

14
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"

"ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE
FAGOCITOSIS DE Trypanosoma cruzi".

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
LOURDES DE LA CRUZ GARCIA



**TESIS CON
VALIA DE ORIGEN**

MEXICO, D. F.

1989



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

INTRODUCCION	1
FUNDAMENTACION DEL TEMA	19
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
OBJETIVOS	22
HIPOTESIS	22
MATERIAL Y METODOS	23
RESULTADOS	30
DISCUSION DE RESULTADOS	39
CONCLUSIONES	42
ANEXOS	43
BIBLIOGRAFIA.	45

"Estandarización de la Técnica de fagocitosis
de Trypanosoma cruzi".

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

En 1882, el zoólogo ruso Metchnikoff (1845-1916) estudió el papel de las células móviles de la larva transparente de una estrella de mar, en la protección contra algún agente extraño. El introdujo una espina de rosa en estas larvas y observó que algunas horas después la espina estaba rodeada por células móviles. Este experimento puede considerarse el punto de partida de la inmunología celular. Ya había sido establecido por Koch y Neisser que las bacterias pueden hallarse en el interior de los leucocitos, Metchnikoff demostró que los leucocitos habían engullido a los microorganismos. (10)

En 1884, Metchnikoff extendió sus observaciones a los leucocitos de los conejos y del hombre, empleando diversas bacterias. Observó que la ingestión de los microorganismos por los leucocitos a la que denominó **fagocitosis**, se incrementaba en forma notoria en los animales que estaban recuperándose de alguna infección o después de la vacunación con algún preparado de estos microorganismos. Posteriormente, demostró la existencia de dos tipos de leucocitos circulantes capaces de fagocitar, los polimorfonucleares y los macrófagos, así como la de ciertos leucocitos fijos con la misma capacidad y propuso el término general de **fagocitos** para todas estas células. (10)

Actualmente se define la fagocitosis como la ingestión de microorganismos, células ó partículas extrañas por parte de células vivas, conocidas como fagocitos. (2)

En los últimos 15 años se ha establecido una nueva clasificación de los macrófagos, los monocitos y sus células precursoras. En base a su origen común, sus características morfológicas y funcionales, estas-

células se han agrupado en un solo sistema: el fagocítico mononuclear.

(10)

Sistema fagocítico mononuclear:

Los fagocitos mononucleares se originan en la médula ósea, a partir de una célula precursora pluripotencial común a todas las células hematopoyéticas, incluyendo eritrocitos, megacariocitos, granulocitos y fagocitos mononucleares. Conforme la célula precursora se va diferenciando a través de divisiones sucesivas, las series de fagocitos mononucleares y granulocitos continúan compartiendo una célula precursora común, de la cual se van a diferenciar. (fig 1) La primera célula precursora identificable como parte del sistema fagocítico mononuclear es el monoblasto. Los monoblastos son capaces de realizar la fagocitosis, se adhieren al vidrio, presentan receptores para Fc y esterasas - citofúncicas típicas de la progenie más madura y son distintos de los mieloblastos, los cuales son precursores de las series granulocíticas.

(10)

Los promonocitos comparten con el monoblasto las características típicas de los fagocitos mononucleares, incluyendo el importante almacenamiento de gránulos azurófilos, algunos de los cuales son además positivos a la mieloperoxidasa. Los gránulos almacenados se sintetizan únicamente en esta etapa de la maduración de los fagocitos mononucleares. (cuadro 1)

Al madurar, los promonocitos dan origen a los monocitos, los cuales poseen un número menor de gránulos positivos a la mieloperoxidasa y presentan un aumento en la proporción citoplasma/núcleo. En comparación con los neutrófilos, la cantidad de monocitos presentes en médula es pequeña. En los humanos se liberan a la sangre 2.5 días después de su formación, donde circulan con una vida media aproximada de un día,

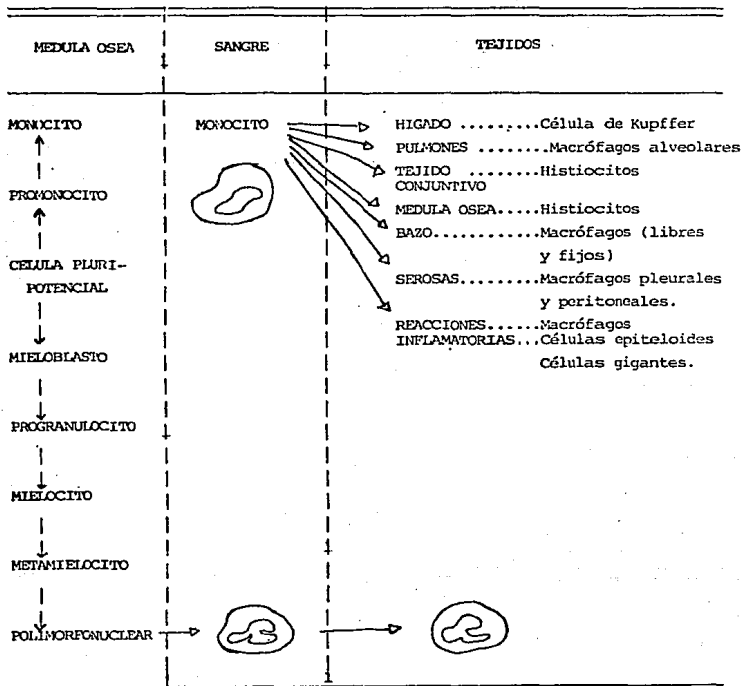


Fig. 1 . Origen y distribución de los fagocitos en el organismo humano.
 (Bach, J.F.; Inmunología; 1984)

PROPIEDAD	PRO-MONOCITO	MONOCITO	MACROFAGO INMADURO	MACROFAGO MADURO
Proliferación	++++	+++	++	0
Gránulos azurófilos (positivos a la mieloperoxidasa)	+++	++	±	0
Lisosomas	+	++	++++	++++
Adherencia al vidrio.	+	++	++++	+++
Fagocitosis	±	+	+++	++++
Receptores para Fc.	+	++	+++	+++
Interacción con los linfocitos.	?	++	++++	++++
Estearasa inespecífica.	+++	+++	+++	+++
Secreción de lisozima.	?	++	++	++

Cuadro 1. CAMBIOS EN LAS CARACTERISTICAS FUNCIONALES DE LAS CELULAS DURANTE LA MADURACION DE LOS FAGOCITOS MONONUCLEARES.

(Stites, D. P. ; INMUNOLOGIA BASICA Y CLINICA; 1985).

emigrando al azar del torrente sanguíneo hacia el medio extravascular.--

(10)

Los macrófago tisulares surgen de la maduración de los monocitos --- que han emigrado desde la sangre a los tejidos;este tránsito provoca un aumento en el tamaño celular y en el número de los organelos citoplasmáticos, incluyendo las mitocondrias y los lisosomas (que contienen las enzimas hidrolíticas), al igual que otros cambios morfológicos, bioquímicos y funcionales. Estos cambios varían de tejido a tejido, según el estado del huésped (normal, infectado ó estimulado en alguna otra forma). La madurez funcional de éstas células se manifiesta por el aumento de la capacidad fagocítica, del número de receptores para Fc de las IgG sobre la superficie celular y de la respuesta a la activación por los leucocitos.

