

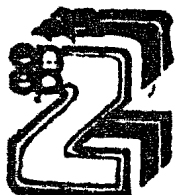


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"ZARAGOZA"**

**EVALUACION DE ALGUNOS FACTORES DE LA
RESPUESTA INMUNE EN UN MODELO
EXPERIMENTAL DE MALARIA
EN RATONES**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE;
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A N
FRANCISCO JAVIER PARADA GARCIA
ARMANDO RAMIREZ GONZALEZ



México, D. F.

Octubre de 1984



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AREA ESPECIFICA DEL PROYECTO

I N M U N O L O G I A

PARTICIPANTES.

ASESOR: DR. RUBEN MARROQUIN SEGURA.

ALUMNOS: ARMANDO RAMIREZ GONZALEZ.

FRANCISCO JAVIER PARADA GARCIA.

I N D I C E

	pag.
Introducción	1
Fundamento de la elección del tema	23
Planteamiento del problema	25
Objetivos	27
Hipótesis	29
Material y equipo	31
Material biológico	35
Reactivos	38
Metodología	41
Resultados	58
Discusión de los resultados	71
Conclusiones	73
Bibliografía	75

I N T R O D U C C I O N .

EVALUACION DE ALGUNOS FACTORES DE LA RESPUESTA INMUNE
EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE MALARIA EN RATONES

I N T R O D U C C I O N

Sinonimia y agente etiológico.

El paludismo tiene varios sinónimos, entre ellos, la malaria, fiebre de los pantanos, fiebre de Changres, fiebre tropical y frios. (1)

Algunos de los protozoarios que infectan al hombre son los parásitos del paludismo. Se encontraron por primera vez en 1880 por Laveran, y su ciclo vital en los eritrocitos humanos fue descrito por Golgi. Las sugerencias de Manson permitieron a Ross demostrar, en 1898 la transmisión del paludismo aviario por los mosquitos y posteriormente, en ese mismo año, Grassi, Bignami y Bastianelli demostraron el mecanismo de transmisión del paludismo humano. (2)

Los agentes etiológicos del paludismo en el hombre son: Plasmodium vivax, Plasmodium malariae, Plasmodium falciparum y Plasmodium ovale,

En roedores los agentes etiológicos son: Plasmodium berghei y Plasmodium knowlesi.

Distribución mundial.

P. vivax, se encuentra ampliamente difundido, en especial en las zonas ecuatoriales, tropicales, subtropicales y templadas; es el que tiene una mayor distribución mundial.

P. falciparum, prepondera en las regiones tropicales, en especial en la costa occidental de Africa, también en regiones templadas.

P. malariae, está localizado principalmente en Ceilán, Malasia, Nueva Guinea, Brasil y las Antillas.

P. ovale, se localiza en Africa intertropical, Egipto, India y Filipinas. (1)

P. berghei, se encuentra principalmente en el Congo. (3)

Paludismo en México.

En la historia de la medicina, el paludismo es tan antiguo como el más primitivo de los escritos médicos. Sin embargo, la historia de este padecimiento en México, antes de la Epoca Precolombina, está encerrada en la misma incógnita que el origen de la malaria en América, ya que no se ha precisado si esta enfermedad existía o no antes del descubrimiento del nuevo mundo.

México, con gran parte de su territorio dentro de la zona tropical, presenta condiciones favorables para la transmisión del paludismo. Antes de la campaña de erradicación en 1955 el

número de defunciones anuales, alcanzaba cifras de 25,000, y esto situaba al padecimiento dentro de las cinco primeras causas de muerte.

En 1955 se creó la Comisión Nacional para la erradicación del Paludismo (C.N.E.P.), dependiendo de la S.S.A. y en 1956, se hicieron los preparativos para lanzar las operaciones de campo, que incluyeron el reconocimiento geográfico, el censo de casas, cartografía, y estudios epidemiológicos para delimitar el área afectada y las características del paludismo. Se adiestró a todo el personal y se realizó un programa de información nacional. (1)

Desde 1961, el paludismo en México ha dejado de ser un problema grave de salud pública, y las áreas de consolidación han crecido notablemente.

Ciclo biológico.

El paludismo es una enfermedad transmitida por el mosquito Anopheles hembra (por ser solo la hembra hematófaga). Aunque también puede ser inducida por transfusiones procedentes de donadores con paludismo, o por material quirúrgico contaminado.

Los Anopheles son insectos dípteros, nematóceros, de la familia de los culicidos, subfamilia de los anofelinos. Su cuerpo está dividido en tres partes: cabeza, tórax y abdomen. La cabeza tiene por delante de los ojos la trompa, situada en la

parte media, y de dentro afuera los palpos y las antenas.

Al igual que todos los mosquitos, los Anopheles, insectos de metamorfosis completa, presentan desarrollo acuático. Las distintas fases del desarrollo requieren solo unos días en las mejores condiciones.

Los Anopheles no suelen vivir en las aguas muy contaminadas de las grandes ciudades, por lo que se considera una enfermedad rural. La guarida de los insectos puede ser natural, o creada por el hombre, como arrozales, canales de riego y fosas. El agua en general debe estar estancada, pero a veces puede presentar una ligera corriente, e incluso algunas especies se adaptan a los torrentes.

La longevidad de las hembras, es inferior a treinta días.

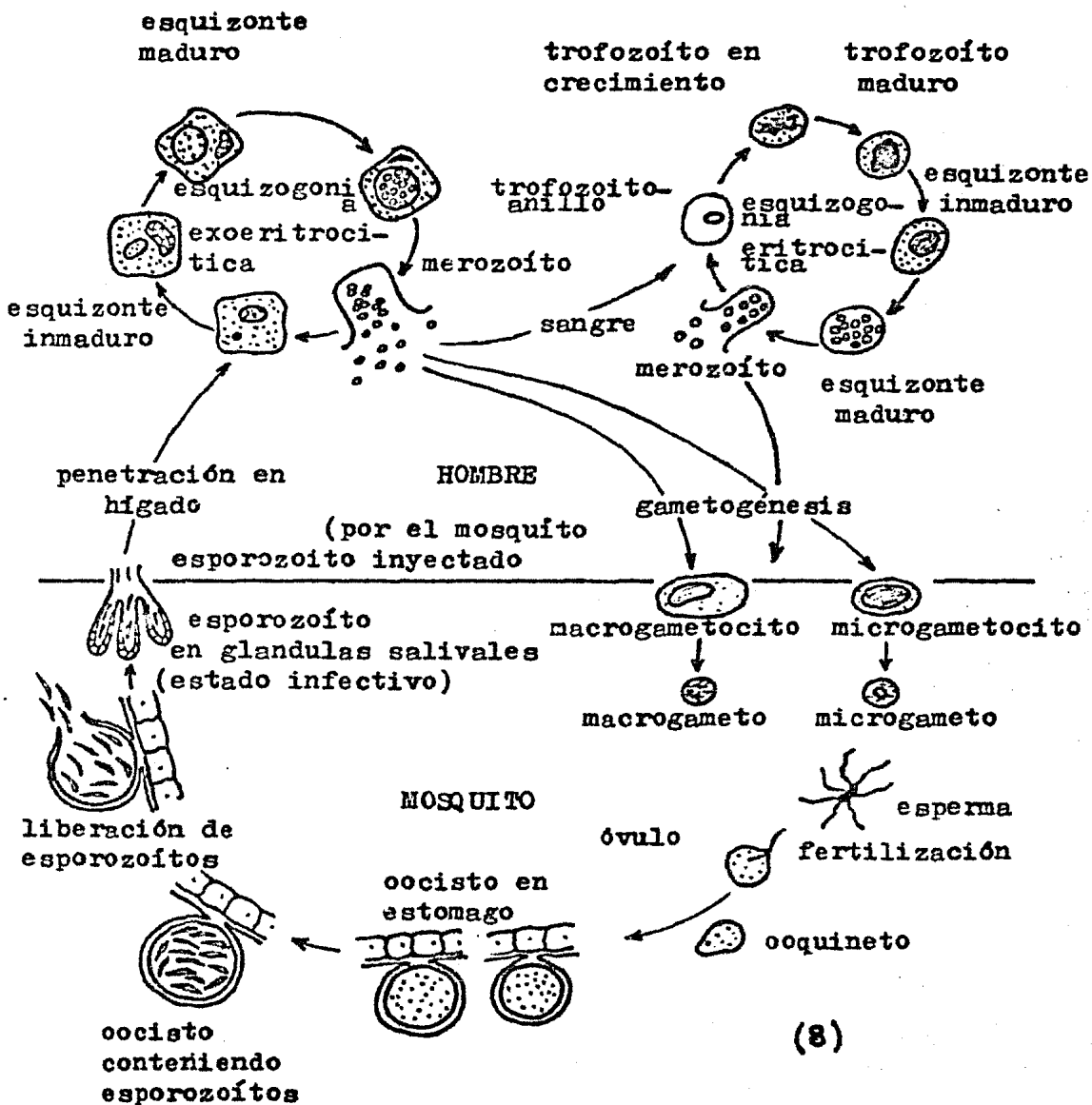
Como se dijo con anterioridad, el hombre adquiere el paludismo por la picadura de un mosquito infectado, que le inoculara esporozoítos. Estos desaparecen rápidamente de la sangre y se alojan en las células del parénquima hepático, en las cuales se desarrollan, segmentan y esporulan. Esta es la fase preeritrocítica y asintomática de la infección. Al llegar a la madurez los merozoítos escapan de las células del hígado y penetran en los eritrocitos, con lo que comienza el ciclo hemático de la enfermedad. En todas las variedades del paludismo, exceptuando a la terciana benigna (P. falciparum), una parte de los merozoítos invaden a otras células tisulares, y esta etapa de la infección, el ciclo exoeritrocítico, puede proseguir durante varios

años y originar recrudescencias o recaídas clínicas. La fase de esquizogonia se produce en los eritrocitos, a consecuencia del desarrollo y segmentación de los merozoítos.

