



41  
2ej

**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 TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A:**

**REYNALDO SANCHEZ MOTA**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

México, D.F.

Noviembre. 90



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

	PAGINA
I. INTRODUCCION.....	1
1. BREVE HISTORIA DE LA INMUNOLOGIA.....	1
2. DEFINICION.....	2
3. CARACTERISTICAS.....	2
3.1 Epidemiologia.....	4
3.2 Cuadro Clínico.....	5
3.3 Diagnóstico.....	6
3.4 Tratamiento.....	9
3.5 Prevención.....	9
4. CICLO BIOLÓGICO DE LA MALARIA.....	10
5. ESPECIES EN HUMANOS Y ROEDORES.....	17
6. INMUNOLOGIA DE LA MALARIA.....	18
7. ANTECEDENTES.....	21
7.1 Respuesta Inmune Celular.....	21
7.2 Respuesta Inmune Humoral.....	22
7.3 Complemento.....	24
7.4 Fagocitosis.....	26
II. FUNDAMENTACION DEL TEMA.....	29
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	32
IV. OBJETIVOS.....	33
V. HIPOTESIS.....	34

	PAGINA
VI.	MATERIAL Y METODOS..... 35
	1. MATERIAL..... 35
	2. EQUIPO..... 36
	3. METODOS..... 37
	4. REACTIVOS..... 43
	5. PREPARACIONES DE SOLUCIONES..... 44
	6. MATERIAL BIOLÓGICO..... 45
VII.	RESULTADOS..... 46
	1. GRÁFICAS..... 48
VIII	DISEÑO ESTADÍSTICO Y ANÁLISIS DE RESULTADOS..... 54
	1. ANÁLISIS DE DATOS..... 55
IX.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS..... 57
X.	CONCLUSIONES..... 60
	ANEXO I - ABREVIATURAS..... 61
	ANEXO II - GLOSARIO..... 62
XI.	BIBLIOGRAFÍA..... 70

## I. INTRODUCCION

### 1. BREVE HISTORIA DE LA INMUNOLOGIA

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 *inmunis*, esto es, "exento de cargos" (impuestos, cargos). Sin embargo, durante casi un siglo, el término *inmunitas* 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.

## 2. DEFINICION

El paludismo es un padecimiento endémico en territorios tropicales y subtropicales producido por un parásito intracelular obligado, que pertenece a la clase Sporozoa, orden Haemosporidia, familia Plasmodiidae, del género Plasmodium, - cuyo huésped intermediario es el hombre y otros vertebrados, sus huéspedes definitivos son dos mosquitos anofelinos hembras siendo estos del género Anopheles: Pseudopunetipennis, Aztecus albamanus quadrimaculatus. (4)

## 3. CARACTERISTICAS

El paludismo humano es causado por especies del género Plasmodium, es transmitido por mosquitos hembras que ingieren las formas sexuales del parásito en sus comidas de sangre. Los esporozoítos infectantes se desarrollan en el mosquito y son inyectados en el interior del huésped definitivo cuando el hombre es picado por el insecto; también es transmitido por donadores palúdicos, material quirúrgico contaminado y excepcionalmente por placenta. (1-3).

El paludismo se caracteriza porque produce debilidad y anemias crónicas como la hemolítica, la forma más grave es

la producida por P. falciparum (terciaria maligna) esto se debe a las perturbancias y estabilidad física de los eritrocitos así como en la eliminación de los productos metabólicos - intermediarios de parásito. Habitualmente los glóbulos rojos y la hemoglobina disminuyen, habiendo 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, hemosidenuria, etc.)

Las alteraciones en el metabolismo del glutati6n reducido (GSH) en el eritrocito y la generaci6n del oxidante per6xido de hidr6geno por el par6sito representan factores que contribuyen a la anemia severa por infecci6n del P. vivax. En las formas cr6nicas, la cifra de leucocitos suele ser baja, - pero aumentan muchas veces los monocitos. Se presenta leucocitosis despu6s de los escalofríos. Los 6rganos muestran gran cantidad de pigmento pal6dico, hay hepato y esplenomegalia, y se encuentran par6sitos y pigmentos en las biopsias del bazo. El hu6sped actúa como intermediario y reservario y realiza - dos ciclos esquizog6nicos: el exoeritrocítico y el eritrocítico.

El ciclo sexuado se inicia en el hombre, pero se rea-

liza en el mosquito anopheles, los cuales siendo huéspedes de definitivos, funcionan como transmisores. Sólo la hembra es hematófaga y por lo tanto la transmisora. (4, 5, 24).

### 3.1 Epidemiología

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 algunas zonas hiperendémicas los vectores más importantes son Anopheles gambiae, A. funestus, A. arabiensis, A. oswaldoi, A. darlinge, A. triamalus, A. nuneztovari; en México los principales 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). (25, 26).

### 3.2 Cuadro Clínico

Las principales características clínicas en un caso típico de Paludismo son los paroxismos de fiebre, que aparecen con intervalos regulares. Se presentan escalofríos, fiebre y sudación en un periodo de 2 a 4 hrs., después el paciente vuelve a su estado normal para presentar otro acceso al día siguiente, al tercer día o cuarto día. El paroxismo tiene lugar por la súbita liberación de merozoítos en la corriente sanguínea.

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

P. malariae produce fiebre cuaterna con intervalos apiréxicos.

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 el tamaño, pero no en su totalidad. También puede presentarse hepatomegalia y malaria cerebral, 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.

La parasitemia en estos casos puede también ser oligo sintomática o asintomática. Se observa leucocitosis y desviación a la izquierda de los neutrófilos; finalmente aparece monocitosis. (27, 28).

### 3.3 Diagnóstico

El diagnóstico se realiza rápidamente mediante la observación microscópica de frotis sanguíneo o de la gota gruesa.

También puede diagnosticarse por análisis inmunológicos.

Como la inmunoprecipitación, el radio inmunoensayo, -electroforesis de fluido cerebroespinal y el ensayo inmunogenético.

Cuando el cuadro febril está empezando o desapareciendo, la parasitemia disminuye notablemente o, 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 malárico (para determinar principalmente si el paciente tuvo paludismo). (29, 30, 32).

La parasitemia alcanzada dependerá notablemente de la especie de Plasmodium:

P. malariae: Parasitemia hasta de 30,000/mm<sup>3</sup> de sangre.

P. vivax: Parasitemia hasta de 50,000/mm<sup>3</sup> de sangre.

P. falciparum: Parasitemia hasta de 200,000/mm<sup>3</sup> de sangre.

**DIAGNOSTICO DIFERENCIAL DE LOS PARASITOS DEL PALUDISMO**

	<b>P. falciparum.</b>	<b>P. malariae</b>	<b>P. vivax.</b>	<b>P. ovale</b>
<b>TROFOZOITO JOVEN.</b>	ANILLO FINO INFECCION MULTIPLE 1-2 PEQUEÑOS PUNTOS DE CROMATINA.	ANILLO GRUESO 1 PUNTO DE CROMATINA	ANILLO GRUESO A - MENDUDO IRREGULAR 1 PUNTO DE CROMATINA.	ANILLO GRUESO 1 PUNTO DE CROMA- TINA.
<b>TROFOZOITO MADURO.</b>	ANILLO AGRANDADO LIGERAMENTE IRREGULAR	REDONDO CON CROMATINA CENTRAL Y FORMAS EN - BANDA. FIGMENTO DESFI NIDO.	IRREGULAR AMEBOCIDE.	REDONDO COMPACTO.
<b>ESQUIZONTE</b>	RARAMENTE SE VE EN SANGRE PERIFERICA. 18-32 MEROZOITOS.	8-10 MEROZOITOS A MENUDO DISPUESTOS EN ROSETAS . PIGMENTO GENERAL - MENTE EN EL CENTRO.	12-18 MEROZOGITÓS DISPUESTOS IRREGU LARMENTS.	8-14 MEROZOITOS DISPUESTOS IRRE GULARMENTE.
<b>GAMETOCITO</b>	SEMILUNAR MASCULINO ROJIZO CON CROMATINA DIFUSA FEMENINO AZULADO CON CROMATINA COMPACTA.	OVALADO O REDONDEADO MASCULINO CROMATINA DIFUSA.	OVALADO O REDONDEADO MASCULINO CROMATINA DIFUSA.	OVALADO O REDON DEADO. MASCULINO CROMATINA DIFUSA
<b>TAMAÑO DEL ERITROCITO</b>	INVARIABLE	INVARIABLE O MAS PEQUEÑO.	AGRANDADO.	AGRANDADO.
<b>FORMA DEL ERITROCITO</b>	A VECES IRREGULAR Y CRENADO.	INVARIABLE	INVARIABLE	A MENUDO IRRE- GULAR CON BOR- DES MELLADOS.
<b>PUNTEADO.</b>	A VECES PRESENTE (PUNTOS DE MAURER)	(RARA VEZ PRESENTE (PUNTOS DE ZIEMAN)	A MENUDO PRESENTE (PUNTOS DE SCHUFFNER)	SIEMPRE PRESENTE (PUNTOS DE SCHUFFNER)

### 3.4 Tratamiento

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

Amodiaquina (camoquinal), cloroquina (aralen, resoquina, nivaquina, mepracrina) (metoquina, atebrina), quinina, -diaminofenilsulfa, primetamina (daraprim), primaquina (neo---quipenil). La asociación de medicamentos ha mostrado potenciación que permite disminuir la dosis, como son: sulfametopiracina-pirimetamina (daraprim), quinina-tetracilcina, amodiaquina-tetraciclina, sulfadimetoxina-pirimetamina-primaquina.