Polimorfonucleares

Los polimorfonucleares que realizan fagocitosis (fundamentalmente neutrófilos) pertenecen a la serie granulocítica la cual se origina, al igual que el sistema fagocítico mononuclear, de una célula precursora pluripotencial con las diferencias indicadas en la figura 1. (10)

El neutrófilo maduro es una célula de etapa final, que una vez liberada de la médula ósea, circula con una vida media de 6 a 7 horas antes de perder su capacidad funcional. Su eliminación ocurre de manera aleatoria, no relacionada con la edad. Aproximadamente 10^{11} neutrófilos se generan y eliminan del organismo cada día. Los factores que controlan la maduración y producción de granulocitos aún no están bien entendidos.

En los seres humanos, como en la mayor parte de los organismos superiores, el neutrófilo es un elemento importante en la defensa del huésped contra los microorganismos invasores. Si un agente agresor vence las barreras mecánicas y químicas del organismo entra en acción el fagocito --

polimorfonuclear. (10)

Por otro lado, se sabe también que los fagocitos (mono y polimorfo-- nucleares) poseen estructuras celulares llamadas lisosomas, con enzimas - que por lo general, pueden digerir la partícula engullida. En algunos casos no ocurre la digestión de partículas o microorganismos ingeridos, ya sea por el volumen del material fagocitado o por escasez de hidrolasas - del lisosoma. Algunos microorganismos (p.ejm. H. capsulatum) Tienen la fa cultad de sobrevivir a la fagocitosis y reproducirse dentro del fagocito. La infección con estos agentes suele dar como resultado la presencia de grandes cantidades de microorganismos viables dentro de su citoplasma ; - partículas que como el sílice no pueden ser digeridas, permanecen en el - interior del fagocito y finalmente causan la muerte de éstos últimos (- fagocito "suicida") y acumulación de fagocitos muertos. La deficiencia -- congénita de hidrolasa ácidas en los fagocitos guarda relación con una - mayor susceptibilidad a la infección ; un ejemplo de ésto es la enfermedad granulomatosa crónica. (5) La fagocitosis por macrófagos ha sido estudiada por más de un siglo pero sólo en la última década se ha reconoci do la importancia de éstos como células secretoras. Se han identificado más de 50 productos de secreción de los macrófagos.

Los microorganismos, en su lucha por la sobrevivencia, han desarrolla do mecanismos de evasión tales como el escape de la vacuola fagocítica, - la inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma, la evasión del efecto tóxi- co de los radicales de oxígeno y la inhibición de los lisosomas secunda- rios. Estos mecanismos han despertado el interés de los investigadores y los han llevado a buscar sus causas. (10)

Descripción del proceso fagocítico

Se han publicado muchos estudios sobre fagocitosis. Diferentes investigadores han empleado varios tipos de células fagocíticas (polimorfo nucleares, monocitos ó macrófagos), procedentes de diferentes regiones anatómicas (generalmente sangre, peritoneo ó alveolos) y de diversos organismos (humano, conejo, cobayo ó ratón). Como resultado de las distintas condiciones experimentales utilizadas en los estudios referentes a la interacción fagocito-partícula, se ha observado que el proceso de fagocitosis de una gran variedad de microorganismos sigue un patrón común. (5) A continuación se analizará brevemente este proceso que consta de 6 fases interrelacionadas: quimiotaxia, opsonización, adherencia, ingestión, desgranulación y destrucción. (10)

Quimiotaxia

La quimiotaxia puede definirse como la capacidad de las células móviles para reconocer y responder con migración direccional a un gradiente adecuado. La quimioquinesis es la reacción por la cual las sustancias químicas determinan la velocidad de la locomoción celular. Ambos factores influyen en la acumulación de células inflamatorias en un foco infeccioso.

Opsonización

La función de las opsoninas del suero es la de reaccionar con los microorganismos y volverlos más susceptibles para su ingestión por los fagocitos. La virulencia de muchos agentes patógenos se relaciona en parte con su capacidad para evadir la fagocitosis, en virtud de ciertos antígenos de superficie, como los polisacáridos capsulares de P. aeruginosa y la proteína A de S. aureus. (8)

La opsonización aumenta la hidrofobicidad reduciendo la repulsión entre microorganismos y neutrófilos, pues ambos están cargados negativamente.

La opsonización de las bacterias puede ocurrir por lo menos por uno de tres mecanismos :

Primero, el anticuerpo por sí solo (subclase IgG1 e IgG3) puede actuar como opsonina.

Segundo, el anticuerpo ,actuando junto con el complemento a través de la vía clásica (C1,C4,C2) puede promover la opsonización microbiana.

Tercero, la opsonización puede ser inespecífica, a través de la vía alterna del complemento. (10)

Adherencia

Para poder entrar en contacto con el material que deben fagocitar, las células deben ser capaces de desplazarse y esto es posible cuando la célula puede emitir pseudópodos (en el caso de polimorfonucleares), o vellos citoplásmicos (para los macrófagos).

La adherencia de las células fagocíticas es el resultado de interacciones entre factores celulares y factores extracelulares, así como también de la naturaleza de la partícula a ingerir.

La interacción entre partículas es un proceso altamente organizado, que requiere de energía y el reconocimiento por los receptores del macrófago de los ligandos unidos a la partícula. A este proceso se le denomina **cremallera** . (4)

La adherencia de partículas a la superficie del fagocito, no resulta necesariamente en su ingestión. Por ejemplo, E. coli encapsulada tratada con Conavalina A se adhiere a macrófagos peritoneales de ratón y a leu-

cocitos polimorfonucleares humanos, pero no es ingerida a menos que se --
adicionen anticuerpos antibacterianos específicos.

En contraste, otras partículas tales como látex, zimosan y bacterias-
no encapsuladas, son ingeridas aunque no existan anticuerpos en su super-
ficie. (3)

Ingestión

La ingestión es la etapa en la cual la partícula inerte ó viva pene-
tra al fagocito. Esta ingestión se asocia a una invaginación de la membra-
na del fagocito en el seno de la cual se halla la partícula ingerida. --
Posteriormente, las extremidades de esta invaginación de la membrana se -
fusionan para construir una vacuola, a la cual se le denomina fagosoma.

