



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Desarrollo y optimización de un nuevo método de purificación de oocinetos de *Plasmodium berghei* basado en las propiedades adhesivas del oocineto

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Benito Recio Tótoro

TUTOR PRINCIPAL
Humberto Lanz Mendoza
[Instituto Nacional de Salud Pública](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Mario Henry Rodríguez López
[Instituto Nacional de Salud Pública](#)

Wilhelm Hansberg Torres
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MÉXICO, D. F. noviembre, 2015



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 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.



Instituto de Biotecnología
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

BIÓL. BENITO RECIO TOTORO

Por este conducto me permito informarle que la Comisión Académica acordó asignarle el siguiente jurado de examen para obtener el grado de Maestro en Ciencias.

| | | |
|------------|------|-----------------------------|
| Presidente | Dr. | Jean Louis Charli Casalonga |
| Secretario | Dra. | Rosario Vera Estrella |
| Vocal | Dr. | Jesús Santa Olalla Tapia |
| Vocal | Dr. | Alejandro Alagón Cano |
| Vocal | Dra. | Rosana Sánchez López |

Sin más por el momento me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuernavaca, Mor. a 13 de octubre de 2015

Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz
Coordinadora de Docencia

En un plazo máximo de **tres semanas**, contados a partir del momento en que el sinodal designado oficialmente reciba la tesis, éste deberá dar su voto fundamentado por escrito, el cual será comunicado al comité académico. Si considera que le será imposible cumplir con esta obligación deberá indicarlo al alumno para ser sustituido de inmediato.



AV. UNIVERSIDAD 2001. COL. CHAMILPA
C.P. 62210 CUERNAVACA, MORELOS, MÉXICO
TELS. (5255) 5622 7600 - (777) 329 1600
www.ibt.unam.mx

A mi padre

Agradecimientos

Quiero agradecerle a mi padre Benito Recio Téllez, a mi madre Adriana Tótoro Axtle, a Koch, a San Nicolás Tolentino (Nikko), a Dotol Boom, a Eshkav, a Türk y al resto de mi familia por su amor incondicional y compañía.

A mi madre, mi abuelo Benito Recio Folla, a Salomé Cabrera Romo, a mi padre, a Dauno Tótoro Nieto, a Silvia Cárdenas Arriaga, a Doña Gloria y a mis colegas del Laboratorio Tres Planta Alta del CISEI-INSP, en especial a Renaud Condé y Humberto Lanz Mendoza por estar al pendiente y apoyarme económicamente tan pronto como se me terminó la beca.

A mi tutor Humberto Lanz Mendoza por dejarme explorar mis propias ideas, y a mis asesores Mario Henry Rodríguez López y Wilhelm Hansberg Torres por aconsejarme y orientarme durante la realización de este trabajo.

A Miguel Ángel Linares Aragón por ayudarme a realizar algunos experimentos, a Renaud Condé por las largas discusiones durante la hora del café y las cervezas, y a Carlos Alberto Ayala de Lucio por escucharme y aconsejarme.

A María del Carmen Rodríguez Gutierrez por proporcionarme los parásitos y la dispa II utilizados en este trabajo, a Bruno Zárate García, quien elaboró las dos primeras imágenes del trabajo y a Luis Giovanni Cassani López por orientarme y proporcionarme la resina plástica para la centrífuga en el eje de rotación.

Finalmente a Fabiola Claudio Piedras, a Juan Manuel Hernández Tablas y a los miembros del jurado: Jean Luis Charli Casalonga, Rosario Vera Estrella, Alejandro Alagón Cano y en especial a Jesús Santa Olalla Tapia y a Rosana Sánchez López por los valiosos comentarios y sugerencias realizados para mejorar la versión final de la tesis.

Al CONACYT por la beca que permitió la realización de este trabajo.

Desarrollo y optimización de un nuevo método de purificación de oocinetos de *Plasmodium berghei* basado en las propiedades adhesivas del oocineto

Benito Recio Tótoro

Índice de contenido.

| | |
|---|-----------|
| 1. Resumen..... | 1 |
| 2. Introducción..... | 2 |
| 2.1. <i>La malaria y el parásito que la causa.....</i> | <i>3</i> |
| 2.2. <i>Ciclo de vida de <u>Plasmodium berghei</u>.....</i> | <i>4</i> |
| 2.2.1. <i>Fase asexual del ciclo de vida.....</i> | <i>5</i> |
| 2.2.2. <i>Fase sexual del ciclo de vida.....</i> | <i>5</i> |
| 2.3. <i>Biología del oocineto.....</i> | <i>9</i> |
| 2.4. <i>Proteínas adhesivas del oocineto.....</i> | <i>12</i> |
| 3. Antecedentes | |
| 3.1. <i>El cultivo de oocinetos.....</i> | <i>15</i> |
| 3.2. <i>La purificación de oocinetos.....</i> | <i>17</i> |
| 3.3. <i>El estrés generado durante el manejo de células.....</i> | <i>22</i> |
| 4. Objetivos | |
| 4.1. <i>Objetivo general.....</i> | <i>26</i> |
| 4.2. <i>Objetivos particulares.....</i> | <i>26</i> |
| 5. Materiales y métodos | |
| 5.1. <i>Valores, unidades de medida y reactivos.....</i> | <i>26</i> |
| 5.2. <i>Crecimiento de las fases merogónicas en el ratón.....</i> | <i>27</i> |
| 5.3. <i>Cultivo de oocinetos.....</i> | <i>27</i> |

| | |
|--|------------|
| 5.4. Crecimiento de células Sua5.1..... | 28 |
| 5.5. Purificación de oocinetos utilizando diversos sustratos de adhesión..... | 28 |
| 5.6. Recuperación y resuspensión de oocinetos del sustrato de adhesión..... | 29 |
| 5.7. Determinación de la viabilidad de los oocinetos..... | 31 |
| 5.8. Crianza de mosquitos <i>Anopheles albimanus</i> | 31 |
| 5.9. Alimentación de mosquitos con oocinetos purificados y verificación de la infección..... | 33 |
| 5.10. Manejo de datos, gráficas y análisis estadístico..... | 33 |
| 6. Resultados y discusión | |
| 6.1. Estandarización de algunos aspectos del cultivo de oocinetos..... | 34 |
| 6.2. Purificación de oocinetos utilizando un sustrato de adhesión/invasión | |
| 6.2.1. Prueba de concepto..... | 41 |
| 6.2.2. Extracción y resuspensión de los oocinetos adheridos o embebidos en el ECM gel..... | 43 |
| 6.2.3. Distintos sustratos de adhesión y concentración del ECM gel..... | 46 |
| 6.2.4. Recuperación y pureza partiendo de densidades distintas de oocinetos..... | 53 |
| 6.2.5. Recubrimiento de tubos de fondo cónico con ECM gel para la purificación de oocinetos..... | 63 |
| 6.2.6. Aspectos adicionales en la optimización de la purificación de oocinetos..... | 66 |
| 6.2.7. Infección de mosquitos con oocinetos purificados..... | 71 |
| 7. Conclusiones..... | 74 |
| 8. Referencias..... | 79 |
| Apéndice I. Purificación de oocinetos utilizando iohexol..... | 88 |
| Apéndice II. Graficas adicionales..... | 93 |
| Apéndice III. Protocolos sugeridos para la purificación de oocinetos con ECM gel..... | 105 |
| AIII.1. Cultivo merogónico para generar gametocitos de <i>Plasmodium berghei</i> | 105 |
| AIII.2. Cultivo in vitro de oocinetos de <i>Plasmodium berghei</i> | 108 |
| AIII.3. Purificación de oocinetos con ECM gel en laminillas Lab-Tek..... | 110 |
| AIII.4. Purificación de oocinetos con ECM gel en cajas de 24 pozos..... | 112 |

| | |
|--|------------|
| <i>AIII.5. Purificación de oocinetos con ECM gel en cubreobjetos.....</i> | <i>113</i> |
| <i>AIII.6. Purificación de oocinetos con ECM gel en cajas Petri.....</i> | <i>115</i> |
| <i>AIII.7. Purificación de oocinetos con ECM gel en tubos Falcon de 15 ml.....</i> | <i>117</i> |

Índice de figuras.

| | |
|---|----|
| Figura 1. Ciclo de vida de <i>Plasmodium berghei</i> | 7 |
| Figura 2. Detalle del ciclo esporogónico de <i>Plasmodium berghei</i> | 8 |
| Figura 3. Transcurso de la infección de <i>Plasmodium berghei</i> en ratones..... | 36 |
| Figura 4. Correlación entre parasitemia, gametocitemia y exflagelación..... | 37 |
| Figura 5. Disminución en el rendimiento del cultivo al utilizar columnas de CF-11 para eliminar a los leucocitos..... | 38 |
| Figura 6. Efecto de la heparina en la exflagelación y la producción de oocinetos..... | 40 |
| Figura 7. Purificación de oocinetos mediante ECM gel, tiempo de incubación y número de lavados..... | 42 |
| Figura 8. Análisis de degradación del ECM gel por la dispasa II..... | 44 |
| Figura 9. Viabilidad de los oocinetos purificados..... | 46 |
| Figura 10. Imágenes representativas de purificaciones realizadas con distintos sustratos..... | 48 |
| Figura 11. Purificación de oocinetos con distintos sustratos y con distintas concentraciones de ECM gel en varios diluyentes..... | 50 |
| Figura 12. Gráficas de recuperación y pureza partiendo de cantidades distintas de oocinetos...55 | |
| Figura 13. Repartición de los factores aglutinantes en dos fases: una celular y una soluble.....58 | |
| Figura 14. Dependencia del número de eritrocitos por oocinetos en el rendimiento y pureza de la purificación.....62 | |
| Figura 15. Elaboración de la funda para centrifugación en el eje de rotación y montaje del aparato.....65 | |
| Figura 16. Dispositivo para purificar oocinetos utilizando imanes.....69 | |
| Figura 17. Simulación de un evento de invasión <i>in vitro</i>70 | |
| Figura 18. Infección de mosquitos con oocinetos purificados.....73 | |
| Figura 19. Número de ooquistes en intestinos de mosquitos alimentados con oocinetos purificados.....74 | |
| Figura AI.1. Verificación de las soluciones de iohexol.....90 | |
| Figura AII.1. Histograma de la concentración de eritrocitos por mililitro de sangre en ratones infectados.....94 | |

| | |
|--|-----|
| Figura AII. 2. Observación a partir de la base de datos de la relación entre E/Ooc y el rendimiento y pureza de la purificación..... | 95 |
| Figura AII. 3. Recopilación, en gráficas de burbuja, del total de purificaciones realizadas..... | 96 |
| Figura AII. 4. Reacción de precipitina..... | 103 |
| Figura AII. 5. Ejemplos de centrifugación en el eje de rotación..... | 104 |

Índice de tablas.

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Esquema de alimentación de las larvas de mosquito..... | 32 |
| Tabla 2. Purificación con ECM gel partiendo de distintas cantidades de oocinetos..... | 56 |
| Tabla AI.1. Experimento 1 sin utilizar cloruro de amonio..... | 89 |
| Tabla AI.2. Experimento 2 sin utilizar cloruro de amonio..... | 91 |
| Tabla AI.3. Experimento 3 sin utilizar cloruro de amonio..... | 92 |
| Tabla AII.1. Variables que se lograron identificar durante la planeación y experimentación del método..... | 93 |

Lista de abreviaturas

- ADN: Ácido Desoxiribonucleico
- AP2: Apetala 2
- ARN: Ácido Ribonucleico
- BrEt/NA: Bromuro de Etidio y Naranja de Acridina
- BSA: Bovine Serum Albumin (Albúmina Sérica de Bovino)
- CD11b: Cluster of Differentiation 11b (Cluster de Diferenciación 11b)
- CD18: Cluster of Differentiation 18 (Cluster de Diferenciación 18)
- CD62L: Cluster of Differentiation 62 L-selectin. (Cluster de Diferenciación 62 L-selectina)
- CDPK3: Calcium Dependent Protein Kinase 3 (Proteína Cinasa Dependiente de Calcio 3)
- CelTOS: Cell-Traversal Protein of *Plasmodium* Ookinete and Sporozoite (Proteína de Atravesamiento de Células del Oocineto y Esporozoíto de *Plasmodium*)
- CF-11: Cellulose Fiber Powder 11 (Polvo de Fibra de Celulosa 11)
- CMI: Complejo de Membrana Interior
- Col IV: Colágeno tipo IV
- CT: Células Totales
- CTRP: Circumsporozoite- and Thrombospondin-related Adhesive Protein (TRAP)-Related Protein (Proteína Relacionada a Circumsporozoíto- Relacionada a la Proteína Adhesiva tipo Trombospondina (TRAP))
- ECM gel: Extracellular Matrix Gel (Gel de Matriz Extracelular). Equivalente al Matrigel.
- ECM buffer: Extracellular Matrix Buffer (Amortiguador del Gel de Matriz Extracelular)
- EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
- ee: error estándar
- E/Ooc: Eritrocitos por Oocineto
- FH: Fenilhidrazina
- GAGs: Glicosaminoglicanos
- GSH: Glutación
- IP: Intraperitoneal

- L2: Larva de estadio 2
- LAP: Lectin Adhesive-like Protein (Proteína Adhesiva tipo Lectina)
- MAOP: Membrane Attack Ookinete Protein (Proteína Adhesiva de Ataque a Membrana del Oocineto)
- MEM: Medio Esencial Mínimo
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- Ooc: Oocineto
- P21: Proteína de la familia *Plasmodium* 21 kDa
- P25: Proteína de la familia *Plasmodium* 25 kDa
- P28: Proteína de la familia *Plasmodium* 28 kDa
- PABA: Ácido para-aminobenzóico
- Pbs21: *Plasmodium berghei* surface 21 kDa (*Plasmodium berghei* superficie 21 kDa)
- Pbs25: *Plasmodium berghei* surface 25 kDa (*Plasmodium berghei* superficie 25 kDa)
- PBS: Phosphate Buffered Saline (Amortiguador de Fosfatos Salino)
- PC: Punción Cardíaca
- Pfs28: *Plasmodium falciparum* surface 28 kDa (*Plasmodium falciparum* superficie 28 kDa)
- Pgs28: *Plasmodium gallinaceum* surface 28 kDa (*Plasmodium gallinaceum* superficie 28 kDa)
- PPLP4: *Plasmodium* Perforin-Like Protein 4 (Proteína tipo Perforina de *Plasmodium*)
- PSN: Penicilina-Streptomycin-Neomicina
- RPMI 1640: Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute 1640
- RPMI-Ooc: Medio de cultivo RPMI suplementado para Oocinetos
- s: error estándar de la regresión
- Schn-Ooq: Medio de cultivo Schneider suplementado para Ooquistes
- SFBdc: Suero Fetal Bovino Descomplementado
- SOAP: Secreted Ookinete Adhesive Protein (Proteína Adhesiva Secretada del Oocineto)
- TA: Temperatura Ambiente
- Took: Transforming Ookinete (Oocineto en Transformación)

-TRAP/MIC2: Thrombospondin-Related Adhesive Protein / Microneme protein 2 (Proteína Adhesiva Relacionada a Trombospondina / Proteína del Micronema 2)

-U: Unidades

-UI: Unidad Internacional

-WARP: von Willebrand factor A domain-Related Protein (Proteína Relacionada al dominio A del factor de von Willebrand)

Desarrollo y optimización de un nuevo método de purificación de oocinetos de *Plasmodium berghei* basado en las propiedades adhesivas del oocineto

Benito Recio Tótoro

1. Resumen

Plasmodium, el parásito causante de la malaria, presenta un ciclo de vida que involucra a un hospedero vertebrado y un mosquito que funge como vector. El desarrollo asexual en el vertebrado ha sido extensamente estudiado, pero aún falta mucho por entender en cuanto al desarrollo sexual en el mosquito. La diversidad de etapas del desarrollo sexual del parásito en el mosquito, y su paso por múltiples regiones con microambientes distintos hace que el desarrollo sexual tenga un comportamiento complejo. Por su capacidad para invadir el epitelio intestinal y habilidad para escapar del bolo alimenticio durante el proceso de digestión, y asegurar la infección en el mosquito, el oocineto es uno de los estadios de desarrollo más relevantes en el vector. Las limitaciones para estudiar al oocineto radican, en parte, en la complejidad para purificarlos y obtenerlos en cantidades suficientes. Existen al menos cinco métodos de purificación de oocinetos que varían en cuanto a la cantidad de oocinetos obtenidos, la pureza de los mismos y la composición de la contaminación celular que no se logra eliminar en el preparado final. Estos métodos se basan en principios físicos, químicos o celulares, cada uno involucrando posibles inductores de estrés durante el manejo del parásito.

