de la aparición de cepas resistentes, por lo que se ha hecho necesario la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos: Mefloquina triple en Holanda y Tailandia, (26); Quinhalo en India, (32) y principio amargo de Tabebuia rosea en México, (33).

Con las vacunas no se han tenido resultados satisfactorios en general, debido principalmente a las siguientes causas:

- Son específicos de especie y estado del parásito, (11).
- Dificultad para obtener extractos de antígeno completamente puro, (9).

-Obtención de bajos rendimientos de antígeno, especialmente en el caso de esporozoitos, (26 y 40).

-Falta de reproducibilidad, pues se han probado algunas vacunas en mones, aves, roedores y humanos, sin observar comportamiento homogéneo, (9).

La vacunación se ha ensayado con: microgametos, (20); eritrocitos parasitados, (26); esporozoitos, (34 y 35); merozoitos, (36); esquizontes, (37); mezcla de antígeno esporozoítico y virus recombinante, (26); sueros hiperinmunes palúdicos, (4 y 5); anticuerpos monoclonales dirigidos principalmente contra la proteína circumsporozoítica, (CSP), presente en la superficie del esporozoito, (20, 38-40).

Basándonos en estos resultados se realizó el presente trabajo que consistió en determinar la presencia de factores inmunosupresores en suero de ratones palúdicos, para lo cual se utilizó una cepa letal de P. berghei yoelii.

En la evaluación de la respuesta inmune no se incluyó la actividad del macrófago, ya que ha sido demostrado por muchos investigadores mencionados anteriormente, que existe una inhibición en su capacidad fagocítica.

IV. OBJETIVOS

- Determinación del inóculo.
- Obtención de antígeno de Plasmodium berghei yoelii.
- Determinación de la presencia de factores inmunosupresores en suero de ratones infectados con Plasmodium berghei yoelii.
- Determinación de la especificidad de dichos factores, utilizando un modelo de ratones inoculados con glóbulos rojos de carnero.

V. HIPÓTESIS

-Considerando que se han detectado factores inmunosupresores en sangre completa de ratones infectados con --- Plasmodium berghei y sabiendo que en los ratones parasitados con la cepa letal de Plasmodium berghei yoelii la sobrevivencia es menor que en los primeros, suponemos que hay una producción mas alta de tales factores, por lo que será fácil detectarlos en suero.

-Uno de los mecanismos propuestos en las alteraciones inmunodeficientes, es la presencia de factores inmunosupresores inespecíficos. Sabiendo que en el paludismo hay deficiencia de la respuesta inmune, suponemos que dichos factores serán del mismo tipo.

VI. MATERIALES Y METODOS

Material biológico

Ratones CD-1: hembras de 2 a 3 meses. Bioterio de la E.N.E.P. Zaragoza.

Cepa letal de Plasmodium berghei yoelii: proporcionada por el Dr. - Filiberto Malagón, Jefe del Laboratorio de Malariología de la Facultad de Medicina. U.N.A.M.

Glóbulos rojos de carnero: Obtenidos de un carnero adulto del bioterio de la E.N.E.P. Zaragoza y conservados en alsever.

Suero de cobayo fresco: obtenido de cuyos adultos del bioterio de la E.N.E.P. Zaragoza.

Suero fetal de ternera. Sigma.

Ovoalbúmina. Sigma.

Reactivos

Citrato de sodio. Monterrey.

Cloruro de sodio. Monterrey.

Fosfato de potasio monobásico. Baker.

Fosfato de sodio dibásico. Baker.

Fosfato de sodio monobásico. Baker.

Colorante de Giemsa. Sigma.

Cloruro de potasio. Merck.

Acido acético. Baker.

Cristal violeta. Sigma.

Saponina. Sigma.

Hidróxido de sodio. Baker.

Carbonato de sodio. Baker.

Tartrato de sodio y potasio. Baker.
 Sulfato de cobre pentahidratado. Baker.
 Reactivo de Folin-Ciocalteu. Sigma.
 Cloruro de calcio monohidratado. Baker.
 Sulfato de magnesio heptahidratado. Merck.
 Acido clorhídrico. Baker.
 Metanol. Baker.
 Etanol. Baker.
 Acido pterico. Baker.
 Glicerina. Sigma.
 Eter etílico. Merck.
 Formaldehido al 37%. Baker.
 Para-rosaanilina. Sigma.
 Azul de toluidina. Sigma.
 Nitrito de sodio. Baker.
 Buffers de pH 4 y 7. Sigma.
 Cloruro crómico. Baker.
 Agarosa. Sigma.
 Medio McCoy. Sigma.
 Alfa-naftil acetato. Sigma.
 Acetona. Baker.

Material

Cajas de Petri de 10 y 20 cm. de diámetro. Corning y Pyrex.
 Cámara de Neubauer. Becton-Dikison.
 Cubrehematímetros. Becton-Dikison.
 Tamices metálicos de 3 a 4 cm..
 Cubreobjetos de 22 X 22 mm. Madesa.

Espátula de acero inoxidable. Scientific Products.

Gradillas de 20 y 36 tubos. Equipar.

Jeringas desechables de 1, 3, 5 y 10 ml. Plastipak.

Matraces aforados de 50, 100, 250, 500 y 1000 ml. Pyrex.

Matraces Erlen-Meyer de 125, 250 y 1000 ml. Pyrex.

Mechero Fisher. Scientific Products.

Micropipetor de 50 microlitros. Clinipette.

Puntas para micropipetor de 50 microlitros. Clinipette.

Pipetas graduadas de 1, 2, 5 y 10 ml. Pyrex.

Placas para microtitulación de 12.7 x 9.5 cm. Cooke.

Micropipetas de 50 microlitros. Microtiter.

Microdilutores de 50 microlitros. Microtiter.

Agitador para microdilutores. Microtiter.

Pipetas para glóbulos blancos. Proper Thoffy Products.

Tabla de disección de 40 x 25 cm.

Tubos de ensaye de 13 x 100 y 12 x 75 mm. Pyrex.

Tubos de Khan. Pyrex.

Tripié metálico. Scientific Products.

Tela de asbesto.

Bulbos de plástico para pipetas Pasteur.

Pipetas Pasteur.

Estuche de disección. Scientific Products.

Papel para film. American Company.

Jaulas para ratones.

Algodón.

Papel filtro del número 3. Whattman.

Gasas.

Papel aluminio. Alupak.

Anillo metálico de 6 cm. Pyrex.

Soporte universal. Pyrex.

Palillos de madera. Píngüino.

Portaobjetos de 75 X 25 mm. Profesional.

Vasos de precipitados de 5, 50, 100, 250, 500 y 1000 ml. Pyrex.

Vidrios de reloj. Pyrex.

Piseta de 500 ml. Pyrex.

Probetas de 10, 25, 50, 100 y 500 ml. Corning.

Cámaras de tinción. Corning.

Embudo de vidrio de talle corto. Pyrex.

Celdas para espectrofotómetro. Corning.

Equipo

Olla express de 10 l. Presto.

Balanza analítica. Mettler, H80.

Baño de agua con temperatura controlada. Precision.

Sonicador. MSE, PG 1563.

Centrífuga clínica de 8 camisas. Sol-Bat, V-2.

Espectrofotómetro. Baush & Lomb, Spectronic 20.

Microscopio óptico. Carl-Zeiss.

Potenciómetro. Sargent-Welch, PBL-400.

Refrigerador. Philips, 127-VCA.

Agitador. Vortex-Genie.

Incubadora. Riossa, EC.

Estufa. Mapsa.

Homogenizador de tejidos. Thomas.

Agitador de pipetas. Sol-Bat.

Preparación de soluciones-Salina Isotónica: SSI

Disolver 8.5 g. de cloruro de sodio en un litro de agua destilada.

-Salina citratada:

Disolver 5 g. de citrato de sodio en 100 ml. de solución salina isotónica.