Se sabe que esta etapa de la fagocitosis depende de manera muy im-
portante del metabolismo de la célula fagocítica y que este proceso de -
ingestión depende de un gasto de energía. (1)

Estallido respiratorio

Este término describe una vía metabólica, inactiva en las células en
reposo, que produce un grupo de agentes microbicidas altamente reactivos
mediante la reducción parcial del oxígeno. Existen 4 características del
estallido respiratorio: el incremento en el consumo del oxígeno, la pro-
ducción de superóxido, la producción de H_2O_2 y la activación de la vía he-
xosa monofosfato. (8)

Desgranulación

La destrucción de los microorganismos susceptibles dentro de los -
neutrófilos está íntimamente relacionada al proceso de desgranulación, o
sea, a la liberación del contenido lisosomal en el interior del fagosoma.

Además existen evidencias firmes de que se realiza cierta desgranu lación hacia el exterior de la célula.

Los neutrófilos humanos presentan dos tipos de gránulos. Los gránulos primarios contienen abundantes enzimas hidrolíticas, gran cantidad de mieloperoxidasa (cuyo tinte es responsable de la coloración del pus), lisozima, elastasa y protefnas catiónicas. (Estudios recientes sugieren que puede haber otra población de gránulos primarios que carecen de mieloperoxidasa). Los gránulos secundarios aparecen a medida que el promielocito madura y se convierte en mielocito en la médula ósea. Los gránulos secundarios contienen lactoferrina y lisozima. (8)

A medida que se forma el fagosoma durante el englobamiento bacteriano, los gránulos del neutrófilo se aproximan al fagosoma, se fusionan con la vacuola fagocítica y desaparecen del citoplasma (desgranulación). (8)

Destrucción

Los mecanismos antimicrobianos de los fagocitos de origen humano pueden dividirse en dos amplias categorías: dependientes del oxígeno e independientes del mismo.

A. Sistemas dependientes de oxígeno: Los mecanismos oxidativos de destrucción pueden dividirse en aquellos que están mediados por la mieloperoxidasa (MPO) y los que no lo están. De todos ellos sólo se ha probado en forma definitiva la participación del sistema de la MPO dependiente del oxígeno en los fagocitos. Sin embargo, estudios recientes indican que en 0.025% de la población general los neutrófilos no contienen MPO y aún así estas personas no muestran predisposición a las infecciones. Por lo tanto se discute la importancia de la MPO en la destrucción oxidativa de los microorganismos.

1.- Sistemas mediados por la MPO. Los componentes del sistema MPO - son los siguientes:

a.- Mieloperoxidasa: La MPO se encuentra en los gránulos primarios- (azurófilos) y representa hasta un 5% del peso seco del neutrófilo. Junto con el H_2O_2 , haluros oxidables y un pH ácido, integra un potente sistema antimicrobiano en el fagolisosoma, que tiene propiedades antibacterianas, antimicóticas, antivirales y antimicoplásmicas.

b.- H_2O_2 : Bajo circunstancias ordinarias, el peróxido de hidrógeno- utilizado en este sistema surge del estallido respiratorio. Con la producción insuficiente del H_2O_2 (por ejemplo en la enfermedad granulomatosa crónica), ciertos microorganismos pueden proporcionar, en forma paradójica, el peróxido de hidrógeno, que medie su propia destrucción.

c.- Haluros: En el interior del neutrófilo hay cloruros en una cantidad considerablemente superior a lo requerido para su participación en la destrucción mediada por la MPO. El cloruro puede penetrar a la vacuola fagocítica junto con la partícula fagocitada o puede ser transferido a - través de la membrana del fagolisosoma. Otro haluro participante podría ser el yoduro, proporcionado por el suero o por desyodación de las hormonas tiroideas. Tanto T_3 como T_4 se unen a las membranas en los neutrófilos y bacterias. (8)

d.- pH ácido: El sistema mediado por la MPO requiere de un pH ácido óptimo, condición que se satisface en la vacuola fagocítica.

e.- Oxígeno único: El oxígeno único (O_2^*) tiene la misma fórmula molecular que el oxígeno atmosférico (tripleto) (O_2), pero difiere en la -- distribución de los electrones alrededor de los dos núcleos del oxígeno. En el oxígeno atmosférico, los electrones forman una nube cilíndrica; en - el oxígeno único, la nube electrónica está distorsionada; esto altera sus propiedades químicas de tal modo que el oxígeno único y el atmosférico -

pueden considerarse como especies químicas diferentes. (8)

Durante el estallido respiratorio hay varias fuentes potenciales de producción de oxígeno único:

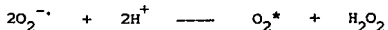
1.- El OCl^- , un producto de la reacción de la MPO, que se sabe que reacciona con el H_2O_2 produce oxígeno único:



2.- La reacción del superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$) con el H_2O_2 puede producir -- oxígeno único y radicales oxhidrilo. Esta reacción es catalizada por el hierro y la lactoferrina.



3.- La dismutación espontánea del superóxido (en presencia de la -- superóxido dismutasa), puede producir oxígeno único:



El oxígeno único tiene propensión particular a reaccionar con las -- dobles ligaduras y podría ser letal para cualquier sistema biológico con el que tuviera contacto.

2.- Sistemas independientes de la mieloperoxidasa: En ausencia del sistema de la MPO pueden funcionar cuando menos 4 sistemas dependientes del oxígeno, los cuales se describen brevemente a continuación:

a.- H_2O_2 : A concentraciones elevadas el peróxido de hidrógeno tiene

actividad antimicrobiana directa. Además puede actuar en combinación con el ácido ascórbico y ciertos iones metálicos, para matar a los microorganismos ingeridos por sistemas no enzimáticos. Algunos microorganismos son más susceptibles al H_2O_2 que otros, dependiendo de su capacidad para producir catalasa o peroxidasa.

b.- Anión superóxido: Se ha postulado el efecto tóxico del anión superóxido sobre los microorganismos, sin embargo, los microorganismos que contienen superóxido dismutasa, probablemente resistirían la acción de este radical en la vacuola fagocítica. El H_2O_2 formado a partir del anión superóxido tiene mayor potencial germicida cuando se emplea como un componente mediado por la MPO. El anión superóxido por sí solo es un bactericida débil.

c.- Oxígeno único: Se halla presente en cantidades reducidas en los PMN que están fagocitando y son deficientes en MPO. Es posible que el radical aparezca como un producto intermediario en la dismutación espontánea del anión superóxido.

d.- Radical hidroxilo: El radical hidroxilo, formado por la interacción del H_2O_2 y el anión superóxido, puede formarse en el leucocito mediante la reacción de Haber-Weiss. El radical hidroxilo es una especie oxidante muy inestable, que reacciona casi instantáneamente con la mayor parte de las moléculas orgánicas que encuentra. Es conocido como uno de los principales productos que resultan del paso de una radiación ionizante a través del agua, se le ha implicado en la toxicidad producida en los tejidos por la radiación. Estudios recientes sugieren que el radical hidroxilo se produce tanto en los PMN como en los monocitos.