### 3.5 Prevención

Las medidas de prevención contra la infección son: - Protección contra los mosquitos, utilizando telas de alambre en puertas y ventanas; emplear insecticidas residuales como - el malatión, DDT, dieldrin, propoxur, en paredes y muebles. - No emplear la sangre de donadores que hayan padecido paludismo en los últimos 4 años. (33).

#### 4. CICLO BIOLÓGICO DE LA MALARIA

Los parásitos del Paludismo humano tienen dos estadios:

Uno extrínseco en el Anófeles y otro intrínseco en el hombre. El primero, en el cuál se lleva a cabo la reproducción sexual, se conoce como huésped definitivo y el último en el que tiene lugar la reproducción asexual, como intermedio.

#### CICLO VITAL DEL PARASITO PALUDICO

1. Fase Preeritrocítica. (Fase exoeritrocítica, Esquizogonia exoeritrocítica primaria, Esquizogonia preeritrocítica). Los esporozoítos introducidos en el hombre por el mosquito infectado abandonan pronto el torrente circulatorio quedando la sangre libre de ellos aproximadamente en 1 Hr., penetrando en las células del hígado y, por multiplicación asexual o esquizogonia producen merozoítos (Fig. 1 a-f). (Los esporozoítos se convierten en esquizontes exoeritrocíticos redondos u ovales, y su núcleo se divide repetidamente. No hay pigmento. Cuando el esquizonte madura, se libera en gran número de merozoítos exoeritrocíticos).

La esquizogonia exoeritrocítica primaria termina cuando los merozoítos exoeritrocíticos invaden los glóbulos rojos. las primeras dos o tres generaciones de merozoítos exoeritrocíticos pueden reinvasir las células del parénquima hepático. En P. vivax y P. ovale existe una esquizogonia exoeritrocítica secundaria o latente con una o varias generaciones de merozoítos exoeritrocíticos que aparecen después de que los eritrocitos han sido invadidos.

Los merozoítos y los esquizontes se mantienen presentes durante un período de hasta 105 días. Esta esquizogonia - extraeritrocítica tardía no se produce en P. falciparum y probablemente tampoco en P. malariae.

Las fases exoeritrocíticas que surgen directamente de los esporozoítos se han denominado "criptozoítos", pero éste término sólo se emplea actualmente para los parásitos aviáres, al igual que el de "metacriptozoíto" que se aplica a la fase exoeritrocítica que surge de los criptozoítos y se produce antes de la invasión de los eritrocitos.

II. Fase eritrocítica. Los merozoítos de los esquizontes preeritrocíticos invaden los hematíes produciendo trofozoítos (Fig. 1 g-k), lo que conduce a la esquizogonia reproductiva (Fig. 1 l), y a la formación de los gametocitos femeninos

nos (Fig. 1 m-o) y masculinos (Fig. 1 p-s).

En esta fase los merozoítos exoeritrocíticos penetran en los eritrocitos y reticulocitos, donde se desarrollan a ex pensas de la célula huésped.

El merozoíto tiene una superficie selectivamente adhe siva para la fijación al eritrocito y un complejo apical de - roptrios, micronemas y anillos polares para la invasión. - - Bannister (1977), ha indicado que para la invasión del eritro cito por el merozoíto, los pasos sucesivos serían la adherencia a la superficie eritrocitaria, la fijación del complejo - apical a la membrana del hematíe, la formación de una vacuola parasitófora y el englobamiento del merozoíto por el hematíe, durante el cuál la cubierta externa del merozoíto desaparece, al menos en algunas especies.

En el glóbulo rojo, el merozoíto se presenta vacuola- do, en forma de anillo más o menos ameboide y uninucleado.

Ahora se denomina trofozoíto, nombre con el que es co nocido hasta que su núcleo se empieza a dividir. Se alimenta de Hemoglobina, que no se metaboliza de forma completa y deja residuos de globina de una hematina de ferroporfirina. Este - último es el llamado pigmento palúdico, un compuesto de hema- tina (Acido hemoférrico) y proteína.

Los trofozoítos crecen hasta que su núcleo se divide por mitosis, sus vacuolas se llenan, sus movimientos ameboides cesan y se convierten en un esquizonte maduro, el cual - lleva a cabo la esquizogonia eritrocítica, dando lugar a los merozoítos eritrocíticos. El eritrocito se rompe y los merozoítos caen al torrente sanguíneo. Muchos son destruidos por los mecanismos inmunes del huésped, pero otros invaden nuevos eritrocitos en los cuales llevan a cabo un nuevo ciclo de esquizogonia eritrocítica. Después de dos o tres generaciones - eritrocíticas se inicia el fenómeno de gametocitogénesis.

Algunos de los merozoítos intracelulares, en vez de - convertirse en esquizontes desarrollan microgametocitos o macrogametocitos. Se desconoce si estos se desarrollan a partir de un tipo especial de esquizonte, o si se producen en res--- puesta a un estímulo específico.

III. Fases en el mosquito. Los gametocitos captados de la sangre periférica del hombre llegan al intestino medio del mosquito (Fig. 1 o-s), donde maduran en gametos femeninos (Fig. 1 o') y masculinos (Fig. 1 s'). Un gameto masculino pene<sup>tra</sup> en uno femenino (Fig. 1 s' o"). Produciendo un cigoto - (fig. 1,1), que se convierte en el oocineto móvil (Fig. 1,2), y emigra a la pared externa del estómago, donde forma el - - oocisto (Fig. 1,3). Este crece produciendo un gran número de

esporozoítos (Fig. 1, 3-7). Cuando madura el oocisto estalla, liberando los esporozoítos (Fig. 1,8), que llegan a las glándulas salivales (Fig. 1,9) y a través de los conductos salivales alcanzan la hipofaringe introduciéndose en el huésped humano cuando el mosquito vuelve a picarle. Cuando los microgametocitos (machos) y los macrogametocitos (hembras) se introducen en el estómago de un mosquito susceptible, maduran rápidamente a gametos. Los microgametocitos maduran por exflagelación, en donde se desarrollan los microgametos o flagelos - con membranas externas, separándose 10 ó 12 minutos después - de iniciado el proceso.

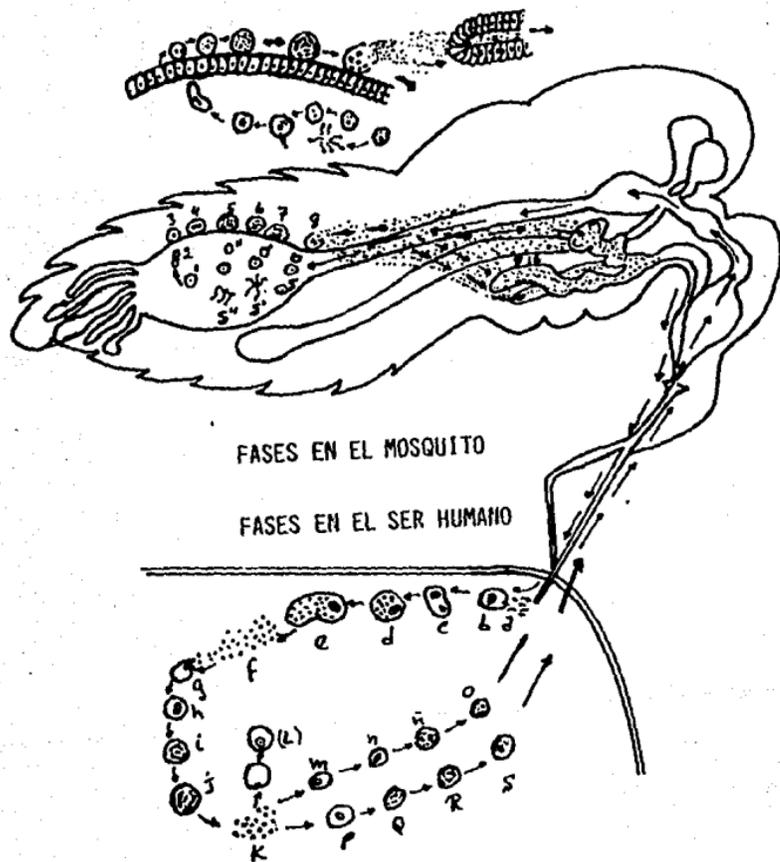
Los macrogametocitos se desarrollan en macrogametos. Su núcleo se mueve hacia la superficie formando una proyección. La fertilización tiene lugar cuando un microgameto penetra en esta proyección, tras lo cual se denomina cigoto.