-Amortiguadora de fosfatos: PBS (0.15 M, pH 7.2)

Pesar:

8.0 g. de cloruro de sodio,

0.2 g. de cloruro de potasio,

1.15 g. de fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4)

0.2 g. de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)

Disolver en agua destilada y aforar a un litro.

-Líquido de Turk:

Mezclar 2 ml. de ácido acético glacial con 98 ml. de agua destilada y agregar dos gotas de cristal violeta.

- Salina amortiguada: SSA

Prepara las siguientes soluciones:

Solución A

8 g. de cloruro de sodio.

0.4 de cloruro de potasio

0.2 g. de sulfato de magnesio heptahidratado

0.045 g. de fosfato dibásico de sodio.

0.060 g. de fosfato monobásico de potasio

Disolver en 500 ml. de agua destilada.

Solución B

Disolver 0.147 g. de cloruro de calcio monohidratado en 500 ml. de agua destilada.

Solución C

Mezclar soluciones A y B. Agregar 10 ml. de glucosa al 10%.

Solución D

Agregar 10 ml. de rojo de fenol al 0.02% a la solución C.

Solución E

Disolver 19.1 g. de tris(hidroximetil)aminometano, (TRIS), en 800 ml. de agua destilada y ajustar el pH a 7.4 con ácido clorhídrico. Añorar a un litro con agua destilada.

Solución de trabajo

Mezclar volúmenes iguales de la solución D y E y de ser necesario reajustar el pH a 7.4.

Esterilizar a 15 lbs. de presión por 15 min.

-Alsever:

Pesar:

20.5 g. de glucosa

8.0 g. de citrato de sodio dihidratado

0.55 g. de ácido cítrico monohidratado

4.2 g. de cloruro de sodio

Disolver en un litro de agua destilada.

Esterilizar a 10 lbs. de presión por 15 min.

-Baker:

Medir 49.7 ml. de formaldehído al 37% y completar a 500 ml. con agua destilada.

Agregar 5 g. de cloruro de calcio y guardar la solución en refrigeración.

Amortiguadora de fosfatos: (0.067 M y pH 5)

Pesar:

0.1127 g. de fosfato dibásico de sodio

8.9800 g. de fosfato monobásico de potasio

Disolver en un litro de agua destilada.

-Para-rosaanilina diazotizada:

Disolver 1 g. de p-rosaanilina en 20 ml. de agua destilada y 5 ml. de ácido clorhídrico, enfriar y filtrar. Almacenar en refrigeración, en frasco ámbar.

Preparar una solución acuosa de nitrito de sodio al 4%, (al momento).

Mezclar volúmenes iguales de las soluciones anteriores y agitar -- hasta aparición de un color ámbar.

-Azul de toluidina:

Disolver 1 g. de azul de toluidina en 100 ml. de agua destilada.

Filtrar y guardar en frasco ámbar.

-Alfa-naftil acetato:

Disolver 10 mg. en 0.4 ml. de acetona.

-Agarosa :

Colocar 0.06 g. de agarosa en 100 ml. de medio McCoy. Esterilizar en autoclave a 10 lbs. durante 15 min.

-Reactivo de Lowry:

Reactivo A*

Carbonato de sodio al 2% y tartrato de sodio y potasio al 0.02%
en hidróxido de sodio 0.1N

Reactivo B*

Sulfato de cobre al 0.5%

Mezclar 50 ml. del reactivo A con 1 ml. del reactivo B.

*Se conservan en refrigeración.

-Saponina:

Preparar al momento en una concentración de 60 mg/ml en PBS.

Métodos-Inoculación:

Se administra intraperitonealmente.

-Determinación del inóculo:

Se prueban los inóculos de 2, 4, 10 y 20×10^5 eritrocitos infectados en grupos de 5 ratones, determinándose diariamente el porciento de parasitemia.

-Obtención de sangre de ratones:

Se realiza una punción cardiaca por apertura de caja torácica.

-Obtención de suero de ratones parasitados: Suero problema.

Se inoculan 3 grupos de 7 ratones, sucesivamente, cada cuatro días con 4×10^5 eritrocitos infectados y al catorceavo día después de la -- primera inoculación, se sangran los ratones para obtener los sueros del sexto, décimo y catorceavo día.

-Obtención de suero de ratones no parasitados: Suero control.

Se sangran 7 ratones sanos y se separa el suero.

-Adsorción del suero:

Se obtiene el hígado de un ratón sano y se lava con PBS. Se coloca un pedazo del mismo en el homogenizador de células, con un ml. de PBS. Se macera hasta disgregación completa y se centrifuga a 2,500 R.P.M., durante 15 min. Se lava tres veces con PBS. Se agrega el suero al sedimento y se resuspende suavemente. Se incuba a 37°C durante 15 min. Se centrifuga y se separa el suero.

-Preparación de animales:

Se inoculan cuatro grupos de cinco ratones para cada ensayo con --- 0.25 ml. de los diferentes sueros obtenidos. Al día siguiente se administran 4×10^5 eritrocitos infectados con Plasmodium berghei yoelii para ENSAYO A y 0.4 ml. de una suspensión de glóbulos rojos de carnero al

10%, (GRC), para ENSAYO B.

Diez días después se sacrifican los ratones y se hacen las determinaciones.

-Porcentaje de parasitemia:

Se realizan frotis sanguíneos de cada ratón y se tiñen con Giemsa.³ Se cuentan 500 eritrocitos y se determina el porcentaje de parasitados, que se distinguen porque el parásito se tiñe de azul.

-Preparación del antígeno:

La saponina es un detergente que actúa desestabilizando membranas celulares. En este caso, debido a su baja concentración lisa únicamente los eritrocitos, sin dañar al parásito, lo que permite obtener un conglomerado de éste, que se disgrega por la emisión de ondas sonoras de alta intensidad, (sonicación).

Técnica:

Se inoculan 30 ratones con 2×10^6 eritrocitos infectados con P. berghei yoelii. Se sangran cuando tienen entre un 60 y 80% de parasitemia, (aproximadamente 5 ó 6 días después de la inoculación), recolectando la sangre en solución salina citratada. Se lavan los glóbulos rojos con SSI, (Centrifugación a 2,500 RPM, por 10 min.). Se resuspende el paquete globular en 5 veces su volumen con SSI y se agrega un volumen de saponina equivalente a la décima parte del volumen total. Se deja en hielo durante media hora con agitación continua y posteriormente se centrifuga a 3,000 RPM por 20 min. Se lava dos veces con SSI y se resuspende el sedimento en la mínima cantidad de SSI. Se sonica durante 5 min. a $3/4$ de la amplitud máxima en baño de hielo. Se cuantifican proteínas por el método de Lowry y se ajusta a una concentración de antígeno de 2 mg/ml en SSI.

-Determinación de proteínas: Método de Lowry

El cobre en solución alcalina forma un complejo de color azul con las proteínas, el cual absorbe a 600 nm. La intensidad del color es proporcional a la concentración de proteínas presentes. (41)

Técnica:

Se realiza una curva patrón colocando una serie de 10 tubos que contengan solución de ovoalbúmina en concentraciones de 50, 100, 150 500 microgramos por ml, (a partir de una solución de 500 microg/ml. en SSI.). El blanco se hace con un ml. de SSI. En otro tubo se coloca un ml. de la muestra problema. A todos los tubos se les agregan 3 ml. del reactivo de Lowry, (preparado al momento) y se dejan durante 10 min. a temperatura ambiente. Se adiciona 0.1 ml. del reactivo de Folin-Ciocalteu y se deja a temperatura ambiente durante 30 min., agitando ocasionalmente. Se lee en un espectrofotómetro a 600 nm.

-Sensibilización de GRC con antígeno:

El mecanismo por el cual el cloruro crómico pega el antígeno al eritrocito es aún desconocido.