B.- Sistemas independientes del oxígeno: Estos sistemas incluyen a las proteínas catiónicas, la lactoferrina, la lisozima, las histonas nuclea

res, las elastasas y la producción de ácido en las vacuolas fagocíticas. Los mecanismos microbicidas no oxidativos, tienen importancia debido a que ciertos microorganismos pueden ser destruidos por los neutrófilos bajo - condiciones anaerobias.

1.- Proteínas catiónicas: Las proteínas catiónicas de los gránulos-azurófilos, fueron las primeras sustancias antimicrobianas identificadas- en los neutrófilos. Las proteínas catiónicas son abundantes en arginina; son más activas a pH neutro y afectan más rápidamente la capacidad de los microorganismos para desarrollarse sin destruir su integridad estructural. Las diferentes subclases de éstas muestran especificidad por ciertas clases de microorganismos. Aún no se han informado ejemplos clínicos de -- transtorno de la función catiónica de las proteínas en los neutrófilos - humanos. (8)

2.- Lactoferrina: Proviene de gránulos específicos y puede ejercer función antimicrobiana, fijando y reteniendo el hierro requerido por las bacterias ingeridas. En la literatura existe por lo menos la descripción de un paciente en quien el transtorno en la destrucción de las bacterias se asoció con gránulos deficientes en lactoferrina en sus neutrófilos.

3.- Lisozima: Se encuentra en los gránulos primarios y en los gránulos secundarios y ataca los mucopéptidos de la pared celular de diversas bacterias. Debido a que la muerte bacteriana a menudo precede a la acción de la lisozima, esta enzima puede caracterizarse por su capacidad digestiva y no tanto microbicida.

4.- pH bajo: Durante la fagocitosis, el pH en el fagosoma disminuye. La acidificación parece aumentar la actividad de algunos sistemas enzimáticos antimicrobianos (por ejemplo MPO-H₂O₂-haluro y lisozima) pero otros (por ejemplo las proteínas catiónicas) funcionan mejor a pH neutro o li-

geramente alcalino. Algunas bacterias son destruídas directamente por los ácidos orgánicos en un medio ácido.

5.- Histonas nucleares: Estas sustancias son liberadas a los tejidos circunvecinos a las células por su muerte y autólisis. Las histonas nucleares tienen actividad antimicrobiana directa.

6.- Proteasas: Los granulocitos contienen diversas proteasas, que son activas a pH neutro (por ejemplo la catepsina G, la serina, las esterasas y las elastasas). Estas sustancias pueden ser más importantes en la destrucción que en la destrucción bacteriana.

7.- Factores séricos: Los factores séricos favorecen la destrucción fagocítica de microorganismos, principalmente por su función opsonica; sin embargo, un estudio reciente ha demostrado que la IgG y el complemento - pueden aumentar la capacidad de los monocitos humanos para destruir intracelularmente a S. aureus y E. coli. Aún no se ha explicado el mecanismo por el cual esto sucede. (8)

Destino de los microorganismos intracelulares.

Dependiendo de su capacidad para sobrevivir a las condiciones intracelulares, los microorganismos fagocitados pueden ser muertos, parcialmente degradados o bien no ser destruídos y simplemente ser secuestrados en el interior de las células. Algunos microorganismos han desarrollado aparentemente mecanismos para asegurar la supervivencia y replicación intracelular en los fagocitos. (8)

Importancia del proceso fagocítico en la eliminación de parásitos - intracelulares.

Los fagocitos desempeñan un papel clave en la defensa del organismo contra la mayoría de las infecciones. Ya sea solos o en acción conjunta con factores humorales, son los responsables de las capacidades microbicidas del organismo.

El estudio de la biología parásito-célula fagocítica ha permitido - por un lado conocer más acerca de la fisiología de la célula fagocítica - y por otro identificar algunos de los mecanismos de evasión del parásito.

A continuación se enuncian algunos de los mecanismos que alteran -- las fases del proceso fagocítico, debido a la interacción del parásito con la célula huésped. Como se ha descrito, el paso inicial para el establecimiento de la infección intracelular es la adherencia del parásito a la membrana citoplasmática de la célula huésped. Para que la adherencia se lleve a cabo, es indispensable la presencia de moléculas específicas en la membrana del parásito, así como la existencia de sitios complementarios en la membrana de la célula fagocítica. Sin embargo esto parece no ser siempre cierto. Un ejemplo de esto lo dan algunos estudios de Nogueira y cols. usando cultivos de células de ratón, humano ó bovino, infectadas con T. cruzi. Los autores observaron que los tripomastigotes viables son ingeridos y pueden parasitar una amplia variedad de células que incluyen - fibroblastos de embrión de bovino, fibroblastos de ratón y células epiteliales humanas. Sin embargo, al probar tripomastigotes calentados o epimastigotes (ambas formas no infectivas pero viables), éstos sólo son ingeridos por macrófagos. (2)

La falta de ingestión de éstos parásitos puede deberse en los tripomastigotes

mastigotes a la pérdida de receptores para reconocer a la célula blanco (no macrófago) y penetrarla, lo que no impide que el macrófago lo ingiera sin un receptor de los eliminados por calentamiento.

En los epimastigotes es probable la falta de receptores para todas las otras células excepto para el macrófago.

El tratamiento con enzimas proteolíticas (tripsina y quimotripsina) disminuye la incorporación de tripomastigotes y epimastigotes a macrófagos.

Johan y Hirsch, observaron que Toxoplasma gondii inhibe la formación del fagolisosoma, como un mecanismo para mantener su viabilidad intracelular. Se propone que este efecto requiere de la participación activa del parásito. (2)

Algunos parásitos han desarrollado estrategias para escapar de la vacuola fagocítica al citoplasma de la célula.

Ejemplo de esto se tiene en los estudios de Nogueira y cols. con T. cruzi. Al cultivar los tripomastigotes con macrófagos peritoneales de ratón, los primeros fueron ingeridos observándose las clásicas vacuolas fagocíticas. Una hora después de la ingestión, el parásito aún estaba dentro de las vacuolas pero 48 horas después, el parásito estaba libre en el citoplasma. Sin embargo, al estudiar epimastigotes, parece que estos nunca escapan del fagosoma, siendo degradados a las 24-48 horas posteriores a la ingestión. Los amastigotes parecen escapar también de la vacuola fagocítica.

Wibson y cols. han observado que T. gondii no provoca el estallido respiratorio al interactuar con monocitos humanos mantenidos en cultivo durante 5-6 días, desencadenándose sólo un débil incremento de la vía hexosa monofosfato en macrófagos peritoneales de ratón.

Sin embargo T. gondii puede estimular el estallido respiratorio en monocitos humanos los cuales lo matan. (3)

Tripanosomiasis americana ó Enfermedad de Chagas.