En este trabajo se desarrolló un método de purificación de oocinetos que aprovecha su adhesividad por los componentes de la lámina basal. El principio del método consiste en recubrir con un gel de matriz extracelular, la superficie en la que se van a cultivar los oocinetos, al cual solamente los oocinetos logran adherirse, permitiendo que las demás células contaminantes sean eliminadas por lavados. Con esta metodología se obtienen rendimientos del 1 % al 13 % y purezas del 60 % al 80 %, lográndose alcanzar purificaciones de hasta el 90 % al 99 %, utilizando superficies que no presenten ángulos como cubreobjetos. Además, es posible desprender a los oocinetos del sustrato utilizando dispasa II para obtenerlos en suspensión. La recuperación de oocinetos incrementa al aumentar el tiempo de incubación, la cantidad del ECM gel y la cantidad de oocinetos iniciales en el cultivo; y disminuye exponencialmente con respecto al grado de contaminación con eritrocitos. El incremento de la superficie de adhesión aumenta el rendimiento de la purificación, pero sólo hasta un límite en donde se observa aglutinación de la sangre por un efecto de dilución, dando como resultado una menor pureza. Este método de purificación permite mantener a los oocinetos en condiciones que no sólo permiten su supervivencia, sino que fomentan su desarrollo, minimizando a su vez los factores estresantes que puedan comprometer su fisiología celular.

Desarrollo y optimización de un nuevo método de purificación de oocinetos de *Plasmodium berghei* basado en las propiedades adhesivas del oocineto

Benito Recio Tótoro

2. Introducción

A pesar de que la malaria es una de las enfermedades parasitarias transmitidas por vector más importantes a lo largo de la historia de la humanidad (Hedrick, 2011), y que a la fecha sigue ocasionando cientos de miles de muertes y cientos de millones de personas siguen padeciéndola anualmente (Nadjm y Behrens, 2012; WHO, 2014), aún no se ha logrado comprender en su totalidad al complejo parásito que la causa y las interacciones que establece entre sus dos hospederos, el humano y el mosquito. La complejidad del parásito que produce la malaria reside en sus numerosas fases de desarrollo y en las estrategias que utiliza para ser transmitido de mosquitos a humanos y viceversa, las cuales apenas se están logrando esclarecer (Bannister y Sherman, 2009). *Plasmodium* pasa de ser un parásito principalmente intracelular en el humano a ser un parásito casi exclusivamente extracelular en el mosquito, encontrándose microambientes completamente distintos y propios de cada hospedero (Bannister y Sherman, 2009; Talman, et al., 2004) y, no por lograr su desarrollo en éstos, dejan de ser hostiles para su historia de vida (Smith y Jacobs-Lorena, 2010; Smith, et al., 2014; Becker, et al., 2004). Especialmente en el mosquito, donde el parásito inicialmente se encuentra en el bolo alimenticio en proceso de digestión, del cual debe salir y atravesar numerosas barreras físicas y químicas que le impone el mosquito (Smith, et al., 2014) para residir durante no menos de 15 días en la membrana basal del intestino, donde se multiplica considerablemente. Durante su travesía, la población parasitaria disminuye considerablemente, pasando de cientos de miles de gametocitos y oocinetos a no más de diez ooquistes, los cuales logran restablecer la población nuevamente en el orden de decenas de miles de parasitos en etapa de esporozoíto (Smith, et al., 2014; Baton y Ranford-Cartwright 2005b). Son principalmente las fases de oocineto y ooquiste, las menos estudiadas y de las cuales las técnicas y metodologías de cultivo, así como de purificación, aún no han logrado las expectativas de muchos investigadores para generar muestras lo suficientemente abundantes, puras y

mínimamente manipuladas para su satisfactorio análisis. En este trabajo, se presenta una metodología de cultivo y purificación de oocinetos novedosa que permite mantener las condiciones óptimas para su desarrollo, además de lograr enriquecimientos, cantidades suficientes y sobre todo, no alteradas con químicos y procesos físicos bruscos que puedan modificar el comportamiento del parásito durante el posterior análisis que se desee realizar con él.

2.1. La malaria y el parásito que la causa.

La malaria o paludismo es una enfermedad parasitaria de gran importancia en salud pública, con una gran repercusión económica y social. Esto debido a la alta morbilidad y mortalidad que causa, principalmente en los sectores más vulnerables de la población; como las regiones rurales, suburbanas marginales y en estado de pobreza. Este sector de la población comprende a la gran mayoría de la humanidad, por lo que aproximadamente el 50 % de la población mundial está en riesgo de adquirir la enfermedad. En el 2013, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó una estimación de 198 millones de casos y 584 mil muertes (WHO, 2014). La mayor incidencia y mortalidad se presenta en niños, quienes suelen presentar varios episodios de malaria durante su infancia, convirtiendo a esta enfermedad en un aspecto cotidiano de la vida en ciertas regiones como África, Asia y en menor medida en América Latina y el Caribe (RBM, 2008; Shah, 2010; WHO, 2014). La OMS clasifica a México en fase de eliminación, con 499 casos en el 2013 (WHO, 2014) y 591 en el 2014 (Secretaría de Salud, 2015) distribuyéndose principalmente en el noroeste y sur del país.

Los agentes causales de esta enfermedad son parásitos protozoarios apicomplexos del género *Plasmodium* (Haemosporida: Plasmodiidae), transmitidos al hombre por mosquitos vectores del género *Anopheles* (Diptera: Culicidae). Estos protozoarios son parásitos obligados que presentan un ciclo de vida que involucra a dos hospederos : el vertebrado intermediario, en el cual el parásito se reproduce asexualmente, y el invertebrado definitivo, donde se reproduce sexualmente. De las más de 200 especies de *Plasmodium* descritas, al menos 19 parasitan al hombre (Coatney y Roudabush, 1936). De éstas, las que establecen infecciones definitivas o exitosas son: *P. falciparum*, especie que produce el mayor número de casos letales, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi* y *P. vivax* (Bannister y Sherman, 2009). *P. vivax* es el agente etiológico de la malaria en México y, aunque no suele ser tan virulenta como *P. falciparum*, genera infecciones recurrentes, es decir, las personas infectadas con esta especie presentan recaídas debido a que el parásito es

capaz de permanecer en el hígado de manera inactiva (Bannister y Sherman, 2009), lo que dificulta su erradicación. *Anopheles* es el género de mosquitos que transmite estas cinco especies de parásitos al hombre, aunque los mosquitos del género *Aedes* y *Culex* son también vectores de algunas especies de *Plasmodium* exclusivamente para aves y reptiles (Bannister y Sherman, 2009). En México los principales vectores de la malaria son: *Anopheles pseudopunctipennis*, *A. albimanus*, *A. darlingi*, *A. vestitipennis* y *A. punctimacula* (WHO, 2014; Casas-Martínez y Orozco-Bonilla, 2006).

Las especies comúnmente utilizadas como modelos para estudiar la biología del género son: a) *Plasmodium falciparum*, que parasita al hombre y cuyo vector es *A. gambiae*, b) *Plasmodium gallinaceum* que parasita a *Gallus gallus* y cuyo vector es *Aedes aegypti*, y c) *Plasmodium berghei* que parasita a *Thamnomys surdaster* (Muridae) y cuyo vector es *Anopheles durenii*. A pesar de que la especie filogenéticamente más parecida a los parásitos que infectan al humano es *P. gallinaceum* (Leclerc, et al., 2004) Su vector, *Aedes aegypti*, no transmite la enfermedad al hombre, además de que estudios más recientes indican que *P. berghei* es más cercana (Escalante, et al., 2010; The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/Plasmodium/68071>). Debido a esto, a que el vector del paludismo en el hombre es *Anopheles*, y a la facilidad de trabajar con ratones, varias líneas de investigación se han enfocado en la interacción del mosquito *Anopheles* y parásitos murinos.

En este trabajo se utilizó *Plasmodium berghei* cepa Antwerpen-Katanga (ANKA) clon 2.34, capaz de infectar a *Mus musculus* (ratón común) y al mosquito *A. albimanus*, con el inconveniente de que éste último no es un buen vector para *P. berghei* (Crampton, et al., 1997).

2.2. Ciclo de vida de *Plasmodium*.

El complejo ciclo de vida de *Plasmodium* involucra varias formas distintas y especializadas que le permiten la invasión y desarrollo dentro de los tejidos y/o células de sus hospederos. Presenta tres formas invasivas, cuatro formas tróficas y cuatro formas reproductivas (figura 1). Las formas tróficas, como los trofozoítos y el ooquiste joven, se nutren de los recursos del hospedero para crecer y producir las fases reproductivas como los esquizontes y el ooquiste tardío, que generan subsecuentemente a las fases invasivas. Estas fases invasivas, como el esporozoíto y el oocineto son las que aseguran la infección del hospedero. El ciclo de vida de

las numerosas especies de *Plasmodium* es similar, lo que permite estudiarlo de manera general a nivel de género (Bannister y Sherman, 2009).

2.2.1. Fase asexual del ciclo de vida

Cuando un mosquito infectado con *Plasmodium* se alimenta de sangre, inyecta junto con la saliva a los esporozoítos en la dermis del hospedero vertebrado. Subsecuentemente, los esporozoítos migran por el torrente sanguíneo y los vasos linfáticos hasta el hígado e invaden a los hepatocitos, donde ocurre una primera ronda de multiplicación. Los esporozoítos maduran en trofozoítos hepáticos y posteriormente en esquizontes hepáticos. La ruptura del hepatocito, libera a los merozoítos que invaden a los eritrocitos en el torrente sanguíneo. Dentro de los eritrocitos, los merozoítos maduran a trofozoítos y después se forman los esquizontes, los cuales liberan nuevamente a los merozoítos al torrente sanguíneo, permitiendo que nuevos eritrocitos sanos sean infectados (figura 1) (Bannister y Sherman, 2009). Durante la fase eritrocítica es cuando el hospedero manifiesta la sintomatología característica de la malaria como consecuencia de la ruptura del eritrocito y la liberación de las moléculas de desecho del parásito generan las características reacciones febriles de la malaria, aunque la periodicidad de éstas, así como otros signos y síntomas, varían entre las distintas especies de *Plasmodium* (Bannister y Sherman, 2009; Bartoloni y Zammarchi, 2012). La muerte del hospedero vertebrado generalmente es debida a anemias severas, nefropatías, fallo respiratorio y a la obstrucción de los vasos sanguíneos que aportan irrigación al cerebro por parásitos que se adhieren al endotelio vascular (Bartoloni y Zammarchi, 2012).

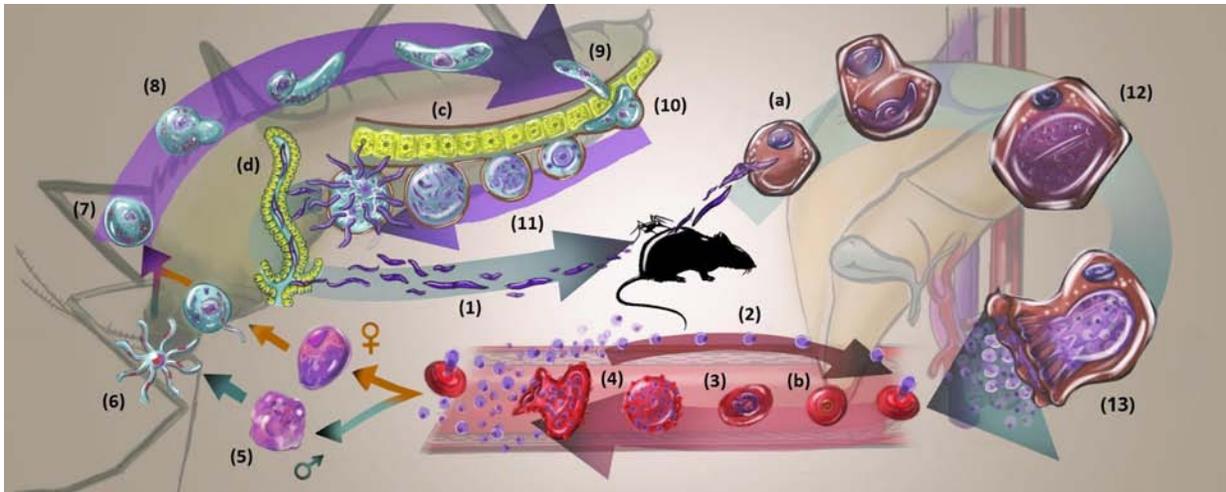
2.2.2. Fase sexual del ciclo de vida

Entre el 1 % y el 10 % de los trofozoítos son condicionados a formar las fases sexuales a través de la formación de esquizontes que liberan merozoítos machos o hembras. Estos merozoítos condicionados, tras la invasión del eritrocito, se transforman en las células pre-sexuales en latencia o gametocitos (Baker, 2010). Se desconocen los factores que disparan la gametocitogénesis, pero se sabe en general, que los disparadores son factores estresantes tal como la ruptura masiva de los eritrocitos (que produce anemia), la presión inmunológica del hospedero, parasitemias altas, abundancia de reticulocitos y drogas como la cloroquina y pirimetamina (Horrocks y Merrick, 2015; Talman, et al., 2004; Baker, 2010). No obstante

el disparador, factores transcripcionales de la familia AP2 (que en las plantas esta involucrado en el desarrollo de las flores) parecen ser los controladores maestros no sólo de la gametocitogénesis, sino también del resto de las fases sexuales (Horrocks y Merrick, 2015; Painter, et al., 2011).

Cuando un mosquito se alimenta de un hospedero infectado, ingiere a los gametocitos junto con la sangre. En el bolo alimenticio, la disminución de la temperatura de $\approx 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a temperatura ambiente, el aumento del pH de 7.4 a 8.3 y la presencia del ácido xanturénico, disparan la maduración a gametos, formando macrogametos (hembra) sésiles y microgametos (macho) móviles que fecundan a los primeros (Billker et al. 1998). Tras la fecundación, en el cigoto ocurre la fusión de los dos núcleos haploides produciendo uno diploide, una división meiótica sin cariocinesis ni citocinesis y posteriormente una segunda meiosis mientras que el cigoto se diferencia en un oocineto tetraploide (Baton y Ranford-Cartwright, 2005b) adquiriendo forma de retorta durante el proceso (figura 1) (Janse, et al., 1985a; Janse, et al., 1985b).

El oocineto o cigoto móvil es la fase del parásito que nos ocupa en este trabajo, es una célula alargada en forma de banana que se desplaza para salir del bolo alimenticio mediante deslizamientos hasta llegar a la membrana peritrófica y el glicocálix secretado por el mosquito para protegerse de patógenos y enzimas digestivas. El oocineto atraviesa la membrana peritrófica, compuesta principalmente por quitina, utilizando quitinasas y llega a la membrana luminal de las células epiteliales, las cuales atraviesa a través del citoplasma (aunque existe controversia con respecto a si también puede cruzar intercelularmente), alojándose entre la membrana basal del epitelio intestinal y la lámina basal que recubre a todos los órganos internos del mosquito (figuras 1 y 2) (Baton y Ranford-Cartwright, 2005a; Whitten, et al., 2006; Vlachou, et al., 2004). En este sitio, el oocineto se diferencia en un ooquiste que se nutre de la hemolinfa del mosquito, produce miles de esporozoítos haploides que emergen hacia la hemolinfa, y migran a través de ésta hasta encontrar a las glándulas salivales para invadirlas y poder ser inoculados en un nuevo hospedero vertebrado durante la alimentación del mosquito (figuras 1 y 2) (Janse, et al., 1985a; Bannister y Sherman, 2009; Marquardt, 2004; Sinden y Billingsley, 2001; Sinden, 1974).



