

38
2 ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
Zaragoza

AISLAMIENTO DE PROTEINAS ANTIGENICAS DE
PLASMODIUM YOELLII YOELLII EN UN MODELO
DE PALUDISMO EN ROEDORES

T E S I S

Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACOBIOLOGO
p r e s e n t a

Martha Ofelia Peña Pérez

México, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1989



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

I N D I C E

	Página
I. INTRODUCCION	
1.0 Definición	1
2.0 Características	1
2.1 Epidemiología	2
2.2 Cuadro clínico	3
2.3 Diagnóstico	4
2.4 Tratamiento	5
2.5 Prevención	5
3.0 Ciclo biológico	5
3.1 Características de especies en humano	10
4.0 Especies en humano y en roedor	11
5.0 Inmunología de la malaria	12
6.0 Antecedentes	14
6.1 Breve historia de la inmunología	14
6.2 Respuesta inmune celular	14
6.3 Respuesta inmune humoral	15
6.4 Complemento	16
6.5 Fagocitosis	18
II. FUNDAMENTACION DEL TEMA	20
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
IV. OBJETIVOS	22
V. HIPOTESIS	23
VI. MATERIAL Y METODOS	24
1.0 Métodos	24
2.0 Equipo	29
3.0 Material	30
4.0 Reactivos	32
5.0 Preparación de soluciones	33
6.0 Material biológico	34

VII.	RESULTADOS	35
1.0	Gráficas	37
VIII.	DISEÑO ESTADISTICO Y ANALISIS DE RESULTADOS	43
1.0	Análisis de datos	44
IX.	ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS	45
X.	CONCLUSIONES	47
	ANEXO I - ABREVIACIONES	48
	ANEXO II - GLOSARIO	49
XI.	BIBLIOGRAFIA	54

I. INTRODUCCION

1. DEFINICION.

El paludismo es un padecimiento endémico en territorios tropicales y subtropicales producido por un parásito in-tracelular obligado, que pertenece a la clase Sporozoa, orden Haemosporidia, familia Plasmodiidae, del género - Plasmodium, cuyo huésped intermediario es el hombre y - otros vertebrados. (4)

Sus huéspedes definitivos son 2 moscos del género Anopheles: pseudopunctipennis, Aztecus albimanus quadrimaculatus.

2. CARACTERISTICAS

La enfermedad llamada paludismo malarico es común en el hombre, se transmite por picaduras de moscos infectados del género Anopheles, por transfusiones de donadores palúdicos, material quirúrgico contaminado y excepcionalmente por placenta. (1-3)

El paludismo se caracteriza porque produce debilidad y anemias crónicas; la forma más grave es la producida -- por P. falciparum (terciaria maligna). Las manifestaciones del paludismo son varias: Habitualmente los glóbulos rojos y la hemoglobina disminuyen paralelamente. Puede haber macrocitosis a consecuencia del mayor número de reticulocitos y por el crecimiento de los glóbulos rojos infectados (P. vivax y P. ovale). En las fases activas, existen signos de hemólisis (bilirrubina -

Indirecta del suero elevada, metahemalbuminemia, hemosi denuria, etc.). En las formas crónicas, la cifra de leucocitos suele ser baja, pero aumentan muchas veces los monocitos. Se presenta leucocitosis después de los escalofríos. Los órganos muestran gran cantidad de pigmento palúdico. Hay hepato y esplenomegalia, y se encuentran parásitos y pigmento en las biopsias del bazo.

El huésped actúa como intermediario y reservorio, y realiza dos ciclos esquizogónicos, y el exocitrocítico y el eritrocítico. El ciclo sexuado se inicia en el hombre, pero se realiza en mosquitos del género *Anopheles*, los cuales siendo huéspedes definitivos, funcionan como transmisores. Sólo la hembra es hematófaga y por lo tanto la transmisora. (4-5).

2.1 EPIDEMIOLOGIA

La malaria está distribuida mundialmente, en zonas tropicales, lo que provoca una de las causas principales de muerte. Por eso se está planteando la posibilidad de erradicarla, mediante la suspensión total de la transmisión durante un año desapareciendo la infección en los reservorios, así los mosquitos ya no pueden infectarse al picar al hombre. Esto puede ser posible con el uso de insecticidas residuales del tipo del DDT.

En México los principales transmisores son:

Anopheles pseudopunctipennis, *A. Albimanus*, *A. quadrimaculatus*, *A. aztecus*.

La dinámica de la transmisión depende de aspectos ecológicos: altura sobre nivel del mar, topografía del terreno, lluvias, salinidad y otras características de los criaderos. También es necesario tratar de evitar la transmisión extradomiciliaria cuando se suspende ésta con el uso de insecticidas residuales.

El paludismo se puede transmitir por medio de una transfusión sanguínea, por usar jeringas no estériles, así como también por vía transplacentaria (en los últimos días de embarazo o durante el parto).

2.2 CUADRO CLINICO

Se presentan calosfríos, fiebre y sudación en un periodo de 2 a 4 horas, después el paciente vuelve a su estado normal para presentar otro acceso al día siguiente, al tercer o cuarto día.

P. vivax y P. ovale producen fiebre terciaria similar o sea el primer y el tercer día, siguiendo la periodicidad.

P. malariae produce fiebre cuartana con intervalos apiréticos.

P. falciparum, produce fiebre más continua, llamada subterciaria.

Durante el ascenso febril puede haber náusea, vómito y cefalea. El cuadro en general puede durar 2 ó 3 semanas, difícilmente dura más de un mes. Al final de la primera semana aparece la esplenomegalia, que aumenta de tamaño notoriamente, al finalizar el tratamiento disminuye de tamaño, pero no en su totalidad.

También puede presentarse hepatomegalia, las pruebas funcionales se alteran, pero vuelven a la normalidad al desaparecer la parasitemia.

Un problema que siempre se presenta en el paludismo, es la anemia hemolítica, pero dependiendo del Plasmodium es la gravedad de ésta. Se observa leucocitosis y desviación a la izquierda de los neutrófilos; finalmente aparece monocitosis.

2.3 DIAGNOSTICO

El diagnóstico se realiza rápidamente mediante la observación microscópica de frotis sanguíneo o de la gota gruesa el primero se puede determinar en 20 minutos y el segundo en unos 5 minutos.

Cuando el cuadro febril está empezando o desapareciendo la parasitemia disminuye notablemente, es nula, por lo que es conveniente determinarla posteriormente, 1 ó 2 días después. También se pueden realizar cortes histológicos del bazo o del hígado, en las células del sistema reticuloendotelial, se encuentra pigmento malarico (para determinar principalmente si el paciente tuvo paludismo).

La parasitemia alcanzada dependerá notablemente de la especie de Plasmodium:

P. malariae parasitemias hasta de 30 000 por mm^3 de sangre.

P. vivax parasitemias hasta de 50 000 por mm^3 de sangre.

P. falciparum parasitemias hasta de 200 000 por mm^3 de sangre.

2.4 TRATAMIENTO

Para destruir formas eritrocíticas (tratamiento del cuadro clínico), emplear:

Amodiaquina (Camoquina), Cloroquina (Aralón, Resoquina, Nivaquina), Mepracrina (I'etoquina, Atebrina), Quina, Diaminofenil-sulfa, Primetamina (Daraprim), Primaquina (Neo-quipenyl). La asociación de medicamento ha mostrado potenciación que permite disminuir la dosis: - Sulfametopiracina-pirimetamina (Daraprim), Quina-Tetraciclina, Amodiaquina-Tetraciclina, Sulfadimetoxina-Pirimetamina-Primaquina.

2.5 PREVENCIÓN

Protegerse de los mosquitos, utilizando telas de alambre en puertas y ventanas, emplear insecticidas residuales en paredes y muebles.

No emplear la sangre de donadores que hayan padecido paludismo en los últimos 4 años.

3. CICLO BIOLÓGICO.

La fase exoeritrocítica en humanos del Plasmodium se realiza en las células hepáticas; por división del núcleo del parásito, se originan acúmulos de varios miles de criptozoitos que son liberados al romperse la célula huésped. Los criptozoitos pueden invadir nuevas células hepáticas para continuar el ciclo exoeritrocítico o invadir los eritrocitos.