T. cruzi produce en el hombre la enfermedad de Chagas. Se ha visto que la severidad de los cuadros clínicos y la irreversibilidad de las lesiones-cardiacas ó de otros órganos, con relativa frecuencia causan invalidez y --- muerte por lo que constituyen problemas de salud pública. (11)

En la república Mexicana se considera como área endémica probable, todo el territorio que se encuentra entre los 0 m.s.n.m. y los 1 800 m.s.n.m.

El parásito agrede al huésped de varias maneras, pero quizá la destrucción de las células del sistema fagocítico mononuclear y de otros tejidos, por el crecimiento y multiplicación del parásito sea de las más importantes. Una síntesis interpretativa de la etiopatogenia de las lesiones producidas por T. cruzi es: a) La teoría inflamatoria, por la evidencia del componente-inflamatorio de las lesiones y b) la teoría alérgica, en la cual las lesiones se deberían a fenómenos de inmunología causados por los productos de desintegración de los parásitos así como de los tejidos dañados por los mismos. Lo que sí es claro es que los parásitos del miocardio bloquean los haces -- produciendo disfunción (bloqueo de rama), dilatación (cardiopatías) o también inflamación miocárdica (miocarditis aguda) con infiltración celular -- (mono y polimorfonucleares) que posteriormente se traducirá en inflamación mononuclear con fibrosis (miocarditis chagásica crónica). Los parásitos invaden gran cantidad de tejidos y órganos como corazón, cerebro, hígado, bazo, ganglios linfáticos, músculos, etc., produciendo lesiones y cuadros clínicos--diversos. (11)

FUNDAMENTACION DEL TEMA

Los parásitos intracelulares que infectan células fagocíticas representan un reto para los investigadores. Los mecanismos que utiliza un parásito para evadir las barreras de defensa inespecífica y los factores humorales, así como los mecanismos de penetración que le permiten ingresar o ser fagocitado por una célula, lo convierten en un parásito exitoso dentro de un medio ambiente óptimo para su desarrollo. (3)

El estudio de los mecanismos antes mencionados, permitirá a los investigadores en salud, aplicar medidas eficientes para evitar a los parásitos que han evolucionado de tal manera, con el fin último de capacitar al hombre para un mejor desarrollo dentro de su medio ambiente.

Trypanosoma cruzi es un parásito intracelular de importancia en México y en América Latina. La enfermedad de Chagas es la infección producida en el hombre y en animales por el T. cruzi, observado por primera vez en 1909 por el investigador brasileño Carlos Chagas y desde entonces a la fecha se ha encontrado el parásito prácticamente en todos los países del continente americano, en algunos de los cuales se presenta en forma endémica, constituyendo un problema de salud pública de importancia tal que se encuentra incluido en el programa de entrenamiento para la investigación de enfermedades (TDR) (7). Este programa propuesto por la organización mundial de la salud (OMS) tiene apoyo de investigadores de todo el mundo y está dando grandes avances en cuanto a la erradicación a nivel mundial de la parasitosis ya mencionada.

T. cruzi tiene la capacidad de invadir células del sistema fagocítico mononuclear y aunque se conoce parte de su mecanismo de pato--

genicidad, este aún es motivo de muchos estudios. La fagocitosis llevada a cabo por células del sistema fagocítico mononuclear y polimorfonucleares es uno de los principales mecanismos de eliminación de parásitos intracelulares.

En el departamento de parasitología de la ENCB se han desarrollado proyectos de investigación en relación a la biología e inmunología de T. cruzi.

El trabajo de tesis que aquí se presenta forma parte de un proyecto de investigación aprobado por la dirección de posgrado e investigación de IPN el cual se creó ante la necesidad de establecer una técnica que nos permita estudiar la fagocitosis como un mecanismo de eliminación de parásitos intracelulares "in vitro". Estudios posteriores permitirán, con esta técnica, conocer algunos de los mecanismos involucrados en la inmunidad celular (linfocinas) contra estos parásitos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El problema a resolver en este proyecto es establecer una técnica que nos permita cuantificar la fagocitosis de parásitos intracelulares que tienen importancia en México y en América Latina. La cuantificación de la fagocitosis nos permitirá disponer de una técnica para medir en estudios futuros algunos de los mecanismos de inmunidad celular (linfocinas) que intervienen en la eliminación de parásitos, así como conocer cuales son los factores que favorecen la penetración del parásito a la célula.

OBJETIVOS

Objetivo General

Cuantificar la fagocitosis de T. cruzi llevada a cabo por fagocitos humanos (mono y polimorfonucleares) que son seleccionados por su adherencia al vidrio.

Objetivos específicos

1) Optimizar los cultivos de epimastigotes de T. cruzi .

2) Estandarizar la técnica de fagocitosis de levaduras Sacharomyces cereviceae que servirá como testigo de fagocitosis.

Estandarización de la técnica de fagocitosis de T. cruzi.

HIPOTESIS

Si la fagocitosis es un mecanismo importante en la eliminación del parásito Trypanosoma cruzi, entonces la cuantificación de éste mecanismo permitirá obtener un sistema de estudio en el cual se determinará el papel de diferentes factores que intervienen en el proceso fagocítico.

MATERIAL

Anillo de fierro	
cámara de Neubauer	
Cubreobjetos	
Embudo de cristal	
Fibra de vidrio	
Jeringa	10 ml
Matr�az erlenmeyer con tapón de rosca	125 y 250 ml
Papel absorbente	
Perilla de succión	
Pinzas de extremos planos	
Pipeta graduada	1,5 y 10 ml
Pipeta Pasteur	
Placas Multidish 4 Nunclon Delta	2 ml
Portaobjetos	
Probeta	50, 100 ml
Soporte universal	
Tubos de ensaye	13 x 100
Tubos de ensaye con tapón de rosca	20 x 200
Tubos de plástico con tapón de rosca	30 x 150
Vasos de precipitados	100 ml

MATERIAL BIOLÓGICO

Sangre de carnero

Sangre venosa humana

Suero fetal de ternera (in vitro)

Suero humano con títulos altos de complemento (C₃)

Levaduras Sacharomyces cereviceae

Toxoplasma gondii

Trypanosoma cruzi

MEDIOS DE CULTIVO

Agar bacteriológico (Bioxón de México)

Bacto Agar Base Difco

Infusión Cerebro-Corazón (BHI)

Medio Mínimo Escencial (MEM) (In Vitro)

SOLUCIONES

Azul tripano al 2%

Solución de alsever

Solución Salina al 0.85%, 0.95%

REACTIVOS

Aceite de inmersión

Acido cítrico nohidratado

Agua Bidestilada

Agua destilada

Alcohol metílico puro y neutro

Benzal

Bicarbonato de sodio

Citrato de sodio dihidratado

Cloruro de sodio

Colorante de Giemsa

Colorante de May-Grunwald

Dextrosa

Estreptomocina S

Glucosa

Heparina

Penicilina G procaínica

EQUIPO

Autoclave

Balanza analítica (Mettler)

Centrifuga (Jolbat S-12)

Centrifuga (Jovan-Paris K-63S)

Estufa de incubación (Pelisa-SE)

Microscopio óptico (Zeiss)

Reloj

METODOLOGIA

1.- Medios de cultivo

A.- Bifásicos

Los cultivos se realizaron en tubo de vidrio (13 x 100 y 20 x 200) y matrás erlenmeyer con tapón de rosca (125 y 250 ml)

Se agregaron 5 ml de medio en cada tubo y 25 ml en cada matrás , una vez solidificado el medio se agregó solución salina al 0.95% en volúmenes iguales.