Técnica:

Se colocan 100 microlitros de paquete de GRC, (previamente lavados con SSI), con 100 microlitros de antígeno y 100 microlitros de cloruro crómico al 0.01% en SSI, (preparado al momento). Se agita suavemente durante 15 min. a temperatura ambiente. Se centrifuga a 2,500 RPM por 5 min. y se elimina el sobrenadante. Se lava una vez con SSI y dos veces con PBS, ajustándose el paquete final a la concentración deseada.

-Células formadoras de placa: Método de Jerne.

Las células formadoras de anticuerpos, (CFP), se pueden determinar "in vitro", por la propiedad que tienen los anticuerpos de fijar complemento después de unirse a su antígeno. El sistema se establece con célu

Las linfoides que se mezclan con GRC, (prueba directa), o con GRC sensibilizados con antígeno, (prueba indirecta) y al agregar el complemento - se produce la lisis de los eritrocitos, lo que es fácil de observar por las placas líticas formadas en un soporte semisólido de agarosa, (43).

Técnica:

Se sacrifican los ratones extrayendo el bazo, que se lava con SSA -- (los pasos siguientes se hacen en baño de hielo). El bazo se coloca sobre un tamiz metálico y se transfiere a una caja de Petri que contiene - 4 ml. de SSA. Se macera con un tubo de ensaye hasta que quede sólo la -- cápsula del bazo en el tamiz. El tamizado se resuspende con una jeringa- (de preferencia de 3 ml.), hasta homogenizar, transfiriéndose la suspen- sión a un tubo de ensaye, donde se deja reposar por un minuto pasando el sobrenadante a otro tubo. Se toma 0.1 ml de éste y se coloca en otro tu- bo que contenga 0.9 ml. de medio McCoy, pasándose a la vez 0.1 ml. a o- tro tubo que contenga 2 ml. de agarosa al 0.06 %, (mantenida en un baño a 45°C), adicionando 0.2 ml. de GRC al 10 % en medio McCoy para el ensa- yo B y 0.2 ml. de GRC sensibilizados, el 10 % en medio McCoy para ensayo A. El contenido del tubo se vierte rápidamente en una caja de Petri de - 10 cm. de diámetro, (previa agitación). y se deja incubar a 37°C duran- te 30 minutos. Se agrega 2 ml. de suero fresco de cobayo, diluido 1:10 - como fuente de complemento y se incuba a 37°C durante 45 min. Se cuanti- fica el número de placas hemolíticas por caja.

NOTA: En caso de no observar placas, la incubación se prolonga 30 mi- nutos más; si no aparecen, se deja en refrigeración 24 h.

-Hemaglutinación:

Al reaccionar un antígeno particulado con su anticuerpo específico, - se produce aglutinación, cuando el antígeno es un eritrocito, se conoce -- con el nombre de hemaglutinación directa y cuando el eritrocito sirve --

como soporte para el antígeno, la hemaglutinación es indirecta, (44).

Técnica:

Se colocan 50 microlitros de PBS en cada pozo de la placa. Se agregan 50 microlitros del suero en el pozo no. 1 y se van diluyendo al doble progresivamente, dejando el último pozo como testigo. Se adicionan en todos los pozos 50 microlitros de GRC al 1% en PBS, para ensayo B y 50 microlitros de GRC sensibilizados al 1% en PBS para ensayo A. Se incuba a 37°C por una hora y se lee.

NOTA: Si no se aprecia adecuadamente la aglutinación, se puede dejar en refrigeración por 24 h.

-Cuantificación de Linfocitos T: Método de ANAE.

Los linfocitos T poseen la enzima alfa-naftil acetato esterasa, (ANAE), que no tienen los otros linfocitos. Cuando se coloca el sustrato de alfa-naftil acetato en una mezcla de linfocitos, es captado por los linfocitos T. Al adicionar la para-rosaanilina diazotizada, se forma un complejo con el sustrato mencionado, que puede observarse claramente -- por un color café rojizo en el citoplasma de las células, al contrastar con azul de toluidina, (45 y 46).

Técnica:

Se prepara un frotis de células de bazo en un portaobjetos y se deja secar a temperatura ambiente. Se fija en una solución de formol-calcio, (Baker), a 4°C por 10 min. Se lava con agua destilada a temperatura ambiente por 20 min. y se incuba la preparación en un medio que contenga 40 ml. de amortiguador de fosfatos de pH 5, (0.067 M), 2.4 ml. de p-rosaanilina diazotizada y 0.4 ml. de alfa-naftil acetato, ajustando el pH a 5.8 con hidróxido de sodio 1 N. Se incuba a temperatura ambiente durante 21 h. en la oscuridad. Se lava la preparación con agua destilada durante 40 min. y después de secar al aire el frotis se contrasta-

con azul de toluidina por una hora. Se cuantifica el porcentaje de linfocitos con actividad ANAE positiva, identificados por la presencia de manchas café rojizo en su citoplasma.

- Métodos estadísticos:

ANADEVA:

La técnica de análisis de varianza, (ANADEVA), nos permite dividir la variación total de nuestras observaciones en fuentes perfectamente identificadas, con el objeto de saber si las diferencias -- son debidas al error experimental o a los tratamientos.

Se propone una hipótesis nula, (H_0), que afirma que los grupos -- son iguales y una hipótesis alterna, (H_a), que afirma que por lo menos un grupo es diferente.

Se determina un valor de "F", (F. calculada), con la relación de las medias cuadráticas, (estimadores de varianza), obtenidas para el tratamiento, (entre los grupos), y para el error experimental, (dentro de los grupos). Este valor se compara con una "F" de tablas para un nivel de significancia dado, ($P < 0.05$). El criterio de decisión es que si "F" calculada, ("F" calc.) es mayor que "F" de tablas, la H_0 se rechaza.

Si existen diferencias por ANADEVA y hay más de dos grupos, es necesario determinar cual o cuales grupos son diferentes, mediante la -- técnica paramétrica de contrastes ortogonales.

Contrastes Ortogonales:

Este análisis se basa en dividir el efecto global de los tratamientos en fragmentos. Se selecciona el grupo que tenga un valor de media, (\bar{X}), más alejado y se contrasta con los grupos restantes. Se realizan tantos contrastes como sea necesario. Los cálculos y el criterio de decisión son los mismos que para ANADEVA, (47).

VII. RESULTADOS

Tabla no. 1

Determinación del inóculo

Inóculo ($\times 10^5$ e.i.)	% Parasitemia Máxima (Medias)	Sobrevivida (Dias)
20*	85	6
10	80	12
4**	95	16
2	60	21

* Inóculo para obtener antígeno.

** Inóculo para ensayo A.

e.i.: eritrocitos infectados.

Tabla no. 2

Determinación del periodo adecuado para
obtener los sueros problema.

Día	% Parasitemia, (Medias)
1	0.0
2	1.0
3	3.0
4	5.0
5	10.5
6	17.5
7	22.5
8	32.5
9	37.5
10	50.5
11	62.5
12	71.2
13	82.5
14	90.0
15	92.5
16	95.0

Se eligieron los días 6, 10 y 14 (Gráfica no. 1)

Tabla no. 3

Evaluación de la respuesta inmune para Ensayo A: ratones infectados con Plasmodium berghei yoelii.

Parámetro	T i p o d e s u e r o			
	Control	60. día	100. día	14avo. día
% de Parasitemia	45	37	45	39
	41	33	38	47
	41	31	31	44
	41	32	31	47
	36	27	47	44
% de Linfocitos T	65	65	68	72
	65	54	70	71
	63	76	81	43
	64	68	76	59
	52	70	76	74
Titulo de Anticuerpos	1:4	1:8	1:8	1:4
	1:4	1:4	1:2	1:2
	1:4	1:4	1:2	1:2
	1:4	1:8	1:8	1:2
	1:4	1:4	1:2	1:4
C. F. P. (X 10 ⁶ cel)	4	201	177	261
	0	178	288	275
	9	184	134	292
	0	165	172	178
	0	161	225	211

El análisis estadístico se efectuó en la computadora Burroughs 7800 del Programa Universitario de Cómputo, (PUC), con el sistema SPSS, (Statistical Package for - Social Science), versión 8.