Cuando el hematíe estalla, los merozoítos infectan a otros eritrocitos y el ciclo comienza de nuevo. Esta rotura periódica de los eritrocitos es la causa de los característicos calosfríos del paludismo. Por causas aún desconocidas, algunos de los merozoítos que invaden a los hematíes no siguen el ciclo de reproducción asexual, sino que se convierten en formas sexuadas: los gametocitos masculino y femenino. La evolución de estas formas no prosigue hasta que el mosquito hembra ingiere la sangre que los contiene. En el intestino del mosquito, el gameto masculino madura y da origen a los microgametocitos móviles flagelados, uno de estos fecunda al gameto femenino y se forma así el cigoto. En la pared del intestino, el cigoto se transforma en oocisto, dentro del cual se forman los esporozoítos infectantes. (4,5,10)

En la hoja siguiente se esquematiza el ciclo biológico del Plasmodium .

CICLO VITAL



Cuadro clínico.

El periodo de incubación es variable, según la especie de Plasmodium de que se trate. Para P. vivax y falciparum es de 10 a 15 días; para P. ovale de 11 a 16 días, y para P. malariae de 28 a 37 días.

Los síntomas consisten en paroxismos de calosfríos, fiebre y sudoración, que se presentan a intervalos regulares, dependiendo del tiempo en que se completa el ciclo esquizogónico eritrocítico. Así P. vivax y P. ovale lo completan en 48 horas, produciéndose un paroxismo cada tercer día (por lo que se le llama fiebre terciana). P. malariae cada 72 horas, por lo que se produce un paroxismo cada cuatro días (por lo que se le llama cuartana); P. falciparum es más irregular y puede causar paroxismos cada 24, 36 ó 48 horas.

El inicio sintomático generalmente es brusco, con calosfríos, fiebre de 40 a 41^o C, cefaleas, mialgias, taquicardia y polipnea. Después de varias horas, la fiebre crisis acompañada de sudoración profunda. Sin embargo no es raro que el cuadro febril sea atípico especialmente en los primeros días del padecimiento, cuando el ciclo eritrocítico no se ha sincronizado.

El cuadro clínico de la malaria suele durar 2 a 3 semanas; es excepcional que evolucione durante más de un mes. Esto también nos permite diferenciarlo de otros padecimientos febriles.
(4,5)

Entre otros trastornos pueden observar esplenomegalia, ictericia y siempre se presenta anemia. P. vivax y P. falciparum pueden causar formas graves llamadas Formas Perniciosas, en las que se puede presentar coma, convulsiones y paro cardiaco. (1,4)

Diagnóstico y tratamiento.

En las áreas endémicas de malaria, el diagnóstico de laboratorio se hace mediante frotis delgado de sangre o por la técnica de gota gruesa; los cuales se tiñen con giemsa. Deberán de tomarse muestras de sangre con un intervalo de 6 horas hasta encontrar el parásito o durante 4 días, para darlo como negativo. Las reacciones serológicas hasta la fecha no han dado resultados satisfactorios.

En los cortes histológicos del bazo o del hígado, en las células del sistema reticuloendotelial, puede encontrarse pigmento malarico lo cual nos indicará que el paciente tuvo, en los últimos meses, o que tiene paludismo. (6)

Para destruir las formas eritrocíticas, o sea para tratar el cuadro clínico (tratamiento supresivo) podrá emplearse -- amodiaquina, cloroquina, mepacrina, proguanil o quinina, por vía oral, siendo los dos primeros medicamentos los de elección. La administración parenteral sólo está indicada en casos graves o en enfermos que no puedan ingerir el medicamento, volviendo a la vía bucal tan pronto como sea posible; por esta vía se puede emplear cloroquina, meparina o quinina. (21)

En infecciones con P. vivax, P. malariae y P. falciparum, además habrá que administrar primaquina, que actúa contra las formas exoeritrocíticas y reduce la posibilidad de recaídas - (cura radical); también puede emplearse primetamina.

Se ha demostrado la aparición de cepas resistentes a los medicamentos específicos. En la actualidad se ha observado aparición de resistencia a todos los fármacos disponibles, de modo que si el cuadro clínico no cede ni disminuye la parasitosis, es urgente cambiar a un medicamento diferente del que se había iniciado; para estos casos se ha recomendado la quinina. La asociación de antimaláricos con sulfonas o sulfonamidas logra controlar mejor las cepas resistentes. (5)

Prevención.

En las zonas endémicas, es recomendable la protección de las casas con tela mosquitero en puertas y ventanas, y el uso de insecticidas residuales aplicados en paredes y muebles.

Cuando una persona tiene que viajar a zonas endémicas de paludismo, se puede recomendar como profiláctico la cloroquina.

En los bancos de sangre debe evitarse tener como donadores a personas que hayan padecido paludismo.

El medicamento de elección en la actualidad para profilaxis es el pamoato de cicloguanilo, que es aplicado en una inyección que se mantiene en niveles protectores por más de 4 meses. (4)

RESPUESTA INMUNE

La observación de que algunas enfermedades infecciosas difícilmente se repetían en el mismo individuo, llevó a la búsqueda de los factores y mecanismos que se hallaban involucrados en este fenómeno. En la actualidad se sabe que es el resultado de la respuesta inmune provocada por el primer contacto con el agente infeccioso y que se efectúa por proteínas plasmáticas llamadas anticuerpos (respuesta inmune humoral) y por los productos de células especializadas conocidos como linfocitos sensibilizados (respuesta inmune celular).

La respuesta inmune tiene cuatro características, que la diferencian de cualquier otro fenómeno biológico. En primer término, la respuesta es inducible debido a que solo se presenta cuando una sustancia inductora, llamada antígeno penetra en el organismo. En segundo lugar, la respuesta es específica y un sujeto inmunizado con un antígeno dado no presenta inmunidad para otro antígeno diferente. La tercera característica es la memoria que se refiere al hecho de que el segundo contacto con un determinado antígeno da por resultado una respuesta más rápida y vigorosa (respuesta secundaria) que en la primera ocasión (respuesta primaria). Finalmente la respuesta inmune puede ser transferible de un sujeto inmune a otro que no lo es, ya sea por medio de suero que contenga anticuerpos o de linfocitos sensibilizados.

El establecimiento de la respuesta inmune requiere de la

interacción de varios tipos celulares que colaboran entre sí. Todo parece indicar que para el inicio de la respuesta, es necesaria alguna modificación en la estructura o presentación del antígeno, efectuada por los macrófagos. Posteriormente intervienen los linfocitos, de los cuales se conocen dos variedades, conocidas como T y B. Los linfocitos T o timodependientes requieren de la presencia de dicho órgano linfoide para adquirir la aptitud de responder a ciertos antígenos, dar origen a los linfocitos sensibilizados y cooperar con los B. Los linfocitos B se diferencian como tales en la bolsa de Fabricio de las aves o en algún otro órgano linfoide, aun no identificado plenamente en los mamíferos. De cualquier modo, los linfocitos B son los precursores de las células plasmáticas que son las que elaboran y secretan grandes cantidades de anticuerpos. En uno y otro caso, los linfocitos que han estado en contacto con los antígenos, sufren modificaciones en su metabolismo y tienen alteraciones morfológicas tales que culminan en una división celular acelerada asimétrica, la cual resulta en la formación de células terminales (linfocitos sensibilizados y células plasmáticas) y células de memoria (linfocitos T de memoria y linfocitos B de memoria) .

Respuesta inmune humoral.

Una de las características más importantes de la respuesta inmune es su especificidad. Por lo que toca a los anticuerpos

este es un fenómeno en el que está establecido que estas moléculas pueden reconocer al antígeno que indujo su formación, aun en presencia de otras moléculas.

Cuando la reacción antígeno-anticuerpo se realiza en un organismo viviente, se desencadena una serie de acontecimientos que conducen a la eliminación efectiva del complejo formado. Puede bastar la interacción del antígeno con el anticuerpo para neutralizar la actividad biológica del primero, como es el caso de algunos virus y toxinas (neutralización). Si el antígeno forma parte de una célula, la unión con su anticuerpo hace que este sufra modificaciones en su conformación y, a consecuencia de ello pueda interaccionar con otras moléculas y células que favorezcan la eliminación del antígeno.