Se dejaron incubar a 28 °C para prueba de esterilidad.

A las 24 horas de incubación se inocularon los medios con suspensiones de T. cruzi obtenidas de ratón.

B.- Líquido

Los cultivos se realizaron en tubos de vidrio de 13 x 100 con tapón de rosca y matraces erlenmeyer con tapón de rosca.

Se probaron diferentes variables:

- 1.- Concentración de antibióticos
- 2.- Tiempo de desarrollo
- 3.- Concentración de suero fetal de ternera

1.- Concentración de antibióticos

Se utilizaron combinaciones de Estreptomicina S y Penicilina G - procaínica en las siguientes concentraciones

- a.- 80 UI de cada antibiótico / 15 ml de medio
- b.- 800 UI de cada antibiótico / 15 ml de medio

2.- Técnica de fagocitosis

La técnica de fagocitosis se llevó a cabo como se indica en el - Manual de laboratorio de Inmunología, ENCB (7) con las siguientes modificaciones:

- a) Obtener 10 ml de sangre venosa con una jeringa conteniendo 0.3 ml de heparina, homogeneizar la mezcla. *
- b) Incubar la jeringa con sangre en posición vertical, durante 45 minutos a 37 °C. *
- c) Separar el plasma rico en leucocitos y recibirlo en un tubo de ensayo.
- d) Centrifugar a 1500 rpm durante 7 min a temperatura ambiente y descartar el sobrenadante, teniendo la precaución de eliminarlo totalmente con ayuda de un papel absorbente. *
- e) Resuspender el botón celular en 2 ml de alsever.
- f) Centrifugar 15 min a 500 rpm *
- g) Repetir e *
- h) Centrifugar a 1500 rpm durante 7 min. *
- i) Si quedan eritrocitos en el botón celular, centrifugar y resuspender el botón celular en 1 ml de agua destilada y homogeneizar con la pipeta pasteur durante 30 seg.
- j) Resuspender el botón celular en 5 ml de alsever.
- k) Ajustar las células a $1 \times 10^5 / 0.1$ ml, para lo cual se toma 0.1 ml de la suspensión celular resultante de los incisos anteriores y se agregan 0.9 ml de solución de azul tripano al 2%, se cuentan las células y se ajustan con MEM. *
- l) Depositar 100 ul de la suspensión celular y 900 ul de MEM en placas de poliestireno de microcultivo de pozos de 2 ml de volumen (placas Multidish Nunclon Delta), conteniendo cubreobjetos de aproximadamente 25 mm^2 . *

m) Oscilar ligeramente la placa e incubar 60 min a 37 °C y en atmósfera -- parcial de CO₂.

n) Retirar los cubreobjetos con una pinza de extremos planos y colocarlos en una placa limpia.

o) Lavar dos veces con MEM. *

p) Depositar 100 ul de levaduras(muertas por esterilización a 15 lb / 15-min) ó T. cruzi (ambas a una concentración de 1×10^6 / 0.1 ml) y 900 ul - de MEM en cada pozo. (e) *

q) Oscilar ligeramente la placa e incubar 15,30,60 y 90 min para T. cruzi- y 60 min para levaduras, a 37 °C y en atmósfera parcial de CO₂. *

r) Retirar los cubreobjetos y lavar con solución salina al 0.85% 3 veces.*

s) Dejar secar los cubreobjetos. *

t) Teñir utilizando la tinción de May Grünwald-Giemsa. *

u) En la estandarización de la fagocitosis de levaduras se colocaron 4 cubreobjetos sobre cada portaobjetos.

En las fagocitosis de parásitos se colocaron 3 cubreobjetos de fagocitosis del parásito y un testigo de fagocitosis de levaduras, teniendo un portaobjeto para cada tiempo de incubación.

v) Leer al microscopio óptico con objetivo de inmersión. Obtener el porcentaje de células fagocitando, leyendo 500 células de cada cubreobjetos con fagocitosis de levaduras y 100 células de cada cubreobjetos de fagocitosis del parásito.

Nota: Las modificaciones fueron introducidas a fin de disminuir la concentración de células a usar, en la técnica original se usan 1×10^6 / 0.1 ml y en las modificaciones se disminuye 10 veces esta concentración.

- * modificaciones

- ul microlitros

- (8) se realizó un ensayo con T. gondii a la misma concentración.

- Oponización de levaduras

La oponización de levaduras se llevó a cabo preparando una suspensión - de éstas e incubándolas con mezclas de sueros con títulos altos de C_3 de - individuos normales durante 15 min, al cabo de los cuales se lavaron 3 veces con agua destilada para eliminar el suero. Finalmente se resuspendieron en MEM.

RESULTADOS

A) Optimización de cultivos de T. cruzi .

a.- medios de cultivo

Los resultados se resumen en el cuadro No. 1

Cuadro No. 1

	Tiempo de incubación (días)				
	3	4	5	6	7
Infusión cerebro-corazón solución salina al 0.95%.	+	+	+	++	++
Agar sangre-solución salina al 0.95%.	+	+	++	++	+++
Medio Mínimo escencial.	-	+	+	+	+

- : no hubo crecimiento
- + : poco crecimiento
- ++ : buen crecimiento
- +++ : abundante crecimiento

b.- Antibióticos.

Cuadro No. 2

Concentración de antibióticos	Desarrollo	
	Bacteriano	Fúngico
80. UI* / 15 ml de medio	++	-
800 UI* / 15 ml de medio	+	-
400 UI* / ml de medio	+	+
800 UI* / ml de medio	+	++
<hr/> Benzal	++	++

* Se utilizaron combinaciones de Estreptomicina S y Penicilina G procaínica, las concentraciones marcadas en el cuadro son de cada antibiótico.

c.- Concentración de suero fetal de ternera.

Cuadro No. 3

Concentración de suero (%)	Crecimiento
1.0	-
2.5	+
5.0	-

Tabla no. 1

PORCENTAJE DE ENDOCITOSIS DE Sacharomyces cereviceae SIN OPSONIZAR
LLEVADA A CABO POR FAGOCITOS HUMANOS.

Muestra ¹	1	2	3	4	5	6
	4.4	5.1	8.4	6.7	5.3	4.3
Muestra ¹	7	8	9	10	11	12
	5.5	4.8	5.9	5.4	5.6	5.6
\bar{x}	5.5	*				
s	1.6	*				

1) Se realizaron 12 ensayos en total por cuadruplicado, leyendo 100 células en cada ensayo.