Tabla no. 4

ANADEVA: Ensayo A

FUENTES DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	"F" TABLAS ($P < 0.05$)
Tratamiento	3	3.24
Error	16	

PARAMETRO	MEDIAS CUADRATICAS		"F" CALC.
	Tratamiento	Error	
% de Parasitemia	132.58	22.67	5.85**
% de Linfocitos T	147.73	73.35	2.01*
Título de Anticuerpos	6.66	4.20	1.59*
C. F. P. (X 10^6 cel.)	58,852.58	1,507.37	37.05**

* "F" Calc. $<$ "F" Tablas; Ho se acepta, por lo tanto no hay diferencias significativas entre los grupos. -- (Gráficas 2 y 3).

** "F" Calc. $>$ "F" Tablas; Ho se rechaza, por lo tanto, hay al menos un grupo diferente. Se requiere de la técnica paramétrica de Contrastes Ortogonales para establecer cual o cuales grupos son diferentes.

Tabla no. 5

CONTRASTES ORTOGONALES: Ensayo A

G01: Control; G06: ratones con suero de 6 días; G10: ratones con suero de 10 días; G14: ratones con suero de 14 días.

%		de		"F" Tablas = 4.49
P a r a s i t e m i a				($P < 0.05$)
GRUPO	MEDIA	C O N T R A S T E		"F" CALC.
01	40.8	G14 vs G01, G06, G10		9.89*
06	32.0	G01 vs G06 y G10		4.60*
10	38.4	G06 vs G10		3.04
14	44.2			
C. F. P.				"F" Tablas = 4.49
(X 10 ⁶ cel.)				($P < 0.05$)
GRUPO	MEDIA	C O N T R A S T E		"F" CALC.
01	2.6	G14 vs G06 y G10		0.41
06	177.8	G06 vs G10		0.047
10	199.2			
14	243.4			

* "F" Calc. > "F" Tablas; H_0 se rechaza:

- El % de parasitemia entre los grupos se encuentra de la siguiente manera: $G14 > G01 > G10 = G06$. (Gráfica no. 4)
- El contraste del grupo control contra los problemas no fue necesario en las C.F.P., ya que se observa claramente la diferencia. Los grupos se encuentran: $G01 > G06 = G10 = G14$ (Gráfica no. 5).

Tabla no. 6

Evaluación de la respuesta inmune para Ensayo B: ratones inoculados con glóbulos rojos de carnero, (GRC).

Parámetro	Tipo de suero			
	Control	60. día	100. día	14avo. día
% de Linfocitos T	46	37	39	51
	57	39	48	35
	58	43	47	44
	57	46	43	44
	--	52	49	45
Título de Anticuerpos	1:256	1:128	1:128	1:128
	1:256	1:64	1:128	1:128
	1:256	1:128	1:128	1:128
	1:256	1:64	1:128	1:128
	---	1:128	1:128	1:128
C. F. P. (X 10 ⁶ cel)	47	71	117	154
	266	42	147	350
	43	35	380	100
	43	93	170	177
	--	105	320	88

El análisis estadístico se realizó igual que para Ensayo A.

Tabla no. 7

ANADEVA: Ensayo B

FUENTES DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD		"F" TABLAS
Tratamiento	3		($P < 0.05$)
Error	15		3.29
PARAMETRO	MEDIAS CUADRATICAS		"F" CALC.
	Tratamiento	Error	
% de Linfocitos T	116.10	29.18	3.97**
Título de Anticuerpos	20,350.65	327.68	62.10**
C. F. P. ($\times 10^6$ cel.)	25,170.20	9,370.30	2.69*

* "F" Calc. $<$ "F" Tablas; No se acepta, por lo tanto no hay diferencias significativas entre los grupos (Gráfica no. 6).

** "F" Calc. $>$ "F" Tablas; No se rechaza, por lo tanto hay al menos un grupo diferente. Se requiere de la técnica paramétrica de Contrastes Ortogonales para establecer cual o cuales grupos son diferentes.

Tabla no. 8

CONTRASTES ORTOGONALES: Ensayo B

G01: Control; G06: ratones con suero de 6 días; G10: ratones con suero de 10 días; G14: ratones con suero de 14 días.

%		de		"F" Tablas = 4.54
L i n f o c i t o s T				(P < 0.05)
GRUPO	MEDIA	C O N T R A S T E		"F" CALC.
01	54.5	G01 vs G06, G10, G14		11.62*
06	43.4	G10 vs G06 y G14		0.29
10	45.2	G06 vs G14		0.013
14	43.8			

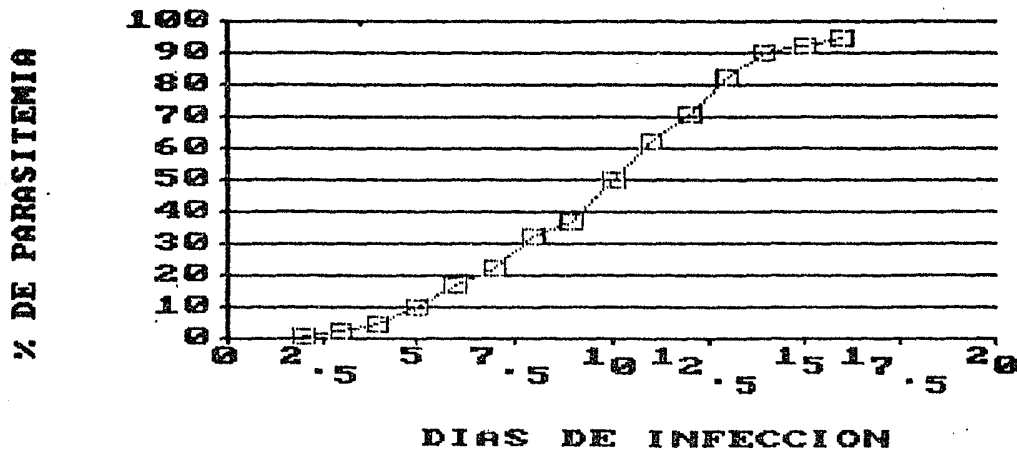
T t t u l o		de		"F" Tablas = 4.54
A n t i c u e r p o s				(P < 0.05)
GRUPO	MEDIA	C O N T R A S T E		"F" CALC.
01	1:256			
06	1:102	G10 vs G06		5.00*
10	1:128			
14	1:128			

* "F" Calc. > "F" Tablas; H_0 se rechaza:

- El % de linfocitos T dentro de los grupos se encuentra de la siguiente manera: $G01 > G14 = G10 = G06$. (Gráfica no. 7).
- Sólo fue necesario un contraste, ya que las demás relaciones son claras, para el título de anticuerpos. Los grupos se encuentran: $G01 > G10 = G14 > G06$. (Gráfica no. 8)

Gráfica no. 1

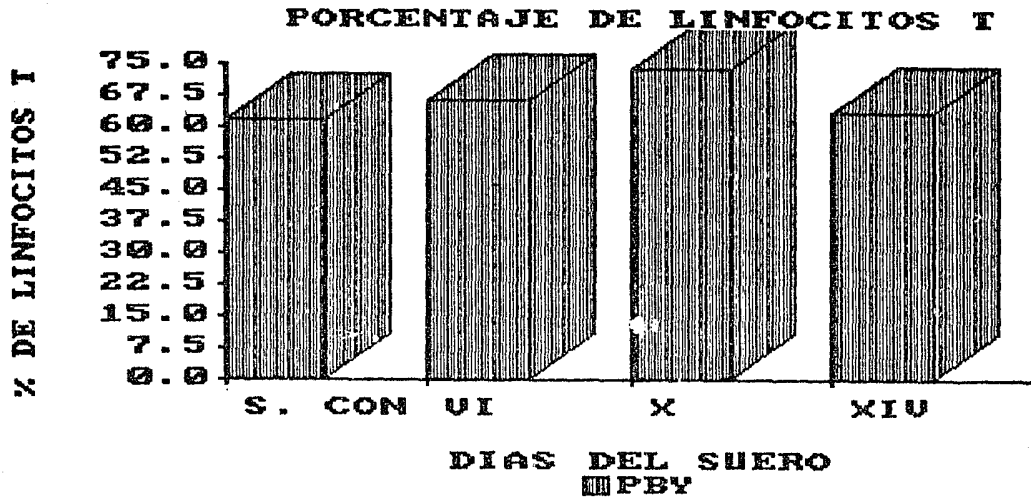
Determinación del periodo adecuado para
obtener los sueros problema.