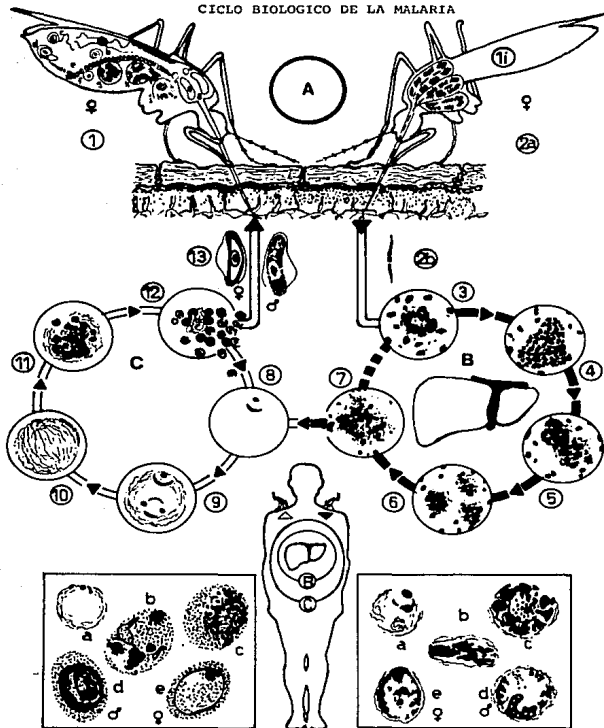
Se denomina ciclo preeritrocítico al originado por los esporozoítos inoculados por el mosquito transmisor y que posteriormente van a dar origen a las primeras formas eritrocíticas, esto sucede durante el periodo de incubación del padecimiento. El ciclo exoeritrocítico NO produce manifestaciones clínicas. (4, 6, 10)

P. falciparum carece de formas paraeritrocíticas, no pudiendo causar recaídas después de haberse destruido todas las formas eritrocíticas, cuya longevidad es de un año, tiempo en el cual pueden existir parasitemias extraordinariamente bajas que no originan molestias, o periodos llamados recrudescencias, que al aumentar la parasitemia producen las manifestaciones clínicas. (4, 6)

El ciclo eritrocítico es el que produce las manifestaciones clínicas de la malaria, se completa en 48 a 72 horas, dependiendo de la especie de Plasmodium, (diferencias morfológicas). (6, 10)

CICLO BIOLÓGICO DE LA MALARIA

7.



I Plasmodium vivax (Malaria tertiana)

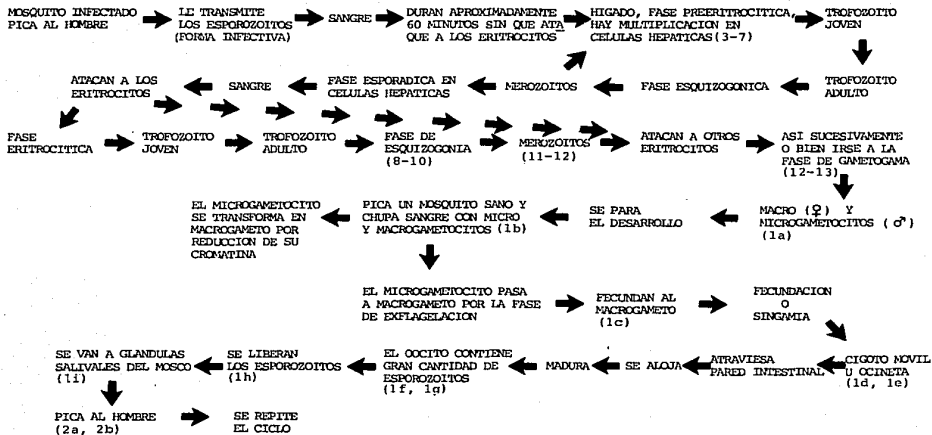
II Plasmodium malariae (Malaria quartana)

- a) esquizonte juvenil en forma anular
- b) esquizonte polinuclear
- c) estadios finales de la esquizogonía (denominada mórula (I) o roseta (II))
- d) gametocitos masculino
- e) gametocitos femenino

CICLO BIOLÓGICO DE LA MALARIA
(Coloración por GIEMSA)

- A Desarrollo sexual (Gamagonia) en la hembra del mosquito Anopheles**
- 1 a gametocito ingerido con la sangre humana
 - b gametos, azul = célula femenina (macrogameto)
 rojo = desarrollo de los microgametos, se denomina exflagelación.
 - c fecundación
 - d cigoto (forma en retorta)
 - e cocineto
 - f oocisto (ooquiste)
 - g esporocisto (esporoquiste)
 - h esporocisto maduro a punto de estallar
 - i esporozoítos en las células de la glándula salival
 - 2 a el Anopheles transmite esporozoítos por la picadura
 - b esporozoíto aislado
- B Desarrollo preeritrocítico en la célula hepática:**
- 3-7 diferentes estadios de la denominada forma endotelial o tisular en el hígado
- C Desarrollo eritrocítico (esquizogonia)**
- 8,9 esquizontes ("estadios anulares") del agente causal de la malaria tropical
 - * 10 esquizonte juvenil excéntrico; eritrocito con las denominadas manchas de Maurer
 - 11 estadio en mórula con unos 20 merozoítos
 - 12 merozoítos liberados invaden a otros eritrocitos, y algunos vuelven a convertirse en esquizontes, otros en gametocitos
 - 13 gametocitos (en forma semilunar) (véase I y II, d-e)

CICLO BIOLÓGICO



CARACTERISTICAS GENERALES DE ESPECIES DE PLASMODIUM EN HUMANO

<u>CARACTERISTICA</u>	<u>P. VIVAX</u>	<u>P. MALARIAL</u>	<u>P. FALCIPARUM</u>	<u>P. OVALE</u>
TROFOZOITO JOVEN FORMA DE DISCO	2-3 M	2 M	1-1.5 M	2 M
INVASION MULTIPLE EN LOS ERITROCITOS	RARO	RARO	FRECUENTEMENTE 4 A 5 TROFOZITOS POR ERITROCITO	RARO
CICLO ERITROCITICO	48 HRS.	72 HRS.	48 HRS.	48 HRS.
FIEBRE	TERCIARIA BENIGNA		TERCIARIA MALIGNA	TERCIARIA BENIGNA
TROFOZITO MADURO	PRESENTE EN SANGRE	PRESENTE EN SANGRE	NO PRESENTE EN SANGRE, SOLO EN VISCERAS	PRESENTE EN SANGRE
CARACTERISTICA DE LOS ERITROCITOS	GRANOS DE SCHUFFNER	GRANOS DE ZIEMAN	MANCHAS DE MAUREN	GRANOS DE SCHUFFNER
MEROZOITOS	16-18	10	16-24	8-9
GAMETOCITOS	OVALES	OVALES	FORMA DE PLATANO	OVALES
PIGMENTO	PARDO	PARDO OSCURO O NEGRO		PARDO VERDUSCO

El ciclo sexuado se inicia en el hombre con la formación de gametocitos, que tampoco son responsables de manifestaciones clínicas. Los gametocitos aparecen cuando menos una semana después de iniciado el ciclo eritrocítico (*P. falciparum*, los gametocitos aparecen con una disminución de las formas esquizogónicas, que después llegan a desaparecer, cuando los gametocitos son abundantes). (4)

Algunos mosquitos del género *Anopheles* ingieren gametocitos cuando pican a personas portadoras y en su estómago se termina la fase gametogónica del ciclo sexuado, al producirse los oocinetos, continua la fase esporogónica con la formación de oocistes en la pared del estómago, los cuales liberan esporozoitos, que invaden las glándulas salivales y son inoculados a un nuevo huésped vertebrado mediante la saliva del mosquito en el momento de la picadura. (4)

4. ESPECIES EN HUMANO Y EN ROEDOR.

Las especies de *Plasmodium* en humano son:

- *Plasmodium falciparum*
- *Plasmodium vivax*

En menor proporción están:

- *Plasmodium ovale* y
- *Plasmodium malariae*

Excepcionalmente se han reportado casos de malaria producida por:

- *Plasmodium cynomolgi* (agente etiológico en antropoides) (1, 11, 12)

Especies que producen paludismo en roedores:

- P. berghei
- P. yoellii
- P. knowlesi
- P. chabaudi
- P. inui
- P. berghei yoellii
- P. yoellii yoellii

(1, 11, 12)

5. INMUNOLOGIA DE LA MALARIA

Características inmunológicas principales:

- Producción de IgG contra merozoitos, después de varias infecciones.
- Inmunoglobulinas altas en suero en zonas endémicas por paludismo.
- Inmunosupresión a otros Ag durante el curso de la enfermedad.
- Variación antigénica en los parásitos.
- Producción de varios Ac humorales, y aumento de la actividad del sistema reticuloendotelial.
- Estado complejo de inmunidad parcial inducida después de muchos años y múltiples exposiciones en las que intervienen características humorales y celulares, específicas e inespecíficas, hereditarias y adquiridas, así como el efecto de una infección actual de bajo nivel en el desafío de una infección: Premunitorio. (3, 5)

Existe una disposición de respuesta humoral en el huésped producida por los merozoítos de los eritrocitos, de mostrado por las reacciones de fijación del complemento, de precipitación, de aglutinación y del anticuerpo fluorescente. (5)

Se presentan recaídas sintomáticas o verdaderas en todos los casos de paludismo, que varía de 2 a 30 años para presentarse: tanto la resistencia adquirida como la innata, la específica o la inespecífica al paludismo, - son influidas por un número de características genéticas que reflejan una fuerte presión selectiva en las zonas que poseen combinaciones específicas mosquito-hombre - Plasmodium. La resistencia se desarrolla años después del comienzo de la enfermedad grave en todos los niños de más de 3 meses de edad. La protección pasiva inicial se presenta debido a la IgG materna transplacentaria. - Se considera que la respuesta inmunitaria que proporciona la protección es la producción de Ac (anticuerpo) independientes del complemento que inhiben la entrada de merozoítos a los eritrocitos del huésped. (5)

Mediante diversas adaptaciones protectoras (por Ej. variabilidad antigénica), los parásitos sobreviven, y por un grado limitado de destrucción eritrocítica, provocan sólo una respuesta benigna del huésped. Por lo tanto, - ocurren respuestas del huésped de protección innata y adquirida (específica e inespecífica) y contra adaptaciones del parásito a estas características del huésped. - Además la biología del vector y la fluctuación de su población, y la respuesta del parásito a las variaciones de las condiciones ecológicas. Todo se combina para determinar el equilibrio huésped-parásito-ambiente del --

cual se forman los numerosos patrones de paludismo humano que existen. (3, 5)

6. ANTECEDENTES.

6.1 Breve historia de la inmunología.

La inmunología constituye una rama relativamente joven de la ciencia de la medicina. Algunos de los avances más importantes fueron posibles gracias a la introducción de técnicas químicas para la elucidación de la naturaleza de los antígenos y de los anticuerpos. El término inmune deriva del latín *immunis*, esto es, exento de "cargos" (impuestos, pagos). Sin embargo, durante casi un siglo, el término inmunidad ha denotado la resistencia al posible ataque por algún agente infeccioso. La primera inmunización efectiva, aunque todavía empírica, fue llevada a cabo por Edward Jenner, un médico inglés (1749-1823), que observó que las personas que se curaban después de alguna infección con la viruela del hombre. En 1796 se introdujo la vacunación con la viruela de la vaca como medio para proteger contra la humana. (3, 5)

Louis Pasteur (1822-1895) y sus colaboradores dieron el enfoque científico en sus estudios cuando investigaron la posibilidad de proteger contra la infección mediante inmunizaciones con cepas atenuadas de microorganismos.

6.2 Respuesta inmune celular.

En 1882, en Messina, el zoólogo ruso Elie Metchnikoff -- (1845-1916) estudió el papel de las células móviles de --

la larva transparente de una estrella de mar en la protección contra algún intruso extraño. El introdujo una espina de rosa en el interior de estas larvas y observó que algunas horas después la espina estaba rodeada por células móviles, demostró que los leucocitos se habían engullido a los microorganismos. Este experimento puede considerarse el punto de partida de la inmunología celular, Metchnikoff observó que la fagocitosis se incrementaba en forma notoria en los animales que estaban recuperándose de alguna infección o después de la vacunación con una preparación de estos microorganismos, también demostró la existencia de 2 tipos de leucocitos circulantes capaces de fagocitar: Los polimorfonucleares y los macrófagos. En su opinión, la inflamación daba por resultado un proceso de digestión enzimática debido a la ingestión del agente nocivo por los fagocitos móviles. (3,5)

6.3 Respuesta inmune humoral.

Fodor en 1886 fué, al parecer, el primero que observó la inmunidad en ausencia de células en el efecto directo de un suero inmune sobre los microorganismos durante sus estudios en bacilos de ántrax.

Behring y Kitasato (1890) demostraron la actividad antitóxica neutralizante de sueros de animales inmunizados con toxina diftérica o tetánica, lo cual se consideró como la primera prueba de inmunidad humoral. (13, 14)

El fenómeno de Pfeiffer descrito por Pfeiffer e Isaëff (1894) demuestra un importante mecanismo humoral de defensa: Los vibriones del cólera inyectado en el peritoneo de cobayos previamente inmunizados pierden su movili

dad se aglutinan, ya no se tiñen y son fagocitados por los leucocitos y lisados en ausencia de células.

Jules Bordet (1870-1961) en 1898 descubrió que tanto la bacteriólisis como la lisis de los eritrocitos requerían de 2 factores: uno que denominó el sensibilizador, era - termostábil y específico; el otro que llamó alexina era termolábil e inespecífico, este último pensaba que poseía la actividad enzimática y que constaba de diversos componentes; fué denominada por Metchnikoff como citasa y complemento por Ehrlich. Posteriormente se estableció que los factores humorales se originaban en las células linfoides. Durante este periodo, el término antígeno fué - introducido para designar cualquier sustancia (entonces principalmente microorganismos o células) capaz de introducir alguna reacción contra sí misma y el término ilógico de anticuerpo (siendo ambos "anti") para designar el factor presente en el suero que poseía esta actividad.

(3, 5)

6.4 Complemento.

El sistema del complemento (C), es el mediador humoral - primario de las reacciones antígeno-anticuerpo, consiste de cuando menos 20 proteínas plasmáticas, química e inmunológicamente distintas capaces de actuar de manera recíproca una con otra, con el anticuerpo y con las membranas celulares. Cuando se activa el sistema, las reacciones generan una actividad biológica: desde la lisis de - diferentes clases de células, bacterias y virus, hasta la mediación directa de los procesos inflamatorios, también puede aislar otros sistemas efectores humorales y - celulares y conseguir la participación de ellos inducien

do la liberación de histamina de las células cebadas, la migración dirigida de los leucocitos, la fagocitosis y - la liberación de los constituyentes lisosómicos de los - fagocitos. (5)

En el sistema del complemento las protefnas individuales se encuentran normalmente en la circulación como moléculas precursoras inactivas, que comprenden el 15% (p/p) - de la fracción globulínica del plasma (C_1 , C_2 , C_3 , etc., properdina, factor B, factor D, etc.). Cada componente es activado sucesivamente en condiciones apropiadas para que progrese una reacción del C. Por lo tanto la activación permite a las protefnas volverse miembros de un sistema funcional integrado, en el cual actúan recíprocamente. Durante el proceso de activación se forman enzimas: C_{1s} , factor B. (5, 15)

Existen 2 mecanismos paralelos, o vías, pero totalmente independientes que conducen a la activación de la porción terminal, biológicamente importante, de la serie de reacciones del complemento: las vías clásica y alternativa o de la properdina, las cuales son sustancias diferentes. Las 2 vías de activación convergen en el punto medio del sistema del complemento y el resto de la serie de reacciones (de C_5 a C_9), es común para ambas vías. (15)

La porción terminal también puede ser activada por enzimas séricas y celulares no pertenecientes al sistema. - (enzimas parecidas a la tripsina que activa C_3 ó C_5 son: enzimas fibrinolítica plasmina y ciertas enzimas lisosómicas). (5)

6.5 Fagocitosis.

Elie Metchnikoff fué el primero en observar que los leucocitos "engullían" a los microorganismos durante la respuesta inflamatoria, denominando a este proceso: fagocitosis. Los fagocitos son: leucocitos polimorfonucleares (células circulantes que emigran a los sitios de inflamación) y los fagocitos mononucleares (circulan en la sangre o se encuentran fijos en los tejidos y también se acumulan en los sitios de inflamación). Ambos tipos de células son capaces de reconocer e ingerir partículas, mediante sus receptores en la superficie celular y de digerir tales substancias dentro de sus lisosomas. Los fagocitos mononucleares muestran mucho mayor diversidad funcional y de respuesta, que es el resultado de la maduración progresiva de estas células a partir de sus precursores en la médula ósea, sus experiencias con la endocitosis y su interacción con los linfocitos T. (5)