* De todas las muestras.

\bar{x} Media

s Desviación estandard

Tabla No. 2

PORCENTAJE DE ENDOCITOSIS DE Sacharomyces cereviceae OPRONIZADAS
LLEVADA A CABO POR FAGOCITOS HUMANOS

Experimento	1	2	3	4	5	6	7	8
Muestra								
1	39.1	27.6	23.3	61.4	46.8	32.6	34.3	70.2
2	44.5	25.4	37.8	65.8	49.9	30.5	24.6	68.0
3	52.2	24.6	37.4	59.2	52.1	28.6	27.5	66.1
4				65.5		28.2		
	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
\bar{x}	45.2	25.8	33.5	63.0	49.6	29.2	28.8	68.1
s	6.5	1.5	8.8	3.2	4.3	2.8	1.2	5.7

Tabla no. 2 (cont.)

Experimento	9	10	11	12	13	14	15	16
Muestra								
1	26.2	11.2	24.6	19.8	24.6	13.0	25.0	13.0
2	22.4	11.4	21.0	15.8	21.0	16.0	35.6	18.2
3	29.6	12.0	25.0	19.0	25.4	10.0	31.2	14.4
4	19.0						24.6	18.4
	---	---	---	---	---	---	---	---
\bar{x}	24.3	11.3	23.5	18.2	23.6	13.0	29.1	16.0
s	4.6	0.4	2.2	1.7	2.2	2.4	4.3	2.4

Tabla No. 2 (cont.)

Experimento	17	18	19	20	21	22	23	24
Muestra								
1'	15.8	18.4	24.4	22.8	21.6	24.2	17.3	48.4
2	16.8	17.0	24.2	24.6	27.4	20.0	17.0	40.4
3	17.0	18.8	22.2	22.2	16.8	16.8	17.6	26.4
4	17.8	19.6	30.0	22.8	25.6	21.2		24.2
	----	----	----	----	----	----	----	----
\bar{X}	16.8	18.4	25.2	23.1	22.8	20.5	17.3	34.7
s	0.71	0.94	2.9	0.9	4.1	3.0	0.29	10.0

Tabla No. 2 (cont.)

Experimento	25	26	27	28	29
Muestra					
1	21.4	21.6	25.0	24.0	21.4
2	20.6	22.0	26.6	24.8	22.4
3	20.8	20.8	27.2	25.2	20.6
4	22.4	22.8	27.6	26.4	21.8
	---	---	---	---	---
\bar{x}	21.3	21.8	26.6	25.1	21.5
s	0.7	0.72	0.99	0.77	0.75

TABLA No. 3

PORCENTAJE DE ADHERENCIA DE Trypanosoma cruzi LLEVADA A CABO POR
 FAGOCITOS HUMANOS.

Experimento	1	2	3	4 20	21	22
Tiempo (min)							
15	0	0	0	0	0	3	0
30	0	0	0	0	0	5	2
60	0	0	0	0	0	0	0
90	0	0	0	0	0	0	3
Testigo de lavaduras.	30	45	27	50	38	43	52

Dado que se contó con una cepa de Toxoplasma gondii , se realizó un ensayo de fagocitosis de toxoplasma, observándose los siguientes resultados:

Tabla No. 4

Muestra	Tiempo (min)	Porcentaje
1	15	17
2	30	16
3	60	12
4	90	17

Debido a que en la fagocitosis de T. cruzi y T. gondii el número de células finales se veía disminuida respecto a las células adheridas en la fagocitosis de levaduras, hubo necesidad de reducir el total de células a leer de 500 a 100.

DISCUSION DE RESULTADOS

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos hacer las siguientes consideraciones:

En el cuadro No. 1 se observa que el medio agar sangre-solución salina al 0.95% es el medio óptimo para el crecimiento del T. cruzi en fase de epimastigote, en este medio se obtuvieron cosechas abundantes desde los 5 días de cultivo, determinándose sólo cualitativamente, observándose grandes diferencias entre los medios probados. esto es lógico ya que el medio bifásico es un medio enriquecido que presenta menos limitaciones al crecimiento del parásito, aunque éstos medios presentan el inconveniente de cosechar filtrando a través de fibra de vidrio pues pueden desprenderse pequeños fragmentos de agar y dificultar la fagocitosis del parásito.

En cuanto al medio líquido (MEM) utilizado para cultivos celulares, T. cruzi no presentó crecimientos óptimos aunque se observó un ligero incremento al adicionar suero fetal de ternera al 2.5% según lo muestra el cuadro No.3 .

Por otro lado, el cuadro No.2 nos muestra las diferentes concentraciones de antibióticos probadas, se observa que la concentración óptima probada para la eliminación de bacterias fué de 800 UI / 15 ml de medio. A concentraciones menores hubo abundante contaminación bacteriana y a concentraciones mayores se incrementaba la contaminación por hongos y levaduras. Es importante dado que la cepa de T. cruzi fué obtenida de casos humanos por-pase a través de ratón fué difícil obtener la cepa libre de contaminación.

Al estandarizar la técnica de fagocitosis de levaduras se probaron -- primero levaduras sin opsonizar observándose porcentajes muy bajos (tabla No. 1) por lo que se procedió a probar levaduras opsonizadas, que nos proporcionaron porcentajes más altos de fagocitosis.

Se obtuvieron buenos resultados opsonizando a través de C_3 como se ha descrito, usando la incubación de levaduras con mezclas de sueros de individuos normales. El efecto de la opsonización se observó al aumentarse los porcentajes de fagocitosis de 5.5% en levaduras sin opsonizar a 37% en levaduras opsonizadas. Aunque el porcentaje de endocitosis de experimento a experimento es muy variable (del 11.3 al 68.1%) la desviación estándar dentro de un mismo experimento generalmente es baja (aunque hay experimentos en los que las diferentes muestras se notan con porcentajes muy diferentes una de otra, trayendo por consecuencia una desviación estándar muy grande, esto puede ser debido a alguna alteración en la técnica).

Debido a que las células para cada experimento provienen de diferentes donadores establecemos que en nuestro trabajo el porcentaje de fagocitosis para donadores aparentemente sanos va del 11.3 al 68.1% (tabla NO.2).