A los 20 minutos inicia la formación de pseudópodos, por los cuales fluye citoplasma formando un cuerpo fusiforme llamado oocineto, o estadio móvil del huevo. A medida que el oocineto crece, los núcleos macho y hembra se funden penetrando el cuerpo de una célula epitelial del estómago y atravésandola hasta el lado opuesto. En esta localización el oocineto secreta una fina pared, crece en forma esférica y recibe el nombre de oocisto, el cual alcanza un tamaño de 50  $\mu$  más extendiéndose hacia la cavidad celómica del insecto. Según la

temperatura, el oocisto madura entre los 4 y los 15 días siguientes a la ingestión de los gametocitos por el mosquito; - el núcleo se multiplica y el citoplasma se transforma en miles de cuerpos independientes que reciben el nombre de esporozoitos. El oocisto se rompe y los esporozoitos llegan al hemocele del mosquito, dispersándose por esta vía en el cuerpo del insecto. Los que entran en contacto con las glándulas salivales penetran en ellas a través de las células y permanecen en los conductos acinares. Así, cuando los mosquitos se alimentan, inyectan saliva que lleva los esporozoitos, los cuales entran de ésta manera en el huésped humano. Solamente los mosquitos hembras Anopheles se alimentan de sangre.

Los esporozoitos tienen una estructura compleja limitada por una membrana relativamente gruesa. Su forma varía y puede ser estrecha, ligeramente curva (*vivax*), gruesa (*malariae*) o en media luna (*falciparum*), y mide de 10 a 14  $\mu$  de longitud. Poseen fibras periféricas que pueden tener función locomotora. Hay mitocondrias pero no pigmento. (33, 37).

FIG.1 CICLO BIOLÓGICO DE LA MALARIA



CARACTERÍSTICAS GENERALES DE ESPECIES DE PLASMODIUM EN HUMANO

CARACTERÍSTICA	<u>P. vivax</u>	<u>P. malariae</u>	<u>P. falciparum</u>	<u>P. ovale</u>
Trofozoito joven forma de disco	2-3 $\mu$ .	2 $\mu$ .	1- 1.5 $\mu$ .	2 $\mu$ .
Invasión múltiple en los eritrocitos	Raro	Raro	Frecuentemente 4-5 trofozoitos por eritrocito	Raro
Ciclo eritrocí- tico	48 Hrs.	72 Hrs.	48 Hrs.	48 Hrs.
Fiebre.	Terciaria benigna		Terciaria maligna	Terciaria benigna
Trofozoito maduro	Presente en sangre	Presente en sangre	No presente en sangre sólo en vísceras	Presente - en sangre
Característica de los eritrocitos	Granos de Schuffner	Granos de Ziemann	Manchas de Maurer	Granos de- Schuffner
Merozoítos	16-18	10	16-24	8-9
Gametocitos	Ovales	Ovales	Formas de plátano	Ovales
Pigmento	Pardo	Pardo oscuro o negro		Pardo verdusco.

## 5. ESPECIES EN HUMANOS Y ROEDORES

Las especies de Plasmodium en humano son:

- a. Plasmodium falciparum.
- b. Plasmodium vivax.

En menor proporción están:

- a. Plasmodium ovale.
- b. Plasmodium malariae.

Excepcionalmente se han reportado casos de malaria -  
producida por:

- a. Plasmodium cynomolgie, agente etiológico en antropoide (1, 11, 12).

Especies que producen paludismo en roedores:

- a. P. berghei.
- b. P. yoellii
- c. P. knowlesi.
- d. P. chabaudi.
- e. P. berghei yoellii.
- f. P. yoellii yoellii.

(1, 11, 12).

## 6. INMUNOLOGIA DE LA MALARIA

## Características Inmunológicas principales:

- Producción de IgG contra merozoítos, después de varias infecciones.
- Inmunoglobulinas altas en suero en zonas endémicas por paludismo.
- Inmunosupresión a otros antígenos durante el curso de la enfermedad.
- Variación antigénica en los parásitos.
- Producción de varios anticuerpos 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 premonitorio. (3, 5).

Las recaídas y recrudescimientos se pueden asociar con bajas en los niveles de los títulos de anticuerpos, o con la capacidad aumentada del parásito para enfrentarse con los --

anticuerpos, pero también puede depender de diferencias genéticas de las poblaciones de los esquizontes.

Existe una disposición de respuesta humoral en el huésped producida por los merozoítos de los eritrocitos, demostrado por las reacciones de fijación del complemento, de precipitación, de aglutinación y del anticuerpo fluorescente (5). Los síntomas en las recaídas, generalmente son menos marcadas que en el primer ataque, pero la parasitemia es más elevada. Después del primer ataque y entre las recaídas, el paciente se hace tolerante a los efectos del parásito y, de hecho, puede tener parasitemias tan elevadas como las que se presentan durante el primer ataque, aunque permaneciendo asintomático.

Tales portadores asintomáticos son muy importantes en la epidemiología de la enfermedad. La inmunidad protectora es principalmente una premonición, esto es, resistencia a la super-infección, en tanto solo haya una pequeña población de parásitos; si la persona se cura completamente, la susceptibilidad regresa.

Se presentan recaídas sintomáticas o verdaderas que varían 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. Así, en las zonas de alta endemia, los lactantes poseen protección pasiva inicial transplacentaria por los anticuerpos (IgG) maternos, y los niños pequeños están en gran riesgo después del destete. Si los niños sobreviven al primer ataque, entonces su inmunidad estará continuamente estimulada por las picaduras de mosquitos infectados mientras vivan en la zona de paludismo.

Se considera que la respuesta inmunitaria que proporciona la protección es la producción de anticuerpos independientes del complemento que inhiben la entrada de merozoítos a los eritrocitos del huésped. (5, 38).

Mediante diversas adaptaciones protectoras (por ejemplo variabilidad antigénica), los parásitos sobreviven, y por un grado limitado de destrucción eritrocítica, provocan solo 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).

## 7. ANTECEDENTES

### 7.1 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 dos 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).

## 7.2 Respuesta Inmune Humoral

Fodor en 1886, fue 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 antrax.

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 Isaef

(1894) demuestra un importante mecanismo humoral de defensa: los vibriones del cólera inyectado en el peritoneo de cobayos previamente inmunizados pierden su movilidad, se aglutinan, ya no se tiñen y son fagocitados por los leucocitos y lizados en ausencia de células.

Jules Bordet (1870-1961). En 1898 descubrió que tanto la bacteriolisis como la lisis de los eritrocitos requerían de dos factores: uno que denominó el sensibilizador era termostábil y específico; el otro que llamo alexina era termolábil e inespecífico, este último pensaba que poseía la actividad enzimática y que constaba de diversos componentes; fue 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 fue introducido para designar cualquier substancia (entonces principalmente microorganismos o células), capaz de introducir alguna reacción contra si misma y el término ilógico de anticuerpo (siendo ambos "anti") para designar el factor presente en el suero que poseía esta actividad. (3, 5).

### 7.3 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 - induciendo 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 proteínas individuales se encuentran normalmente en la circulación como moléculas precursoras inactivas, que comprenden el 15% (p/p) de la fracción globulínica del plasma (C1, C2, C3, etc., properdina, factor B, factor D, etc.).

Cada componente es activado sucesivamente en condiciones apropiadas para que progrese una reacción del complemento.

Por lo tanto, la activación permite a las proteínas volverse miembros de un sistema funcional integrado, en el cual actúan recíprocamente. Durante el proceso de activación se forman enzimas; C1, 5, 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 dos vías de activación convergen en el punto medio del sistema del complemento y el resto de la serie de reacciones (de C5 a C9), 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 C3 o C5 - son: enzimas fibrinolítica plasmina y ciertas enzimas lisosómicas.) (5).

#### 7.4 Fagocitosis

La fagocitosis se caracteriza por la ingestión y, en última instancia, la digestión de partículas más importantes, de diámetro superior a 10 nm. Esas partículas pueden ser -- inertes (agregación de cristales de sílice) o vivas (células, virus, bacterias, parásitos, etc.).

Estas células están representadas por los polimorfo-- nucleares y las células mononucleares; los monocitos y los ma crófagos.

Desde 1882, año en que Elie Metchnikoff descubrió la importancia de esas células en la resistencia del organismo -- contra las enfermedades infecciosas, se ha demostrado que las funciones de las células fagocíticas, principalmente de los ma crófagos, no se limitan a la destrucción de agentes infecciosos, sino que también intervienen en diversas reacciones inmunitarias. Los fagocitos polimorfonucleares son 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 inflama ción.