La parasitemia sube bruscamente entre
el 6o. y el 14avo. día. En base a es-
to se eligieron los días para extraer
los sueros.

Gráfica no. 2

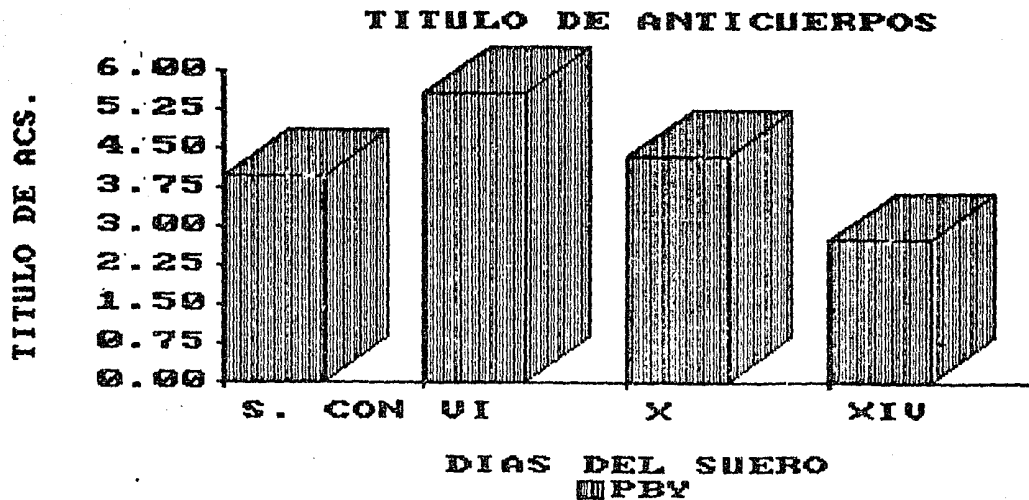
Ensayo A: ratones con P. berghei yoelii



No hay diferencias significativas entre los -
grupos.

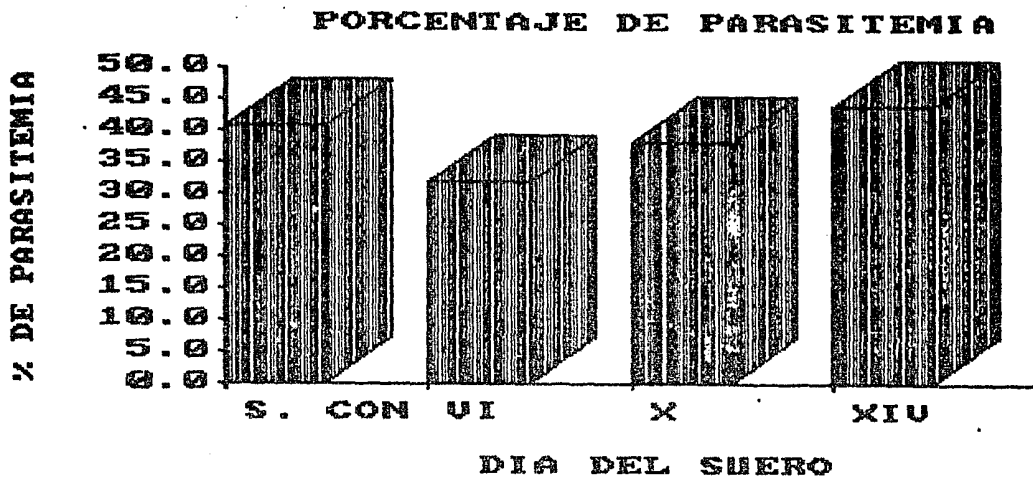
Gráfica no. 3

Ensayo A: ratones con P. berghei yoelii



No hay diferencias significativas entre --
los grupos.

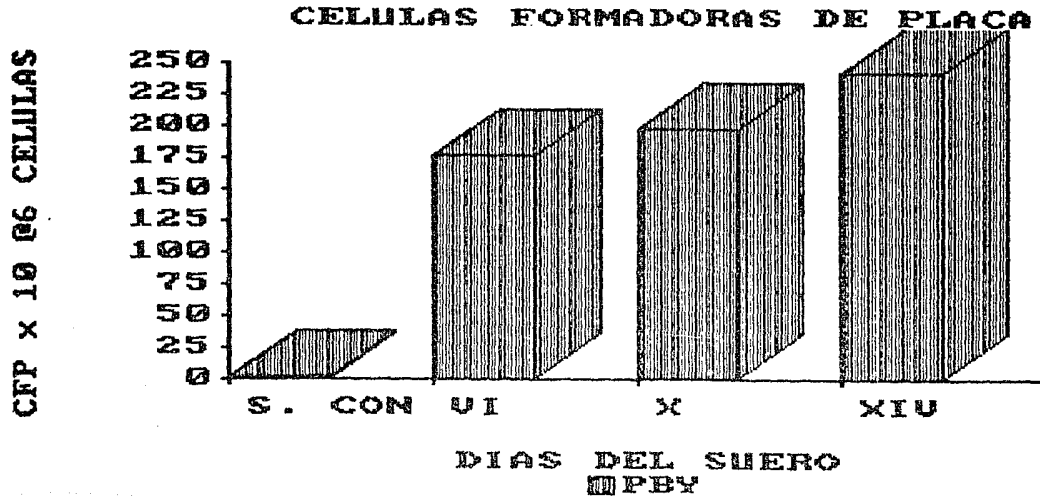
Ensayo A: ratones con P. berghel voelii



El % de parasitemia baja de manera similar en los ratones con suero de 6 y 10 días, con respecto al control; mientras que los ratones con suero de 14 días presentan valores semejantes al control.

Gráfica no. 5

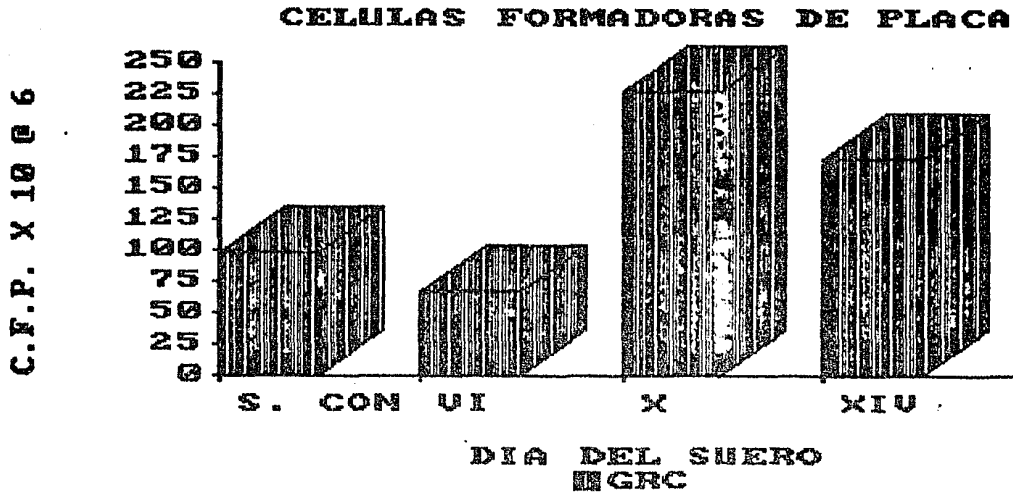
Ensayo A: ratones con P. berghei yoelii



Los niveles de C.F.P. en los grupos problema se encuentran muy por encima del grupo control, sin haber diferencias significativas entre ellos.