En este último caso, se encuentra la activación secuencial de una serie de proteínas plasmáticas, colectivamente conocidas como sistema de complemento (C). Estas proteínas pueden así convertirse en enzimas, por alteración de su estructura, y liberar fragmentos con actividades biológicas diversas. La activación del complemento provoca un aumento en la permeabilidad capilar por lo que, de los vasos sanguíneos, sale líquido que puede diluir a ciertas toxinas, llevar consigo sustancias antimicrobianas y provocar una zona que limite la dispersión de gérmenes. También se forman factores quimiotácticos que atraen neutrófilos al lugar donde están los microorganismos, los fagocitan y los destruyen. Otros factores del complemento sufren modificaciones estructurales y en contacto con células, permiten

que estas se adhieran a macrófagos o a otras células con receptores para tales componentes modificados del complemento, favorece la formación de anticuerpos contra ellos mismos, con lo que se incrementa la aglutinación de los microorganismos (inmunoconglutinación) y se favorece su fagocitosis. Finalmente la acción del complemento sobre ciertas bacterias y células da por resultado su lisis.

El complemento es un formidable efector y amplificador de la respuesta inmune y su participación en la eliminación de gérmenes es de gran importancia; sin embargo, es el mismo el que puede activarse en forma exagerada y conducir a las reacciones de hipersensibilidad, en las que hay destrucción de células y tejidos del propio organismo.

Uno de los primeros elementos estudiados e identificados en la respuesta inmune fueron los anticuerpos, se encontraron en plasma y líquidos extravasculares. Fueron localizados en la fracción gamma del suero, razón por la que les denominó las inmunoglobulinas (Ig). Después de estudios con tratamientos enzimáticos sobre la molécula de Ig se encontraron dos porciones. La fracción cristalizable, que es constante en las Ig, (Fc), tiene la mayor actividad biológica, puede activar complemento, fijarse en membranas celulares, atravesar placenta, etc. La fracción variable (Fab), que es la fracción que le da especificidad a la molécula y la que se combina con los antígenos.

Hay cinco tipos de Ig en el hombre, son la IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Las cuales se pueden identificar entre si por

características físicas, químicas y biológicas.

Respuesta inmune celular.

La respuesta inmune mediada por linfocitos timodependientes tardó en ser plenamente reconocido y analizada debido a la - falta de una metodología apropiada que permitiera conocer los mecanismos en ella implicados.

Koch demostró que el estado inmune a Mycobacterium tuber-
culosis se puede poner de manifiesto mediante pruebas cutáneas en las cuales se inyectan dosis pequeñas del producto del meta-
bolismo del microorganismo (tuberculina o PPD), lo cual da por resultado que al cabo de unas 24 horas aparezca un eritema - (enrojecimiento) e induración, localizados en el sitio de la inoculación. Este tipo de reacciones fueron llamadas de hiper-
sensibilidad tardía para diferenciarlas de las reacciones de hipersensibilidad inmediata, las cuales se manifiestan segundos o minutos después de la inoculación del antígeno.

Las reacciones de hipersensibilidad inmediata pueden trans-
ferirse por medio de anticuerpos, a diferencia de las tardías - en que no es posible por éste medio. Fueron Landsteiner y Chase quienes lo lograron utilizando células linfoides provenientes - de sujetos inmunizados. Posteriormente se demostró que no era - indispensable que los linfocitos estuvieran intactos, y que -- las células rotas o una sustancia dializable obtenida de éstas (factor de transferencia) también eran capaces de transferir -

la respuesta inmune celular.

Desde luego que la inmunidad celular no sólo está asociada con el bacilo tuberculoso pues otros microorganismos con las características comunes de tener vida parasitaria intracelular (virus, ciertas bacterias y hongos), inducen excelentes respuestas celulares. Existen evidencias que en el rechazo de trasplantes intervienen linfocitos sensibilizados a los antígenos de membrana celular del donador. Este rechazo a trasplantes es un caso particular de un fenómeno mucho más general de reconocimiento de células con antígenos diferentes a los propios, situación que frecuentemente se presenta en el caso de aparición de células aberrantes, potencialmente neoplásicas, que pueden surgir por mutación de células normales a causa de factores del medio ambiente, tales como radiaciones, sustancias químicas o agentes biológicos.

Los experimentos "in vitro" han logrado dilucidar los mecanismos de la inmunidad celular. Cuando se cultiva una población de células linfoides provenientes de un sujeto inmune en presencia del antígeno específico, se presentan cambios morfológicos y metabólicos que pueden estudiarse con facilidad. La interacción antígeno-linfocito sensibilizado se lleva a cabo por receptores específicos en la membrana de éste cuya estructura y propiedades son muy similares a la de los anticuerpos. Esta unión conduce a que el linfocito aumente de tamaño, prolifere y forme una serie de sustancias solubles que son liberadas en el medio. Estas sustancias son glicoproteínas con actividades biológicas diversas, colectivamente -

han sido denominadas linfocinas y aunque aún no hay una demostración absoluta de su participación en fenómenos "in vivo", actualmente se les considera como las mediadoras de la inmunidad celular. (11)

Respuesta inmune en la malaria.

La malaria presenta como características inmunológicas principales: La producción de anticuerpos protectores IgG específicos contra los merozoitos, después de múltiples infecciones. También hay valores elevados de inmunoglobulinas en el suero en las regiones endémicas debidas en parte sólo al paludismo. Otro factor es la inmunosupresión de otros antígenos durante el curso de la enfermedad, y finalmente los parásitos despliegan variación antigénica.

Las formas exoeritrocíticas aparentemente inducen escasa o nula respuesta inmunitaria debido a que P. vivax y otras formas recurrentes existen por periodos prolongados en la fase exoeritrocítica, si no aparecen formas en la sangre.

La respuesta inmune que conduce a la protección se cree, por lo general, que se debe a la producción de anticuerpos no dependientes del complemento, los cuales inhiben la entrada de los merozoitos en el interior de los eritrocitos del huésped, aunque los diversos antígenos producidos durante la infección dan por resultado otro tipo de inmunidad aún no entendida. Se ha demostrado que en los individuos que residen en las zonas

endémicas, disminuye su parasitemia a medida que avanza su edad y que los niños en estas regiones parece que están protegidos durante su primer año de vida por las inmunoglobulinas IgG que atraviesan la placenta, provenientes de la madre inmunizada durante el embarazo.

Aunque las respuestas inmunes deprimidas contra otros antígenos pueden ser demostradas durante las infecciones palúdicas, el mecanismo de la inmunosupresión no está claro. Puede resultar de la competencia antigénica causada por la ocupación previa de los macrófagos con la carga masiva de antígenos, producida por los parásitos del paludismo, por algún producto específico producido durante la infección que actúa sobre los macrófagos o por algún producto que actúe sobre los linfocitos T de los animales infectados que son requeridos para montar una respuesta protectora efectiva.

Las respuestas inmunes destructivas debidas a los complejos antígeno-anticuerpo contra los eritrocitos alterados, corazón, tiroides o células parietales gástricas pueden provocar daño mediado por la inmunidad durante la enfermedad. Ciertas respuestas inmunes tambien pueden proteger a los parásitos; por lo tanto, el curso subsiguiente es el resultante de un equilibrio dinamico de las respuestas inmunitarias.

Estudios con vacunas ha demostrado que la protección por estas es muy específica; no obstante estos ensayos proporcionan una base para trabajo posterior en una vacuna multivalente efectiva, aprovechando que ya se pueden cultivar los merozoitos in vitro.

FUNDAMENTOS DE LA METODOLOGIA

Inmunización.

Se conoce como inmunización al proceso mediante el cual se induce una respuesta inmune en un individuo competente, a consecuencia del contacto con un antígeno específico en forma natural o artificial. La respuesta inmune obtenida puede ser humoral, celular o ambas, dependiendo de diversos factores como dosis, vía de administración, tipo de antígeno. (11)

Obtención de IgM.

Si se inyecta una dosis única de una sustancia extraña a un animal inmunocompetente, aparecen anticuerpos específicos en el suero al cabo de un tiempo. El primer contacto con el inmunógeno da lugar a una respuesta primaria, que se caracteriza por la producción de IgM. En el periodo llamado de inducción o latencia, el inmunógeno es reconocido como extraño, además es modificado y se envía a las células que producen anticuerpos. Por ejemplo si se inyectan eritrocitos extraños a un animal inmunocompetente, se encuentran anticuerpos al cabo de 3 ó 4 días, la respuesta primaria frente a este inmunógeno se caracteriza por la producción de IgM; la clase IgG aparece tiempo después. La IgM producida en el suero se precipita con ácido bórico, se purifica en una columna de sephadex G-200 y por

hemaglutinación se titula haciendo diluciones de la IgM. (9)

Reacción de Hemaglutinación.

La aglutinación es una reacción inmunológica que se efectúa cuando se combinan antígenos con sus anticuerpos específicos. Esta reacción se ha usado ampliamente debido a la facilidad con que se lleva a cabo y su alta sensibilidad, comparada con la pre cipitación. Sin embargo, esta prueba no permite la cuantificación exacta de anticuerpos, y los resultados se expresan en función de la dilución mayor que aún se observa aglutinación. (11)

Células formadoras de anticuerpos (Jerne).