La fagocitosis con T. cruzi, que era uno de nuestros objetivos de estudio, no se observó; se realizaron 22 ensayos con éste, de los cuales sólo en el 9.5% se observó adherencia orientada entre la parte anterior del epimastigote y la membrana celular aún cuando el testigo de levaduras presentaba los porcentajes de fagocitosis semejantes a los informados en la tabla No. 2, observándose ésta adherencia desde los 15 hasta los 90 minutos con porcentajes muy bajos que fluctuaron entre 2 y 5%. Así también fué frecuente observar daño celular en estas preparaciones, el cual no fué observado en los testigos. La adherencia puede sugerirnos que aunque existen receptores para T. cruzi sobre la membrana del fagocito, el proceso de fagocitosis no es concluido. esto puede deberse a :

a) El tamaño del epimastigote (15-20 micras), en relación al tamaño de la célula (18 micras), aunque existen referencias de que ésta fagocitosis ocurre. (3)

b) Los epimastigotes no fueron opsonizados y por nuestro experimento- con levaduras podemos observar que la opsonización es un factor muy impor- tante para que se tengan porcentajes óptimos de fagocitosis. No se probó - la fagocitosis de fase de epimastigote de T. cruzi debido a que esta fija- complemento a través de C_3 lo cual daría como resultado la lisis de ésta - fase. (2)

Probablemente lo idóneo sería usar fases de T. cruzi que no fijan --- complemento (tripomastigotes) lo cual implica complicaciones metodológicas ya observadas por otros autores.

Ya que no se observó la fagocitosis de T. cruzi y se contaba con una- cepa de T. gondii, se realizó un experimento que fuera indicativo que se - podría generalizar a otros protozoarios.

de los resultados con T. gondii podemos observar que sí existe una fago- citosis completa para este parásito aunque un resultado no es significativo. Es importante recordar que T. gondii presenta mecanismos de penetración -- diferentes a los de T. cruzi así como que la fase estudiada para T. gondii es la fase infectiva del parásito.

Las modificaciones propuestas para la técnica de fagocitosis de leva- duras nos permiten usar un menor número de células, lo que a su vez permite probar un mayor número de variables por experimento y con éstas facilidad- de manejo. El uso de cajas de petri en la técnica original involucra un ma- yor número de células, así como una mayor cantidad de medios de cultivo y - reactivos.

CONCLUSIONES

- 1.- Las condiciones óptimas de los cultivos de T. cruzi fueron:
- | | |
|-------------------------------|---|
| medio | : Agar sangre-solución salina al 0.95%. |
| concentración de antibióticos | : 800 UI / 15 ml de medio. |
| Tiempo de incubación a 28 °C | : 5 días |

2.- Se estandarizó la técnica de fagocitosis de levaduras opsonizadas obteniéndose un rango de fagocitosis de 11.3 a 68.1 para donadores sanos.

3.- Para T. cruzi sólo se observó adherencia orientada y nunca fagocitosis aún después de observar a diferentes tiempos de incubación. Se propone el uso de otras fases del parásito.

4.- Para el experimento con T. gondii se observó la fagocitosis a diferentes tiempos por lo que concluimos que el método de fagocitosis aquí estandarizado nos permite cuantificar este mecanismo en algunos parásitos-intracelulares.

ANEXO

Preparación de medios de cultivo

A.- Bifásicos

a.- Infusión Cerebro-Corazón - Solución salina al 0.95%

Infusión cerebro-corazón	3.7 g
Agar	2.0 g
Dextrosa	1.0 g

Disolver en 100 ml de agua y esterilizar a 10 lb / 10 min.

Solución salina al 0.95%

Cloruro de sodio	0.95 g
Agua	100 ml

Disolver y esterilizar a 15 lb / 15 min.

b.- Agar Sangre- Solución Salina al 0.95%

Bacto agar base Difco	40.0 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver y esterilizar a 15 lb / 15 min.

Una vez enfriado el medio a 40 °C agregar 100 ml de sangre de carnero.

Solución salina al 0.95%

Cloruro de sodio	0.95 g
Agua	100 ml

Disolver y esterilizar a 15 lb / 15 min.

B.- Líquidos

a.- Medio Mínimo Escencial (MEM)

Se preparó de acuerdo a las instrucciones del fabricante:

10 ml de MEM + 90 ml de agua bidestilada + 1 ml de bicarbonato de sodio
7.5%. Agitar.

Bicarbonato de sodio 7.5%	
Bicarbonato de sodio	7.5 g
Agua	100 ml.

Tinción de Giemsa

(6)

- 1) Preparar una dilución 1:10 a partir de la solución original de Giemsa - con agua destilada, filtrar.
- 2) Agregar una gota de metanol a cada cubreobjeto durante 1 min.
- 3) Lavar con agua destilada .
- 4) Agregar 0.4 ml de la dilución de Giemsa, durante 30 min.
- 5) Lavar con agua destilada.
- 6) Dejar secar al aire.

Tinción de May Grünwald-Giemsa

(7)

- Preparación de la solución madre

Polvo del colorante de May Grünwald	0.30 g
Alcohol metílico puro y neutro	.100 ml.

Técnica

- 1) Diluir la solución madre 1:2 con agua destilada.
- 2) Añadir esta dilución a los cubreobjetos durante 5 min.
- 3) Lavar con agua destilada.
- 4) Hacer una dilución del colorante Giemsa 1:10 con agua destilada.
- 6) Lavar con agua destilada.
- 7) Secar al aire.

Solución de aisever

Glucosa	20.50 g
Citrato de sodio dihidratado	8.00 g
Acido cítrico monohidratado	0.55 g
Cloruro de sodio	4.20 g
Agua bidestilada	1000 ml

Esterilizar a 10 lb / 10 min ,previo envasamiento en cantidades de ---
40-50 ml en frascos .

BIBLIOGRAFIA

- 1).- Bach, J.F. (1984) *Inmunología*. Primera edición. Editorial Limusa. México, D.F. pp 105-123.
- 2).- Cohen, S. (1982) *Immunology of Parasitic Infection*. Blackwell Scientific Publication. Second edition. Oxford, G. B.
- 3).- Edelson, P.J. (1982) Intracellular parasites and phagocytic cells: Cell biology and pathophysiology. *Review of Infections Diseases*. 4 (1) : 124-135.
- 4).- Horwitz, M.A. (1982) Serial Feature. *Phagocytosis. Review of Infections Diseases* 4 (1) : 104-122.
- 5).- Kierszenbaum, F. (1974) Phagocytosis: A defense mechanism against infection with *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Immunology* 112 (5) : 1839-1844.
- 6).- Lynch, M. J. (1972) *Métodos de Laboratorio*. Segunda edición. Editorial Interamericana. México, D.F.
- 7).- *Manual de Laboratorio de inmunología*. ENCB IPN (1986).
- 8).- Peleáz, D. (1979) II Congreso Nacional de la Asociación Nacional de Química Clínica, curso de Parasitología, p 18.
- 9).- Stewart, S. (1985) *Inmunología, Inmunoparasitología e Inmunidad*. Segunda edición. Editorial Harla. México D.F. pp 121-124.
- 10).- Stites, F. P. (1985) *Inmunología Básica y Clínica*. Quinta Edición. Editorial El Manual Moderno. México, D.F. pp 103-118, 204-216.
- 11).- Tay G. (1988) *Parasitología Médica*. Editorial Francisco Méndez Cervantez. México, D. F., pp 105-115.