CELULAS DEL SISTEMA FAGOCITICO MONONUCLEAR EN LOS TEJIDOS NORMALES E INFLAMADOS.

células precursoras (comprometidas)	médula ósea
monoblastos	" "
promonocitos	" "
monocitos	" "

macrófagos

estado normal

histiocitos
 macrófagos alveolares
 células de Kupffer
 macrófagos pleurales y peritoneales
 osteoclastos
 células microgliales
 células sinoviales tipo A
 macrófagos libres y tisulares fijos

tejidos

tejido conjuntivo
 pulmón
 hígado
 cavidades serosas
 huesos
 sistema nervioso
 articulaciones
 bazo, ganglios linfá-
ticos, médula osea y
 otros tejidos.

inflamación

macrófagos exudados
 macrófagos activados
 macrófagos exitados
 células epitelioides
 células gigantes multinucleares (tipos de
 Langrhans y tipo de cuerpo extraño)

cualquier tejido

" "
 " "
 " "
 " "

Durante la fagocitosis, las partículas se fijan a receptores inespecíficos de membrana después son rodeadas por la membrana celular, formando vesículas fagocíticas. La fagocitosis en general puede dividirse en 5 etapas distintas y temperamentalmente secuenciales: 1. movilidad, 2. reconocimiento, 3. ingestión, 4. desgranulación, y 5. destrucción intracelular. (5)

II. FUNDAMENTACION DEL TEMA

Dentro de las actividades de los programas de lucha contra el paludismo el uso de rociamientos intradomiciliarios con insecticidas residuales, ha sido una acción considerada como preventiva. Sin embargo, la utilización de los pesticidas y el desarrollo industrial de los mismos en el combate a las plagas agrícolas ha producido resistencia simple y múltiple de los anofelinos a los insecticidas que se usan en el área de la salud pública. Los casos de paludismo se presentan generalmente en los meses correspondientes al periodo de lluvias (junio a diciembre), en el que se registran alrededor de 80% de los enfermos (sp México). (16, 17 y 18)

La malaria resurge de nuevo, su agente causal el parásito Plasmodium ha desarrollado resistencia a las drogas y el vector del parásito la hembra del mosquito Anopheles, se está volviendo resistente al DDT y otros insecticidas. Para resultar eficaz, la posible vacuna debe instar al sistema inmunitario a que fabrique, anticuerpos que ataquen y neutralicen al parásito. En regiones endémicas los enfermos con infección grave o crónica, o bien que estén sometidos a reinfección del mosquito desarrollan abundantes anticuerpos contra el parásito, pero son pocas las que adquieren inmunidad protectora. La razón es que Plasmodium, aun en los breves periodos que es susceptible al Sistema Inmune muestra tendencia a evadir la respuesta inmunitaria. Es de esperar que, en un futuro no lejano, puedan utilizarse vacunas preparadas por ingeniería genética y otras armas moleculares, para que se logre erradicar la malaria. - (19)

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se han realizado varios intentos para producir anticuerpos específicos contra proteínas antigénicas de los diferentes estadios del Plasmodium. Se han detectado varias proteínas antigénicas en Merozoítos de roedores susceptibles de utilizarse como estimulantes de la respuesta inmune contra la infección de PYY. Se han reportado respuestas inmunes protectoras contra proteínas de la superficie. (7) Así como inhibición parcial de la invasión al eritrocito por la producción de anticuerpos contra glucoproteínas específicas de la superficie del merozoito. (2)

La inmunización de roedores con algunas proteínas específicas de Merozoítos con peso molecular de 235 000, proteínas de esquizonte con P.M. de 30 000 así como sus derivados - proteolíticos, originan protección contra el PYY. (7, 8)

Por tanto es posible separar y purificar a partir de un antígeno soluble proteínas de Merozoítos de PYY con capacidad antigénica y observar su actividad protectora in vivo. (15, 20, 21)

IV. OBJETIVOS

- 1) Obtener un antígeno soluble contra Plasmodium yoellii yoellii. (PYY).
- 2) Desarrollar un esquema de inmunización contra Plasmodium yoellii yoellii usando las fracciones antigénicas obtenidas por filtración molecular.
- 3) Determinar el P.M. de las fracciones antigénicas.

V. H I P O T E S I S

El fraccionamiento adecuado de un sonicado de merozoftos de *Plasmodium yoelli yoellii* puede brindar la fracción - antigénica esperada.

Las hipótesis se plantean según la metodología estadística propuesta por Neyman y Pearson, que consisten en suponer un efecto nulo (H_0 = hipótesis nula) y una donde se supone un efecto (H_a = hipótesis alterna). (23)

H_0 : No existe diferencia entre las fracciones sonicadas de merozoftos sometidas a filtración molecular para producir anticuerpos en ratones CEA.

H_a : Existe diferencia entre las fracciones sonicadas de merozoftos sometidas a filtración molecular - para producir anticuerpos protectores en ratones CEA.

VI. MATERIAL Y METODOS

VI.1 METODOS

1. Inoculación de Plasmodium: Intraperitoneal.

Determinación de la cantidad de C.R.P.: Se prueban los inóculos de 1.5×10^6 y 1×10^6 eritrocitos infectados en grupos de 5 ratones, determinándose diariamente el porcentaje de parasitemia.

Obtención de sangre de ratones: Se realiza una punción cardiaca por apertura de caja torácica, agregando SSC para evitar que se coagule.

Porcentaje de parasitemia: Se realizan frotis sanguíneos de cada ratón y se tiñen con Giemsa. 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 el parásito, lo que permite obtener un conglomerado de este, que se disgrega por la emisión de ondas sonoras de alta intensidad: sonicación.

2. Tinción de Giemsa: Colocar una pequeña gota de sangre, de una muestra fresca con anticoagulante, en un extremo de un portaobjetos limpio. Utilizando el borde de un segundo portaobjetos, extiéndase la gota de sangre a lo largo del portaobjetos con un movimiento uniforme. Los frotis deben fijarse durante 3 minutos en alcohol metílico. Luego se secan y sumergen en colorante Giemsa di-

luido durante 15 minutos a una hora. Luego se lavan en agua destilada y se seca al aire. (2)

- 3.- Obtención de sangre de ratones parasitados (pase): Se inoculan 30 ratones, sucesivamente con 5×10^5 G.R.P., y diariamente se realizan frotis para cuantificar parasitemia, cuando se obtenía el 60% de ésta, se sacrifican los ratones para obtener G.R.P. y para el mantenimiento de la cepa, se pasa por vía intraperitoneal 1 ml de sangre parasitada diluida 1:10 con S.S.I.
- 4.- Obtención de Plasmodium yoelli yoelli: A 30 ratones se les inocula 5×10^5 G.R.P., chequeando la parasitemia diariamente, hasta obtener el 60%, extraer sangre y resuspender en S.S.C., se centrifuga a 2500 rpm por 5 minutos. Lavar primero con S.S.C. y 2 veces más con S.S.I., el paquete se resuspende con S.S.I. 5 veces del volumen, adicionar 1/10 partes del volumen total de saponina -- (60 mg/ml) preparada al momento en PBS: pH=7.2, M=0.11, agitar cuidadosamente en hielo por 30 minutos, centrifugar a 2500 rpm por 20 minutos (5000 rpm X 10 min., 10000 rpm X 5 min.). Desechar el sobrenadante. El paquete se lava 3 veces con SSI a 2500 rpm por 20-30 minutos. - Resuspender en la mínima cantidad de SSI (aproximadamente 1 ml). El paquete de precipitados corresponde a los Pyy desnudos, realizar frotis y teñir con Giemsa.
- 5.- Obtención del antígeno de PYY sonicado: El paquete de PYY con SSI, se centrifuga y se desecha el sobrenadante (S.N.) y se resuspende en PBS; se sonica durante 15' a

media intensidad. Cuantificar las protefmas del antige no por el método de Lowry y ajustar a una concentración de 2 mg/ml con SSI.