Fases invasivas

Esporozoíto (1)
Merozoíto (2)
Oocineto (9)

Fases tróficas

Trofozoíto hepático (12)
Trofozoíto eritrocítico (3)
Gametocitos (5)
Ooquiste joven (11)

Fases reproductivas

Esquizonte hepático (13)
Esquizonte eritrocítico (4)
Gametos (6)
Ooquiste tardío (11)

Figura 1. Ciclo de vida de *Plasmodium berghei*. Cuando un mosquito infectado con el parásito se alimenta de un vertebrado, inocula junto con la saliva a los esporozoítos (1). Después de migrar por el torrente sanguíneo y vasos linfáticos, los esporozoítos llegan al hígado e invaden a los hepatocitos (a), formando esquizontes hepáticos (12). Al madurar, los esquizontes hepáticos liberan a los merozoítos (2) al torrente sanguíneo e invaden a los eritrocitos (b). En estos se establece una fase del ciclo asexual de crecimiento que incrementa considerablemente la población parasitaria. Dentro del eritrocito, el merozoíto se transforma en un trofozoíto (3) y posteriormente en un esquizonte eritrocítico (4) que libera nuevamente a los merozoítos en la sangre. Algunos merozoítos están condicionados a formar a los gametocitos (5), los cuales, al ser ingeridos por un mosquito, maduran a gametos machos o hembras (6). El cigoto (7) que resulta de la fecundación, se diferencia en el bolo alimenticio adquiriendo primero forma de retorta (8) y posteriormente en una célula especializada y móvil llamada oocineto (9). El oocineto migra a través del bolo alimenticio y cruza la membrana peritrófica que recubre el interior del epitelio intestinal (c) y a las células epiteliales, alojándose entre la membrana basal de éstas y la lámina basal que rodea al intestino. En este sitio, el oocineto se diferencia, a través de un estadio llamado *ookin* (10), en un ooquiste (11). El ooquiste crece y madura para formar a los esporozoítos que migran por la hemolinfa del mosquito para invadir a las glándulas salivales (d) y poder ser inoculados en alimentaciones posteriores del mosquito. Imagen construida a partir de Bannister y Sherman, 2009; Carter, et al. 2007; Janse, et al. 1985a; Sinden, 1974; Crédito de la imagen: Bruno Zarate García.

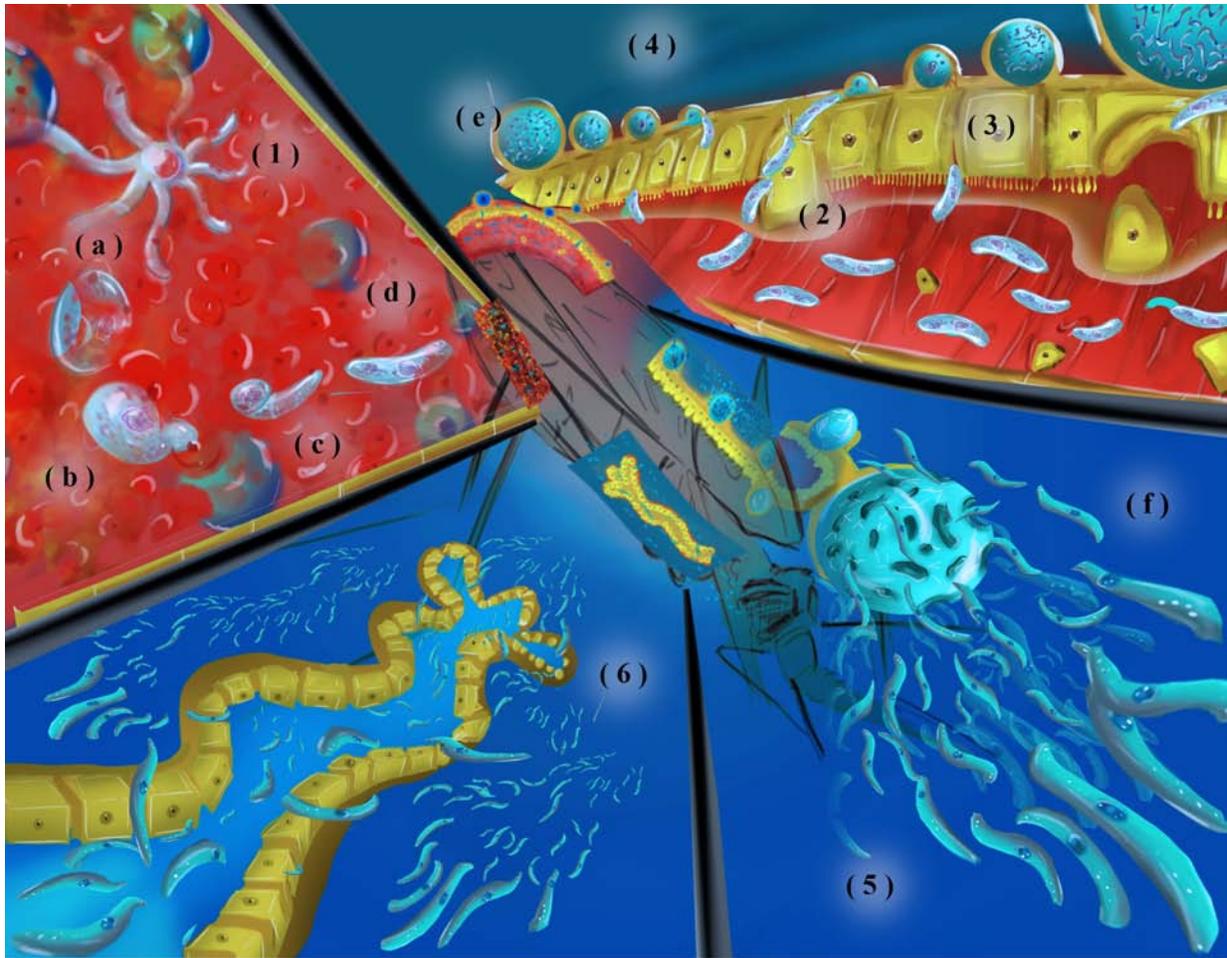


Figura 2. Detalle del ciclo esporogónico de *Plasmodium berghei*. Panel superior izquierdo: En el bolo alimenticio (1), los gametocitos maduran a gametos (a) y ocurre la fecundación. El cigoto (b) resultante comienza a diferenciarse adquiriendo forma de retorta (c) para formar al oocineto (d); célula móvil y en forma de banana que sale del bolo alimenticio mediante un tipo de locomoción basada en deslizamientos y rotaciones. Panel superior derecho: Con desplazamientos activos, deja el bolo alimenticio para llegar a la membrana peritrófica (2) y atravesarla, así como a las células epiteliales del intestino (3). Las células epiteliales, al detectar al parásito, mueren por apoptosis y son extruidas del epitelio intestinal. Si el oocineto logra salir de la célula apoptótica y se encuentra con la lámina basal del intestino (4), comienza a diferenciarse en un ooquiste vegetativo (e) que crece y produce miles de esporozoítos (f). Panel inferior derecho e izquierdo: Los esporozoítos que emergen hacia la hemolinfa (5) del mosquito migran por la hemolinfa propulsados por el flujo que genera el corazón tubular del mosquito hasta llegar a las glándulas salivales (6), donde residen en espera a que el mosquito se alimente nuevamente y poder ser inoculados en un nuevo hospedero vertebrado (panel inferior izquierdo). Imagen construida a partir de Bannister y Sherman, 2009; Carter, et al. 2007; Janse, et al. 1985a; Sinden, 1974; Crédito de la imagen: Bruno Zarate García.

Durante la invasión del mosquito, ocurren dos cuellos de botella en la población parasitaria que reducen su número de miles de gametocitos a menos de 10 ooquistes en el primero, y de ≈ 50 mil a ≈ 10 mil esporozoítos en el segundo. De estos ≈ 10 mil esporozoítos, solamente son inoculados al hombre menos de 100 por picadura (Baton y Ranford-Cartwright, 2005b; Sinden y Billingsley, 2001). Las causas de esta disminución poblacional se le ha atribuido a los componentes inmunológicos del vertebrado presentes en el bolo alimenticio, a la flora intestinal del mosquito, a una respuesta inmunológica montada por el mosquito ante la infección y probablemente a un mecanismo autorregulador de la población parasitaria a través de muerte celular programada (Shahabuddin y Costero, 2001; Dimopoulos, 2003; Akman-Anderson, et al., 2007; Kumar, et al., 2010). Cabe mencionar que este fenómeno también se observa en menor medida *in vitro* y sin ningún estímulo aparente (por ejemplo ver Arambage, et al., 2009).

Estos cuellos de botella en la población parasitaria, el carácter efímero de muchas de estas fases del desarrollo y la dificultad para obtenerlos puros y en abundancia, son algunas de las limitantes que han frenado el estudio de aspectos bioquímicos, moleculares y celulares del ciclo sexual del parásito (Kooij, et al., 2006; Carter, et al. 2007), por lo que nuevas técnicas y metodologías en el cultivo y purificación, en este caso de oocinetos, resultan necesarias.

2.3. *Biología del oocineto.*

El oocineto o “cigoto móvil” es la forma invasiva de *Plasmodium* que infecta al mosquito. Es una célula especializada y móvil cuya principal función es salir del bolo alimenticio, atravesar la membrana peritrófica, el epitelio intestinal y detenerse entre éste y la lámina basal para formar un ooquiste (cigoto enquistado o quiste reproductor) (figuras 1 y 2). El oocineto es una célula resistente pero también flexible que soporta las condiciones extremas del bolo alimenticio y la respuesta inmunológica que impone el mosquito durante su trayectoria hacia la lámina basal (Angrisano, et al., 2012).

En contraste a las fases eritrocíticas del parásito, que son anaerobias, las fases en el mosquito, entre ellas el oocineto, aparentemente presentan un metabolismo aeróbico. Las evidencias de esto son que las mitocondrias en el oocineto presentan muchas más crestas en comparación con las fases eritrocíticas, en las cuales las crestas incluso pueden estar ausentes (Sinden, 1984); además de que los genes implicados en el ciclo de Krebs y la cadena respiratoria se sobre-expresan

en las fases del mosquito (Vontas, et al., 2005; Hall, et al., 2005). Recientemente, se ha encontrado que la cadena respiratoria es esencial para el desarrollo del parásito en el mosquito pero no en el vertebrado (Boysen y Matuschewski, 2011; Sturm, et al., 2015). Además de la mitocondria, el parásito presenta apicoplasto, un organelo tipo plastidio con ADN propio que está involucrado en la síntesis de lípidos (Bannister y Sherman, 2009; Olszewski, et al., 2010).

A diferencia del merozoíto y del esporozoíto, que tienen micronemas, roptrias y gránulos densos en el complejo apical (estructura que caracteriza al grupo de los apicomplexos), el oocineto solamente presenta micronemas. Estas estructuras secretoras están asociadas con la invasión, reconocimiento y adhesión a los tejidos del mosquito. Los gránulos densos y las roptrias están asociados con la formación de la vacuola parasitófora; el oocineto carece de estas dos estructuras y no forma esta vacuola, por lo que está en contacto directo con el citoplasma de las células epiteliales (cuando la invasión es intracelular) (Angrisano, et al., 2012; Lal, et al., 2009). Se han identificado alrededor de 345 proteínas en el micronema del oocineto. La mayoría son proteínas sin identificar (104), proteínas ribosomales (68) y proteínas involucradas en el metabolismo (38). El resto están involucradas en el transporte vesicular (23), chaperonas (23), proteínas de señalización (11) y finalmente proteínas del complejo apical, de superficie y solubles secretadas (24). Estas últimas participan en la degradación de los tejidos del mosquito, como por ejemplo la quitinasa y las proteasas pepsinógeno, plasmepsina, entre otras. También se encuentran proteínas involucradas en la invasión de las células epiteliales como CelTOS, MAOP y PPLP4 (estas últimas dos presentan un dominio tipo perforina); y las involucradas en la adhesión del oocineto a estos tejidos (Lal, et al., 2009), las cuales se mencionarán más detalladamente en el siguiente apartado (ver sección 2.4. Proteínas adhesivas del oocineto).

Estudios de microscopía electrónica indican que el oocineto, al igual que las otras dos fases invasivas (el merozoíto y el esporozoíto), presenta pelliclo (término asignado por la falta de una traducción más acertada de “*pellicle*” en inglés, que se puede traducir como película), una estructura que comprende a la membrana plasmática y otras dos membranas subyacentes tipo vacuolas aplanadas originadas del aparato de Golgi y denominadas complejo de membrana interior (CMI). El CMI presenta microtúbulos localizados por debajo de la segunda membrana que transportan vesículas hacia el complejo apical; además de actina y miosina por encima de la primera membrana del CMI. Esta estructura se ha asociado con el aparato locomotor y morfología del oocineto (Angrisano, et al., 2012; Sinden, et al., 1985).

A diferencia del microgametocito, que se asemeja a un espermatozoide con locomoción flagelar, y que puede desplazarse en un medio líquido, el oocineto por el contrario ejecuta un tipo de locomoción dependiente del sustrato. En consecuencia, el oocineto no puede “nadar”, puesto que necesita un sustrato sólido o un gel muy viscoso para desplazarse (Keeley y Soldati, 2004). Tal es el caso del bolo alimenticio parcialmente deshidratado y en proceso de digestión por el cual debe migrar. Este aparato locomotor se ha denominado “*glideosome*” o desplazosoma en español y, como ya se comentó anteriormente, presenta filamentos muy cortos y dinámicos de actina por debajo de la membrana plasmática que se unen a través de la aldolasa a proteínas adhesivas en la superficie como la CTRP (ver siguiente sección). La actina a su vez se une con las miosinas ancladas al CMI y, por un mecanismo dependiente de calcio, permiten el desplazamiento del oocineto (Keeley y Soldati, 2004). Sintetizando, las proteínas adhesivas membranales son liberadas apicalmente y translocadas al polo posterior del oocineto por la acción de un motor de actomiosina anclado al CMI, lo que resulta en el desplazamiento de la célula (Keeley y Soldati, 2004).

Freyvogel (1966) fue de las primeras personas en comprobar que el oocineto se desplaza activamente para salir del bolo alimenticio y atravesar el epitelio intestinal, desde entonces se observaron tres tipos de movimientos en el oocineto: el primero es una rotación estacionaria, el segundo una translocación en espiral semejante a la forma de un sacacorchos y por último una motilidad en línea recta semejante al que realiza una serpiente (Freyvogel, 1966; Vlachou, et al., 2004). El oocineto cambia de forma ligeramente durante el desplazamiento y cuando pasa por lugares muy estrechos como la membrana peritrófica y las membranas de las células epiteliales, puede incluso adquirir forma de “mancuerna”, en donde todos los organelos pasan por un segmento altamente constreñido (Freyvogel, 1966; Vlachou, et al., 2004). A pesar de que no se ha encontrado ningún tipo de taxismo tanto *in vivo* como *in vitro* en el desplazamiento del oocineto, una vez que comienza con la locomoción después de un periodo de rotación estacionaria, la dirección que toma es prácticamente lineal y con una velocidad de entre (6 y 10.5) $\mu\text{m}/\text{min}$; aunque en ocasiones permanece inmóvil entre periodos de desplazamiento. El movimiento solamente es hacia adelante, el oocineto no puede retroceder o moverse hacia atrás. (Vlachou, et al., 2004; Kan, et al., 2014).