Gráfica no. 6

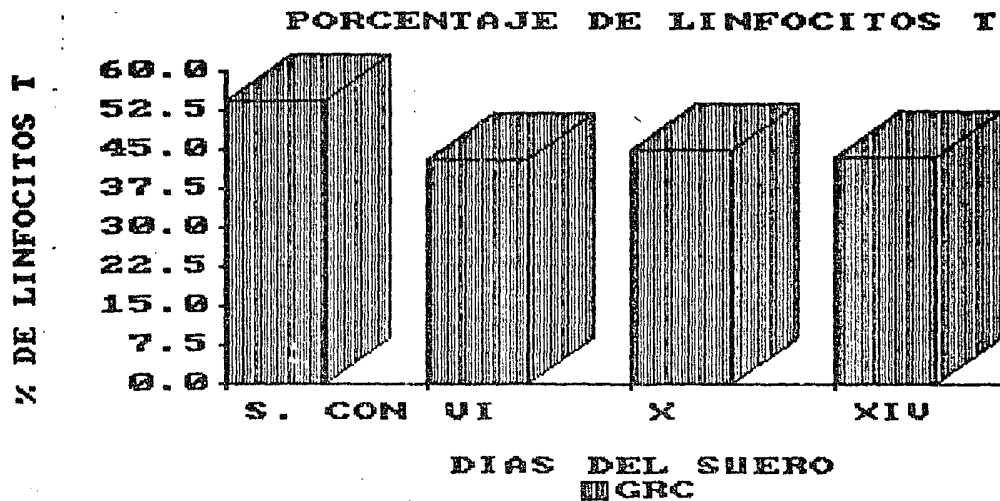
Ensayo B: ratones con G.R.C.



No hay diferencias significativas
entre los grupos.

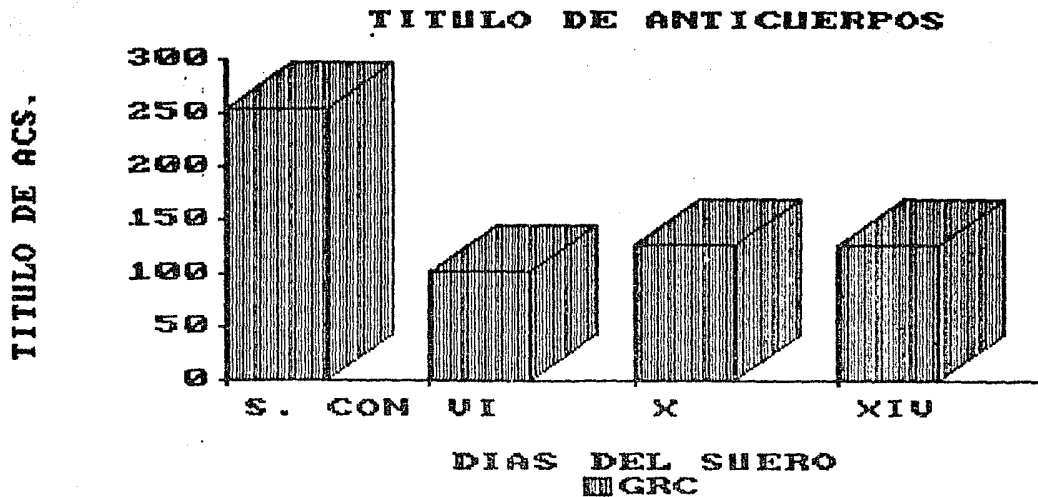
Gráfica no. 7

Ensayo B: ratones con G.R.C.



El % de linfocitos T en los grupos pro
blema se encuentra disminuido con respecto
al control, sin haber diferencias signifi-
cativas en los primeros.

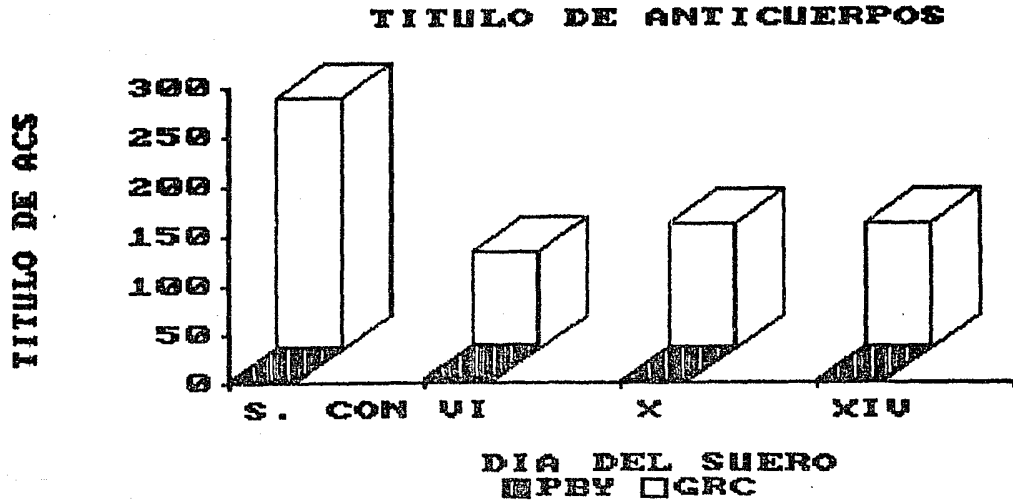
Ensayo B: ratones con G.R.C.



Los niveles de títulos de anticuerpos en los grupos problema se encuentran por debajo con respecto al control; encontrándose valores más bajos en los ratones con suero de 6 días, mientras que en los otros dos grupos no hay diferencia.

Gráfica no. 9

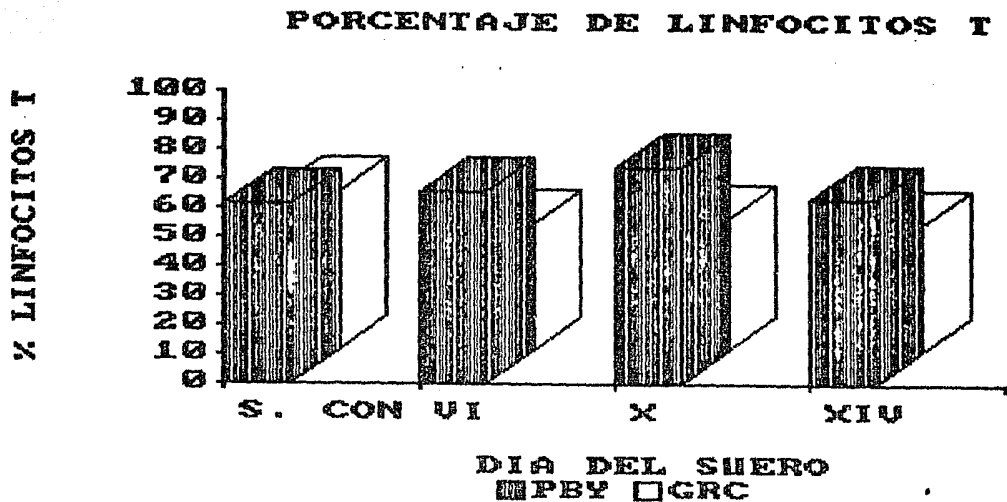
Ensayos A y B



Los niveles de título de anticuerpos en los ratones infectados con *P. berghei yoelii*, (PBV), son muy bajos comparados con los niveles de los ratones inoculados con glóbulos rojos de carnero, (GRC).