- 6.- Determinación de protefmas, Método de Lowry: El cobre en solución alcalina forma un complejo de color azul -- con las protefmas, el cual absorbe a 600 nm. La intensidad del color es proporcional a la concentración de -- protefmas presentes. (22)

TECNICA: Se realiza una curva patrón colocando una serie de 10 tubos que contengan solución de ovoalbumina - en concentraciones de 50, 100, 150 ... 500 μ g por ml., (a partir de una solución de 500 μ g/ml. en SSI). El -- blanco se hace con un ml. de SSI. En otro tubo se colo ca 1 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 minutos a temperatura am biente. Se adiciona 0.1 ml. del reactivo de Folin-Cio- calteu y se deja a temperatura ambiente durante 30 min., agitando ocasionalmente. Se lee en un espectrofotóme- tro a 600 nm.

- 7.- Sensibilización de Glóbulos rojos de ratón (GRR) con an- tigeno: El mecanismo por el cual el cloruro crómico pe ga el antígeno al eritrocito es aun desconocido. TECNI CA: Se colocan 100 microlitros de paquete de glóbulos rojos de carnero (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 minutos a temperatura am

biente. 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.

- 8.- ACTIVACION DEL SEPHADEX A TEMPERATURA AMBIENTE (TA): Activación del S G-100: Pesa la cantidad necesaria para empaquetar la columna, se hidrata 80 hrs. a T.A., se eliminan las burbujas con presión reducida. Se empaqueta la columna evitando la formación de burbujas de aire. - Calibración de la columna: Se hace una mezcla de Proteínas de (PM) conocido: Hemoglobina (Hb), citocromo C (CC), y albúmina de huevo, y azul de dextrán.

Se mide el volumen de exclusión y después se lee a 280 y 540 nm, la absorción de las proteínas se grafica: -- log PM vs. fracción.

- 9.- Fragmentación del antígeno del PYY (Ag de PYY): Pasar por la columna de S G-100 previamente calibrado con proteínas de PM conocido el Ag de PYY sonificado anteriormente y recoger fracciones de 1 ml cada una.

- 10.- Evaluación de los Ag fraccionado: Inmunizar previamente ratones "limpios" con 0.1 ml. de cada una de las fracciones antigénicas y retarlos a los 3 días con 1 ml. de inóculo viable de PYY procedente de un ratón con 40% de parasitemia. Cuantificar parasitemia diariamente contra los controles de GRC y SSI.

- 11.- Quantificación de la Hb, Técnica de la cianometahemoglobina: La hemoglobina es transformada en cianometahemoglobina mediante la adición de ferrocianuro de potasio y cianuro de sodio. La densidad del color producido es directamente proporcional a la cantidad de hemoglobina presente. Método: 20 mm³ (0.02 ml) de -- sangre se diluyen con 5.0 ml de reactivo. Después de 10 min., la densidad de la solución se mide fotométricamente a 540 m μ , utilizando un blanco con cianometahemoglobina. El nivel de la Hb se obtiene interpolando en una curva de calibración preparada con la ayuda de los patrones.

VI.2 EQUIPO

Espectrofotómetro. Spectronic 20 Bausch & Lomb

Balanza analítica. Mettlerhso

Centrifuga clínica de 8 camisas. Solbat Aparatos científicos
Mod. J-12

Centrifuga. Beckman J-6-B 6000 rpm

Microscopio. Zeiss west Germany

Espectrofotómetro U.V. Visible 3A Perkin Elmer

Sonicador. MSE Amp: 30 t=16-20 seg.

Agitador de pipetas. Solbat 115

Agitador tubos ensayo. Vortex-Genic

Baño maría de temperatura controlada. Precisión Circulating
System 253

Balanza granataria. Ohaus Florham. Park N.Y. 07932 USA

Estufa de temperatura controlada. Mod. HDP 334

Refrigerador Mod. 348821

Potenciómetro. Sargent Welch

VI.3 M A T E R I A L

Mechero Bunsen

Pipetas volumétricas. Germang

Termómetros (-10 a 110°C) Taylor de México.

Equipo de disección

Cubreobjetos. Pyrex

Cubrehematímetros

Cámara de Newbauer

Pipeta de Thoma (para eritrocitos y leucocitos)

Jeringas desechables 1 ml. Plastipak

Portaobjetos. Pyrex

Tubos para centrifuga. Pyrex

Tubos de ensayo. Pyrex

Espátulas

Vidrios de reloj

Tripies

Algodón

Masking tape

Matraces Erlenmeyer, 1000 ml. Pyrex

Matraces Erlenmeyer, 500 ml. Pyrex

Matraces Erlenmeyer, 250 ml. Pyrex

Matraces Erlenmeyer, 100 ml. Pyrex

Matraces Erlenmeyer, 50 ml. Pyrex

Matraces volumétricos, 1000 ml. Pyrex

Matraces volumétricos, 500 ml. Pyrex

Matraces volumétricos, 250 ml. Pyrex

Matraces volumétricos, 100 ml. Pyrex

Vasos de precipitados, 500 ml. Pyrex

Vasos de precipitados, 100 ml. Pyrex

Vasos de precipitados, 5 ml. Pyrex

VI.4 REACTIVOS

Cloruro de sodio, R.A. Técnica Química
Sephadex G-100. Farmacia Fine Chemical
Fosfato de sodio dibásico, R.A. Técnica Química
Fosfato de sodio monobásico, R.A. Técnica Química
Cloruro de potasio R.A. Técnica Química
Carbonato de sodio R.A. Técnica Química
Tartrato de sodio y potasio
Hidróxido de sodio. Productos Químicos Monterrey
Sulfato de cobre. J.T. Baker
Citrato de sodio. Productos Químicos Monterrey
Bicarbonato de sodio. J.T. Baker
Cianuro de potasio. J.T. Baker
Ferricianuro de potasio. J.T. Baker
Ovoalbúmina. Sigma
Alcohol metílico. Merck. México
Eter etílico. Merck. México
Cristal violeta. Merck
Colorante Wright. Técnica Química
Colorante Giemsa
Glicerol. Merck. México
Azul de Metileno. Sigma de México
Proteínas. Sigma de México
Saponina
Cloruro crómico
Hemoglobina patrón

VI.5 PREPARACION DE SOLUCIONES

Solución salina isotónica: SSI, disolver 8.5 g de cloruro de sodio en un litro de agua destilada.

Solución salina citratada: SSC, disolver 5 g de citrato de sodio en 100 ml de solución salina isotónica.

Solución amortiguadora de fosfatos: PBS, (0.15 M y -- 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, -- 0.2 g de fosfato de potasio monobásico, disolver en agua destilada y aforar a 1 l.

Reactivo de Lowry: Reactivo A, Carbonato de sodio al 2% y tartrato de sodio y potasio al 0.02% en hidróxido de sodio 0.1 N. Reactivo B, sulfato de cobre al 0.5%. Mezclar 50 ml. del reactivo A con 1 ml del reactivo B. Conservar los 3 reactivos en refrigeración.

Saponina: Preparar al momento en una concentración de 60 mg/ml en P.B.S.

Solución de Giemsa: Al producto en solución comprada, se diluye un volumen por 9 a 15 volúmenes de agua destilada o de amortiguador de pH = 6.8.

VI.6 MATERIAL BIOLÓGICO

Ratones CD-1 o CBA jóvenes mayores de 3 meses, sin importar sexo.

Cepa de Plasmodium yoellii yoellii.

VII. RESULTADOS

Las proteínas patrón: Hemoglobina, albúmina y citocromo C tienen las siguientes absorciones a 280 nm:

Hb	----	0.67
Alb	----	0.72
Cit.c	----	0.44 (Gráfica 1)

Las proteínas problema obtenidas del fraccionamiento del Ag completo sonicado tienen las siguientes absorciones a 280 nm.

Fracción 21	----	0.46
Fracción 25	----	0.51
Fracción 43	----	0.43
Fracción 62	----	0.47 (Gráfica 2)

Se obtuvo el logaritmo del P.M. de las fracciones problemas, a partir del P.M. de las proteínas patrón, a estos P.M. se les determinó el logaritmo, y este se graficó con tra el número de fracción correspondiente, y por medio de la extrapolación se obtuvo el log del P.M. de las proteínas problema, que fueron las siguientes:

Proteína patrón	P.M.	Log PM	Fracción
Hb	64,500	4.80	30
Alb	40,000	4.60	39
C c	13,370	4.12	53
Fracción 21		5.08	
Fracción 25		4.96	
Fracción 43		4.45	
Fracción 62		3.85	(Gráfica 3)

Porcentaje de parasitemias en ratones inmunizados con las diferentes fracciones, Ag sonicado completo y sin Ag.