Otra estructura exclusiva del oocineto y del ooquiste joven es el cristaloides, el cual es denso, con el contenido muy organizado y compacto. Parece estar formado por vesículas del aparato de Golgi y se cree que es un reservorio de proteínas y

ARN que el oocineto utiliza durante la diferenciación a ooquiste (Canning y Sinden, 1973; Sinden, et al., 1985; Carter, et al., 2008; Saeed, et al., 2010; Dessens, et al., 2011).

2.4. *Proteínas adhesivas del oocineto.*

Para reconocer y adherirse a la lámina basal del epitelio intestinal del mosquito, cuyos principales componentes son la laminina, el colágeno tipo IV (col IV) y algunos proteoglicanos y glicoproteínas (Arrighi y Hurd, 2002; Mathias, et al., 2013; Zieler, et al., 1999), el oocineto presenta en la superficie proteínas membranales y solubles con afinidad para estas proteínas estructurales. La vía mejor conocida de secreción de proteínas tanto solubles como membranales en el oocineto es la de los micronemas, los cuales descargan su contenido por el poro apical, localizado en el complejo apical en el extremo anterior del oocineto (Patra y Vinetz, 2012; Lal, et al., 2009). La biogénesis de los micronemas ocurre en el aparato de Golgi y posteriormente son transportados por medio de microtúbulos subpeliculares hacia el poro apical (Lal, et al., 2009),

Las proteínas más abundantes en la superficie del oocineto, que representan alrededor del 25 % del total de proteínas membranales, pertenecen a una familia protéica rica en cisteínas y muy conservada con masas moleculares de entre 20 kDa y 35 kDa (Tsuboi, et al., 1998; Tomas, et al., 2001). Se caracterizan por presentar una secuencia señal, tres o cuatro dominios tipo factor de crecimiento epidérmico, un extremo C-terminal hidrofóbico y un extremo N-terminal también hidrofóbico que une a estas proteínas a la membrana externa a través de un anclaje de glicosilfosfatidilinositol (Tsuboi, et al., 1998; Blanco, et al., 1999; Rodriguez, et al., 2000; Tomas, et al., 2001). Los miembros de la familia P25/P28 derivan su nombre del peso molecular de la proteína y de la especie en la cual se encuentran siguiendo este esquema: *Plasmodium*, **sp.**, “*surface*” y **peso molecular** aproximado; por ejemplo Pbs25, donde “b” representa la especie *P. berghei*. La familia está separada en dos grupos principales, el P25 y el P21/28. P25 se encuentra en todas las especies de *Plasmodium*, mientras que P21 es el homólogo de P28 en las especies murinas de *Plasmodium*. P28 se encuentra en las especies que infectan al hombre y a las aves (Tsuboi, et al., 1998). P25 y P21/P28 no se secretan a través del micronema, en cambio aparentemente se trafican a la superficie a través de otras vesículas y llegan a la membrana plasmática a través de unos poros en el CMI que permiten su paso (Blanco, et al., 1999; Raibaud, et al., 2001). Tanto P25 como P21/P28 se expresan desde los macrogametos hasta el ooquiste joven (Blanco, et al., 1999; Rodriguez, et al., 2000) y presentan propiedades adhesivas para los componentes de

la lámina basal. Tal es el caso de Pbs21, P25 y Pfs28 las cuales se unen a laminina (Vlachou, et al., 2001; Arrighi y Hurd, 2002), y Pgs28 de *P. gallinaceum*, la cual además de unirse a laminina, también se une débilmente a col IV (Adini y Warburg, 1999). Cuando se inyectan oocinetos doblemente “*knockout*” para P25 y P28 en el hemocele de mosquitos, los oocistes resultantes se encuentran flotando libremente en la hemolinfa, o adheridos muy débilmente a la lámina basal (Tomas, et al., 2001). Pbs25 es capaz de formar homodímeros o heterodímeros con Pbs21, además de que es posible que otras proteínas solubles como las LAP (ver más abajo) se unan a la membrana a través de P25 (Wass, et al., 2012).

Además de las propiedades adhesivas de P25 y P21/P28, se ha encontrado que protegen al oocineto de enzimas proteolíticas (como la tripsina) secretadas por el mosquito durante la digestión (Tomas, et al., 2001), y se ha propuesto que asisten al oocineto durante la invasión de la célula epitelial (Baton y Ranford-Cartwright, 2005c).

Las proteínas de la superficie del oocineto no solamente se adhieren a otras proteínas del mosquito, también se ha documentado que la adhesión del oocineto a los tejidos del mosquito depende, en parte, en los carbohidratos de la superficie celular (Zieler, et al., 1999), como el condroitín sulfato en la membrana apical y el heparán sulfato en la membrana basal del epitelio (Mathias, et al., 2013). Las proteínas CTRP y WARP del oocineto se unen a glicosaminoglicanos (GAGs) cargados negativamente (Li, et al., 2004; Mathias, et al., 2013). Aunque ambas proteínas pertenecen a la familia TRAP/MIC2 (Kaneko, et al., 2006), presentan características distintas. CTRP es una proteína de ≈ 230 kDa la cual contiene un péptido señal, seis dominios de adhesión tipo von Willebrand A contiguos, siete dominios contiguos tipo trombospondina, un dominio transmembranal y un C terminal ácido citoplasmático que interacciona con el aparato locomotor de actomiosina en el complejo interno de membrana, por lo que está implicada en adherirse a una superficie y “jalar” al oocineto durante la locomoción (Yuda, et al., 1999; Mathias, et al., 2013). Además de unirse a GAGs, también se une a col IV y laminina (Arrighi y Hurd, 2002; Trottein, et al., 1995). WARP por el contrario es una proteína soluble que aparentemente se asocia a proteínas membranales del oocineto, pesa aproximadamente 40 kDa y presenta un péptido señal y un sólo dominio de adhesión tipo von Willebrand A (Gholizadeh, et al., 2009; Yuda, et al., 2001). A pesar de que se une a GAGs, no se conocen las moléculas específicas en el mosquito a las cuales se une (Gholizadeh, et al., 2009; Mathias, et al., 2013). La proteína soluble del oocineto SOAP, de ≈ 20 kDa, presenta características análogas con WARP: ambas son proteínas pequeñas y solubles, están codificadas por genes únicos muy conservados, están dirigidas hacia los micronemas y

forman complejos muy grandes a través de puentes disulfuro (Dessens, et al., 2003). SOAP se une a laminina y probablemente interaccione con otras proteínas membranales del oocineto (Dessens, et al., 2003). Otras son las proteínas LAP1 y LAP2 con adhesividad tipo lectina, las cuales también se encuentran asociadas a proteínas de la superficie y son secretadas por el oocineto (Sinden, 2004; Wass, et al., 2012).

Otras proteínas de la superficie del oocineto no se unen a proteínas estructurales o de las membranas celulares, sino a otras moléculas que asisten al oocineto durante el proceso de invasión. Una de ellas es la enolasa, que presenta propiedades adhesivas. Su ligando en el mosquito es desconocido pero se sabe que se une al glicocalix. Además de que es capaz de unirse al plasminógeno de la sangre en el bolo alimenticio a través de un motivo de lisina, el cual después de activarse a plasmina, asiste en la invasión del epitelio intestinal (Ghosh, et al., 2011). De manera similar, los oocinetos se unen por medio de una molécula desconocida a anexinas del mosquito durante la travesía por el epitelio intestinal. Esta interacción es importante para que el oocineto establezca infecciones en el mosquito, ya que cuando se alimentan a los mosquitos con oocinetos y un antisuero antianexinas, la prevalencia de ooquistes en el mosquito disminuye (Kotsyfakis, et al., 2005).

La prevalencia de ooquistes también disminuye en parásitos “*knockout*” para CTRP, SOAP (Nacer, et al., 2008; Dessens, et al., 1999; Dessens, et al., 2003), Pbs21 y Pbs25 (Siden-Kiamos, et al., 2000), así como la intensidad de la infección cuando se utilizan ratones infectados e inmunizados contra Pbs25 (Rodriguez, et al., 2000). La prevalencia también disminuye con la falta de las proteínas a las que se adhieren los oocinetos en el mosquito, como demostró Arrighi et al. (2005) con la laminina (Arrighi, et al., 2005). Los oocinetos “*knockout*” para estas proteínas logran diferenciarse a ooquistes *in vitro*, con la excepción de los oocinetos que carecen de Pbs21, en los cuales la transformación a ooquistes disminuye en un 93 % (Siden-Kiamos, et al., 2000; Nacer, et al., 2008; Dessens, et al., 1999; Dessens, et al., 2003). La disminución en la infección se debe, probablemente, a que los oocinetos no logran reconocer a la lámina basal y cruzan hacia el hemocele, imposibilitando cuantificar la prevalencia e intensidad en el intestino (Nacer, et al., 2008).

Como se ha descrito, dado que el oocineto es una célula móvil con capacidades adhesivas e invasivas, se desarrolló la idea de que podrían aprovecharse estas características para purificarlo de los demás componentes celulares presentes en el cultivo de oocinetos utilizando un sustrato al cual puedan adherirse, mientras que las demás células contaminantes no. Éste es el fundamento principal del método

que se presenta en este trabajo y del cual se explicará su desarrollo en los apartados de metodología y resultados. Antes de esto se revisarán algunos otros métodos de purificación de oocinetos, sus pros y sus contras, así como los antecedentes que permitieron el establecimiento de la nueva metodología desarrollada en esta investigación.

3. Antecedentes

3.1. El cultivo de oocinetos

El cultivo de las fases esporogónicas o sexuales de *Plasmodium* ha permitido y sobre todo facilitado el estudio de aspectos bioquímicos, moleculares y celulares del parásito, de tal manera que gran parte del conocimiento que actualmente tenemos sobre éste organismo se ha generado *in vitro* (Hurd, et al., 2003). Esto se debe mayoritariamente a los problemas inherentes que implica purificarlos de los tejidos del mosquito. Si bien el estudio del parásito dentro del mosquito nos aporta conocimiento en su contexto natural, cualquier experimento de este tipo implicaría controlar más variables relacionadas con el hospedero, las cuales son o muy complejas o imposibles de controlar (p.ej. ver Merrick y Duraisingh, 2010). Tal es el caso de la obtención de transcriptomas o proteomas del parásito (p.ej. Lal et al. 2009), la prueba de drogas y fármacos (p.ej. Nzila y Mwai 2010), el desarrollo de vacunas para evitar la transmisión (Bounkeua, et al., 2010), hasta la obtención y análisis de moléculas y metabolitos del parásito que son indistinguibles de las del mosquito, o que representarían mucho menos del 0.1 % en un extracto total de un mosquito (Recio-Tótoro, 2012) o de sangre infectada con *Plasmodium* (Vega-Rodríguez, et al., 2009).

A pesar de que el cultivo de las fases sexuales, principalmente de gametos, data desde las primeras veces en que Ronald Ross y otros investigadores observaron la exflagelación del parásito (término con el cual se refiere a la activación de los microgametocitos) en laminillas frescas de sangre extraída de aves infectadas, y comprobando posteriormente que este fenómeno se debía a condiciones adecuadas de manejo y no a la muerte del parásito como criticaba Grassi (Ross, 1902); no fue hasta casi cien años después que Weiss y Vanderberg (1977) lograron obtener oocinetos *in vitro* de manera reproducible. Estos investigadores utilizaron medio esencial mínimo (MEM) con sales balanceadas de Earle para cultivar sangre de hámster infectada con *Plasmodium berghei* a 20-21 °C durante 24 h (Weiss y Vanderberg, 1977), método que después fue perfeccionado por Janse et

al. (1985a), quienes utilizaron medio RPMI 1640 a pH 8 suplementado con suero fetal bovino e incubando a 20 °C por 24 h. En este artículo, los autores además documentaron el proceso de maduración del parásito desde cigoto a oocineto, describiendo todas las formas que va adquiriendo durante la diferenciación celular (Janse, et al., 1985a). Debido a que los merozoítos de *P. berghei* solamente invaden a los reticulocitos, Janse et al., en otro artículo del mismo año, inyectaron a los ratones con fenilhidrazina para inducir una anemia hemolítica y aprovechar la reticulocitosis resultante (Berger, 2007; Flanagan y Lessler, 1970) para aumentar la producción de parásitos (Janse, et al., 1985b).

Este método de cultivo establecido por Janse et al. (1985a y b) es el que se sigue utilizando hasta la fecha con muy pocas modificaciones, entre éstas se encuentran: la adición de bicarbonato de sodio, glutamina e hipoxantina (Rodríguez, et al., 2002) que el parásito necesita para sintetizar purinas (Jayaraman, et al., 2012). Por otra parte, algunos investigadores han implementado el uso de filtros o columnas de cromatografía que eliminan a los leucocitos de la sangre por la razón de que disminuyen el rendimiento del cultivo de oocinetos al provocarles la muerte (Akman-Anderson, 2008) a través de muerte celular programada (Al-Olayan, et al., 2002). Sin embargo, el uso de estos filtros o columnas no están generalizados. Numerosos investigadores reportan una retención de los eritrocitos infectados en dichas columnas (Sriprawat, et al., 2009) e incluso de gametocitos (ver Resultados y discusión), lo que disminuye considerablemente el rendimiento en la producción *in vitro* de oocinetos. Las columnas mayoritariamente implementadas son los filtros Plasmodipur y las columnas de CF-11 basadas en celulosa, principalmente utilizadas debido a su bajo precio (Venkatesan, et al., 2012; Sriprawat, et al., 2009; Janse y Waters, 1995). Estas columnas de CF-11 se han complementado con fibra de vidrio (Carter, et al., 2003). También se utilizan los métodos de eliminación de leucocitos basados en centrifugación en gradientes de Percoll, iohexol o Ficoll (Sriprawat, et al., 2009) aunque de nuevo, son pocas las referencias que reportan la utilización de estos métodos, salvo que la investigación llevada a cabo, por ejemplo, requiera que las muestras estén libres de ADN proveniente del vertebrado o de plaquetas (que también son retenidas en la columna de CF-11). La eliminación de leucocitos y plaquetas es, además, parte de un aspecto concerniente a la purificación de oocinetos, la cual se describirá a continuación.

3.2. La purificación de oocinetos

Poco tiempo después de haber establecido el método para cultivar a los oocinetos *in vitro*, se generalizó el interés de purificarlos del resto de las células presentes en el cultivo. Tal es el caso de los leucocitos y las plaquetas (que se logra con los métodos mencionados anteriormente), los eritrocitos y otras fases del parásito como los esquizontes, trofozoitos, cigotos y gametocitos que no lograron continuar con su desarrollo. Para lo anterior se han desarrollado varias técnicas que varían en cuanto a si se purifican los oocinetos, o los gametocitos y/o los cigotos para después diferenciarlos a oocinetos; y en cuanto a la técnica en particular de purificación que se lleva a cabo, por ejemplo: centrifugación diferencial, columnas de cromatografía o lisis diferencial de las células contaminantes con químicos (Hurd, et al., 2003).

El método más generalizado para llevar a cabo la purificación de las fases esporogónicas es mediante centrifugación diferencial en gradientes y/o centrifugación isopícnica, las cuales aprovechan la densidad de flotación de los oocinetos o cigotos, así como su forma y tamaño para separarlos. En estas técnicas, los gradientes y colchones empleados son principalmente los de Percoll, Ficoll, Histopaque e iohexol (Munderloh y Kurti, 1987; Zieler, et al., 1999; Janse y Waters, 1995). El iohexol (cuyo nombre comercial es Nycodenz de Axis-shield o Histodenz de Sigma) es el más utilizado debido a que es menos tóxico que otros compuestos y permite la formación de colchones y gradientes con un mayor rango de concentraciones y densidades sin modificar drásticamente la osmolaridad (Axis-Shield, 2012). Dearsly et al. (1987) utilizaron colchones de iohexol al 10 % para enriquecer a los cigotos y macrogametos de los eritrocitos y otras formas asexuales del parásito. La preparación contenía también retortas (la forma inmadura de los oocinetos). Al utilizar colchones al 12 % de iohexol, la preparación, además de cigotos y macrogametos, también presentaba una gran cantidad de oocinetos (Dearsly, et al., 1987). Posteriormente se optimizó el procedimiento, demostrándose que para obtener un enriquecido principalmente de oocinetos se debía utilizar un colchón de iohexol al 17 % (Rodríguez, et al., 2002), técnica que se sigue empleando sin modificaciones sustanciales hasta la fecha. Las modificaciones residen principalmente en realizar una serie de centrifugaciones diferenciales para ir eliminando otros contaminantes del cultivo y en la utilización de cloruro de amonio a 0.17 M, para lisar diferencialmente a los eritrocitos (Rodríguez, et al., 2002).