Gráfica no. 10

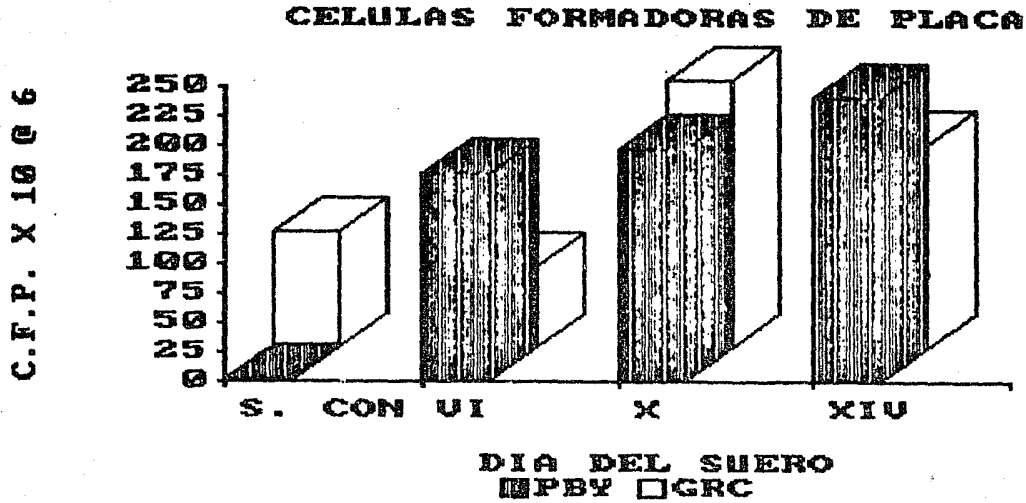
Ensayos A y B



Los valores en el % de linfocitos T para los ratones infectados con *P. berghei yoelii*, (PBY), se encuentran por encima de los valores observados en los ratones inoculados con glóbulos rojos de carnero, (GRC).

Gráfica no. 11

Ensayos A y B



No se observa comportamiento homogéneo,
por lo que este parámetro no sirve para
establecer una comparación entre los --
dos sistemas.

VIII. ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS

Se ha visto que la parasitemia en ratones, producida por Plasmodium sp., sube paulatinamente en el inicio, pero después de cierto tiempo se incrementa bruscamente, dependiendo de la especie del parásito y de la cantidad de inóculo, (8 y 16). Se piensa que lo anterior sea debido a la aparición de factores inmunosupresores de origen plasmódico, (11, 24-26).

En este experimento se siguió una cinética de inmunosupresión basándose en la determinación de un inóculo que permitió una sobrevivida de 16 días, (tabla No. 1), lo que dió un margen adecuado para evaluar dicha cinética a los 6, 10, y 14 días, (gráfica no. 1), ya que se cree que en este intervalo es probable que aparezcan los factores mencionados.

Analizando los resultados para el ensayo con P. berghei yoelii, se observa que en los ratones con suero de 6 y 10 días, la parasitemia baja y vuelve a niveles similares al grupo control en los ratones que recibieron suero de 14 días (gráfica no. 4). Con respecto a la respuesta inmune, se puede ver que en la cantidad de linfocitos T, no existe diferencia entre los grupos, (gráfica no. 2), mientras que en las células formadoras de placa, (C.F.P.), se ve un aumento considerable en los ratones con suero problema, en proporción semejante en los tres grupos, (gráfica no. 5). A pesar de esto, los niveles de título de anticuerpos son bajos en todos los grupos, (gráfica no. 3).

El comportamiento de la parasitemia podría explicarse por la presencia de IgM administrada en los sueros de 6 y 10 días, ya que esta inmunoglobulina es la primera que aparece al inicio de una primoinfección, disminuyendo sus niveles alrededor de la segunda semana, lo que coincide con el aumento de la parasitemia en los ratones con suero de 14 días. A pesar de que algunos autores proponen que la IgM no es protectora en esta enfermedad, (3, 4 y 7), no se puede descartar totalmente la posibilidad de que actúe como opsonina, facilitando

así el ataque al parásito.

El aumento de las C.F.P. observado, podría deberse a la presencia de un factor mitogénico de origen plasmódico que actúa sobre dicha extirpe, (11 y 48).

El nivel bajo de anticuerpos se debió a que el parásito presenta gran variabilidad antigénica, lo que provoca que al inicio de la infección se produzca -- cierto tipo de anticuerpos, que varían a medida que progresa la infección y probablemente el antígeno obtenido no correspondía al periodo en el que se obtuvieron los sueros. Además, también cabe la posibilidad de una inmunosupresión en la producción de anticuerpos por efecto de células supresoras, (7 y 11).

De los resultados obtenidos para el sistema de glóbulos rojos de carnero, - podemos ver que los niveles de linfocitos T y de títulos de anticuerpos, están bajos en los ratones tratados con suero problema con respecto al control, (gráficas 7 y 8). sin diferencias entre los tres grupos, para linfocitos T, mientras que para título de anticuerpos se vio una disminución mayor en los ratones con suero de 6 días. Con respecto a las C.F.P. se observó que los cuatro grupos se comportan de diferente manera, sin embargo, no es posible deducir una diferencia significativa, ya que es mayor la variabilidad dentro de los grupos que entre los grupos, (gráfica no. 6)

La disminución de linfocitos T y título de anticuerpos a un antígeno no relacionado como lo fue el glóbulo rojo de carnero, (GRC), nos da un indicio de una inmunosupresión de tipo inespecífica, debida a la presencia de un factor en el suero administrado, que podría tratarse de una linfocina, (7 y 11).

Ahora bien, al hacer una comparación gráfica de los dos ensayos, se observa claramente que los niveles en el título de anticuerpos en los ratones infectados con P. berghei yoelii, (PBV), se encuentran muy por debajo de los niveles en los ratones con GRC, (gráfica no. 9), Esto es fácil de entender, ya que se sabe que en la malaria generalmente se detectan bajos títulos de anticuerpos debido a la inmunosupresión, (7 y 9), por esta misma causa, el efecto inmunosupresor -

del suero problema observado en el sistema de GRC, no fué posible detectarlo - en los ratones con PBY.

En cuanto al % de linfocitos T, puede verse que los valores en el sistema de PBY son más altos que en los ratones tratados con GRC, además, en los primeros no se observa una disminución por efecto del suero problema como sucede en los últimos. Haciendo referencia a lo que algunos investigadores proponen sobre la existencia de un mitógeno de origen plasmódico que actúa sobre células supresoras, (11 y 31), suponemos que este efecto es el que se observa, además, de que si existe dicho factor no es detectable en suero, (gráfica no. 10).

con respecto a las C.F.P., no podemos hacer una comparación (gráfica no. 11), ya que el comportamiento no es homogéneo en los ratones inoculados con GRC.

IX. CONCLUSIONES

- El suero de ratones infectados con Plasmodium berghei yoelii, produjo una inmunosupresión inespecífica sobre la producción de anticuerpos y el % de linfocitos T.
- Los sueros obtenidos de ratones infectados con Plasmodium berghei yoelii, no presentaron diferencias relevantes en su efecto con respecto al día.
- Creemos en la existencia de un mitógeno de origen plasmódico, que actúa sobre células supresoras, no detectable en suero de ratones infectados con Plasmodium berghei yoelii.

Para asegurar lo anterior, se tendría que evaluar las subpoblaciones de linfocitos T mediante sueros específicos, (49), o agregados de inmunoglobulinas, (50).

Para mejorar la determinación del título de anticuerpos, es recomendable obtener el antígeno de la misma serie de ratones a los que se les vaya a cuantificar los anticuerpos, así como fraccionar el antígeno. (40, 50 y 51), y probar todas las fracciones, con el fin de hacer la determinación más específica.