Las células formadoras de anticuerpos (CFA), pueden determinarse "in vitro", mediante la propiedad que tienen los anticuerpos producidos, de fijar complemento después de unirse a su antígeno. El sistema se establece con el uso de células linfoides de un animal inmunizado con glóbulos rojos de carnero (GRC), las cuales se mezclan con GRC y al agregar el complemento se produce lisis de los eritrocitos, observándose pequeñas placas líticas, que son fáciles de observar por que el sistema se encuentra en un soporte semisólido de agarosa. En el centro de las placas líticas se encuentran células linfoides productoras de anticuerpos. (17)

Receptores para Fc (Rosetas).

Sobre la superficie de las células que intervienen en la respuesta inmune, existen receptores para diferentes estructuras. Para identificarlos se han creado varios métodos, uno de ellos se basa en la aparición de rosetas, formadas por un linfocito o por un macrófago unido a células indicadoras apropiadas. Los receptores Fc (para la fracción cristalizable de la Ig), son capaces de fijar complejos antígeno-anticuerpo o agregados de inmunoglobulinas con intervención de la fracción Fc de estas. Si colocamos GRC con IgM anti-GRC y células de exudado peritoneal, se formarán rosetas, que pueden cuantificarse por observación al microscopio. Estas rosetas reciben el nombre de Rosetas Fc o Rosetas EA. Se considera roseta cuando la célula tiene - unidos tres o más eritrocitos. (13,14,15)

Capacidad de halogenación (Mieloperoxidasa).

La fagocitosis es un mecanismo para la eliminación de sustancias extrañas, por ejemplo los microorganismos. Después de que una célula ha fagocitado un microorganismo y formado una vacuola digestiva, la fase siguiente es su destrucción; uno de estos mecanismos es el de la mieloperoxidasa (MPO), en el cual se forma un complejo de MPO, peróxido de hidrógeno y un haluro. Este mecanismo de acción del complejo consiste en halogenar las proteínas del microorganismo y de esta manera lo destruye. En

este caso el haluro es el yoduro radioactivo y la célula fagocítica es una célula de exudado peritoneal (CEP). La CEP al fagocitar el zymosan, capta el Iodo; al formarse la vacuola digestiva el yoduro radioactivo halógeno a la partícula fagocitada. Estas células se lavan para eliminar el Iodo no utilizado, y el captado por la célula se cuantifica, proporcionando la capacidad de fagocitosis de la célula. (18)

Cuantificación de linfocitos T.

Los linfocitos T pueden diferenciarse de los linfocitos B mediante diferentes técnicas. Una de estas técnicas es la de la alfa-naftil-acetato-esterasa (ANAE). Esta técnica se basa en la capacidad de los linfocitos T de poseer la enzima ANAE que no tienen los linfocitos B. Cuando se coloca el sustrato, en este caso el alfa-naftil-acetato, los linfocitos T de una muestra, aprovecharán dicho sustrato por poseer la ANAE, cosa que no sucede con los B. Ya captado el sustrato por los linfocitos T se forma un complejo con la para-rosanilida-diazotizada, que se hace visible al contrateñir con azul de toluidina, el complejo (café-rojizo) se puede detectar al microscopio en el citoplasma de las células T. Realizando el conteo en un frotis de linfocitos, puede sacarse un porcentaje de linfocitos T y B respectivamente. (19)

FUNDAMENTOS DE LA ELECCION DEL TEMA.

FUNDAMENTOS DE LA ELECCION DEL TEMA.

Las enfermedades parasitarias causan grandes pérdidas tanto económicas como humanas por lo que su control es un problema - que necesita ser remediado con prontitud. Los parásitos fueron los primeros agentes patológicos conocidos, pero sus estudios se centraron en sus ciclos vitales, transmisión y el desarrollo de medicamentos para su control. En cuanto a su bioquímica y a la respuesta inmune que presenta el hospedero son aspectos - de reciente introducción, por lo que su conocimiento es relativamente pobre. (7).

En lo que respecta a el grupo del *Plasmodium*, se sabe que este protozoario presenta inaccesibilidad para el sistema inmune debido a la localización intracelular del parásito, ya que tiene la capacidad para alterar su composición antigénica, produciéndose un fracaso por parte del sistema inmune del hospedero para reconocerlo y además libera grandes cantidades de - antígenos solubles que desarrolla tolerancia por parte del - hospedero y también estos antígenos pueden funcionar como bloqueadores similares a los descritos para pacientes con enfermedades malignas.

Debido a estas condiciones juzgamos que sería interesante la evaluación de las respuestas inmunológicas de defensa tanto celular como humoral en un modelo experimental de malaria en ratones infectados con *Plasmodium berghei*. (8, 9, 22, 23). Ya que este es uno de los parásitos causantes de paludismo en los roedores.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El paludismo o malaria es una enfermedad parasitaria, de tipo endémico en territorios tropicales y subtropicales de todo el mundo y ocupados por cerca de la tercera parte de la población mundial. Se ha calcula que entre dos y tres millones de personas mueren actualmente a causa de esta enfermedad. (4).

El género Plasmodium que es el causante de esta enfermedad presenta características especiales al estar parasitando a los hospederos, dichas características son:

- a) Es un parásito intracelular.
- b) Presenta variabilidad de estadios.
- c) Despliega gran variación antigénica.
- d) No confiere inmunidad después de su ataque.

Debido a esto, presenta cierta inaccesibilidad para el sistema inmunológico (7, 8, 9, 22, 23), esta es la razón por la que se optó en investigar como se encuentra el sistema inmune en ratones infectados con Plasmodium berghei, y comparando dicho sistema con el de ratones sanos.

OBJETIVOS.

OBJETIVOS.

A. Objetivo general.

Evaluación de algunos factores de la respuesta inmune - celular y humoral en un modelo experimental de malaria en ratones.

B. Objetivos específicos.

a) Determinación de la respuesta inmune celular, cuantificando:

Los receptores para Fc presentes en la membrana de células de exudado peritoneal.

Linfocitos T.

Capacidad fagocítica de células de exudado peritoneal.

b) Determinación de la respuesta inmune humoral, cuantificando:

Células formadoras de anticuerpos en bazo.

Niveles de producción de anticuerpos.

HIPOTESIS.

HIPOTESIS.

Debido a que se evaluarón los sistemas celular y humoral - y ya que estos sistemas tienen mecanismos de acción diferente, se pueden formular las siguientes hipótesis.

a) En lo que respecta a la inmunidad celular.

Los receptores Fc de membrana en células de exudado peritoneal, no se verán alterados, por que el Plasmodium es un parásito intracelular.

La población de linfocitos T se incrementará, por ser estas células uno de los mecanismos principales contra la fase esporo-zoítica del parásito.

La capacidad fagocítica por parte de la células de exudado peritoneal no sufrirá alteración significativa, ya que la fagocitosis no es efectiva contra este parásito.

b) La inmunidad humoral no estará alterada ya que el ataque del Plasmodium berghei en ratones casi siempre es fulminante - en poco tiempo, en ratones infectados con este parásito este proceso de defensa no alcanzará a actuar en plenitud.

M A T E R I A L Y E Q U I P O .

MATERIAL.

Cajas de Petri, 10 cm de \varnothing , Corning.
Cámara para anestesia, 10 X 25 cm.
Cámaras de Neubauer, Bencton Dikison.
Cámaras de tinción, 9 X 6 cm.
Coladores malla # 20.
Columna para cromatografía, 800 x 15 mm, Pharmacia, Fine Chemicals.
Cronómetros, English Clock Systems.
Cubre hematímetros, Bencton Dikison.
Cubreobjetos 22 x 22 mm, MADESA.
Dilutor, Cooke Laboratory Products.
Espátulas de acero inoxidable.
Equipo de disección, Stainless.
Frascos estériles, 100 y 200 ml, Lux.
Gradillas para 12, 24 y 36 tubos.
Jaulas con tapa para ratones, 45 x 30 cm.
Jeringas de plástico estériles de 1, 5 y 10 ml, Bencton - Dikison.
Marcadores, Esterbrook.
Matraces aforados de 100, 250, 500 y 1000 ml, Pyrex.
Matraces Erlenmeyer de 125, 250, 500 y 1000 ml, Pyrex.
Mecheros de Bunsen.
Micropipetas, 0.05 ml, Clinipette.
Perillas de seguridad.
Pipetas graduadas de 0.5, 1, 5, 10 ml, Pyrex.

Pipetas Pasteur, sin graduación.

Placas para microtitulación, 12.7 x 9.5 cm, Cooke -
Laboratory Products.

Portaobjetos, 75 x 25 mm, Plain.

Soportes con base de hierro.

Tabla de disección, 40 x 25 cm.

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

Tubos de Khan, 12 x 75 mm, Benkton Dikison.

Tripies de hierro.

EQUIPO.

Autoclave, 12 lts, Presto.

Balanza analítica, Mettler, mod. H - 80.

Balanza granataria, Ohaus, cap. 600gr.

Baño de agua con temperatura controlada, Precision.