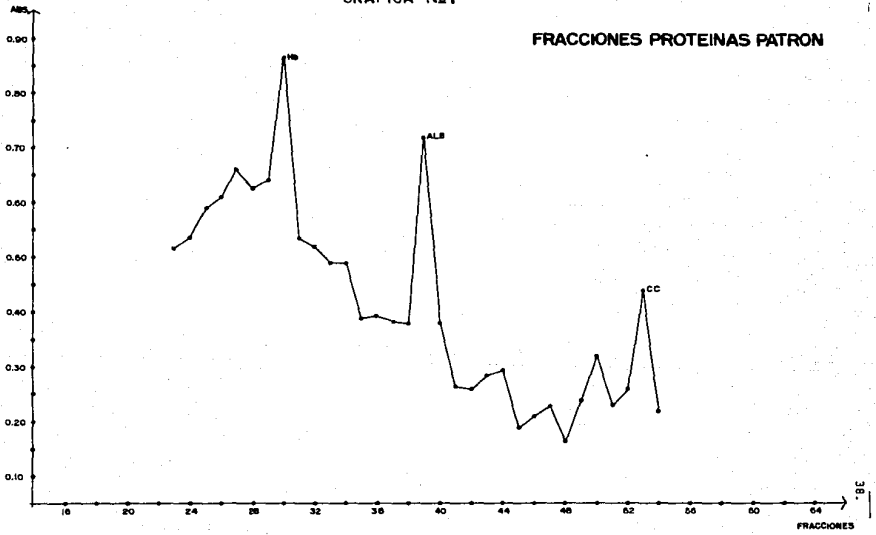
<u>DIAS</u>	<u>4</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>9</u>	<u>10</u>	<u>11</u>	<u>13</u>	<u>16</u>
FRACCIONES								
21	21.6	55.5	56.0					
25	7.8	43.3	55.0	59.0	60.0	60.0	60.0	69.0
43	15.0	47.0	65.0					
62	16.6	69.0						
Ag comp.	5.0	19.4	25.5	41.0	49.6	62.3	78.5	
Sin Ag	2.0	24.0	42.5	51.0	60.5	64.0		

(Gráfica 4 y 5)

G R A F I C A S

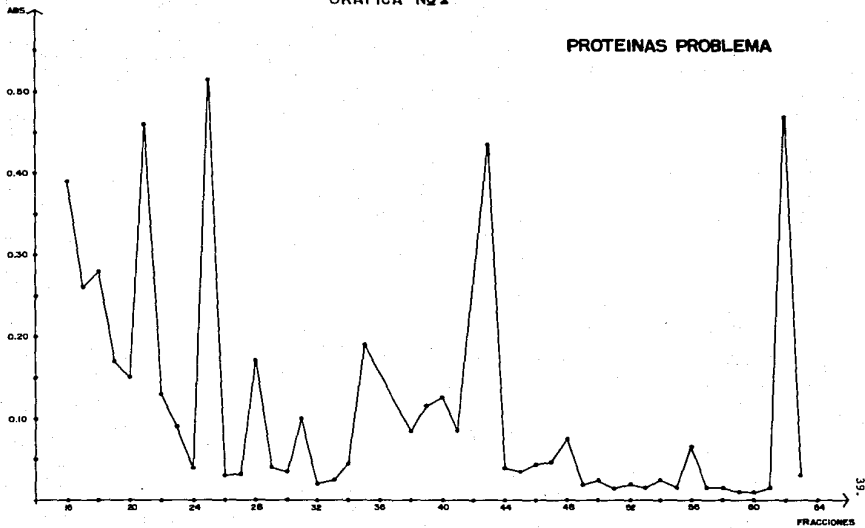
GRAFICA Nº1

FRACCIONES PROTEINAS PATRON



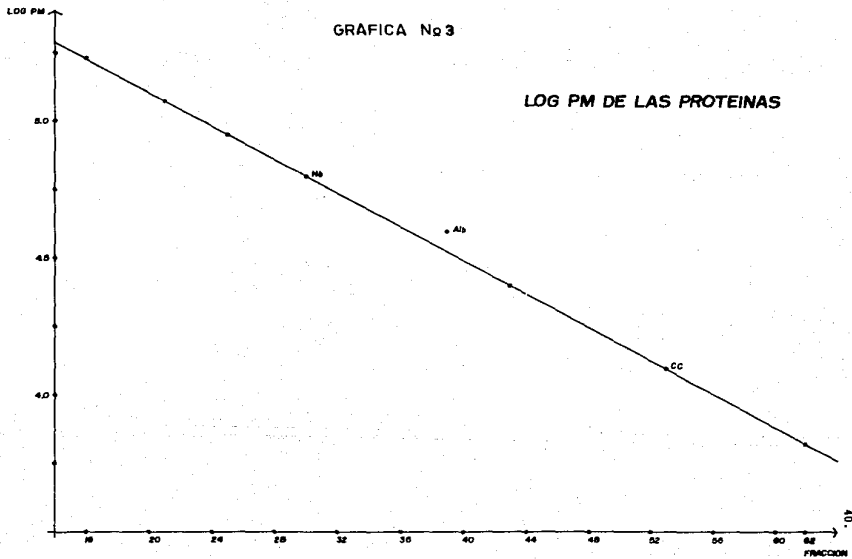
GRAFICA N^o 2

PROTEINAS PROBLEMA

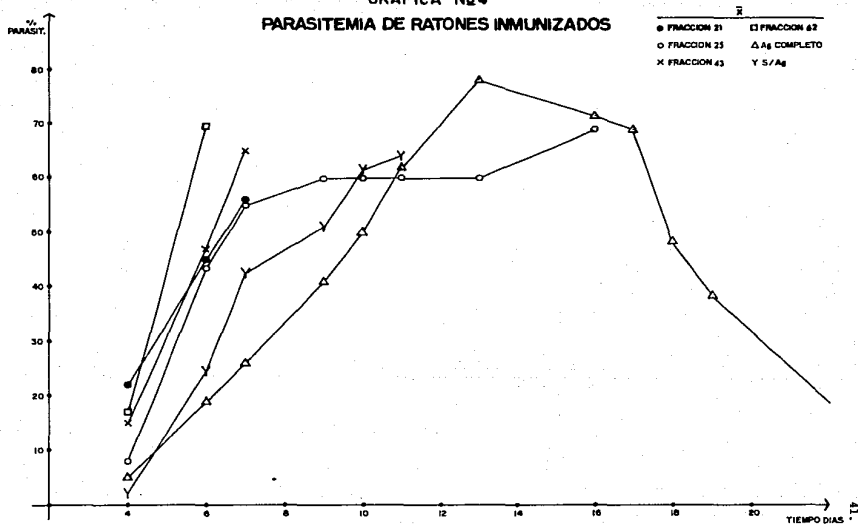


GRAFICA N° 3

LOG PM DE LAS PROTEINAS

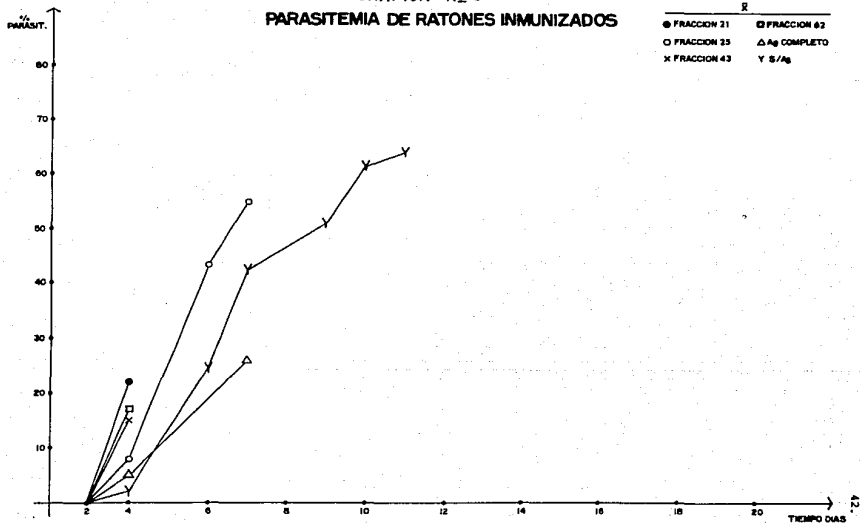


GRÁFICA Nº 4
PARASITEMIA DE RATONES INMUNIZADOS



GRAFICA No 5

PARASITEMIA DE RATONES INMUNIZADOS



VIII. DISEÑO ESTADÍSTICO Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para deducir si las diferencias encontradas en los resultados, son debidas al efecto de un tratamiento o a la variabilidad biológica de las unidades de experimentación se -- procede con el modelo:

$$Y_{ij} = m + T_i + E_j(i)$$

Y_{ij} = j - énsima repetición del i -ésimo tratamiento.

m = media de mayor nivel de significancia

T_i = efecto del i -ésimo tratamiento

$E_j(i)$ = variabilidad biológica de la j -ésima observación asignada al i -ésimo tratamiento *

El modelo anterior se resuelve por análisis de varianza y la estadística de prueba es la F de Fisher.