Se produce una lisis diferencial de los eritrocitos mediante soluciones isotónicas de cloruro de amonio debido a la presencia de un canal exclusivo para $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ en la membrana plasmática de los eritrocitos (Chernyshev, et al., 2008). En solución el NH_4Cl se disocia en NH_4^+ y Cl^- , el NH_4^+ se transforma en NH_3 el cual es permeable para la membrana celular a diferencia del NH_4^+ . Una vez dentro de la célula, el NH_3 establece un equilibrio con el NH_4^+ lo que resulta en una entrada neta del ión Cl^- que ocurre a través del intercambiador aniónico $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, incrementando considerablemente la concentración de NH_4Cl dentro del eritrocito y por ende de agua, provocando un choque osmótico y reventando al eritrocito. Dado que el ión bicarbonato está en equilibrio con el CO_2 , la lisis debe llevarse a cabo en agitación para permitir que las células estén en contacto con este gas (Chernyshev, et al., 2008). Como el oocineto carece de este transportador aniónico para cloro y bicarbonato, no hay una entrada neta de cloruro de amonio a la célula y el oocineto no se lisa. Además del NH_4Cl , se han utilizado (con menos éxito) otros agentes que provocan la lisis de los eritrocitos, tal es el caso de la lisis con ultrasonido, una reducción repentina de la presión, lisis hipotónica o utilizando saponina (Kreier, 1977; Kapoor y Banyal, 2009). Estas técnicas deben ajustarse muy delicadamente para evitar la lisis del parásito y se han utilizado principalmente para el cultivo de gametos, cigotos y fases eritrocíticas.

Frecuentemente, las técnicas explicadas arriba vienen acompañadas de inhibidores de la síntesis de ADN como la mitomicina C (Dearsly, et al., 1987) y la pirimetamina (Rodríguez, et al., 2002) para eliminar las fases asexuales del parásito durante el crecimiento merogónico. Esto permite que al realizar el cultivo de oocinetos ya no haya otras fases del parásito, con la excepción de gametos y cigotos que no pudieron continuar con su desarrollo hacia oocineto. Cuando en el ratón se alcanza una parasitemia deseada, el ratón es inoculado con estos inhibidores impidiendo que las fases asexuales del parásito continúen reproduciéndose, permaneciendo en la circulación sanguínea solamente los gametocitos. Al realizar el cultivo de oocinetos debe tenerse la precaución de eliminar los inhibidores de la síntesis de ADN, o por lo menos diluirlos considerablemente para permitir la síntesis de ADN en los gametocitos y fases subsecuentes.

Estas técnicas descritas arriba terminaron por formar el método estándar y más utilizado de purificación de oocinetos que se resume a continuación:

- a.- Eliminación de fases asexuales con inhibidores de la síntesis de ADN.
- b.- Eliminación de leucocitos y plaquetas con columnas de CF-11.

c.- Lisis osmótica de los eritrocitos con NH_4Cl .

d.- Centrifugaciones diferenciales en serie para eliminar restos celulares que permanecen en solución.

e.- y la separación de oocinetos mediante centrifugación con una barrera de densidad de iohexol.

Como ya se mencionó, no en todas las investigaciones se llevan a cabo todos estos pasos, lo cual depende de las particularidades y necesidades de cada experimento. Por otra parte, a pesar de ser el más económico, este método es tedioso de llevar a cabo y de optimizar. Este método no es tan gentil con los oocinetos como se mencionará más adelante, además de que, en promedio, se recupera el 1 % de los oocinetos de partida (Carter, et al., 2003) y purificaciones del 80 % aproximadamente (Rodríguez, et al., 2002).

Por esta razón, se han desarrollado otras técnicas de purificación de oocinetos. Sidén-Kiamos et al. (2000) obtuvieron cultivos de oocinetos mucho más enriquecidos que con el método de iohexol utilizando columnas de perlas magnéticas acopladas a un anticuerpo monoclonal que reconoce a la proteína Pbs21 en la superficie del oocineto. Posteriormente observaron que los oocinetos se liberaban de las perlas magnéticas al retirar las columnas del imán. Al moverse, los oocinetos van dejando un rastro de las proteínas de la superficie (Lecona, et al., 2010), reemplazándolas por nuevas proteínas que secretan por el complejo apical (Sidén-Kiamos, et al., 2000; Vlachou, et al., 2004), por lo que los autores asumieron que el anticuerpo anti-Pbs21 también lo perdían. Sin embargo, los macrogametos y los cigotos también presentan Pbs21 (Blanco, et al., 1999) por lo que en las preparaciones se encuentran una cantidad variable de estas fases del parásito (Sidén-Kiamos, et al., 2000). Tres años después Carter et al. (2003) utilizaron columnas con perlas magnéticas, sujetadas por un imán muy fuerte pero sin anticuerpos para purificar a los oocinetos. Esto bajo el fundamento de que la hemozoina o pigmento de la malaria, que resulta de la digestión de la hemoglobina (Müller, 2004), es paramagnética y por lo tanto atraída por un campo magnético, mientras que la oxihemoglobina en los eritrocitos no (Carter, et al., 2003). Con esta metodología, Carter et al. (2003) lograron recuperar el 1 % de los oocinetos y, cuando disminuyeron el flujo de la columna acoplándole agujas de un menor calibre, lograron recuperar hasta el 14 % de los oocinetos, con el inconveniente de que el proceso de purificación se extiende por 4 h. Carter et al. (2003) presentan evidencia de que las purificaciones obtenidas mediante las columnas magnéticas son mayores que con iohexol, sin embargo, aunque los

autores no lo reportaron, se esperaría que otras fases del parásito se encuentren en el cultivo de oocinetos, dado que todas las fases del parásito, con excepción de los merozoítos y los esporozoítos, presentan hemozoina, (Sullivan y Krishna, 2006). De hecho, Kim et al. (2010) utilizaron un método mejorado de las columnas magnéticas para purificar las fases eritrocíticas y a la hemozoina en suspensión, comprobando que no sólo los oocinetos son retenidos por el imán (Kim, et al., 2010).

Un método más completo aunque complicado es el reportado por Bounkeua et al. (2010) para la purificación de oocinetos de *P. falciparum*; el cual consiste en eliminar a la mayoría de los eritrocitos mediante centrifugación en Lympholyte-H, colectando a los parásitos de la interfase y colocándolos en columnas magnéticas, disminuyendo aún más la cantidad de eritrocitos. Después se eliminan los macrogametos en gradientes discontinuos de iohexol al 16 % / 11 % / 6 % recuperando a los cigotos y los oocinetos entre la interfase de 11 % / 16 %. Subsecuentemente se separan los oocinetos de los cigotos mediante citometría de flujo acoplado a un sorteador de células, donde los cigotos se distinguen de los oocinetos y de otras fases del parásito por el contenido de ADN utilizando la tinción Vybrant DyeCycle. Aún con los numerosos pasos en esta metodología, solamente el 33 % de las células en el cultivo resultaron ser oocinetos mientras que el 62 % son cigotos y el 2 % restante está comprendido por gametocitos (Bounkeua, et al., 2010). No obstante, Janse et al. (2004) no lograron purificar a los oocinetos de *P. berghei* mediante citometría de flujo debido a que en suspensión, los oocinetos y los cigotos forman conglomerados que difícilmente se disgregan (Janse, et al., 2004).

Por último, existen algunos otros métodos de purificación que se han realizado en contadas ocasiones, o de los que sólo se han encontrado uno o dos reportes en la literatura. Por ejemplo, el reportado por Zieler et al. (1999) para purificar cigotos de *P. gallinaceum* utilizando un colchón de Ficoll / Hypaque (9 % / 34 %) y mezclando la interfase de cigotos enriquecidos con aglutinina de germen de trigo para permitir que los eritrocitos restantes se aglutinen. Una vez aglutinados los eritrocitos, una centrifugación a muy baja velocidad envía éstos al fondo, dejando en suspensión a los cigotos, los cuales se incuban en medio de cultivo por 16 h a 20 h para permitir la formación de los oocinetos (Zieler, et al., 1999).

Además de éste, se encontraron otros cuatro trabajos relevantes, y que resultan ser los antecedentes más directos del método de purificación presentado en esta tesis, que explotan las capacidades adhesivas e invasivas del oocinetos para realizar sus

experimentos. El primero es el experimento de Zieler y Dvorak (2000) en el cual, tras enriquecer a los oocinetos en un gradiente de Percoll, el cultivo es colocado sobre intestinos de mosquitos para permitir que los oocinetos se adhieran y, después de realizar un lavado, observar mediante microscopía la invasión del oocineto a la célula epitelial del intestino (Zieler y Dvorak, 2000). El segundo, un experimento realizado por Ishino et al. (2006) para determinar que CDPK3, una proteína cinasa dependiente de calcio, es necesaria para la invasión del intestino del mosquito por los oocinetos, fue realizado de la siguiente manera: el cultivo de oocinetos sin previa purificación de los componentes de la sangre o de las otras fases del parásito, es colocado sobre geles gruesos de Matrigel, un sustituto de la matriz extracelular compuesto por aproximadamente 1800 proteínas distintas, principalmente laminina, col IV y enactina (Hughes, et al., 2010), para permitir la invasión del gel por los oocinetos. En este experimento, solamente los oocinetos invadieron el gel mientras que el resto de células contaminantes permanecieron sobre la superficie. Cuando utilizaron oocinetos carentes de esta proteína cinasa, no encontraron invasión (Ishino, et al., 2006). El tercero, el cual es un método de cultivo y purificación de oocinetos y ooquistes propiamente dicho, implementado por Warburg y Schneider (1993) consiste en permitir la formación de oocinetos de *P. falciparum* en medio de cultivo junto con aglutinina de germen de trigo para aglutinar a los eritrocitos. Posteriormente, el cultivo de oocinetos es sembrado junto con células L2 de *Drosophila melanogaster* sobre geles de Matrigel, al cual solamente las células L2, las retortas y los oocinetos se adhieren, mientras que los gametocitos y los eritrocitos contaminantes son eliminados mediante lavados subsecuentes. Con este método, los autores reportaron el cultivo satisfactorio de ooquistes de *P. falciparum* (Warburg y Schneider, 1993) pero no profundizan en la capacidad de purificar a los parásitos de esta manera.

El cuarto, un reporte de Arrighi y Hurd (2002), sobre las propiedades adhesivas del oocineto para los componentes de la lámina basal y su papel en la formación de ooquistes, consta en determinar la adhesión de los oocinetos y la transformación a ooquiste sobre superficies de cultivo recubiertas con: a) nada, b) albúmina sérica de bovino, c) laminina, d) col IV, e) fibronectina, f) Matrigel y g) varias combinaciones de las proteínas anteriormente mencionadas. Después de que se realizara la purificación de los oocinetos mediante lisis de los eritrocitos en cloruro de amonio y un enriquecimiento en un colchón de iohexol al 17 %, los autores cultivaron a los oocinetos sobre pozos recubiertos con estas proteínas anteriormente mencionadas durante 12 h, determinando que los oocinetos permanecen adheridos principalmente a los pozos con col IV, laminina y Matrigel

después de tres lavados para eliminar aquellos que no se alcanzaron a adherir. La cantidad de oocinetos adheridos a estos sustratos después de 12 h es de 80 a 90 oocinetos por campo a 400 aumentos (400X) y mientras menor sea el tiempo de cultivo, menor es la cantidad de oocinetos adheridos, resultando una relación casi lineal con respecto al tiempo: con tan sólo 2 h de incubación encuentran 20 oocinetos por campo y a 6 h 60 oocinetos por campo. A tiempos posteriores la adhesión de los oocinetos parece alcanzar una fase *plateau* (Arrighi y Hurd, 2002).

En estos cuatro trabajos, salvo el de Warburg y Schneider (1993), los autores no visualizan estos experimentos como métodos posibles de purificación de oocinetos. Dada la alta probabilidad de desarrollar con éxito un nuevo método de purificación de oocinetos basado en estas observaciones, se propuso llevar a cabo la implementación y optimización de dicha técnica, estableciéndola en un método consistente para obtener cultivos de oocinetos puros y mínimamente manipulados, que evite introducir artefactos durante la experimentación subsecuente. Para éste último mencionado, veremos algunas fuentes de estrés durante el manejo celular, las cuales pueden evitarse hasta cierto punto con la nueva metodología desarrollada.

3.3. El estrés generado durante el manejo de células

Cualquier manipulación llevada a cabo a los organismos vivos durante la experimentación resulta en fuentes de estrés que, dependiendo del organismo, pueden resultar en la introducción de artefactos que comprometan la calidad e interpretación de los resultados obtenidos (p.ej. ver: Pembrey, et al., 1999 y Hernández-Romano, et al., 2011). Por esta razón, siempre es recomendable evitar procedimientos bruscos y extensos que puedan provocar una respuesta indeseable durante el manejo. Existen múltiples evidencias de esto en la literatura, a continuación sólo se mencionarán algunos que resultan ser adecuados al compararlos con el método más barato y generalizado de purificación de oocinetos; el de lisis con cloruro de amonio y centrifugaciones con barreras de densidad y diferenciales.

Como se mencionó con anterioridad, la purificación de oocinetos se lleva a cabo primero, mediante la lisis osmótica de los eritrocitos en soluciones isotónicas de cloruro de amonio durante 15 min o 20 min a 4 °C y en agitación, para después eliminar el cloruro de amonio mediante cuatro centrifugaciones diferenciales por 5 min cada una a (720, 580, 402 y 258) g que permiten, además, ir eliminando

gradualmente las membranas y vesículas de eritrocitos resultantes de la lisis. Posteriormente los oocinetos se colocan sobre un colchón de iohexol al 17 % para eliminar otras fases del parásito en un buffer de EDTA para evitar la formación de conglomerados. En esta solución, los oocinetos son centrifugados por media hora a 720 g para después recolectar la interfase con oocinetos y someterlos a dos centrifugaciones más para eliminar el iohexol (Rodríguez, et al., 2002). Este procedimiento se extiende por 3 h o 4 h, tiempo en el cual los oocinetos permanecen en buffer de fosfatos salino (PBS) y a 4 °C privados de alimento. Existe la posibilidad de que las numerosas centrifugaciones sometan a los oocinetos a estrés oxidante; al formarse la pastilla en una centrifugación, los oocinetos entran en anoxia y al ser resuspendidos se puede provocar un choque oxidante al volver a estar en contacto súbitamente con un ambiente oxigenado. Los oocinetos, además, deben mezclarse y resuspenderse vigorosamente debido a que forman conglomerados que, si no se disgregan, pueden empobrecer la purificación y el rendimiento. Aunado a esto, existen evidencias de que la fuerza centrífuga a la que están expuestas las células durante la centrifugación altera su fisiología. Por ejemplo Lee et al. (2001) reportan que después de una o varias centrifugaciones, las células osteoblásticas promueven la proliferación celular incrementando la síntesis de ADN e incrementando la actividad de la fosfatasa alcalina (Lee, et al., 2001). De manera similar, las células de carcinoma epitelial de pulmón de humano, incrementan la expresión de la interleucina-1 β después de la centrifugación, expresión que presenta una relación positiva con la velocidad de centrifugación (Yang, et al., 2002). En el caso de los leucocitos, normalmente, cuando están en presencia de corrientes muy fuertes en el torrente sanguíneo, retraen los pseudópodos para evitar quedarse atrapados en los capilares, pero después de una centrifugación a 100 g, esta respuesta de retracción de los pseudópodos se inhibe y los leucocitos ya no pueden esferizarse. Al incrementar la fuerza centrífuga a 600 g, los leucocitos incluso extienden más los pseudópodos irreversiblemente en vez de retraerlos. Al reintroducir estos leucocitos centrifugados en el torrente sanguíneo, los autores reportan un incremento en la retención y extravasación de los leucocitos hacia los tejidos (Fukuda y Schmid-Schönbein, 2002). Lundahl et al. (1995) encontraron que los leucocitos tratados con heparina, en contraste con EDTA como anticoagulante, y purificados en gradientes de Ficoll-Paque, en comparación con el cloruro de amonio, presentan una expresión alterada e incrementada de CD11b/CD18 y de CD62L (Lundahl, et al., 1995). Efectos similares también se observan en bacterias, especialmente en *Escherichia coli*, donde la centrifugación y otros tratamientos preparativos, así como el buffer o medio que se utiliza para ello, disminuyen la viabilidad y la

capacidad de adherirse a distintos sustratos; para algunos sustratos, las células se vuelven más adhesivas después de ser centrifugadas, mientras que para otros sustratos la adhesividad disminuye (Pembrey, et al., 1999).