Ambos tipos de células son capaces de reconocer e in-

gerir partículas, mediante sus receptores en la superficie celular y de digerir tales sustancias dentro de sus lisosomas. Los fagocitos mononucleares muestran mucho mayor diversidad funcional y de respuesta; en la actualidad se sabe que los macrófagos son necesarios para la activación de los linfocitos B y T "in vitro". (5).

CELULAS DEL SISTEMA FAGOCITICO MONONUCLEAR EN LOS  
TEJIDOS NORMALES E INFLAMADOS

Células precursoras (comprometidas)	Médula ósea
Monoblastos	" "
Promonocitos	" "
Monocitos	" "
Macrófagos	Tejidos
Estado Normal:	
Histiocitos	Tejido Conjuntivo
Macrófagos alveolares	Pulmón
Células de Kupffer	Hígado
Macrófagos pleurales y peritoneales	Cavidades sero sas
Osteoclastos	Huesos
Celulas microgliales	Sistema nervio so

Células sinoviales Tipo A	Articulaciones
Macrófagos libres y tisulares fijos	Bazo, Ganglios linfáticos, Médula ósea y - otros tejidos.

#### Inflamación:

Macrófago exudados	Cualquier tejido.
Macrófago activados	" "
Macrófago excitados	" "
Células epiteliodes	" "
Células gigantes multinucleares (Tipos de Langrhans y tipo de cuerpo extraño).	" "

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. Degranulación, 5. Destrucción intracelular.(5).

## II. FUNDAMENTACION DEL TEMA

El paludismo es transmitido por el mosquito Anopheles. Su transmisión se lleva a cabo principalmente, en áreas rurales; el tipo más común, causado por Plasmodium vivax, se presenta en regiones templadas; P. falciparum se limita en gran parte en los trópicos; P. malariae es mucho más raro y tiene distribución focal, y P. ovale y no P. vivax, es el tipo benigno recidivamente de paludismo en Africa Occidental, encontrándose con menos frecuencia en otras partes de Africa y raramente en otros lugares.

En las partes más frescas de las áreas endémicas, el paludismo vivax es el primero que aparece cada primavera, y las infecciones por P. falciparum y P. malariae aparecen más tarde en verano.

En el paciente individual no tratado, las infecciones por falciparum, cuando no son fatales, persisten hasta un año; las de vivax hasta cinco años, y las de malariae mucho más tiempo. La distribución y prevalencia de las diferentes clases de paludismo son modificadas por diversos caracteres genéticos humanos. La glucosa 6-fosfato dehidrogenasa, esencial para el metabolismo de los parásitos, puede ser deficiente en los eritrocitos de algunas personas, y estos eritrocitos son de 2 a 80 veces más resistentes a la invasión por P. falcipa-

rum que los eritrocitos normales. Diversas hemoglobinopatías particularmente la presencia de hemoglobina "S" también lleva a la muerte prematura de *P. falciparum* intraeritrocítico. La distribución geográfica de personas con estos caracteres en - Africa, el este del Mediterráneo y en parte de Asia, y en sus descendientes en otros lugares, es tal que se ha supuesto que la posesión del carácter confiere una ventaja selectiva contra el paludismo.

Esta ventaja permite a los pacientes sobrevivir y aumentar su capacidad de desarrollar inmunidad al paludismo. Al mismo tiempo sigue siendo infeccioso para el mosquito y así - mantienen la transmisión. (16, 18, 35).

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 inmuni--dad protectora.

La razón es que el Plasmodium, aún en los breves pe--ríodos 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 merozoitos 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 merozoitos con peso molecular de 235,000; proteínas de esquizonte con peso molecular 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 merozoitos de PYY con capacidad protectora in vivo. (15, 20, 21).

## IV OBJETIVOS

- 1). Obtener un antígeno soluble contra Plasmodium yoellii yoellii (pvy).
- 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 HIPOTESIS

El fraccionamiento adecuado de un sonicado de merozoitos de Plasmodium yoellii yoellii puede brindar la fracción antigénica esperada.

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

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

$H_a$ : Existe diferencia entre las fracciones sonicadas de merozoitos sometidas a filtración molecular para producir anticuerpos protectoras en ratones CBA.

## VI. MATERIAL Y METODOS

## 1. MATERIAL

MECHERO BUNSEN

PIPETAS VOLUMETRICAS GERMANY

TERMOMETROS (-102 110°C) TAYLOR DE MEXICO

EQUIPO DE DISECCION

CUBREOBJETOS. PYREX

CUBREHEMATIMETROS

CAMARA DE NEWBAUER

PIPETA DE THOMA (PARA ERITROCITOS Y LEUCOCITOS)

JERINGAS DESECHABLES. 1 ml. PLASTIPACK

PORTAOBJETOS. PYREX

TUBOS PARA CENTRIFUGA. PYREX

TUBOS DE ENSAYO. PYREX

ESPATULAS

VIDRIOS DE RELOJ

TRIPIES

ALGODON

MASKING TAPE

MATRACES ERLLENMEYER, 1000 ml. PYREX

MATRACES ERLLENMEYER, 500 ml. PYREX

MATRACES ERLLENMEYER, 250 ml. PYREX

MATRACES ERLLENMEYER, 100 ml. PYREX

MATRACES ERLLENMEYER, 50 ml. PYREX  
 MATRACES VOLUMETRICOS 1000 ml. PYREX  
 MATRACES VOLUMETRICOS 500 ml. PYREX  
 MATRACES VOLUMETRICOS 250 ml. PYREX  
 MATRACES VOLUMETRICOS 100 ml. PYREX  
 VASOS DE PRECIPITADOS 500 ml. PYREX  
 VASOS DE PRECIPITADOS 100 ml. PYREX  
 VASOS DE PRECIPITADOS 5 ml. PYREX

## 2. EQUIPO

ESPECTROFOTOMETRO	SPECTRONIC 20 BAUSH & LAMB
BALANZA ANALITICA	METTLERHSO
CENTRIFUGA CLINICA	SOLBAT APARATOS CIENTIFICOS
DE 8 CAMISAS	MOD J-12
CENTRIFUGA	BECKMAN J-6-B 6000 R.P.M.
MICROSCOPIO	ZEISS WEST GERMANY
ESPECTROFOTOMETRO	3A PERKIN ELMER
U.V. VISIBLE	
SONICADOR	MSE AMP: 30 t=16-20 SEG.
AGITADOR DE PIPETAS	SOLBAT 115
AGITADOR TUBOS DE ENSAYO	VORTEX-GENIC
BAÑO MARIA DE TEMPERATURA	PRECISION CIRCULATING SYSTEM
CONTROLADA	253
BALANZA GRANATARIA	OHAUS FLORHAM PARCK N.Y.
	07932 U.S.A.

ESTUFA DE TEMPERATURA	MOD. HDP 334
CONTROLADA	
REFRIGERADOR	MOD. 348821.
POTENCLOMETRO	SARGENT WELCH

### 3. METODOS

#### 1. INOCULACION DEL P.Y.Y. EN RATONES CBA.

Mantenimiento de la cepa P.Y.Y.: se inoculan 30 ratones sucesivamente con  $5 \times 10^5$ ,  $1.5 \times 10^6$  y  $1 \times 10^6$  glóbulos rojos parasitados en grupos de 10 ratones "limpios", diariamente se realizan frotis para cuantificar parasitemia, cuando se obtenga 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.

Obtención de G.R.P. (P.Y.Y.): se realiza una punción cardiaca por apertura de caja torácica, agregando S.S.C., para evitar que se coagule.

Porciento de parasitemia: Se realizan frotis sanguíneos de cada ratón y se tiñen con Giemsa. Se determina el porciento de parasitemia, que se distingue por que el parásito se tiñe de azul.

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, extiendase 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 diluido durante 15 minutos a 1 hora, se lavan en agua destilada y se secan al aire. (2).

## 2. OBTENCION DE PLASMODIUM YOELLII YOELLII.

A 30 ratones, se les inocula  $5 \times 10^5$  G.R.P., checando la parasitemia diariamente, hasta obtener el 60%, extraer sangre y resuspender en S.S.C., se centrifuga a 2500 R.P.M. 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 volúmen, adicionar 1/10 partes del volúmen 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 R.P.M. por 20 minutos (5000 R.P.M. por 10 minutos, 10,000 R.P.M. por 5 - minutos). Desechar el sobrenadante (SN).

El paquete se lava tres veces con S.S.I. a 2500 R.P.M. por 20-30 minutos. Resuspender en la mínima cantidad de S.S.I.

(aproximadamente 1 ml.). El paquete precipitador corresponde a los Plasmodium yoellii yoellii desnudos, realizar frotis y teñir con Giemsa.

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 éste, que se disgrega por la emisión de ondas sonoras de alta intensidad: sonicación.