Regla de decisión: si F calculada $>$ que F de tablas al 0.05% se rechaza la H_0 y la evidencia experimental demuestra que las diferencias encontradas en los experimentos son debidas al efecto del tratamiento, de lo contrario si $-- F$ calc $<$ F de tablas al 0.05% no se rechaza H_0 y las diferencias encontradas en los resultados son debidas a la -- variabilidad biológica de las unidades de experimentación.

El análisis estadístico se realizó en el paquete estadístico SPSSPC.

ANALISIS DE DATOS

TABLA 1

Datos V1 y V2

V1 = fracción

V2 = tiempo en días

	<u>Valor</u>	<u>Frecuencia de datos</u>
V1-1 = fracción 21	1	3
V1-2 = fracción 25	2	3
V1-3 = fracción 43	3	3
V1-4 = fracción 62	4	3
V1-5 = Ag completo	5	3
V1-6 = control sin Ag	6	2
T O T A L :		17

Días en que se leyó
el % de parasitemia

	<u>Frecuencia de datos</u>
4	3
6	5
7	4
11	2
13	1
16	1
20	1
T O T A L :	17

Análisis de varianza

Grados de Libertad

	5
	11
T O T A L :	16

IX. ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS

El antígeno sonificado se fraccionó en la columna de filtración molecular. El espectro de absorción de las fracciones eluidas a partir del tubo N° 21 (que corresponde al volumen de exclusión) se muestra en la gráfica 1. Se seleccionaron las fracciones 21, 25, 43 y 62, Ag completo sonificado para proseguir el experimento de acuerdo a la metodología descrita.

El P.M. de las fracciones anteriores de acuerdo a la gráfica 2 es de:

Fracción 21	120,226.440
Fracción 25	91,201.084
Fracción 43	22,163.829
Fracción 62	7,079.458

En la gráfica 3, se muestran las parasitemias alcanzadas por los ratones inmunizados con las diferentes fracciones con antígeno sonificado y sin antígeno.

Se considera el grupo de los ratones sin Ag (blancos) como patrones de comportamiento. Tuvieron una duración de 11 días con un máximo de parasitemia.

Los ratones inmunizados con la fracción 21 de P.M. = 120,226 sobrevivieron solo 7 días presentando una parasitemia máxima del 56%, resistieron menos que el control.

El grupo inmunizado con la fracción 25 de P.M. = 91,201, sobrevivieron 16 días, mucho más tiempo que el grupo patrón.

con una parasitemia máxima del 69%, y permaneciendo 5 días con una parasitemia del 60%.

La muestra inmunizada con la fracción 43 de PM = 28,183, - al igual que los inmunizados con la fracción 21, sólo sobrevivieron 7 días, resistiendo una parasitemia máxima del 65%, pero en menos tiempo que el control.

La fracción 62 con PM = 7,079, sólo permitió a los ratones inmunizados con esta, una sobrevivida de 6 días y una parasitemia máxima de 69%, resistiendo menos que el control.

El grupo inmunizado con Ag completo sonicado pudo resistir una sobrevivida de 13 días, dos días más que el control con una parasitemia máxima del 78.5%, este grupo es el que tolera la más alta parasitemia.

De acuerdo a los análisis estadísticos realizados (tabla 1) se deduce que las fracciones y el Ag sonicado completo, -- producen el mismo tiempo de sobrevivida que los ratones que no fueron inmunizados " $P > 0.05$ ", lo que implica suponer -- que ninguna de las fracciones ni el Ag sonicado tienen actividad protectora.

Es posible que las fracciones obtenidas hayan sufrido degradación por la posible actividad de proteasa reportada - en los extractos crudos de protozoarios. Lo anterior significa que se inmunizó al ratón contra un fragmento de las proteínas del antígeno completo, que no necesariamente -- eran los determinantes antigénicos que pudieran brindar -- protección contra una infección sanguínea de Pvy. Así también se puede explicar que se hayan aislado proteínas con un PM menor de 150,000, ya que según la bibliografía consultada, las proteínas protectoras poseen un PM mayor de 235,000.

X. CONCLUSIONES

Se observa que los ratones inmunizados con las fracciones obtenidas se comportan de manera semejante que los testigos y los que fueron inmunizados con antígeno completo. - Los ratones mueren al presentar parasitemias del 60%, lo que indica que tanto el Antígeno completo como las fracciones no tienen efecto antigénico. (Tabla 1 p > 0.05 Análisis de varianza).

No se obtuvieron proteínas con PM mayor a 235,000; lo que sugiere que el antígeno sonicado tiene actividad de proteasa.

Es necesario agregar inhibidor de proteasa al antígeno obtenido por sonicación para evitar su autodegradación catalítica.

La posible autodegradación catalítica del Ag sonicado puede explicarnos la falta de antigenicidad de las diferentes fracciones.

Es recomendable que en ensayos posteriores se emplee inhibidor de proteasa.

ANEXO I - ABREVIACIONES

Ag	Antígeno
Ac	Anticuerpo
C	Complemento (C ₁ , C ₂ ,....., etc)
PM	Peso Molecular
H ₀	Hipótesis nula
H _a	Hipótesis alterna
SSI	Solución Salina Isotónica
SSC	Solución Salina Citratada
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos
PYY	<u>Plasmodium yoellii yoellii</u>
GRP	Glóbulos Rojos de Ratón Parasitado
SN	Sobrenadante
GRC	Glóbulos Rojos de Carnero
GRR	Glóbulos Rojos de Ratón
TA	Temperatura Ambiente
Hb	Hemoglobina
CC	Citocromo C

ANEXO II - GLOSARIO

- Anemia:** Disminución del caudal hemoglobínico o del número de eritrocitos del organismo.
- Antígeno:** Sustancia que introducida en el organismo provoca la formación de anticuerpos, que inducen una respuesta inmunitaria localizable cuando es introducida en un animal.
- Anticuerpo:** Proteína específica de la sangre y otros líquidos orgánicos (globulinas) que aparecen tras la inyección de elementos extraños (antígenos) sobre los que actúa específicamente: aglutinándolos (aglutininas), destruyéndolos (lisinas), neutralizándolos (antitoxinas) o precipitándolos (precipitinas).
- Aglutinación:** Reacción antígeno-anticuerpo en la cual un antígeno sólido o en partículas forma un cristal con un anticuerpo soluble. En la aglutinación invertida el anticuerpo está insertado a la partícula sólida y es aglutinado por un antígeno insoluble.
- Bilirrubina:** Pigmento biliar rojo, producto terminal de la hemoglobina, elaborado por las células de Kupffer del hígado y del que derivan pigmentos como la biliverdina y otros mal definidos.
- Biopsias:** Examen del organismo vivo en oposición a necropsia, y especialmente examen microscópico de una porción de tejido obtenida de un cuerpo vivo.
- Bacteriolisis:** Desintegración de bacterias inducidas por anticuerpo y complemento en ausencia de células.
- Complemento:** Sistema de proteínas séricas que es el mediador humoral primario de las reacciones antígeno-anticuerpo.
- Cepa atenuada:** Grupo de organismos cuya ascendencia es conocida, debilitada.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Célula:** Elemento fundamental de los tejidos organizados, el más simple libre, dotado de vida propia, compuesto por una masa circunscrita de protoplasma que contiene un núcleo.
- Célula linfoide:** Leucocito emigrante
- Célula cebada:** Célula de los tejidos que se parecen a un basófilo de la sangre periférica y que contiene gránulos con serotonina e histamina.
- Células de Kupffer:** Fagocitos mononucleares fijos del sistema reticuloendotelial que se encuentran presentes dentro de los sinusoides del hígado.
- Célula epiteloide:** Células jóvenes del tejido conjuntivo que por mutua comprensión aparecen aplenadas; se observan en procesos inflamatorios y en el tubérculo.
- Célula gigante multinuclear:** Célula grande y con muchos núcleos de la médula ósea. Célula patológica muy grande, en el centro del folículo tuberculoso.
- Endémico:** Que se refiere a enfermedad generalmente infecciosa, que reina constantemente en épocas fijas en ciertos países por influencias de una causa local especial.
- Esplenomegalia:** Aumento del volumen o hipertrofia del bazo.
- Exeritrocítico:** Fuera del glóbulo rojo.
- Eritrocito:** Corpúsculo o glóbulo rojo de la sangre; hematíe.
- Fagocitosis:** Proceso de ingestión y digestión por parte de algunas células de partículas sólidas, bacterianas, fragmentos de tejidos necrosados, cuerpos extraños, etc.
- Fagocito mononuclear:** Célula capaz de englobar cuerpos sólidos, en particular microorganismos, que son destruidos en su interior, en este caso de un solo núcleo. Los fagocitos pueden ser móviles (leucocitos) o fijos (sistema reticuloendotelial).