Centrifuga clínica, 8 camisas, Sol-Bat, mod. V - 2.

Colector de fracciones, L.K.B., mod. 2112.

Contador de centelleo para radiación gamma, Abot.

Espectrofotómetro, Zeiss, mod. Pm 2DL.

Microscópio compuesto, American Optical, mod. One - Ten.

Potenciometro, Sargent-Welch, mod. PBL 400.

Refrigerador, Phillips, mod. 127 VG A.

Vortex, Vortex - Genie.

MATERIAL BIOLÓGICO.

MATERIAL BIOLÓGICO.

Plasmodium berghei.

La cepa de este protozoario nos fue donada por el Q.F.B. Juan Francisco Sanchez Ruiz, utilizando como medio ratones infectados. Se sabe que esta cepa con la que trabajamos fue traída de Inglaterra y aislada en Africa.

Ratones CD 1.

Esta cepa de ratones la proporcionó el bioterio de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza.

Glóbulos rojos de carnero.

Estas células se obtuvieron de un carnero adulto del bioterio de la escuela mencionada. Se conservaron en alsever, esterilizado previamente.

Complemento de rata.

El suero de donde se obtuvo el complemento, es proveniente de ratas del bioterio antes mencionado.

IgM anti-GRC.

Esta inmunoglobulina se obtuvo de ratones de la cepa CD 1, inmunizados con Glóbulos rojos de carnero (GRC).

REACTIVOS.

REACTIVOS.

- Acetona, J. T. Baker, 50 ml.
Acido acético, J. T. Baker, 50 ml.
Acido bórico, Técnica Química, 15 gr.
Acido cítrico, Merck, 10 gr.
Acido clorhídrico, J.T. Baker, 100 ml.
Acido tricloroacético, J. T. Baker, 50 gr.
Agarosa, Sigma, 10 gr.
Alfa - naftil - acetato, Sigma, 5 gr.
Azida de sodio, Merck, 5 gr.
Azul de toluidina, Merck, 3 gr.
Bicarbonato de sodio, J. T. Baker, 5 gr.
Citrato de sodio, Monterrey, 45 gr.
Cloruro de calcio, Monterrey, 25 gr.
Cloruro de magnesio, J. T. Baker, 20 gr.
Cloruro de potasio, Merck, 15 gr.
Cloruro de sodio, Monterrey, 50 gr.
Dextrosa, J. T. Baker, 25 gr.
Eter etílico, J. T. Baker, 500 ml.
Formaldehído, Monterrey, 35 ml.
Fosfato de potasio monobásico, J. T. Baker, 10 gr.
Fosfato de sodio dibásico, Técnica Química, 15 gr.
Fosfato de sodio monobásico, Técnica Química, 10 gr.
Giemsa, Sigma, 30 ml.
Hidróxido de sodio, Monterrey, 25 gr.
Ioduro de sodio (I^{125}), NEN, 0.1 mCi.

Nitrito de sodio, J. T. Baker, 10 gr.

Para-rosa-anilina, Sigma, 5 gr.

Rojo de fenol, Sigma, 0.5 gr.

Sephadex G - 200-40 (Particule size 10-40), Sigma, 150 gr.

Tiosulfato de sodio, J. T. Baker, 5 gr.

Trietanolamina, J. T. Baker, 15 ml.

Tris (hidroximetil) - aminometano, Merck, 30 gr.

Zymosan, Sigma, 6 gr.

M E T O D O L O G I A .

PREPARACION DE SOLUCIONES

Solución salina fisiológica.

Es una solución salina isotónica. Se disuelven 8.5 gr. de cloruro de sodio en 1 litro de agua destilada. (11)

Solución salina citratada.

Se disuelven 4 gr. de citrato de sodio en 1 litro de solución salina fisiológica o isotónica. (11)

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS).

Para obtener un pH de 7.2 y una concentración de 0.15 M pesar los siguientes componentes:

NaCl 8 gr.
KCl 0.2 gr.
Na₂HPO₄ 1.15 gr.
KH₂PO₄ 0.2 gr.

Disolver y aforar a 1000 ml. con agua destilada. (14)

Líquido de Turk.

Medir 3 ml. de ácido acético glacial y aforar a 100 ml. con agua destilada, añadirle dos gotas de azul de metileno. (25)

Solución salina amortiguada.

Se preparan las siguientes soluciones:

Solución A. NaCl 8 gr.
KCl 0.4 gr.
MgSO₄·7H₂O 0.2 gr.
Na₂HPO₄ 0.045 gr.
KH₂PO₄ 0.060 gr.
Disolver en 500 ml. de agua destilada

Solución B. Disolver en 500 ml. de agua destilada 0.147 gr.
de CaCl₂·H₂O .

Solución C. Disolver 1 gr. de glucosa en 10 ml. de agua
destilada y mezclar con 1000 ml. de la solución
a partes iguales de las soluciones A y B .

Solución D. Disolver 0.002 gr. de rojo de fenol en 10 ml.
de agua destilada y añadir la mezcla A+B+C .

Solución E. Disolver 19.1 gr. de Tris (Aminometilidintrimetanol en 800 ml. de agua destilada y ajustar
el pH a 7.4 con HCl. Aforar a 1000 ml. con agua
destilada.

Solución de trabajo. Mezclar volúmenes iguales de la solución E y de la mezcla A+B+C+D y reajustar el pH a 7.4 si es necesario. (12)

Suspensión de células de exudado peritoneal.

- a). Sacrificar a los ratones por dislocación cervical.
- b). Inocular por vía intraperitoneal 5 ml. de solución salina citratada fría, agitar a el animal.
- c). Cosechar las células del peritoneo con pipeta Pasteur.
- d). Lavar las células 3 veces con solución salina amortiguada.
- e). Ajustar al número de células y utilizarlas de inmediato. El ajuste se hace contando las células en la cámara de -- Neubauer y realizando el cálculo correspondiente. (11)

Suspensión de glóbulos rojos de carnero (GRC).

- a). Centrifugar a 1500 rpm la suspensión de GRC (conservados en alsever) durante 5 minutos.
- b). Lavar el botón celular obtenido con solución salina - fisiológica.
- c). Después de tres lavadas se ajustan volumen a volumen en solución salina fisiológica a la concentración deseada. (11)

Medio esencial mínimo de Eagle (MEM).

Disolver 0.96 gr. del medio en 100 ml. de agua destilada. Se ajusta el pH a 7.2 (color salmón) con bicarbonato de sodio y se esteriliza en autoclave a 15 libras. (24)

Solución Alsever.

Su composición consiste en:

Glucosa 20.5 gr.

Citrato de sodio dihidratado 8 gr.

Acido cítrico hidratado 0.55 gr.

Cloruro de sodio 4.2 gr.

Disolver en 1000 ml. de agua destilada. Esterilizar en autoclave a 10 libras por 15 minutos, el pH final será de 6.1 .

Esta solución se utiliza como medio para contener a la sangre de carnero en relación de volumen 1:1 , y se deja en refrigeración una semana para que se estabilicen las células, además no deberán usarse pasado un mes de su recolección. (11)

Zymosan preopsonizado.

a). Pesar 50 mg. de zymosán y resuspender en 5 ml. de agua destilada. Lavar 3 veces centrifugando a 3000 rpm por 5 min. .

b). Resuspender el paquete en 5 ml. de suero de rata.

c). Incubar a 37°C por 20 minutos.

d). Centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos.

e). Tirar el sobrenadante y lavar dos veces con agua destilada.

f). Al final adicionar 5 ml. de agua destilada y poner en refrigeración hasta su uso. (24)

Solución formol-calcio de Baker.

a). Medir 54.05 ml. de formaldehído comercial (al 37%) y aforar a 500 ml., obteniéndose una solución al 4% .

b). A la solución anterior agregarle 5 gr. de cloruro de calcio y disolverlo. Guardar esta solución en refrigeración hasta que se utilice. (13)

METODOLOGIA

OBTENCION DE IgM ANTI-GRC

A.- Inmunización de los ratones.

Para la obtención de IgM anti-GRC (Globulos Rojos de Carne ro): Inocular a los ratones 0.2 ml. de GRC al 10% en solución salina isotónica por vía intraperitoneal. Sangrar a los ratones a los siete días después, separando el suero. (11)

B.- Precipitación de la IgM.

1.- A un litro de ácido bórico (al 2% en agua destilada) adicionar gota a gota con agitación 50 ml. de suero.

2.- Dejar la mezcla suero-ácido bórico a temperatura ambiente por 30 minutos.

3.- Recuperar el precipitado por centrifugación a 2000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente.

4.- Decantar el sobrenadante dejando invertidos los tubos sobre un papel filtro para que permita el drenado del líquido.

5.- Adicionar 2 ml. de amortiguador de fosfatos a cada tubo solubilizar y combinar los precipitados disueltos.

6.- Montar una columna de Sephadex G 200-40 y separarla corriendo con un amortiguador de fosfatos. (11)

C.- Separación en Sephadex G 200-40.