### 3. OBTENCION DEL ANTIGENO DE PLASMODIUM YOELLII YOELLII SONICADO:

El paquete de Plasmodium yoellii yoellii con S.S.I., se centrifuga y se desecha el sobrenadante (SN) y se resuspende en P.B.S.; se sonica durante 15 minutos a media intensidad. Cuantificar las proteínas del antígeno por el método de LOWRY y ajustar a una concentración de 2 mg/ml. con S.S.I.

### 4. DETERMINACION DE PROTEINAS, METODO 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. (22).

TECNICA: se realiza una curva patrón colocando una serie de 10 tubos que contengan solución de ovoalbúmina en concentraciones de 50, 100, 150... 500 ug/ml. (A partir de una solución de 500 ug/ml. en S.S.I.) El blanco se hace con 1 ml. de S.S.I. En otro tubo se coloca 1 ml. de la muestra problema. A todos los tubos se les agregan 3 ml. de reactivo de Lowry, (preparado al momento) y se dejan durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se adiciona 0.1 ml. del reactivo de Folin-Clocalteu y se deja a temperatura ambiente durante 30 minutos, agitando ocasionalmente. Se lee en un espectrofotómetro a 600 nm.

##### 5. SENSIBILIZACION DE GLOBULOS ROJOS DE RATON (G.R.R.) CON Ag.

El mecanismo por el cual el cloruro crómico pega el antígeno (Ag) al eritrocito es aun desconocido.

TECNICA: Se colocan 100 ul. de paquete de (G.R.C.) - globulos rojos de carnero, (previamente lavados con S.S.I.), con 100 ul. de antígeno y 100 ul. de Cloruro crómico al 0.01% en S.S.I., preparado al momento. Se agita suavemente durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Se centrifuga 2,500 R.P.M. por 5 minutos, y se elimi-

na el sobrenadante. Se lava una vez con S.S.I. y dos veces con P.B.S., ajustándose el paquete final a la deseada.

## 6. ACTIVACION DEL SEPHADEX A TEMPERATURA AMBIENTE. (T.A.)

Activación del SG-100: se pesa la cantidad necesaria para empaquetar la columna, se hidrata 80 hrs. a temperatura ambiente, se eliminan las burbujas con presión reducida, se empaca la columna evitando la formación de burbujas de aire.

Calibración de la columna: Se hace una mezcla de proteínas D.P.M. conocido: La hemoglobina (Hb) Citocromo C (C.C) y albúmina de huevo, y azul de dextran.

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.

## 7. FRAGMENTACION DEL ANTIGENO DEL PLASMODIUM YELLII - YOELLII (Ag DE PLASMODIUM YOELLII YOELLII)

Pasar por la columna de SG-100 previamente calibrado con proteínas de P.M. conocido el Ag de plasmodium yoellii -

yoellii sonificado anteriormente y recoger fracciones de 1 ml. cada una.

## 8. EVALUACION DE LOS Ags FRACCIONADOS

Inmunizar previamente ratones "limpios" con 0.1 ml. de cada una de las fracciones antigénicas y retarlos a los 3 días con 1ml. de inóculo viable de Plasmodium yoellii yoellii procedente de un ratón con 40% de parasitemia. Cuantificar parasitemia diariamente contra los controles de G.R.C. y S.S.I.

## 9. CUANTIFICACION DE LA Hb. TECNICA 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.

METODO: 20 mm<sup>3</sup> (0.02 ml.) de sangre se diluyen con -- 5.0 ml. de reactivo. Después de 10 minutos, la densidad de la

solución se mide fotométricamente a 540 nm., utilizando un blanco con cianometahemoglobina. El nivel de la hemoglobina se obtiene interpolando en una curva de calibración preparada con la ayuda de los patrones.

#### 4. REACTIVOS

CLORURO DE SODIO, R.A. TECNICA QUIMICA

SEPHADEX G-100 FARMACIA FINE CHEMICAL

FOSFATO DE SODIO DIBASICO, R.A. TECNICA QUIMICA

FOSFATO DE SODIO MONOBASICO, R.A. TECNICA QUIMICA

CLORURO DE POTASIO R.A. TECNICA QUIMICA

CARBONATO DE SODIO, R.A. TECNICA QUIMICA

TARTRATO DE SODIO Y POTASIO

HIDROXIDO DE SODIO PRODUCTOS QUIMICOS MONTERREY

SULFATO DE COBRE J.T. BAKER

CITRATO DE SODIO, PRODUCTOS QUIMICOS MONTERREY

BICARBONATO DE SODIO. J.T. BAKER

CIANURO DE POTASIO. J.T. BAKER

FERRICIANURO DE POTASIO J.T. BAKER

OVOALBUMINA SIGMA

ALCOHOL METILICO. BERCK-MEXICO

ETER ETILICO. MERCK-MEXICO

CRISTAL VIOLETA. MERCK-MEXICO

COLORANTE WRIGHT. TECNICA QUIMICA

COLORANTE GIEMSA  
GLICEROL. MERCK-MEXICO  
AZUL DE METILO. SIGMA DE MEXICO  
PROTEINAS. SIGMA DE MEXICO  
SAPONINA  
CLORURO CROMICO  
HEMOGLOBINA PATRON

5. PREPARACIONES DE SOLUCIONES

SOLUCION SALINA ISOTONICA: (S.S.I.) Disolver 8.5 g. -  
de cloruro de sodio en un litro de agua destilada.

SOLUCION SALINA CITRATADA: (S.S.C.) Disolver 5 gr. -  
de Citrato de Sodio en 100 ml. de solución salina isotónica.

SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS: (P.B.S.) (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 lt.

REACTIVO DE LOWRY: Reactivo A. Carbonato de Sodio al  
2% y Tartrato de Sodio y Potasio al 0.02% en Hidróxido de So-  
dio 0.1 N, reactivo B, sulfato de cobre al 0.5% mezclar 50 ml.

del Reactivo a con 1ml. del reactivo B. conservar los 3 reactivos en refrigeración.

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

SOLUCION DE GIEMSA: Al producir en solución comprada se diluye un volúmen por 9 a 15 volúmenes de agua destilada o de amortiguador de pH-6.8

#### 6. MATERIAL BIOLÓGICO

RATONES CD-1 O CBA JOVENES MAYORES DE 3 MESES SIN IMPORTAR SEXO

CEPA DE PLASMODIUM YOELLII YOELLII

## VII RESULTADOS

Los resultados patrón! Hemoglobina, albúmina y citocromo tienen las siguientes absorciones a 280 nm:

Hb _____	0.87
Alb _____	0.72
Cit. c _____	0.44 (Gráfica 1).

Las proteínas problema obtenidas del fraccionamiento del antígeno completo sonificado tienen las siguientes absorciones 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 problema, a partir del P.M. de las proteínas patrón, a estos P.M. se les determinó el logaritmo, y éste se graficó contra 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 P.M.	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 sonificado completo y sin Ag.

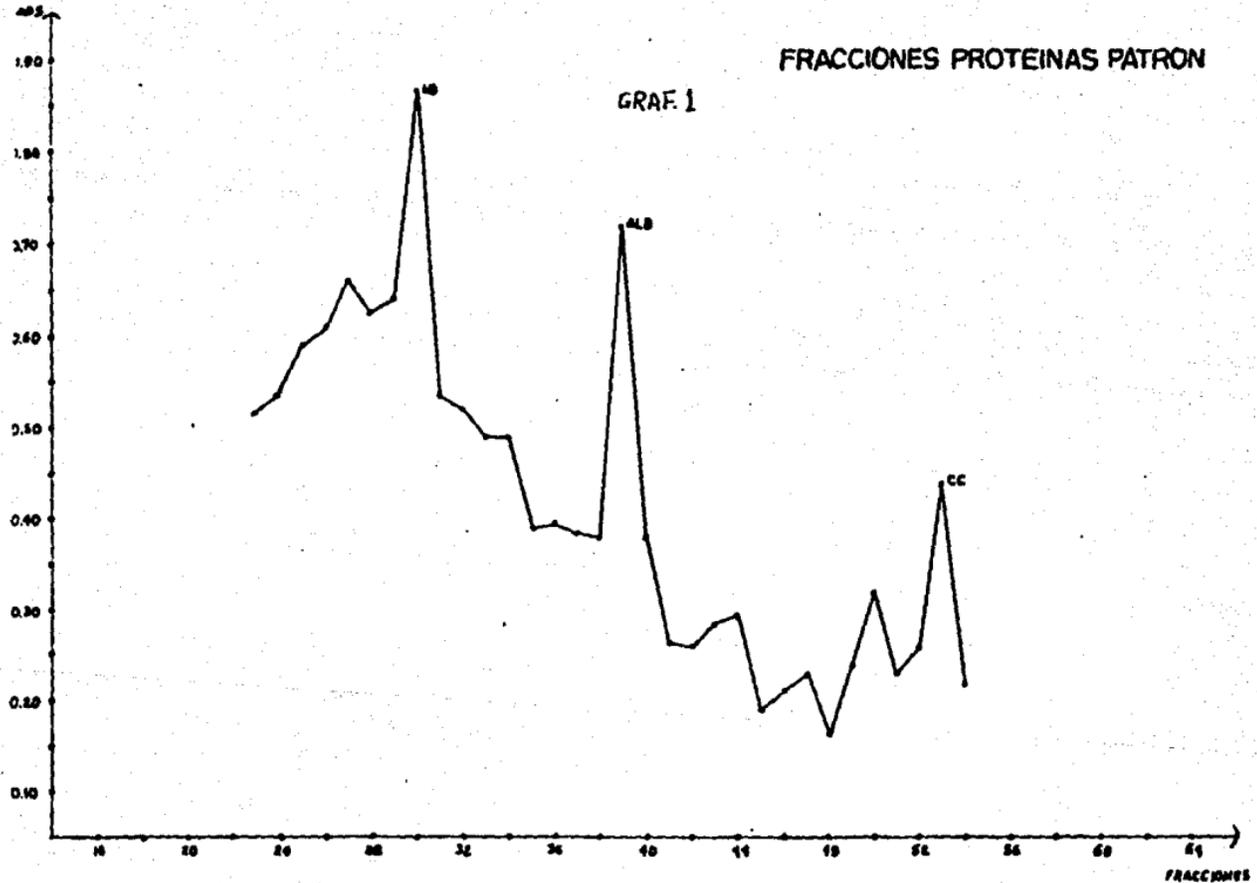
DIAS	4	6	7	9	10	11	13	16
FRACCIONES								
21	21.6	55.5	56.0					
25	7.8	43.3	55.0	59.0	60.0	60.0	60.0	69.0
43	15.0	47.0	65.0					
62	16.6	69.0						
Ag.comp.	5.0	19.4	25.5	41.0	49.6	62.3	78.5	
Sin Ag.	2.0	24.0	42.5	51.0	60.5	64.0		