Un ejemplo muy importante para nuestro laboratorio (que estudia la diferenciación celular y el sistema oxido-reductor del glutatión (GSH) del oocineto) es el de Shim y Fairlamb (1988) donde encuentran que al centrifugar a *Crithidia fasciculata* en medio de cultivo, el GSH intracelular total disminuye progresivamente con el número de lavados, y si se centrifuga en PBS, incluso con una sola centrifugación se invierte la concentración GSH-espermidina y de tripanotión, moléculas que en los tripanosomátidos están involucradas con la proliferación celular y el desarrollo. Cuando un cultivo de *C. fasciculata* en fase estacionaria es diluido, la GSH-espermidina disminuye y el tripanotión aumenta, posiblemente liberando espermidina y promoviendo la división celular (Shim y Fairlamb, 1988).

Por otra parte, el tratamiento para lisar a los eritrocitos con cloruro de amonio no es el ideal para obtener oocinetos íntegros, ya que se ha demostrado que la presencia y/o distribución de algunas proteínas del oocineto pueden alterarse. Hernández-Romano et al. (2011) lo observaron al tratar a los oocinetos con cloruro de amonio y determinar mediante inmunofluorescencia la distribución de actina en la superficie. Los oocinetos no tratados presentan parches de actina, mientras que cierto porcentaje de los oocinetos presentan la actina difuminada en la superficie después de ser tratados. Además, los oocinetos no tratados no presentan tubulina expuesta a la superficie, mientras que los que fueron tratados sí, indicando que ocurrieron daños en la membrana (Hernández-Romano, et al., 2011).

La hemoglobina liberada por la lisis de los eritrocitos también podría generar un estrés oxidante en el oocineto, tal y como se observa en células neuronales corticales de rata, las cuales entran en apoptosis al ser cultivadas junto con hemoglobina (Wang, et al., 2002). La hemoglobina en solución y en proceso de degradación puede generar radicales libres de oxígeno y en especial al radical hidroxilo a través de la reacción de Fenton (Müller, 2004), lo que podría explicar por qué se encuentra una gran proporción, aunque variable, de oocinetos en muerte celular programada tanto *in vivo* como *in vitro* sin ningún estímulo aparente (Al-Olayan, et al., 2002; Arambage, et al., 2009) o después de ser tratados con especies reactivas de oxígeno y otras moléculas (Ali, et al., 2010; Matthews, et al., 2012).

Con base en estas observaciones sería recomendable que cualquier intento de desarrollar una metodología de purificación de oocinetos, redujera al mínimo todos estos factores estresantes y procurara mantener condiciones apropiadas no sólo para la supervivencia, sino también para los requerimientos metabólicos y el desarrollo del oocineto, el cual necesita un sustrato al cual adherirse, moverse y posiblemente recibir señales de supervivencia. (La muerte celular programada del oocineto, observada por Arambage et al. (2009) *in vitro* y sin ningún estímulo aparente, tal vez podría estar ocurriendo debido a que los oocinetos en estos experimentos se mantuvieron todo el tiempo en suspensión. El oocineto es una célula que depende de un sustrato para moverse y es capaz de reconocer los distintos tejidos del mosquito (Zieler y Dvorak, 2000); un oocineto en suspensión, probablemente no esté recibiendo ninguna de estas señales provenientes del sustrato y por lo tanto muriendo a través de un proceso similar a la anoikis, como ocurre en otros organismos multicelulares, en donde las células entran en muerte celular programada al desprenderse de la matrix extracelular (Gilmore, 2005)).

La motivación de implementar un método de purificación de oocinetos distinto al que utiliza cloruro de amonio e iohexol se debe principalmente a que, al investigar la relación entre la diferenciación celular del oocineto a ooquiste y el potencial reductor intracelular, se estaban observando inconsistencias y variaciones muy altas entre los experimentos, los cuales consistían en purificar a los oocinetos mediante el método de cloruro de amonio e iohexol, para posteriormente medir la cantidad de GSH y otros marcadores óxido-reductores durante la diferenciación del oocineto a ooquiste. La viabilidad de los oocinetos variaba hasta en un 40 % entre experimentos, lo que probablemente causaba a su vez variaciones enormes en la cantidad de GSH intracelular. Por lo cual se llegó a la conclusión de que el método que se estaba empleando es muy “agresivo” con los oocinetos y por lo tanto debían buscarse alternativas. El método publicado que parece ser el menos estresante es el de las columnas magnéticas ya sea con o sin anticuerpos reportados por Sidén-Kiamos et al. (2000) y Carter et al. (2003), respectivamente; sin embargo no se lograron implementar por falta de material. Debido a la situación, se planteó el objetivo primordial de desarrollar un método de purificación que evite utilizar sustancias y procedimientos físicos que puedan modificar la fisiología celular del oocineto de *Plasmodium berghei*. Inicialmente, se decidió tratar de purificar a los oocinetos solamente con colchones o gradientes de iohexol, evitándose el paso de la lisis con cloruro de amonio. Sin embargo, no se tuvo éxito (ver Apéndice I). Posteriormente, con base en las características biológicas del oocineto y los antecedentes presentados, se planteó la siguiente

pregunta de investigación. ¿Es factible establecer un método de purificación de oocinetos de *Plasmodium berghei* basado en sus propiedades adhesivas que sea eficiente, reproducible y que evite alteraciones estructurales y/o funcionales en el oocineto?

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Desarrollar un método de purificación de oocinetos de *Plasmodium berghei*, aprovechando sus propiedades adhesivas, que evite el uso de sustancias y procedimientos físicos que puedan alterar la fisiología del oocineto .

4.2. Objetivos particulares

- Determinar el sustrato de adhesión óptimo para la purificación.
- Determinar la influencia de las distintas variables involucradas en la purificación, así como los límites de operación del método.
- Determinar la viabilidad de los oocinetos purificados.
- Optimizar y simplificar el método.

5. Materiales y métodos

5.1. Valores, unidades de medida, y reactivos

Los valores y unidades de medida se reportaron siguiendo los lineamientos y recomendaciones del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, por sus siglas en inglés) (Thompson y Taylor, 2008).

Todos los reactivos utilizados fueron de Sigma a menos que se especifique lo contrario.

5.2. Crecimiento de las fases merogónicas en el ratón

Plasmodium berghei cepa Antwerpen-Katanga (ANKA) clon 2.34 y la variante que expresa constitutivamente la proteína verde fluorescente con resistencia a pirimetamina (Franke-Fayard, et al., 2004), fueron mantenidos en ratones BALB/c machos de 6 a 8 semanas de edad mediante pases por inoculaciones vía intraperitoneal (IP) de un stock criopreservado (sangre de ratón infectada y diluida 1:1 con una solución criopreservante conteniendo 28 % v/v de glicerol, 4.2 % p/v de sorbitol y NaCl a 111.22 mM) (Moll, 2013). Los parásitos se propagaron hasta el pase 8 y por no más de 15 días (d) en cada ratón para evitar que el parásito pierda la capacidad de formar gametocitos (Mons, et al., 1985). La parasitemia, o sea el porcentaje de los eritrocitos infectados, se monitoreó mediante extendidos de sangre finos teñidos con Giemsa al 30 % en agua por 10 min. Los pases se realizaron mediante la extracción de la sangre vía punción cardiaca (PC) con una jeringa heparinizada a una concentración final de 25 UI/ml de sangre de un ratón infectado previamente sacrificado en una cámara de CO₂.

5.3. Cultivo de oocinetos

Para realizar el cultivo de oocinetos, los ratones fueron tratados 2 d antes del inóculo de $(2 \text{ a } 4) \times 10^8$ parásitos/ml de sangre con 200 µl de fenilhidrazina a 6 mg/ml en solución salina isotónica vía IP para inducir reticulocitosis, y aumentar el rendimiento del cultivo (Rodríguez, et al., 2002). Tres días después y tras verificar que la parasitemia estuviese entre el 15 % y 25 % (número de eritrocitos infectados entre número de eritrocitos totales por 100), se verificó la viabilidad de los gametocitos diluyendo 2 µl de sangre infectada con 1 µl de heparina a 250 UI/ml y 7 µl de medio RPMI-Ooc (RPMI 1640 (Gibco) suplementado con bicarbonato de sodio a 23.81 mM, hipoxantina a 0.367 mM, glutamina a 2.05 mM (si el medio no la trae), un cóctel de penicilina-streptomycin-neomicina (PSN) a 1X y 20 % v/v de suero fetal bovino descomplementado por calor (SFBdc) a un pH final de 8.3), e incubando de (19 a 20) °C por 15 min, tiempo en el cual se activan los microgametocitos y es posible ver las rosetas de exflagelación en el microscopio. Una vez verificada la parasitemia y la exflagelación, se extrajo la sangre del ratón sacrificado en una cámara de CO₂ vía PC con una jeringa heparinizada y se cultivó de (19 a 20) °C por (20 a 24) h en medio RPMI-Ooc diluido 1 : 4 (sangre : RPMI-Ooc) para permitir la formación de los oocinetos (Rodríguez, et al., 2002; Carter, et al., 2003). En etapas tempranas de la investigación se utilizaron columnas de CF-11 con o sin fibra de vidrio para eliminar a los

leucocitos del cultivo. Sin embargo, se encontró que este paso estaba dificultando la realización del cultivo debido a que, probablemente, los gametocitos estaban siendo retenidos en la columna, disminuyendo drásticamente el rendimiento en la producción de oocinetos (ver Resultados y discusión). Pasadas las (20 a 24) h de cultivo, los oocinetos fueron contados en un hemocitómetro con una cuadrícula de Neubauer mejorada (<http://www.celeromics.com/en/resources/Technical%20Notes/cells-chamber-concentration.php>) para obtener el número de oocinetos inicial pre-purificación.

5.4. Crecimiento de células Sua5.1

Las células Sua5.1, donadas por el grupo de Fotis Kafatos (Imperial College London), son células extraídas de larvas de *Anopheles gambiae*. Las células fueron cultivadas siguiendo el protocolo de Mueller (2006). Brevemente, las células de un stock criopreservado en nitrógeno líquido fueron cultivadas en 5 ml de medio Schneider suplementado con 10 % de SFBdc y PSN 1X en frascos de cultivo de 25 cm² a 27 °C o temperatura ambiente (TA). El medio de cultivo se cambió cada tercer día, realizando previamente dos lavados con PBS.

5.5. Purificación de oocinetos utilizando diversos sustratos de adhesión

Se evaluaron distintos sustratos para probar la adhesión y purificación de los oocinetos mediante el recubrimiento de laminillas Lab-Tek de 4 y 8 pozos, cubreobjetos redondos de 13 mm de diámetro, cajas de Petri de 60 mm y 90 mm de diámetro, cajas de cultivo de 24 pozos, frascos de cultivo de 25 cm² y tubos de fondo cónico (Falcon) de 15 ml con gelatina al (0.1, 1, 5 y 10) %, col IV, laminina (ambas extraídas de células de sarcoma de Engelbreth-Holm-Swarm de ratón) o albúmina sérica de bovino (BSA) a 0.2 mg/ml en todos los casos. Las superficies recubiertas con estos sustratos se dejaron por toda la noche a 4 °C previamente a la purificación. También se probó realizar purificaciones sobre células Sua5.1 a confluencia, vivas o secas, sin fijar o fijadas con formaldehído al 1 % en PBS o metanol y lavadas con agua destilada; o recubriendo la superficie con un sustituto de matriz extracelular (ECM gel de Sigma o mejor conocido como Matrigel de BD, extraído de células de sarcoma de Engelbreth-Holm-Swarm de ratón) disminuido en factores de crecimiento y sin rojo fenol. El ECM gel se utilizó sin diluir o diluido 1/2, 1/5, 1/10 o 1/100 con medio MEM, medio RPMI-Ooc o con

ECM buffer, compuesto por Tris-base a 40 mM, NaCl a 30 mM y sacarosa al 4 % p/v a pH 8 (Mannuzza, et al., 2004). El ECM gel se utilizó fresco o seco. Para utilizarlo fresco, el ECM gel se dejó gelificar a 37 °C por 30 min y, después de remover el líquido que no se gelificó, se dejó reposar a temperatura ambiente (TA) por otros (15 a 20) min. Para utilizarlo seco, el ECM gel se dejó gelificar a 37 °C por (1 a 2) h y posteriormente se colocó 24 h a 27 °C para guardar a 4 °C hasta su utilización. Después de 4 meses el ECM gel seco siguió funcionando por lo que posiblemente pueda guardarse aún por más tiempo.

Una vez revestidas las distintas superficies, el cultivo de oocinetos fue colocado sobre los distintos sustratos e incubados por (30, 60, 90, 120 o 180) min a temperaturas de (19 a 20) °C, para después realizar (3, 6, 8 o 10) lavados con PBS a TA para eliminar a las células contaminantes que no se adhirieron, o adhirieron muy débilmente a los sustratos. El cultivo, además de oocinetos, contiene otras fases del parásito y células sanguíneas como eritrocitos, leucocitos y plaquetas (éstas dos últimas están presentes si no se utilizan columnas de CF-11) en medio RPMI-Ooc. En algunos experimentos, el cultivo de oocinetos sobre las superficies revestidas se agitó gentilmente cada (15 a 20) min.

Después de la purificación, se contó el número de oocinetos y de células contaminantes por campo a magnificaciones de 200X o 400X, utilizando objetivos de 20X y 40X respectivamente y con un ocular de 10X para determinar el rendimiento y pureza de la preparación final.

5.6. Recuperación y resuspensión de oocinetos del sustrato de adhesión

Una vez purificados, los oocinetos pueden utilizarse adheridos a la superficie o inmersos en el gel para seguirlos cultivando o para aplicarles tratamientos. Sin embargo, en muchas ocasiones, es preferible obtener a los oocinetos purificados en solución para diluirlos, concentrarlos o para introducirlos en un citómetro de flujo por ejemplo. Para esto, tienen que degradarse y desprenderse las proteínas que mantienen a los oocinetos adheridos a la superficie de cultivo/purificación. Esto se logró utilizando dispasa II, una endopeptidasa neutra dependiente de iones divalentes que fragmenta en el lado N-terminal de enlaces peptídicos de aminoácidos no polares. La enzima es más gentil que la tripsina y otras enzimas utilizadas para desprender células en el cultivo (Sinclair, et al., 2013).