1.- Calentar 17 gr. (peso seco) de Sephadex G 200-40 en - aproximadamente 750 ml. de PBS (solución amortiguadora de fosfatos) en un baño de agua hirviendo durante 5 horas. Esto proporciona un abastecimiento de gel suficiente para una columna de 100x2.5 cm. . El hinchamiento del gel es más rápido al hervir y después a temperatura ambiente se expelle el aire del gel.

2.- Enfriar el gel a temperatura de manejo. Generalmente la temperatura ambiente es la adecuada, pero al tratarse de materiales lábiles puede usarse a 4°C. El gel puede vaciarse a igual temperatura, ya que los gases son más solubles a temperaturas bajas por lo que puede correrse a esta temperatura. Puede haber formación de burbujas si se vacia a 4°C y se corre a temperatura ambiente.

3.- Se debe desgasificar el gel al vacío. Las burbujas de aire en el gel deforman las bandas de proteínas durante el corrimiento.

4.- Vaciar el gel dentro de la columna a lo largo de una varilla de vidrio para evitar la formación de burbujas. Tener cuidado de que la columna esté vertical. Todo el gel debe ser vaciado en la columna a un tiempo. Usar una extensión de tubo o reservorio. Dejar destapada la columna durante el empaqueo. La columna de 100x2.5 cm. tarda generalmente 5 horas para su sedimentación.

5.- Empacar la columna haciendo pasar por lo menos dos

volumenes de solución amortiguadora. El adaptador de flujo se requiere, si la columna tiende a empaquetarse después de varias corridas, o es que se esté corriendo la columna demasiado rápido. El sobreempaquetamiento puede evitarse haciendo el flujo cromatográfico, descendiendo y ascendiendo alternativamente.

6.- Aplicación de la muestra.

a). La superficie del gel no debe ser removida durante la aplicación de la muestra, ya que puede causar la distorsión de las bandas. Para protección de la superficie del gel se coloca una malla de nylon.

b). Colocar la muestra con una pipeta Pasteur.

c). Correr la columna con PBS que contenga azida de sodio 0.01 molar. La azida no absorbe a 280 nm. .

d). Colectar muestras de 2 ml. .

e). Leer en el espectrofotómetro a 280 nm. y separar la fracción correspondiente.

f). Realizar una hemaglutinación para titular la IgM anti-GRC, ya purificada. (14)

Esta IgM anti-GRC la utilizamos para la formación de las Rosetas Fc .

REACCION DE HEMAGLUTINACION

Esta técnica se utilizó para titular la Igm anti-GRC, y - para titular la producción de anticuerpos en el suero de ratones infectados y ratones normales.

- 1.- Colocar 50 microlitros de PBS a cada pozo de la placa.
- 2.- Agregar 50 microlitros de la muestra en el pozo 1, e ir diluyendo al doble progresivamente hasta el pozo 11, dejando el pozo 12 como testigo.
- 3.- Agregar a todos los pozos 50 microlitros de GRC al 1% en PBS
- 4.- Incubar a 37°C por una hora.
- 5.- Leer el titulo de hemaglutinación. (11)

ROSETAS Fc

- 1.- Colocar 5 ml. de GRC al 5% en SSA (solución salina - amortiguada).
 - 2.- Añadir 5 ml. de SSA, con una cantidad subaglutinante de IgM, mezclar en el vortex.
 - 3.- Incubar a 37° C por 30 minutos.
 - 4.- Lavar 2 veces los GRC con SSA.
 - 5.- Resuspender en 5 ml. de SSA, quedando los GRC sensibilizados y al 5%, listos para ser utilizados.
 - 6.- Colocar 0.25 ml. de CEP (células de exudado peritoneal) ajustadas a 2 millones por ml., previamente lavadas dos veces con SSA.
 - 7.- Añadir 0.25 ml. de GRC al 1% ya sensibilizados, resuspender en el vortex.
 - 8.- Centrifugar a 1000 rpm por 1 minuto.
 - 9.- Dejar reposar a temperatura ambiente por 15 minutos.
 - 10.- Tirar la mitad del sobrenadante con una pipeta.
 - 11.- Resuspender suavemente.
 - 12.- Colocar una gota de la suspensión en un portaobjetos y colocarle de inmediato el cubreobjetos.
 - 13.- Observar al microscópio, contando el porcentaje de rosetas por cada cien CEP contadas.
- Se considera rosetas a las células que tienen 3 ó más eritrocitos unidos. (14,15,16)

CELULAS FORMADORAS DE ANTICUERPO

-Jerne-

1.- Preparar los ratones inmunizados (3 ó 4 días antes, - con 0.2 ml. de GRC al 10% por vía intraperitoneal) y sacrificarlos por dislocación cervical.

2.- Todos los pasos siguiente deben hacerse en baño de - hielo.

3.- Se extrae el bazo y se coloca en la tapa de una caja de petri que contenga medio esencial minimo(MEM). El bazo se lava en MEM para eliminar los pelos del ratón que pudieran haberse adherido.

4.- El bazo lavado se pasa a la caja de petri, se añaden 2 ml. de MEM y se le hace un corte por un extremo y con varilla de vidrio se oprime el bazo contra la paredes y fondo de la - caja exprimiendose en dirección del corte. Debe evitarse en lo posible romper la capsula del bazo.

5.- Una vez que se ha extraído la mayor cantidad posible de células, se desecha la capsula o sus restos y se recoge la suspensión en una pipeta Pasteur. Se absorbe y se expelle la - suspensión varias veces, de tal forma que se desintegren los - grumos más grandes. Después se recoge la suspensión usando la misma pipeta, se pasa a un tubo de ensaye de 13x100 y los grumos más grandes se dejan sedimentar de 3 a 5 minutos.

6.- Se decanta la suspensión y con ayuda de una pipeta se pasa por una malla fina, recibiendo el sobrenadante en otro - tubo de ensaye.

7.- Se hace una dilución 1:20 (si es de tres días) ó 1:30 (si es de cuatro días después de la inmunización) de las células con MEM

8.- En un tubo de ensaye se mezclan 0.1 ml. de la suspensión de células y 0.15 ml. de una suspensión de GRC (al 20% en MEM). Se añaden 2 ml. de agarosa al 0.8% a 45°C y se homogeniza la suspensión usando el vortex. La suspensión se vacía rápidamente en una caja de petri y se distribuye la agarosa por toda la caja con movimientos rotatorios. Lo anterior debe hacerse lo más rápido posible con el fin de evitar la formación de grumos al solidificar el medio. Es importante que las suspensiones de las células de bazo se sigan conservando en el baño de hielo con el objeto de contarlas posteriormente.

9.- Se deja reposar la caja en una superficie plana hasta que solidifique la agarosa. Se siembran de dos a tres cajas por cada suspensión.

10.- Se incuban las placas a 37°C durante 45 minutos.

11.- Se agrega a cada caja 1.5 ml. de complemento fresco diluido 1:10. Se distribuye por toda la superficie de la placa y se incuban a 37°C por 30 minutos.

12.- Se hace el conteo de las células de la suspensión en la cámara de Neubauer con el líquido de Turck.

13.- Después de incubar la cajas se cuentan las placas hemolíticas que aparezcan en cada caja y se hace el calculo de células formadoras de placa por bazo. (17)

CAPACIDAD DE HALOGENACION

- 1.- Colocar 0.35 ml. de una mezcla que contiene:
 - a) Amortiguador de fosfato de sodio $4 \times 10^{-3} M$, pH 7.4 .
 - b) Cloruro de sodio 0.128M .
 - c) Cloruro de potasio $1.2 \times 10^{-2} M$.
 - d) Cloruro de calcio $10^{-3} M$.
 - e) Cloruro de magnesio $2 \times 10^{-3} M$.
 - f) Glucosa $2 \times 10^{-3} M$.
 - g) Ioduro de sodio $8 \times 10^{-5} M$ (0.05 microcuries de I^{125}).
- 2.- Adicionar 50 ml. de zymosan preopsonizado, y colocar 50 ml. de agua destilada.
- 3.- Incubar a $37^{\circ} C$ por 30 minutos.
- 4.- Adicionar 0.1 ml de la suspensión celular (20×10^6 /ml.), mezclar e incubar a $37^{\circ} C$ por 20 minutos.
- 5.- Detener la reacción con 0.1 ml. de tiosulfato de sodio (0.01M) y 1 ml. de ácido tricloroacético, al 10%.
- 6.- Centrifugar a 2000 rpm por 15 minutos.
- 7.- Desechar el sobrenadante y lavar el botón 4 veces con ácido tricloroacético al 10% .
- 8.- Realizar el conteo de radioactividad en un contador de centelleo.

Introducir un blanco donde lleva todo, menos las células. También introducir un estandar conteniendo la cantidad total de I^{125} en la mezcla de reacción. (18)

CUANTIFICACION DE LINFOCITOS T

-Actividad ANAE-

1.- Preparar una solución que contenga 1 gr. de pararosa-anilina disuelta en 20 ml. de agua destilada y 5 ml. de ácido clorhídrico, enfriar y filtrar. Almacenar a 4°C en la oscuridad.

2.- Preparar una solución acuosa al 4% de nitrito de sodio (prepararla al momento).