(Gráfica 4 y 5)

## GRAFICAS

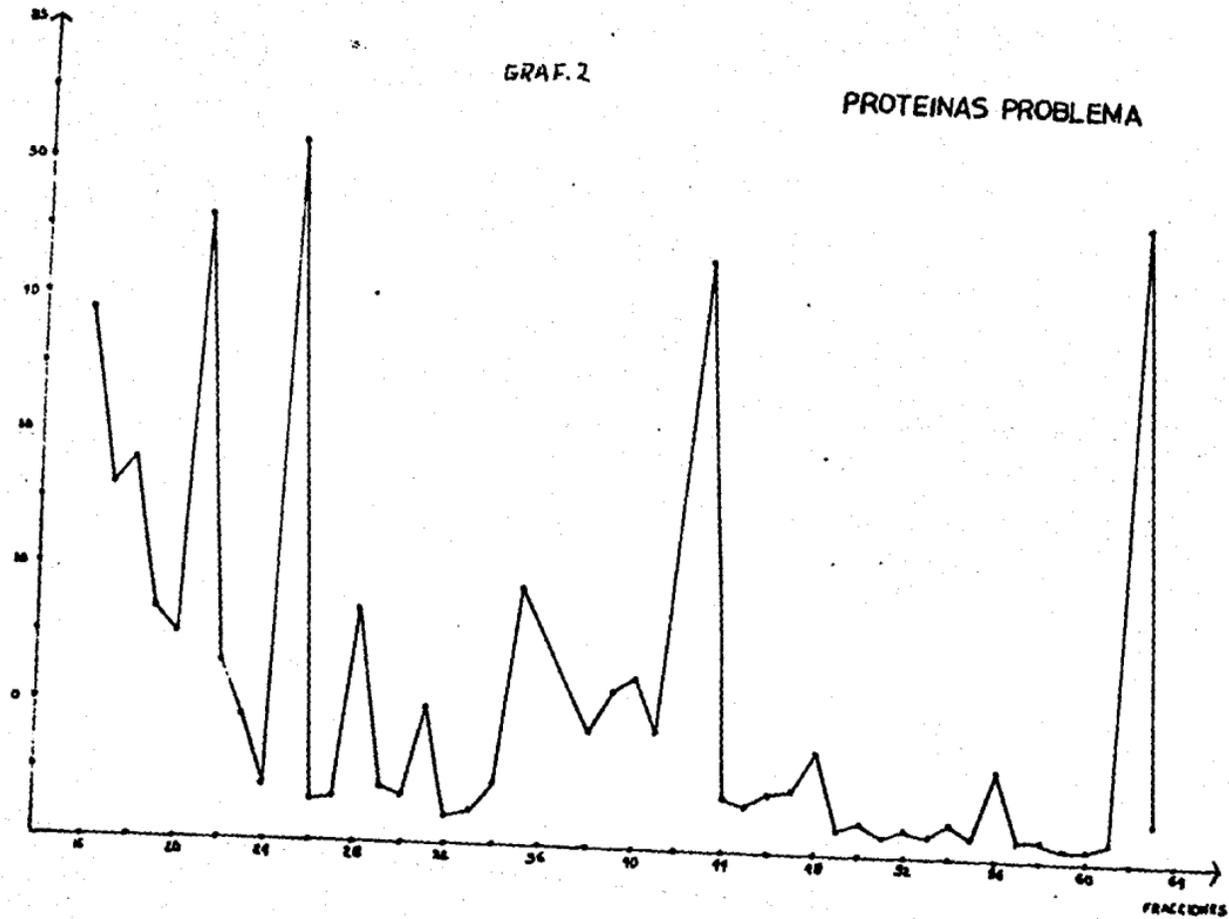
# FRACCIONES PROTEINAS PATRON

GRAF. 1



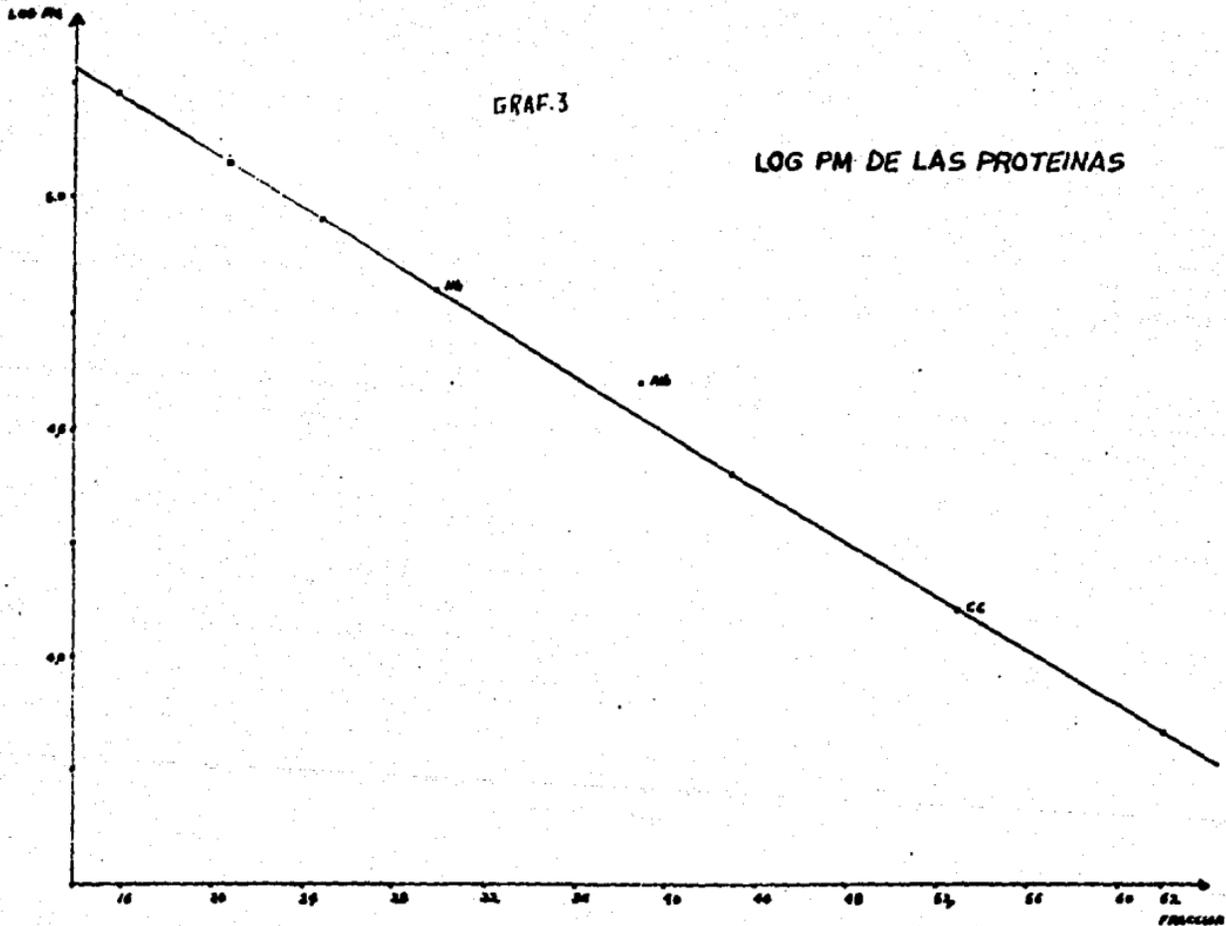
GRAF. 2

PROTEINAS PROBLEMA



GRAF.3

LOG PM DE LAS PROTEINAS

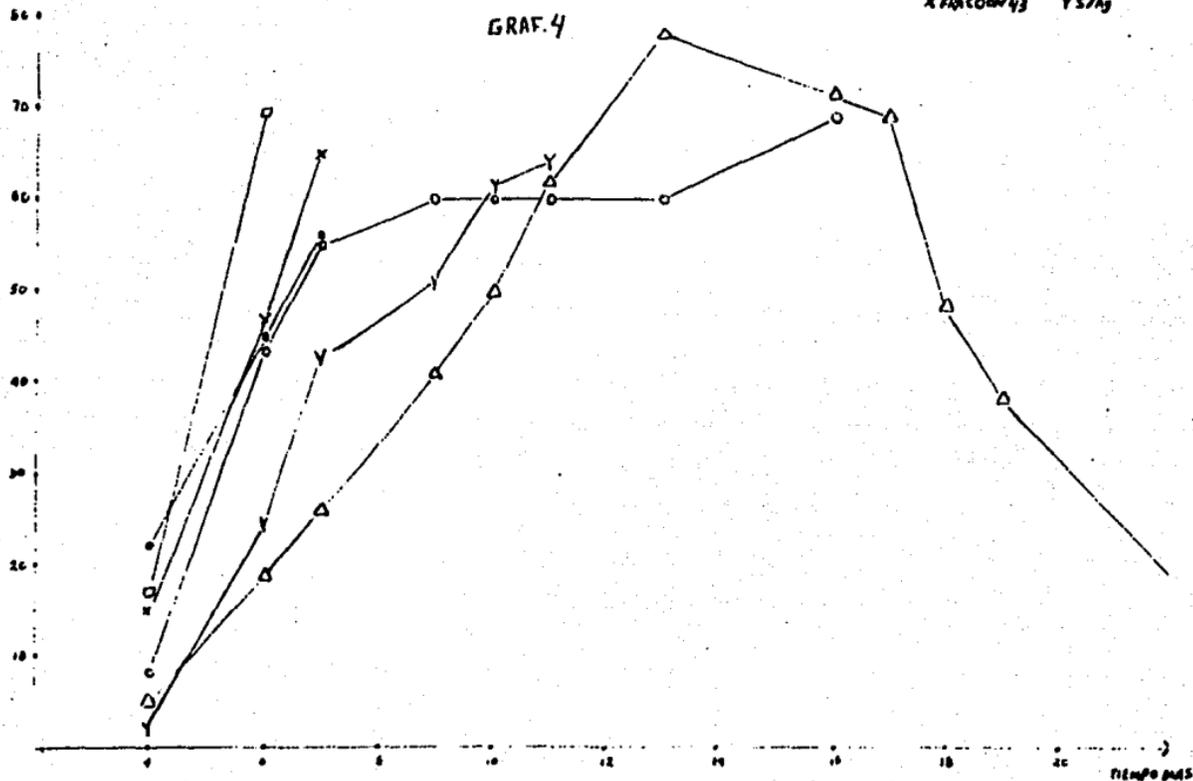


PARASIT.

# PARASITEMIA DE RATONES INMUNIZADOS

- FRACCIÓN 21
- FRACCIÓN 52
- FRACCIÓN 25
- △ Pp COMPLETO
- X FRACCIÓN 43
- Y S/A9

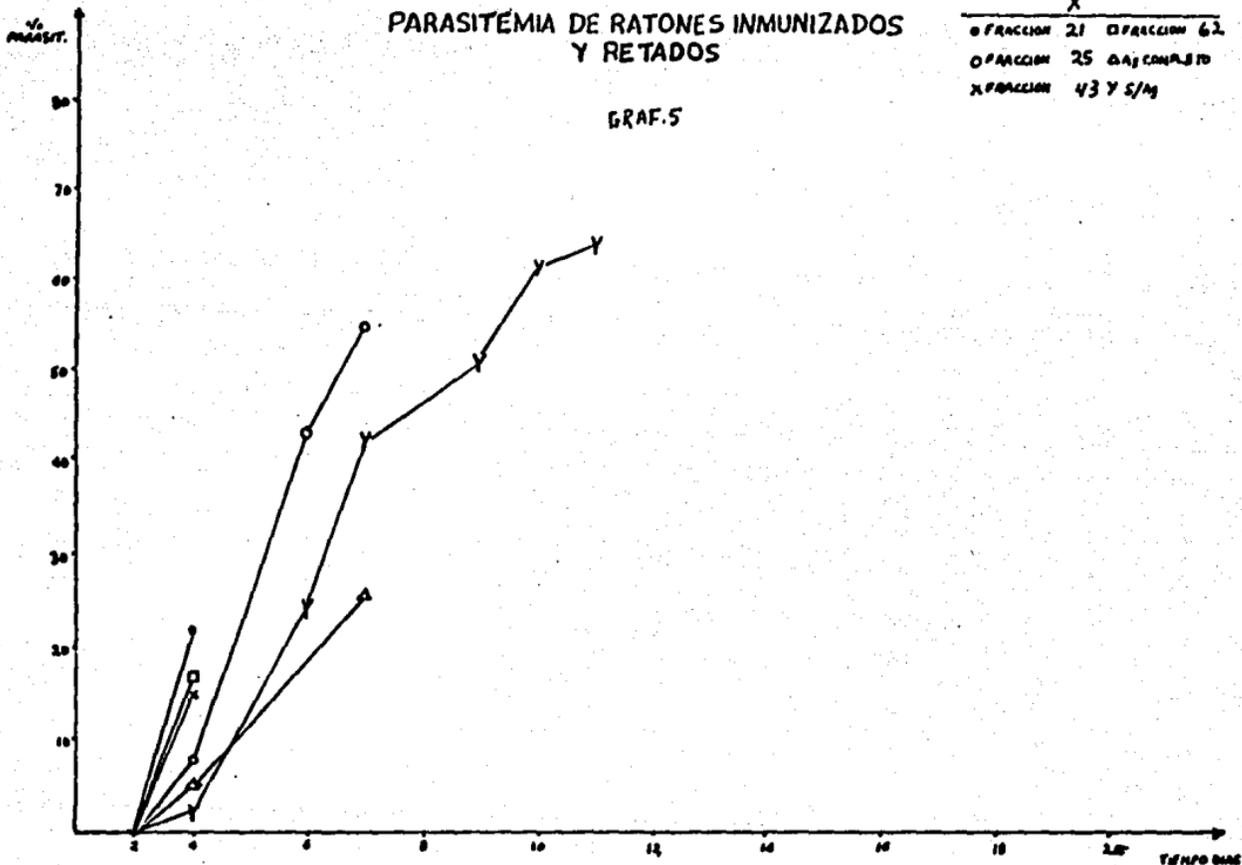
GRAF. 4



# PARASITEMIA DE RATONES INMUNIZADOS Y RETADOS

GRAF. 5

$\bar{x}$	
○ FRACCION 21	□ FRACCION 62
○ FRACCION 25	△ A3 COMPLETO
X FRACCION 43 Y S/A3	



## 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.

## 1. ANALISIS DE DATOS

TABLA 1

Datos V1 y V2

V1 = fracción

V2 = tiempo en días

	Valor	Frecuencia de datos
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

4	3
6	5
7	4
11	2

Días en que se leyó el % de parasitemia	Frecuencia de datos
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 sonicado se fraccionó en la columna de -- filtración molecular. El espectro de absorción de las fracciones eluidas a partir del tubo No. 21 (que corresponde al volumen de exclusión) se muestra en la gráfica 1. Se seleccionaron las fracciones 21, 25, 43 y 62, Ag completo sonicado 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	28,183.829
Fracción 62	7,079.458

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

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

Los ratones inmunizados con la fracción 21 de PM = -  
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 PM = 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 ra-  
tones inmunizados con esta, una sobrevivida de 6 días y una pa-  
rasitemia máxima de 69%, resistiendo menos que el control.