La dispasa II (Gibco), se utilizó en un rango de (1 a 7.8) U/ml. La actividad proteolítica se verificó realizando reacciones de degradación del ECM gel de la siguiente manera: El ECM gel se diluyó a 0.75 µg/µl (concentración final en la reacción) con ECM buffer y se dejó gelificar a TA por 30 min. A los 60 µl de ECM gel se le agregaron 60 µl de dispasa II a (1, 2.4, 5 y 7.8) U/ml y se incubó la reacción a (20 o 37) °C por (0, 5, 10, 15, 20, 25 o 30) min para bloquear con 1.2 µl de EDTA a 500 mM (4 mM final) y guardar a -20 °C hasta su posterior análisis. Se probó la actividad proteolítica de la dispasa II a 20 °C debido a que los oocinetos no resisten la temperatura de 37 °C que el proveedor recomienda para realizar la digestión. Posteriormente, los productos de degradación se observaron mediante electroforesis de geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) y teñidos con Coomassie. Para esto, las muestras se diluyeron en buffer de Laemmli 5X con β-mercaptoetanol y se hirvieron por 5 min. La electroforesis se llevo a cabo en geles de poliacrilamida al 10 % con un gel concentrador al 5 % por 132 min a un voltaje constante de 120 V.

Una vez determinada la concentración de dispasa II adecuada, a los oocinetos ya purificados, se les agregó la dispasa II y se incubó por (15 a 25) min a 20 °C para degradar el ECM gel. Al término de la incubación, se agregó EDTA a una concentración final de 4 mM para bloquear a la dispasa II parcialmente (que presenta un ion de zinc en el sitio activo y cuatro iones de calcio que mantienen la estructura de la proteína y previenen la autólisis) (Alvarez, et al., 2006; Worthington Enzyme Manual) y evitar la formación de grumos de proteínas en la suspensión, ya que se observó que el ECM gel se pega a los oocinetos formando masas amorfas. Después, la solución de dispasa II con los oocinetos suspendidos se colocó en tubos de fondo cónico de 15 ml y la superficie de cultivo se lavó con PBS a 4 °C, colocando estos lavados en el mismo tubo. El PBS se utilizó a 4 °C porque a esta temperatura el ECM gel restante se licua. Una vez en el tubo de fondo cónico, el cultivo de oocinetos se centrifugó una sola vez a 720 g por 8 min a 4 °C y la pastilla se resuspendió con medio Schn-Ooq (medio Schneider suplementado con bicarbonato de sodio 23.8 a mM, hipoxantina a 3.68 mM, PSN 1X, ácido paraaminobenzóico (PABA) a 44 µM, 0.2 % de lípidos/colesterol y 15 % de SFBdc con un rango de pH de 6.8 a 7 (Al-Olayan, et al., 2002; Carter, et al., 2007)) o PBS para realizar el conteo de los oocinetos en un hemocitómetro de Neubauer.

5.7. Determinación de la viabilidad de los oocinetos

Para determinar la viabilidad de los oocinetos purificados mediante dispasa II y EDTA, se utilizó la doble tinción vital de bromuro de etidio/naranja de acridina (BrEt/NA) (Leite, et al., 1999; Liu, et al., 2015) (la solución stock 100X se preparó disolviendo BrEt a 126.81 mM y NA a 56.53 mM en 250 μ l de etanol al 95 % v/v y aforando a 11.25 ml con agua destilada, la solución de trabajo 10X se preparó disolviendo la solución previa en PBS). Esta solución tiñe las células dañadas de color naranja-rojo, mientras que las células íntegras se tiñen de color verde. Las células con estructura íntegra pero en proceso de apoptosis, presentan el núcleo visiblemente marcado de color verde, lo que indica que la cromatina está condensada (Arambage, et al., 2009). El cultivo de oocinetos purificados con ECM gel y resuspendidos mediante los tratamientos con dispasa II y EDTA se diluyó 1/10 con BrEt/NA 10X y los oocinetos se observaron en un microscopio de epifluorescencia Leica DM1000 con lámpara de mercurio y el filtro H3 (Ex.: 420 nm a 490 nm, espejo dicróico: 210 nm, Em.: 515 nm pase largo). Los oocinetos se consideraron inviables si se encontraban teñidos de naranja o si presentaban el núcleo visible.

5.8. Crianza de mosquitos *Anopheles albimanus*

La crianza de mosquitos se llevó a cabo siguiendo la metodología de Benedict (2014) y Foggie y Achee (2009) con adaptaciones y modificaciones. Los mosquitos *Anopheles albimanus* cepa Tapachula se mantuvieron en un insectario a una temperatura de (28 a 30) °C y a una humedad relativa del (70 a 80) %. Las fases larvarias se colocaron en palanganas de (30 x 55) cm, con agua corriente previamente reposada en el insectario con una profundidad de 2 cm y una densidad de \approx 200 larvas por palangana. Las larvas se alimentaron siguiendo el esquema de la tabla 1 y ajustando el agua a 2 cm de profundidad cada vez que fue necesario. Después de (9 o 10) d, las pupas fueron recolectadas diariamente con pipetas de transferencia de plástico y colocadas en botecitos de 7.5 cm de diámetro por 4 cm de alto con suficiente agua (aproximadamente a la mitad del botecito). Posteriormente se colocaron dentro de un bote para imagos de 30 cm de diámetro y 15 cm de alto, los cuales presentan una manga de tela de tul en la cara lateral para permitir la introducción y retiro de los botecitos de pupas y de ovoposición, así como de los mosquitos. Los mosquitos fueron manipulados con un tubo acoplado a un filtro y a una manguera con boquilla para aspirarlos mediante succión. El bote fue tapado con tela de tul para permitir la alimentación

con algodones empapados de agua azucarada al 8 % o alimentadores de sangre. Estos alimentadores son copas con dos compartimientos, el compartimiento interior recibe la sangre con la cual se alimentan los mosquitos a través de un pedazo de película de parafina y el compartimiento exterior permite el paso de agua a 37 °C, la cual fluye a través de un recirculador de agua. A los dos días post alimentación, se colocó un botecito con agua hasta la mitad y un papel filtro rodeando la circunferencia interna para que las hembras realicen la oviposición.

Tabla 1. Esquema de alimentación

| Día | <i>Cantidad de alimento (mg) ^a</i> |
|--------------|--|
| 0 | 1 |
| 1 | 4 |
| 2 | 15 |
| 3 | 15 |
| 4 | 15 |
| 5 | 30 |
| 6 | 35 |
| 7 | 61 |
| 8 | 61 |
| 9 | 75 |
| 10 | 70 |
| 11 | 35 |
| 12 | 15 |
| 13 | 10 |
| Total | 437 |

^a El alimento consiste en croquetas de gato molidas y autoclaveadas.

5.9. Alimentación de mosquitos con oocinetos purificados y verificación de la infección

Los mosquitos fueron alimentados siguiendo el protocolo descrito arriba con oocinetos sin purificar o con oocinetos purificados que expresan la proteína verde fluorescente. Los oocinetos se mezclaron con sangre de un ratón sano para igualar la concentración de oocinetos a (900 o 350) ooc/ μ l de sangre entre los tratamientos. Después de la alimentación, los mosquitos fueron colocados en una incubadora a temperaturas de (19 a 20) °C. Durante las primeras 12 h de incubación, los mosquitos se mantuvieron sin algodón humedecido con agua azucarada para permitir que los machos y las hembras que no se alimentaron murieran por deshidratación. Pasado este tiempo, y después de retirar a los cadáveres, los moscos se alimentan con agua azucarada al 8 % complementada con PABA al 0.5 %. Pasadas 12 h post alimentación se verificó la presencia de oocinetos en el bolo alimenticio disecando el intestino de 5 mosquitos en PBS previamente inmovilizados a 4 °C con la ayuda de un microscopio estereoscópico. Posteriormente a las 48 h y 72 h se verificó la presencia de ooquistes en el intestino medio de aproximadamente 30 mosquitos mediante microscopía de epifluorescencia en un microscopio Leica DM1000 con una lámpara de mercurio y el filtro Leica H3.

5.10. Manejo de datos, gráficas y análisis estadístico

Los datos experimentales se manejaron en hojas de cálculo de Gnumeric, realizando la estadística descriptiva, gráficas y el cálculo del tamaño del efecto en dicho programa. La estadística diferencial se llevó a cabo en Gnumeric y JMP versión 6.0.0. Las regresiones lineales se realizaron gráficamente en Gnumeric y numéricamente en Minitab versión 17. El análisis estadístico y la gráfica de la infección de mosquitos con oocinetos purificados se realizó en Prism versión 5.

Para todos los casos, la normalidad en la distribución de frecuencia absoluta de los datos se probó mediante una prueba de Shapiro-Wilk. En caso de no cumplirse, se buscó la mejor transformación de los mismos. Cuando el número de tratamientos en un experimento fue de $n_t = 2$, se llevó a cabo una prueba de T de Student. Para el caso de $n_t > 2$ se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba *post hoc* de Student-Newman-Kleus (SNK). En caso de no cumplirse la normalidad de los datos, a pesar de la transformación de los mismos, se realizó estadística no paramétrica. En específico, se realizó la prueba no paramétrica de

Kolmogórov-Smirnov para el análisis de la infección de los mosquitos con oocinetos purificados. El cálculo del poder estadístico y el tamaño de la muestra se realizó en las siguientes ligas electrónicas: <https://www.dssresearch.com/KnowledgeCenter/toolkitcalculators/statisticalpowercalculators.aspx> y http://www.statisticalsolutions.net/pss_calc.php.

Los análisis de regresión se realizaron buscando la curva de mejor ajuste a través de regresión lineal, permitiendo la inclusión de términos polinomiales o transformando logarítmicamente las variables x o y . La curva de mejor ajuste se eligió con base en la R^2 (favoreciendo los valores más altos), en el error estándar de la regresión (s) (favoreciendo los valores más bajos) y descartando las curvas ajustadas con sesgos sistemáticos y/o con gráficos residuales no aleatorios.

6. Resultados y discusión

6.1. Estandarización de algunos aspectos del cultivo de oocinetos

El cultivo de oocinetos no es un cultivo celular ordinario en el sentido de que los oocinetos no son células que se reproduzcan. En cambio, los oocinetos son células efímeras, especializadas en realizar una travesía complicada desde el bolo alimenticio hasta la membrana basal del epitelio intestinal y la lámina basal. Este proceso está sujeto a procesos temporales como la digestión y la maduración de la pared peritrófica, la cual, al madurar, impide el paso de los oocinetos (Angrisano, et al., 2012). Si el cultivo de oocinetos se deja incubando por más de 24 h, los oocinetos comienzan a morir o a diferenciarse en ooquistes, incluso en cultivos subóptimos para el desarrollo (Carter, et al., 2007). Por otra parte, la sangre proveniente de distintos ratones, a pesar de presentar parasitemias y gametocitemias (porcentaje de gametocitos sobre parásitos totales) similares, producen cantidades distintas de oocinetos en el cultivo (p. ej. ver (Janse, et al., 1985a). Por esta y otras razones que se mencionarán más adelante, se decidió revisar algunos aspectos del cultivo de oocinetos que se caracterizan por presentar una gran variación entre experimentos, con el fin de verificar y tratar de ajustar el comportamiento del parásito en cultivo.

En primer lugar, la extracción de la sangre para el cultivo de oocinetos se llevó a cabo únicamente en la fase logarítmica de crecimiento (figura 3), momento en el que hay un crecimiento uniforme de las fases merogónicas en el ratón, aunque el hematocrito, determinado por el número de eritrocitos por mililitro de sangre, ya comienza a disminuir debido a la anemia causada por la infección. Debido a esto

es recomendable extraer la sangre de ratones que alcanzaron dicha parasitemia en el menor tiempo posible, de lo contrario, aunque la parasitemia sea elevada, en realidad no hay muchos parásitos porque el hematocrito se encuentra disminuido. Como se muestra en la gráfica de la figura 3a, es posible alcanzar parasitemias entre el 8 % y 20 % en ratones que no fueron tratados con FH después de 3 d a 4 d, pero también después de 6 d a 8 d post el inóculo de sangre infectada, sin embargo, la tendencia en la parasitemia va en decremento para este momento, lo que además podría introducir variabilidad en el cultivo de oocinetos.

A pesar de que la progresión de la parasitemia (figura 3a), al igual que la gametocitemia y la exflagelación (después de tres días post el inóculo de los parásitos en ratones tratados con FH) (figura 4a) es uniforme al realizar inoculaciones con una cantidad de parásitos constante, existe una correlación débil entre estos parámetros al ser analizados individualmente en cada ratón (figura 4b y 4c). De manera que no es posible predecir de manera certera el número de oocinetos producidos en un cultivo de sangre de ratón infectada como se muestra en la figura 6b.

Por otra parte, la columna de CF-11 para eliminar a los leucocitos, fue el paso en el cultivo de oocinetos que más problemas generó durante este trabajo. Frecuentemente se observó que después de realizar la cromatografía en columnas de CF-11 con, o sin fibra de vidrio para eliminar a los leucocitos y las plaquetas, los microgametocitos exflagelaban muy poco o simplemente no exflagelaban en absoluto (prueba de T, $p < 0.001$, tamaño del efecto: g de Hedges = 1.058) provocando que en la mayoría de los casos no se encontrara ni un oocineto (tamaño del efecto: g de Hedges = 0.842) (figura 5). En consecuencia, se decidió eliminar la utilización de las columnas de CF-11 en este trabajo.

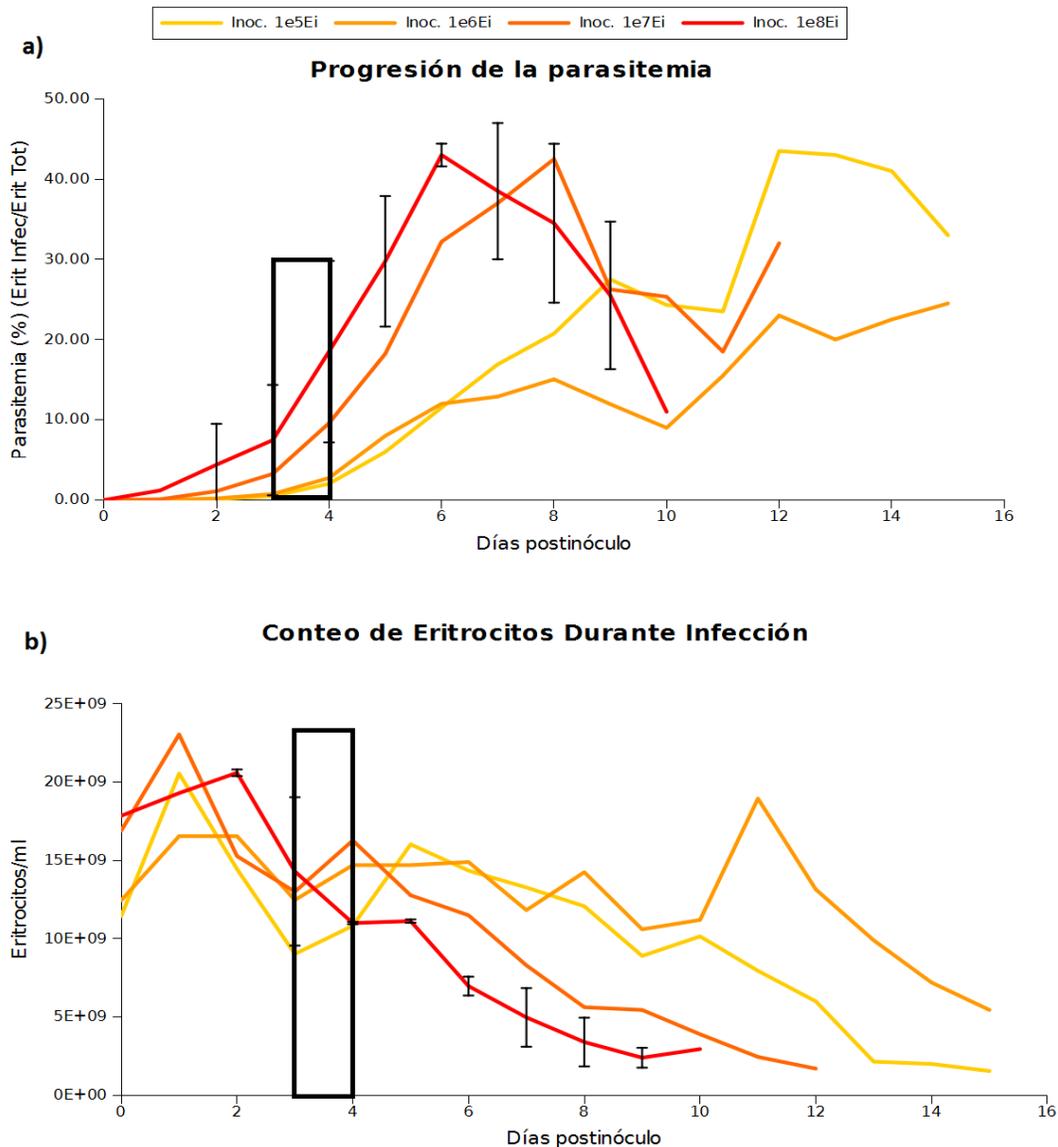


Figura 3. Transcurso de la infección de *Plasmodium berghei* en ratones. a) Progresión de la parasitemia de *P. berghei* en ratones BALB/c machos de 6 a 8 semanas de edad sin haber sido inoculados con FH y partiendo del inóculo de (1×10^5 (amarillo), 1×10^6 (naranja claro), 1×10^7 (naranja oscuro) o 1×10^8 (rojo)) parásitos/ml de sangre infectada (Ei) *vía* IP. Para el cultivo de oocinetos, la extracción de la sangre se realizó entre el tercer y cuarto día únicamente (área dentro del rectángulo) de ratones inoculados con (2 a 4) $\times 10^8$ parásitos/ml de sangre, concentración a la cual se alcanzan parasitemias entre el (15 y 25) % al tercer día post inóculo (datos no mostrados). b) Conteo de eritrocitos de los ratones infectados. Un día después del inóculo los eritrocitos incrementaron para después disminuir paulatinamente hasta que se realizó el sacrificio de los ratones, el cual se llevó a cabo cuando ya presentaban signos avanzados de la enfermedad y era evidente un comportamiento anómalo. Resultados de dos experimentos independientes. Por fines de claridad, sólo se muestran las barras de error (desviación estándar) de la curva de los ratones inoculados con 1×10^8 parásitos.