3.- Mezclar las dos soluciones anteriores en partes iguales y agitar un poco hasta que aparezca un color ambar.

4.- Preparar una extensión de células de bazo en un portaobjetos y dejar secar a temperatura ambiente.

5.- Fijar en una solución de formol-calcio de Baker fría a pH de 6.7, a 4°C por 10 minutos.

6.- Lavar los frotis en agua destilada a temperatura ambiente por 20 minutos

7.- Incubar las preparaciones en un medio que contiene 40 ml. de amortiguador de fosfatos 0.067M, pH de 5. Adicionar - 2.4 ml. de pararosa-anilina diazotizada (que se obtuvo de la mezcla de las primeras dos soluciones) y 10 mg. de alfa-naftil acetato disuelto en 0.4 ml. de acetona.

8.- La mezcla se ajusta a pH de 5.8 usando hidróxido de sodio 1N.

9.- Las preparaciones se incuban a temperatura ambiente durante 21 horas.

10.- Las preparaciones se lavan en agua destilada por 40 minutos y se secan.

11.- Contrateñir con azul de toluidina (en solución acuosa) al 1% durante 60 minutos .

12.- Se cuantifican los linfocitos ANAE positivos, si aparecen en su citoplasma manchas café rojizas, por cada 100 linfocitos contados .

ANAE significa alfa-naftil-acetato-esterasa. (19)

INFECCION DE LOS RATONES

Los ratones fueron infectados con 0.1 ml. de una suspensión de eritrocitos de otros ratones que habíamos infectado con el Plasmodium berghei. Estos eritrocitos se conservaban en congelamiento y fueron tratados de la forma siguiente:

Los glóbulos que se deseen conservar se lavan tres veces con salina normal. A su paquete se agregan cuatro volúmenes iguales de solución al 40% de glicerol (con citrato de sodio al 2%) en PBS. Se mezclan bien, se tapan y se rotulan. La congelación puede hacerse en cualquier congelador, exceptuando el de los refrigeradores.

Para descongelar se retira el tubo del congelador y se deja a temperatura ambiente, hasta que tome el estado líquido. Se centrifuga y se tira el sobrenadante. Se agregan ocho volúmenes de solución de glicerol al 15% en citrato, se centrifuga y tira el sobrenadante (que sale de color rosado). Se hacen los siguientes lavados en la misma forma, con las soluciones de glicerina en menor concentración (7.5, 5.0 y 2.5%), hasta terminar con uno o más lavados de salina isotónica, que debe salir sin señales de hemólisis. Los glóbulos quedan listos para ser utilizados. El paquete celular queda resuspendido en solución salina isotónica, en una proporción del 10%. (27)

RESULTADOS.

RESULTADOS.

Como se observará en las tablas que están a continuación. No se observó diferencia significativa en ninguno de los factores inmunes evaluados entre ratones infectados y ratones normales.

Para detectar esto utilizamos la prueba de "U" (Mann - Whitney), que es una prueba con la cual se hace un análisis muy estricto, por consecuencia se tiene una mayor seguridad en dicho análisis.

En cuanto a la infección de los ratones, se obtuvo un porcentaje de infección en sus eritrocitos del 10 al 15% a los 15 días de infección.

A continuación se explica el método de análisis estadístico de Mann Whitney con su tabla correspondiente. Además se realiza un ejemplo para su mejor comprensión.

Finalmente se observarán las tablas de resultados, en donde los ratones que les corresponde un número no son los ratones infectados de paludismo, y a los ratones que les corresponde número par serán los ratones sanos.

Probabilidad de Mann Whitney.

1. Se tienen dos grupos, uno de ratones normales y otro - de ratones infectados con Plasmodium berghei.
2. Cada grupo esta formado de cierto número de elementos - que son n_1 y n_2 respectivamente.
3. A cada elemento de ambos grupos se les enumera en orden progresivo, de acuerdo a sus valores que presentan, asignando les la numeración 1, 2, 3, , etc.
4. En el caso de dos ó más elementos tengan el mismo valor los números correspondientes del orden progresivo se suman - entre sí y se dividen entre el número de elementos, es decir - si los números que les correspondían eran 4, 5 y 6, se suman - estos y se dividen entre el número de elementos, en este caso es 3, a estos se les asigna el valor obtenido, y al siguiente elemento en el orden progresivo se les pone el número siguiente en este caso el número 7 y así sucesivamente.
5. Obtenido el orden creciente de ambos grupos, se procede a sumarlos, cada grupo por separado.
6. A la suma de cada grupo se les asigna con la letra R_1 y R_2 respectivamente.
7. Se les aplica la siguiente relación para encontrar U_1 y U_2 .

$$U_1 = n_1 n_2 + 1/2 n_2 (n_2 + 1) - R_2$$

$$U_2 = n_1 n_2 + 1/2 n_1 (n_1 + 1) - R_1$$

8. Obtenidos los valores de U_1 y U_2 , se toma el menor.

9. En la tabla de probabilidad de Mann Whitney, buscar - el número de intersección de n_1 y n_2 .

10. Si el valor de U es menor o igual que el obtenido en las tablas, los grupos en cuestión son diferentes estadísticamente, con una p menor de 0.05. (20).

Ejemplo.

En un experimento de receptores para Fc por la técnica de rosetas, en ratones infectados con Plasmodium berghei, con un porcentaje del 10% de eritrocitos infectados.

RATONES NORMALES		RATONES INFECTADOS	
U_1		U_2	
Resultado Experimental.	Orden Progresivo.	Resultado Experimental.	Orden Progresivo.
3	2	5	5
5	5	13	14
7	9	7	9
12	13	2	1
5	5	10	12
4	3	7	9
8	11	26	15
6	7	30	16

$n_1 = 8 \quad R_1 = 55$ $n_2 = 8 \quad R_2 = 81$

Sustituyendo en la formula se tiene:

$$U_1 = (8)(8) + 1/2 \cdot 8(8+1) - 81 = 19$$
$$U_2 = (8)(8) + 1/2 \cdot 8(8+1) - 55 = 45$$

Se elige $U_1=19$, por ser este el menor.

El número de intersección en las tablas de $n_1=8$ y $n_2=8$, -
corresponde a el 13.

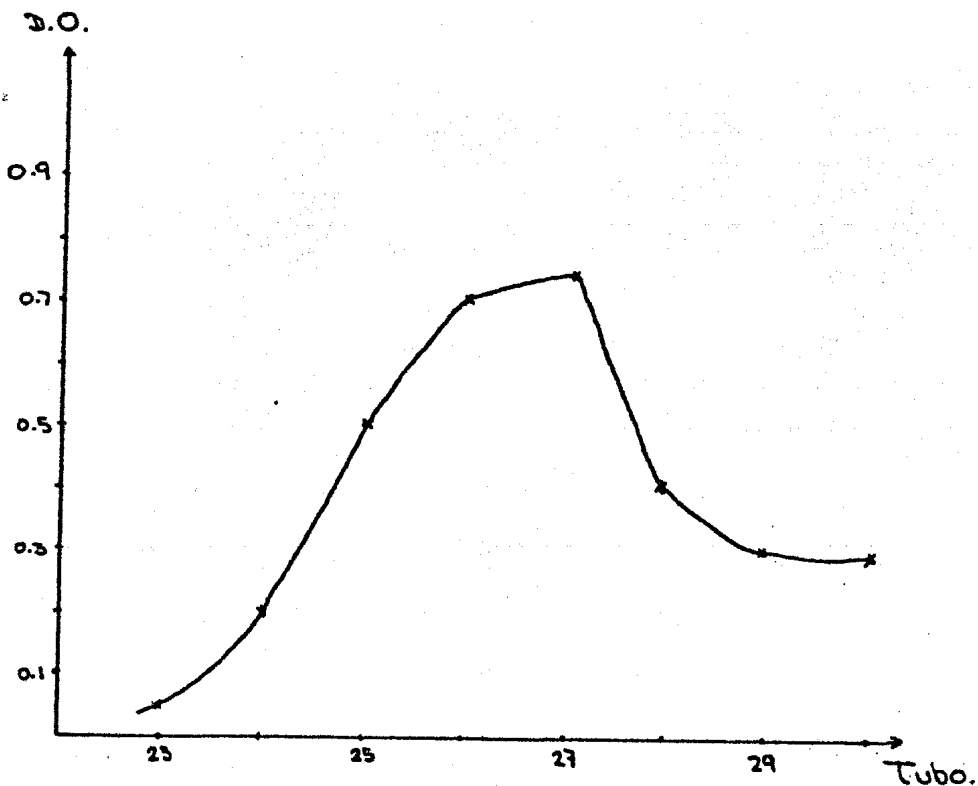
El valor de U_1 es mayor al encontrado en las tablas, por
lo tanto, no hay diferencia significativa entre las dos pobla-
ciones. En otras palabras la $P > 0.05$ (Mann Whitney).