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

De acuerdo a los análisis estadísticos realizados --  
(tabla 1) se deduce que las fracciones y al Ag sonicado com--

pleto, producen el mismo tiempo de sobrevida 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 Pyy. 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 al 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 - ABREVIATURAS

Ag	_____	Antígeno
Ac	_____	Anticuerpo
C	_____	Complemento (C1,C2,...etc)
PM	_____	Peso Molecular
Ho	_____	Hipótesis nula
Ha	_____	Hipótesis alterna
SSI	_____	Solución salina isotónica
SSC	_____	Solución salina citratada
PBS	_____	Solución amortiguadora de fosfatos
PYY	_____	Plasmodium yoellii yoellii
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 hemoglobi-  
nico o del número de eritrocitos  
del organismo.
- Antígeno** \_\_\_\_\_ Sustancia que introducida en el -  
organismo provoca la formación de  
anticuerpos, que inducen una res-  
puesta inmunitaria localizable -  
cuando es introducida en un ani-  
mal.
- Anticuerpo** \_\_\_\_\_ Proteína específica de la sangre  
y otros líquidos orgánicos (globu-  
linas) que aparecen tras la inyec-  
ción de elementos extraños (anti-  
genos) sobre los que actúa especí-  
ficamente: aglutinándolos (aglutin-  
inas), destruyéndolos (lisinas),  
neutralizándolos (antitoxinas) o  
precipitándolos (precipitinas).
- Aglutinación** \_\_\_\_\_ Reacción antígeno-anticuerpo en la  
cual un antígeno sólido o en par-  
tículas forma un cristal con un -  
anticuerpo soluble. En la agluti-  
nación invertida, el anticuerpo -  
está insertado a la partícula só-

lida y es aglutinado por un antígeno insoluble.

- Bilirrubina** \_\_\_\_\_ Pigmento biliar amarillo, 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.
- Bacteriólisis** \_\_\_\_\_ Desintegración de bacterias inducidas por anticuerpos 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.
- Célula** \_\_\_\_\_ Elemento fundamental de los tejidos organizados, el más simple libre, dotado de vida propia, com

puesto 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.
- Esplenomegalia \_\_\_\_\_ Aumento del volumen o hipertrofia del bazo.
- Célula epiteloide \_\_\_\_\_ Células jóvenes del tejido conjuntivo que por mutua comprensión aparecen aplanadas; 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.

- Exoeritrocítico \_\_\_\_\_ 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 cuál 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 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.
- Hematófaga \_\_\_\_\_ 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 hística que contribuye a regularizar el tono de la musculatura lisa.
- Histiocito \_\_\_\_\_ Célula grande, fagocitaria del sistema reticuloendotelial, que se haya 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 cuál 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 relacioandas con las reacciones antígeno-anticuerpo-complemento.
- Insecticida** \_\_\_\_\_ Componente que destruye a los insectos.
- Leucocitosis** \_\_\_\_\_ Aumento transitorio de los leucocitos en la sangre circulante -- (más de  $10,000/\text{mm}^3$ ).
- 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 reproducción esquizógona de los protozoos.
- Microorganismos** \_\_\_\_\_ Planta o animal microscópicos.
- Macrófago** \_\_\_\_\_ Fagocito de pequeño tamaño. Leucocitopolinuclear móvil que se observa en las afecciones 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 activación metabólica provocada por varios estímulos, 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 destrucción 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, especialmente 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 propagadores de infecciones.
- Reacción de precipitación \_\_\_\_\_ Reacción entre un antígeno soluble y un anticuerpo también soluble, en la cuál 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 sólo contra el virus de la vaccina.)

## XI BIBLIOGRAFIA

- 1.- Cruz, O., Parasitología, 2a. ed. Edit. Méndez oteo, México (1981)
- 2.- Lynch, M.J., Mellor, L.D., et al. Métodos de laboratorio, 2a. ed. Nueva Editorial Interamericana, México -- (1969).
- 3.- Rose, N., Principio de Inmunología, Edit. CECSA, México (1983).
- 4.- Biagi, F., Enfermedades Parasitarias. 2a. ed. 6a. reim-  
presión Edit. La Prensa Médica Mexicana, México (1981).
- 5.- Stites, D.P., Stobo, J.D., fudenberg, H.H., Wells, J.V.  
Inmunología Básica y Clínica, 4a. ed. Edit. El Manual -  
Moderno, S.A. de C.V. México (1983).
- 6.- Craig, F. Parasitología Clínica, Edit. Salvat. México -  
(1979).
- 7.- Pirson, P.J., M.E., Caracterización con anticuerpos mo-  
noclonales de un antígeno de superficie en merozoitos -  
de Plasmodium falciparum. J. of Immunology. 134 (3), -  
1946-1951, (1985).
- 8.- Oka, M. Localización ultraestructural de antígenos pro-  
ectores de merozoitos de Plasmodium yoellii usando an-  
ticuerpos monoclonales y criomicrotomía ultradelgada.  
33 (3), 342-346, (1984).

- 9.- Hinchén, J.D. Estadística práctica para la investiga---  
ción química. Edit. El Manual Moderno (1976).
- 10.- Pierarski, G. Parasitología Médica. Instituto de Parasi-  
tología Médica de la Universidad de Bonn Alemania. Edit.  
Sarbenssabriken Bayer AG Leverkusen (1961).
- 11.- Gabriel, J. Specific lysis of plasmodium yoellii infec-  
ted mouse erythrocytes eith antibody aand complemente.  
Clin. Exp. Inmonol 52: 129 (1983).
- 12.- Weinbaum, F., Inmunity to Plasmodium Berghei yoellii -  
yoellii in mice II Specific and nonspecific cellular --  
and humoral responses during the course of infection. J.  
Immunol. 121, 626, (1978).
- 13.- Thoogsuwanm, S., Antibodies in malaria, J. Parasitol, -  
64, 1050, (1978).
- 14.- Cohen, S. Gammaglobulin and acquiere inmunity to mala-  
ria. Immunity to Protozoa, Edit. 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 disease. 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 in-  
jection of X- irradiated sporozoites of Plasmodium --

- berghei, IV. Dose response, specific and humoral immunity, J. Parasitol. 56, 350 (1968).
- 19.- Khansari, N. Immunosuppression in murine malaria: A soluble immunosuppressive factor derived from Plasmodium berghei infected blood. J. Immunol., 127, 1889, (1981).
- 20.- Newsletter, Special programme for research and training in tropical disease. UNPD/WORLD/BANK/WHO, 21, 1, (1984).
- 21.- Aikawa, M. The protective antigen of malaria sporozoites, (Plasmodium berghei). 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. Edit. Limusa. México. (1977).
- 24.- Bharracharya, J., Swarup, S. Mitra., Reduction in erythrocytic GSH-level and stability in Plasmodium vivax malaria. Trans. of the Royal Society of tropical Medicine and Hygiene 81, 64-66, (1987).
- 25.- Giuseppe, G., Engers, H., et al. Antibodies to the repetitive epitope of Plasmodium falciparum circumsporozoite protein in a rural Tanzania community: A longitudinal study of 132 children. Am. J. trop. Med. Hyg. 36 (2), 203-212, (1987).
- 26.- Arruda, M., B. Carvalho, M., S. Nussenzweig, R., et al. Potential vectors of malaria and their different susceptibility to Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax

- in northern Brazil identified by immunoassay, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35 (5), 873-884, (1986).
- 27.- Chapel, H., Warrell, D.A., Loareesuwan, S., et al. Intrathecal immunoglobulin synthesis in cerebral malaria. *Clin. Exp. Immunol* 67, 524-530, (1987).
- 28.- Fox, E., Strickland, G.T., Sarwar, M., et al. Reliable assessment of malaria prevalence through village clinics. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81, 115-117, (1987).
- 29.- Bharia, A., Delplace, P., Fortier, B., et al. Immunochemical analysis of a major antigen of *Plasmodium falciparum* (P 126) among ten geographic isolates. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36 (1), 15-19, (1987).
- 30.- W. Taylor, D., Pacheco, E., B. Evans, Ch., Asofsky, R. Inbred mice infected with *Plasmodium yoellii* differ in their antimalarial immunoglobulin isotype response. *Parasite Immunology*, 10, 33-46, (1988).
- 31.- G., Culvenor, J., J. Langford, Ch., E. Crewther, P., et al. *Plasmodium falciparum*: Identification and localization of a knob Protein Antigen Expressed by a cDNA Clone. *Exp. Parasitology*. 63, 58-67, (1987).
- 32.- E. Egan, J., Haynes, J.D., D. Brown, N., S. Eisemann, - Ch. Polyamine oxidase in human retroplacent serum inhibits the growth of *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35, (5), 890-897 (1986).

- 33.- Beck, J.W., Davies, J.E. Parasitología Médica, 3a. ed. Nva. Edit. Interamericana, México (1984).
- 34.- Zaman, V. Atlas de Parasitología Médica. Edit. Médica - Panamericana. México (1982).
- 35.- I. Braude, A. Enfermedades infecciosas, Edit. Médica -- Panamericana Buenos Aires. (1984)
- 36.- Ch, B. Paul, C.J. rodney. Parasitología Clínica. 2a. Ed. Edit. Salvat Editores, Barcelona (1986).
- 37.- Woodruff, A.W., Bell, S. Sinopsis de Enfermedades Infecciosas y Tropicales. Editores Científico Médica. Barcelona (1971).
- 38.- Francois, B.J. Inmunología. Edit. Limusa México (1984).