- Gametocito:** Célula madre de la cual deriva un gameto, -- (gameto: célula sexual masculina o femenina).
- Hemoglobina:** Materia colorante de los hematíes que contiene el hierro de la sangre; sustancia -- cristalina de color rojo y composición compleja que consta principalmente de una proteína, globina combinada con la hematina.
- Hemólisis:** Desintegración de los hematíes o disolución de los corpúsculos sanguíneos, especialmente de los hematíes, con liberación de hemoglobina por acción de sueros hipotónicos, -- lisinas bacterianas, etc.
- Hepatomegalia:** Aumento de volumen del hígado.
- Hematógena:** Alimentación con la sangre de otro animal.
- Histamina:** Amina depresora que se encuentra en el cornezuelo de centeno y en el organismo animal en el que se produce por descarboxilación -- de la histidina. Se le considera como una hormona histica que contribuye a regularizar el tono de la musculatura lisa.
- Histiocito:** Célula grande, fagocitaria del sistema reticuloendotelial, que se halla en íntimo contacto con los líquidos sanguíneo y linfático.
- Inmunidad:** Protección activa (formación de anticuerpos específicos) o pasiva (por suero con dichos anticuerpos) contra el contagio y la infección.
- Inmunidad celular:** Inmunidad en la cual la participación de -- los linfocitos y macrófagos es predominante.
- Inmunidad humoral:** Perteneciente a moléculas en solución en un líquido del cuerpo, en particular el anticuerpo y el complemento.
- Inmunología:** Estudio de los conocimientos relativos a la inmunidad. Rama de la medicina que estudia los fenómenos, las técnicas y las enfermedades relacionadas con las reacciones antígeno-anticuerpo-complemento.

Insecticida:	Componente que destruye a los insectos.
Leucocitosis:	Aumento transitorio de leucocitos en la -- sangre circulante (más de 10,000/mm ³).
Lisis:	Defervescencia gradual de una enfermedad; -- crisis lenta. Disolución o destrucción de células o bacterias por lisinas.
Lisosomas:	Organoides celulares cuya función consiste en la lisis enzimática de los cuerpos orgánicos que ingresa en el protoplasma.
Merozoito:	Espora formada de un esquizonte en la re-- ducción esquizogona de los protozoos.
Microorganismos:	Planta o animal microscópicos.
Macrófago:	Fagocito de pequeño tamaño. Leucocito poli nuclear móvil que se observa en las afeccio-- nes agudas. Célula fagocitaria del sistema reticuloendotelial de grandes dimensiones; -- histiocitos, células de Kupffer del hígado, endoteliales de los vasos del bazo, médula ósea, etc.
Macrófago activado:	Macrófagos maduros en un estado de activa-- ción metabólica provocada por varios estímu-- los, en especial por la fagocitosis o el -- efecto de una linfocina.
Monoblasto:	Célula que da origen al monocito.
Monocito:	Leucocito grande mononuclear.
Osteoclasto:	Elemento celular gigante multinucleado de -- la médula ósea que tiene por misión la des-- trucción y resolución del tejido óseo.
Protozoario:	Relativo a los protozoos.
Parásito obligado:	El incapaz de vivir separado del huésped.
Premonitorio:	Que sirve de aviso precursor.
Polimorfonuclear:	Que tiene núcleos de muchas formas, espe-- cialmente los leucocitos.
Promonocito:	Monocito no maduro; monoblasto.

- Reservorio:** Cavidad en la que se acumula un líquido como la vesícula biliar o la vejiga urinaria. -- Organismo que alberga gérmenes patógenos pro pagadores de infecciones.
- Reacción de precipitación:** Reacción entre un antígeno soluble y un antígeno también soluble, en la cual se forma -- una malla compleja de formas de conjuntos -- entrelazados.
- Vacunación:** Inmunización con antígeno administrados para la prevención de enfermedades infecciosas -- (término originalmente acuñado para denotar la inmunización solo contra el virus de la - vaccina).

XI. BIBLIOGRAFIA

1. Cruz, O., Parasitología, Ed. Méndez Oteo, 2a. edición, México. 1981.
2. Lynch, M.J., Raphael, S.S., Mellor, L.D., Spare, P.D., INWOOD, M.J.H. Métodos de laboratorio, 2a. edición, -- Nueva Editorial Interamericana, 1969.
3. Rose, N., Principio de Inmunología, Ed. CECSA, México, 1973.
4. Biagi, F., Enfermedades Parasitarias, 2a. edición, 6a. reimpresión, Editorial La Prensa Médica Mexicana, México, 1981.
5. Stites, D.P., Stobo, J.D., Fudenberg, H.H., Wells, J.-V. Inmunología básica y clínica, 4a. edición, Ed. El -- Manual Moderno, S.A. de C.V. México, D.F. 1983.
6. Craig, F. Parasitología Clínica, Ed. Salvat. México, -- 1979.
7. Pirson, P.J., Perkins, M.E., Caracterización con anticuerpos monoclonales de un antígeno de superficie en merozoitos de Plasmodium falciparum. Journal of Immunology.
8. Oka, K. Localización ultraestructural de antígenos -- protectores de merozoitos de Plasmodium yoellii usando anticuerpos monoclonales y criomicrotoma ultradelgada.
9. Hinchey, J.D. Estadística práctica para la investigación química, Ed. El Manual Moderno, 1976.
10. Piekarski, G. Parasitología médica. Instituto de Parasitología Médica de la Universidad de Bonn Alemania, Ed. Sarbenschabrikten Bayer AG Leverkusen, 1961.
11. Gabriel, J. Specific lysis of Plasmodium yoellii infected mouse erythrocytes with antibody and complement. Clin. Exp. Immunol. 52:129, 1983.
12. Weinbaum, F., Immunity to Plasmodium berghei yoellii in mice II Specific and nonspecific cellular and humoral responses during the course of infection. J. Immunol. 121:626, 1978.

13. Choogsuwan, S., Antibodies in malaria. J. Parasitol, 64:1050, 1978.
14. Cohen, S. Gamma globulin and acquired immunity to malaria. Immunity to Protozoa, Ed. Garnham, P.C.C. New York, 1963.
15. Deans, J. Immunology of malaria. Ann. Rev. Microbiol., 37:25, 1983.
16. Newsletter., Special Programme for research and training in tropical diseases. UNPD/WORLD/BANK/WHO, 21:1, 1984.
17. Periódico "Ovaciones" de la tarde del D.F., Junio 10, - 1985.
18. Vanderberg, J. Protective immunity produced by the injection of X-irradiated sporozoites of Plasmodium berchei, IV. Dose response, specificity and humoral immunity. J. Parasitol, 56:350, 1968.
19. Khansari, N. Immunosuppression in murine malaria: A soluble immunosuppressive factor derive from Plasmodium berchei infected blood. J. Immunol., 127, 1989. 1981.
20. Newsletter, Special Programme for research and training in tropical diseases. UNPD/WORLD/BANK/WHO, 21:1. 1984.
21. Aikawa, M. The protective antigen of malaria sporozoites, (Plasmodium berchei). Is a differentiation antigen. J. Immunol. 126:355. 1981.
22. Lowry, H. Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:256. 1951.
23. Daniel, E. Biostatística: Base para el análisis de las ciencias de la salud. Editorial Limusa. México, 1977.