Por otro lado, sería conveniente fraccionar el suero para tratar de detectar la naturaleza de los factores inmunosupresores, mediante ensayos similares a este estudio.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Davidsohn, I *Diagnóstico Clínico por el Laboratorio*. Ed. Salvat. 6a. edición. Barcelona 1979.
- 2.- Craig, F. *Parasitología Clínica*. Ed. Salvat. México 1979.
- 3.- Cruz, O. *Parasitología*. Ed. Méndez Oteo. 2a. edición. México 1981.
- 4.- Rose, N. *Principio de Inmunología*. Ed. C.E.C.S.A. México 1983.
- 5.- Yoshida, N. *Hybridoma produces protective antibodies directed against the sporozoite stage of malaria parasite*. *Science*. 207:71. 1980.
- 6.- Brown, H. *Parasitología Clínica*. Ed. Interamericana. 5a. edición. México - 1985.
- 7.- Gabriel, J. *Specific lysis of Plasmodium yoelii infected mouse erythrocytes with antibody and complement*. *Clin. Exp. Immunol.* 52:129. 1983.
- 8.- Weinbaum, F. *Immunity to Plasmodium berghei yoelii in mice*. II. *Specific and nonspecific cellular and humoral responses during the course of infection*. *J. Immunol.* 121:626. 1978.
- 9.- Deans, J. *Immunology of malaria*. *Ann. Rev. Microbiol.* 37:25. 1983.
- 10.- Lynch, R. *Métodos de Laboratorio*. 2a. Edición. Ed. Interamericana. Mex. 1978.
- 11.- Khansari, N. *Immunosuppression in murine malaria: A soluble immunosuppressive factor derive from Plasmodium berghei infected blood*. *J. Immunol.* 127: 1889. 1981.
- 12.- Waksman, B. *On soluble mediators of immunologic regulation*. *Cell. Immunol.* 21: 161 1976.
- 13.- Hudson, K. *Immunosuppression, high IgM levels and evasion of the immune response in murine trypanosomiasis*. *Nature* 264: 256. 1976.

- 14.- Clark, I. Activation of macrophages in malaria. *Infect. Immuno.* 32:1058.- 1981.
- 15.- Loose, L. Basic research in malaria. *Proc Helminth Soc. Special Issue.* - 39:484. 1972.
- 16.- Bathia, A. Cellular and humoral immune responses in rats experimentally-infected with Plasmodium berghei. *Indian J. med. Res.* 74:506.1981.
- 17.- Thoogsuan, S. Antibodies in malaria. *J Parasitol.* 64:1050. 1978 .
- 18.- Fudenbergh, H. *Inmunología Clínica.* Ed. El Manual Moderno. México 1981.
- 19.- Cohen, S. Gammaglobulin and acquire immunity to malaria. *Immunity to -- Protozoa..* Ed. Garnham P.C.C. Pierce. New York 1963.
- 20.- Epstein, N. Monoclonal antibodies against a specific surface determinant on malaria. (Plasmodium knowlesi), merozoites bock erythrocyte invasion. *J Immunol.* 127:212. 1981.
- 21.- Zuckerman, A. Current status of the immunology of blood tissue protozoa. *II. Plasmodium.* *Exp. Parasitol.* 42:374. 1977.
- 22.- Capron, P. Alterations de la response immune au course desinfection. *Ann. Bull.* 31:243. 1977 .
- 23.- Brown, K. The binding of antibodies from Plasmodium berghei-infected -- ratos to isoantigenic and parasite-specific antigenic sites on the surfa ces of infected reticulocytes. *Parasit. Immunol.* 4:21. 1982.
- 24.- Weinbaum, F. Immunity to Plasmodium berghei yoelii in mice. Specific and no specific cellular and humoral responses during the course of infec -- tion. *J. Immunol.* 121:629. 1978.
- 25.- Correa, M. Suppressive activity of splenic adherent cells from Plasmo -- dium chabaudi infected mice. *J. Immunol.* 125:749. 1980.
- 26.- Newsletter. Special Programme for research and training in tropical dise as. UNPD/WORLD/BANK/WHO. 21:7 .1984.
- 27.- McBride, J. 1977. Immunosuppression in murine malaria. I. Responde to ty

- pe III pneumococcal polysaccharide. *Immunol.* 32:635. 1977
- 28.- Información estadística. Sector Salud y Seguridad Social. Cuaderno no. 3. S.P.P. Instituto Nacional de Estudios Geográficos e Informática. México - 1984.
- 29.- Cohen, S. Gamaglobulin and acquired immunity to human malaria. *Nature.* - 192:733. 1961.
- 30.- Periódico "El debate" de los Mochis, Sin. Enero 4 de 1985.
- 31.- Greenwood, B. Immunodepression in murine malaria. General characteristics *Clin. Exp. Immunol.* 8:467. 1971.
- 32.- Periódico "Ovaciones" de la tarde del Distrito Federal. Junio 10 de 1985.
- 33.- Palacios, S. Investigación del efecto terapéutico del parincipio amargo - de Tabebuia rosea sobre Plasmodium berghei yoelii. Tesis U.N.A.M. Facultad de Química. México 1983.
- 34.- Vanderberg, J. Protective immunity produced by the injection of X-irradiated sporozoites of Plasmodium berghei. IV. Dose response, specificity and humoral immunity. *J. Parasito.* 56:350. 1968.
- 35.- Nussenzweig, R. Futher studies on the Plasmodium berghei-Anopheles stephensi rodent system of mammalian malaria. *Milit. Med.* 134:1176. 1969.
- 36.- Dennis, E. Insolation of Plasmodium knowlesi merozoites using polycarbonates. *Parasitol.* 71:475. 1975.
- 37.- Holder, A. Immunization against blood-stage rodent malaria using purified parasite antigens. *Nature.* 294:26. 1981.
- 38.- Freeman, R. Protective monoclonal antibodies recognising stage-specific-merozoite antigens of a roden malaria parasite. *Nature.* 284:366. 1980.
- 39.- Danforth, H. Production of monoclonal antibodies by hybredomas-sensitized to sporozoites of Plasmodium berghei. *J. Parasitol.* 68:1029. 1982.
- 40.- Aikawa, M. The protective antigen of malaria sporozoites, (Plasmodium berghei). Is a differenciacion antigen. *J. Immunol.* 126:355. 1981.

- 41.- Lowry, H. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*-
193:256. 1951.
- 42.- Jandl, J. The agglutination and sensitization of red blood cells by meta-
llic cations: Interactions between multivalent metals and the reds cell-
membran. *British. J.:Haemat.* 3:19. 1957.
- 43.- Jerne, N. Plaque formation in agar by single antibody producing cell. --
Science. 140:405. 1963.
- 44.- Manual de prácticas de Posgrado del Departamento de Inmunología de la E.
N.C.B., I.P.N. México 1978.
- 45.- Muller, J. Nonspecific acid esterase activity: a criterion for differen-
tiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes. *Eur. J. Immunol.* 5:
270. 1975.
- 46.- Ranki, A. Identification of mouse T and B lymphocytes from cytocentri-
fuged cell smears. *Clin. Exp. Immunol.* 26:632. 1976.
- 47.- Daniel, W. Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la -
salud. Editorial Limusa. México 1977.
- 48.- Gupta, S. Subpopulations of human T lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 30:
222. 1977.
- 49.- Santoro, F. Structural similarities among the protective antigens of --
sporozoites form different special of malaria parasites. *J. Biol. Chem.*-
5:3345.1980.
- 50.- Potocnjak, P. Monovalent fragmentes, (fab), of monoclonal antibodies to-
a sporozoites surface antigen, (PB 44), protect mice against malaria in-
fection. *J. Exp. Med.* 151:1504. 1980.
- 51.- Ronald, N. Antigen-specific T cell-mediated suppression. *J. Exp. Med.* --
151:1245. 1977.