Tabla de Probabilidades de Mann Whitney.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1																				
2												1	1	1	1	1	2	2	2	2
3					1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7	8	8
4				1	2	3	4	4	5	6	7	8	9	10	11	11	12	13	13	13
5			1	2	3	5	6	7	8	9	11	12	13	14	15	17	18	19	20	20
6		1	2	3	5	6	8	10	11	13	14	16	17	19	21	22	24	25	27	27
7		1	3	5	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	34
8		2	4	6	8	10	13	15	17	19	22	24	26	29	31	34	36	38	41	41
9		2	4	7	10	12	15	17	20	23	26	28	31	34	37	39	42	45	48	48
10		3	5	8	11	14	17	20	23	26	29	33	36	39	42	45	48	52	55	55
11		3	6	9	13	16	19	23	26	30	33	37	40	44	47	51	55	58	62	62
12	1	4	7	11	14	18	22	26	29	33	37	41	45	49	53	57	61	65	69	69
13	1	4	8	12	16	20	24	28	33	37	41	45	50	54	59	63	67	72	76	76
14	1	5	9	13	17	22	26	31	36	40	45	50	55	59	64	67	74	78	83	83
15	1	5	10	14	19	24	29	34	39	44	49	54	59	64	70	75	80	85	90	90
16	1	6	11	15	21	26	31	37	42	47	53	59	64	70	75	81	86	92	98	98
17	2	6	11	17	22	28	34	39	45	51	57	63	67	75	81	87	93	99	105	105
18	2	7	12	18	24	30	36	42	48	55	61	67	74	80	86	93	99	106	112	112
19	2	7	13	19	25	32	39	45	52	59	65	72	78	85	92	99	106	113	119	119
20	2	8	13	20	27	34	41	48	55	62	69	76	83	90	98	105	112	119	127	127

Curva de la separación de IgM.

Después de la precipitación de la IgM, esta se purificó en una columna con Sephadex G-200, las muestras de IgM se separaron en un colector de fracciones, y se midió la densidad óptica, resultando la siguiente gráfica.



D. O. = Densidad óptica.

Tubo = Número de tubo en el colector.

Células Formadoras de anticuerpos. (Jerne).

RATON CELULAS FORMADORAS DE PLACA POR BAZO.

1	41580
2	11808
3	21528
4	15552
5	29760
6	44400
7	8268
8	3600
9	35904
10	20340
11	4692
12	6000
13	22656
14	22656
15	18000
16	8208

$P > 0.05$ No es significativo. (Mann Whitney).

Nota: Los ratones con número non son los infectados, -
los ratones con número par son los sanos.

Receptores para Fc. (Rosetas EA)

RATON	‰ DE ROSETAS.
1	5
2	3
3	13
4	5
5	7
6	7
7	2
8	12
9	10
10	5
11	7
12	4
13	26
14	8
15	30
16	6

$P > 0.05$, No es significativo. (Mann Whitney).

Técnica de microhemaglutinación.

Esta técnica se utilizó para la titulación de anticuerpos.

RATON	TITULO
1	256
2	128
3	128
4	128
5	64
6	128
7	64
8	64
9	256
10	256
11	---
12	128
13	256
14	64
15	64
16	512

$P > 0.05$, No es significativo. (Mann Whitney).

Cuenta de linfocitos T. (Por técnica de ANAE).

Nota: ANAE = Alfa - naftil - acetato - esterasa.

RATON	PORCENTAJE DE LINFOCITOS T
1	83
2	73
3	74
4	65
5	94
6	88
7	21
8	80
9	62
10	78
11	86
12	83
13	85
14	72
15	76
16	77
17	78
18	79
19	79
20	70

$P > 0.05$, No es significativo. (Mann Whitney).

Capacidad de halogenación. (MPO).

Nota: MPO = Mieloperoxidasa.

RATON	ACTIVIDAD (CPM).
1	68
2	73
3	62.5
4	63.5
5	29
6	125
7	78
8	27.5
9	13
10	32
11	61

$P > 0.05$, No es significativa. (Mann Whitney).

DISCUSION DE RESULTADOS.

Discusión de resultados.

Se puede enfocar desde diferentes puntos de vista, el -- explicar la causa por la que no hubo diferencia significativa en los resultados obtenidos.

Puede decirse que el periodo de infección es muy corto - para poder encontrar diferencias entre los factores medidos - de los ratones infectados y los ratones normales.

Otro parámetro que pudiera tomarse en cuenta es el porcenta-
taje de eritrocitos infectados en los ratones tratados, que -
fue relativamente pobre (10 - 15 %), lo cual no permitiría -
ninguna reacción significativa.

Finalmente, también hay que considerar que en la mayor -
parte del periodo de infección, el parásito se mantiene en la
fase intracelular, lo cual, se interpone para una reacción -
innune efectiva.

Para saber cual ó cuales parámetros considerados anterior-
mente, son decisivos para la explicación de estos resultados,
se podrían realizar otros experimentos en los cuales se aumen
tára el periodo y el porcentaje de infección, tal vez cambiando
las cepas de ratones y de los parásitos.

CONCLUSIONES.

C O N C L U S I O N E S

Basandonos en lo que está establecido en la literatura, la cual nos menciona algunos cambios en el sistema inmune de los afectados por el paludismo, esperabamos algunas alteraciones - en el sistema inmune de nuestros ratones infectados. Estas alteraciones, especificadas en nuestras hipótesis, no sucedieron en los resultados de nuestro experimento.

Después de realizar el análisis correspondiente a la experimentación de este trabajo, se puede decir, que a las dos semanas de infección de los ratones con Plasmodium berghei, y - con un porcentaje de infección en sus eritrocitos del 15% aproximadamente, no hay diferencia significativa de los factores - evaluados del sistema inmune de los ratones infectados, comparandolos con los factores de los ratones normales.

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

BIBLIOGRAFIA.

1. CRUZ L. Othon, Parasitología, Ed. Méndez Oteo, segunda edición, México (1981).
2. BURROWS William, Tratado de Microbiología. Ed. Interamericana, vigésima edición, México (1974).
3. BERGHE L. Vanden. The history of the discovery of Plasmodium berghei. Ind. J. of Malariology. 3 (4), (1954).
4. BIAGIE Francisco, Enfermedades Parasitarias. Ed. La Prensa Médica Mexicana, segunda edición, México (1981).
5. GOODMAN and Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics. Ed. Mc Millan Publishing, quinta edición, U.S.A. (1975).
6. CRAIG Faust, Parasitología Clínica. Ed. Salvat, primera edición, México (1979).
7. CYPRESS H. Ray, Mecanismos de inmunidad para enfermedades parasitarias. Ed. Interamericana, Segunda edición, México (1981).
8. DEANS A. J., Immunology of malaria a review. Annual Review of microbiology. (37), (1983).
9. FUDENBERG Hugh, Inmunología Médica. Ed. Manual Moderno, primera edición, México (1978).
10. SLEIGH Michael, Biología de los Protozoos. Ed. Blume primera edición, España (1979).

11. Manual de prácticas de postgraduados del departamento de Inmunología de la ENCB, I.P.N., México (1978).
12. FAVOUR C. B., Antigen-antibody reactions in tissue culture. Immunological Methods. Ed. Ackroyd, (1975).
13. RHODES J., Macrophage heterogeneity in receptor activity, the activation of macrophage Fc receptor function in vivo and in vitro. J. Immun., 114 (3), (1975).
14. HUDSON Leslie, Practical Immunology. Ed. Blackwell — Scientific Publications, primera edición, Gran Bretaña — (1976).
15. MANTOVANI Bernardo, Phagocytosis of immune complexes mediated by IgM and C₃ receptors by macrophages from mice — treated with glycogen. J. Immun. 126 (1), (1981).
16. GRIFFIN M. Frank, Effects of soluble immune complexes on Fc receptor and C_{3b} receptor — mediated phagocytosis by — macrophages. J. Exp. Med., 152, (1980).
17. JERNE K. Niels, Plaque formation in agar by single antibody producing cells. Ann. N. Y. Acad. Sci., 76 (3), (1958).
18. SEYMOUR J. Klebanoff, Iodination by human polymorphonuclear leukocytes. A re-evaluation. J. Lab. Clin. Med., 89, (1977).
19. RANKY Annamary, Identification of mouse T and B Lymphocytes from cytocentrifuged cell smears. Clin. Exp. Immunol. 26, (1976).

20. CAMPBELL R. I., Statistics for biologist. Ed. Cambridge, - U.S.A., (1977).
21. HAROLD W. Brown, Parasitología Clínica. Ed. Interamericana, cuarta edición, México (1980).
22. BHATIA A., Cellular and humoral immune responses in rats - experimentally infected with Plasmodium berhei. Ind. J. - Res., 74, (1981).
23. MURPHY R. James, Host defenses in murine malaria. Infec. and Immun., 24, (1979).
24. STOSSEL T. P., Evaluation of opsonic and leucocyte function with a spectrophotometric test in patients with phagocytic disorders. Blood., 42, (1973).
25. TOOD Sanford, Diagnóstico Clínico por el Laboratorio. Ed. Salvat, sexta edición, Barcelona (1978).
26. DULBECCO D. Bernard, Microbiology. Ed. Harper International, segunda edición, U.S.A., (1973).
27. VELEZ Alfonso, Introducción a la hematología. Ed. Sociedad Mexicana de Hematología, primera edición, México (1978).