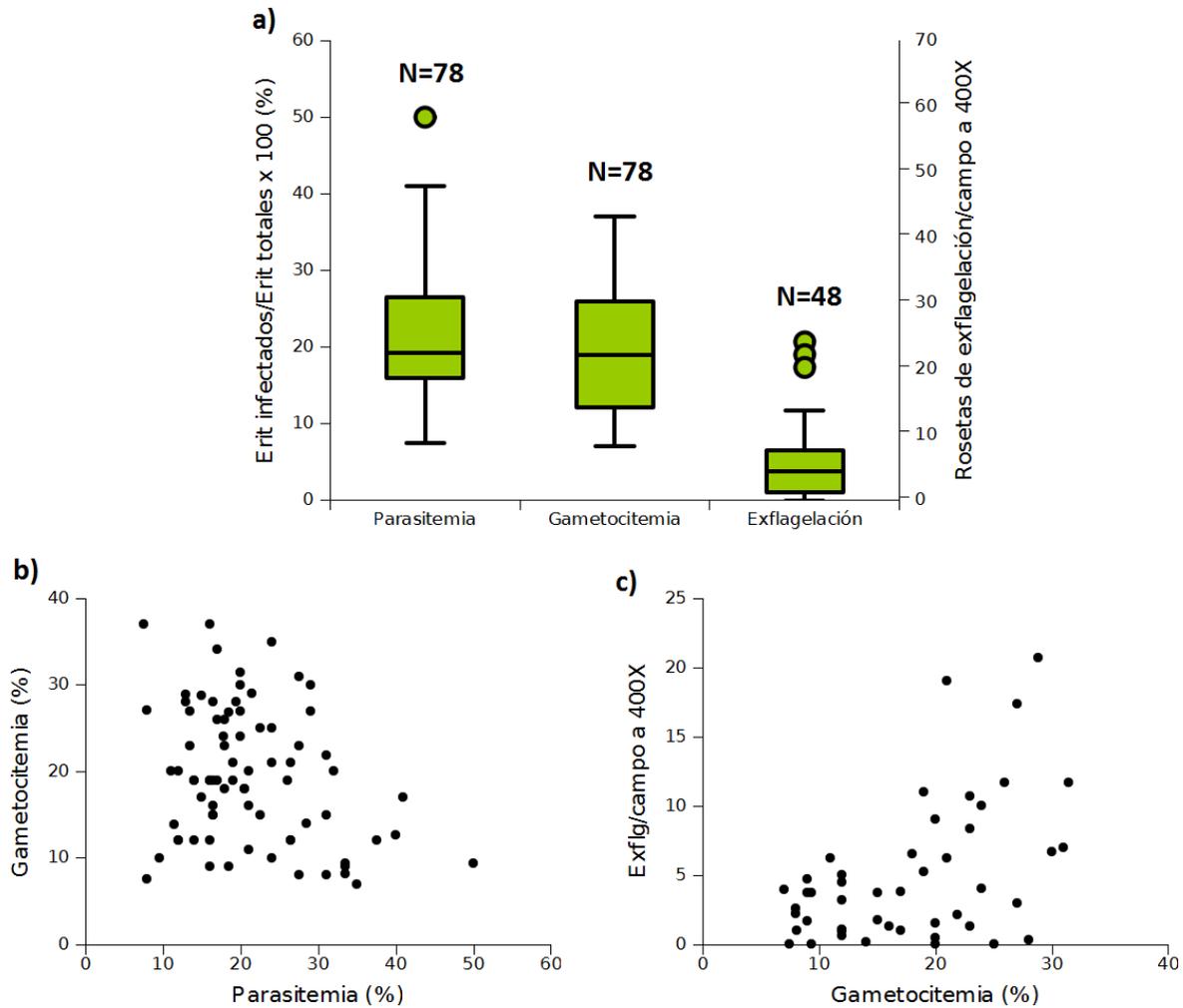


Figura 4. Correlación entre parasitemia, gametocitemia y exflagelación. a) Conteos de la parasitemia (%), gametocitemia (%) y rosetas de exflagelación por campo a 400X en ratones BALB/c machos de 6 a 8 semanas de edad tratados con FH e inoculados con $(1 \text{ a } 4) \times 10^8$ parásitos/ml. Los parámetros fueron tomados en todos los casos al tercer día post el inóculo de parásitos. A pesar de que en promedio se obtuvieron infecciones con parasitemias, gametocitemias y exflagelaciones consistentes (a), la correlación entre la parasitemia y la gametocitemia (b) fue baja y negativa, con un coeficiente de correlación de Pearson de -0.29 , mientras que la correlación entre la gametocitemia y la exflagelación es de 0.50 (c), lo que implica que no es posible predecir la gametocitemia y la exflagelación acertadamente a partir de la parasitemia y gametocitemia respectivamente al inocular un número aproximadamente constante de parásitos en los ratones. N = al número de ratones muestreados. En la gráfica de caja y bigotes en (a), la caja representa el rango intercuartil y la línea que divide a la caja en dos es el segundo cuartil o la mediana. Los bigotes representan el valor máximo y mínimo excluyendo a los posibles datos extremos que se representan mediante círculos.

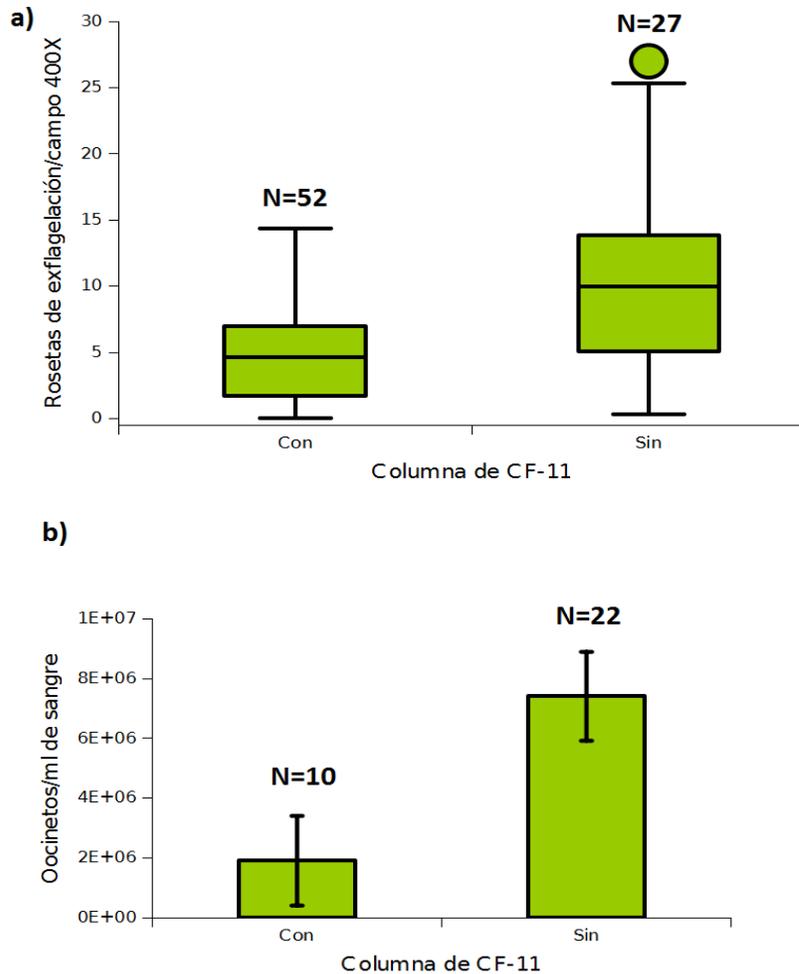


Figura 5. Disminución en el rendimiento del cultivo al utilizar columnas de CF-11 para eliminar a los leucocitos. Número de rosetas de exflagelación por campo de 400X después de pasar la sangre por columnas de CF-11 (a) y número de oocinetos por mililitro de sangre a las 24 h después de pasar la sangre por columnas de CF-11 (b). Tanto para el número de rosetas de exflagelación, como para el número de oocinetos, la cantidad encontrada en el cultivo fue menor cuando se utilizaban columnas de CF-11 (prueba de T, $p < 0.001$ en ambas gráficas). En la gráfica (b) el tratamiento con CF-11 tiene una moda de cero. N = al número de observaciones realizadas, cada una con la sangre de un ratón o con la sangre de dos ratones mezclada en un cultivo. En (a), la caja representa la región intercuartil y los bigotes representan el valor máximo y mínimo. Los posibles datos extremos se representan por círculos. En (b), las barras de error representan el error estándar, no se utilizó una gráfica de cajas y bigotes como en (a) porque abundan concentraciones de cero oocinetos/ml de sangre.

Con respecto a la concentración de heparina, utilizada para prevenir la coagulación de la sangre del ratón al momento de extracción y realización del cultivo de oocinetos, se encontraron inconsistencias en la literatura. Cada grupo de investigación la utiliza a concentraciones distintas para realizar el cultivo de

oocinetos (p. ej. ver Rodríguez, et al., 2002; Munderloh y Kurtti, 1987; Janse, et al., 1985). Una unidad internacional de heparina (UI) está definida como la cantidad de heparina necesaria para mantener un mililitro de sangre de gato en estado líquido durante 24 h (“*Heparin Unit Definition*” Drugs.com, 2015). Sin embargo, en la literatura se reporta el uso desde 100 UI/ml de sangre hasta 2 UI/ml de sangre. Templeton et al, (1998) reportan que la formación de rosetas de exflagelación, y la infectividad del parásito hacia el mosquito es inhibida por carbohidratos sulfatados (en este caso por el sulfato de dextrano) (Templeton, et al., 1998). Debido a que la heparina es un carbohidrato sulfatado, se consideró necesario determinar la concentración mínima de heparina necesaria para realizar cultivos de oocinetos satisfactoriamente, los cuales distaban de ser constantes. Para esto, se evaluó la concentración de heparina necesaria para mantener fluida la sangre en el cultivo de oocinetos de *P. berghei* sin afectar la exflagelación y producción de oocinetos utilizando (0.2, 1, 5 y 10) UI de heparina/ml de sangre (figura 6a). Brevemente, 4 µl de sangre extraída de la punta de la cola de un ratón infectado se mezclaron con 2 µl de heparina a las distintas concentraciones previamente mencionadas y se dejó incubar 15 min en 14 µl de medio RPMI-Ooc en tubos Eppendorf de 0.6 ml a (19 a 20) °C para contar la cantidad de rosetas de exflagelación por campo a 400X. Posteriormente se incubaron los cultivos por 24 h para realizar el conteo de oocinetos en la cámara de Neubauer mejorada.

Se encontró una relación negativa entre la concentración de heparina y la cantidad de rosetas de exflagelación por campo a 400X, disminuyendo 1.3 veces la cantidad de rosetas de exflagelación por campo entre 1 UI/ml y 5 UI/ml y 2.7 veces entre 1 UI/ml y 10 UI/ml. Sin embargo, al analizar la concentración de oocinetos con respecto a la concentración de heparina, se observó lo contrario: a mayor concentración de heparina, mayor fue la producción de oocinetos *in vitro*, aumentando linealmente de 1.65×10^6 oocinetos/µl de sangre con una concentración de heparina de 0.2 UI/ml a 3.6×10^6 oocinetos/µl de sangre con una concentración de heparina de 10 UI/ml. Esto puede deberse a errores en el conteo de oocinetos ya que, aunque la sangre no se coaguló al momento de contar las rosetas de exflagelación 15 min post extracción, después de 24 h de cultivo, se encontraron coágulos de sangre bastante grandes que no se pudieron disgregar por debajo de 1 UI/ml de heparina, en los cuales posiblemente se encontraban oocinetos que fueron imposibles de contar.

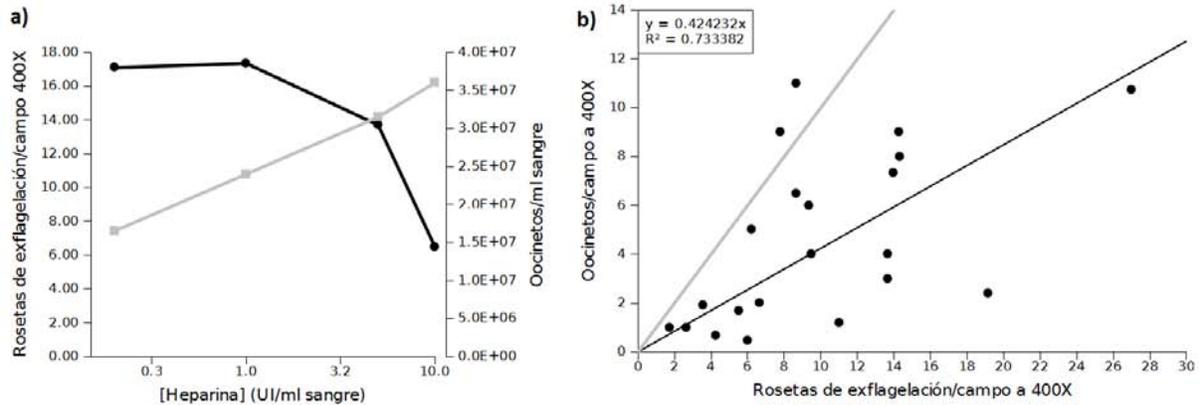


Figura 6. Efecto de la heparina en la exflagelación y la producción de oocinetos. a) Rosetas de exflagelación por campo a 400X (negro) y oocinetos/ml de sangre (gris) en cultivos realizados con distintas concentraciones de heparina para evitar el coágulo de la sangre durante la extracción. Por debajo de 1 UI/ml de sangre, la heparina no evitó el coágulo de la sangre del ratón, razón por la cual es posible que no se haya realizado satisfactoriamente el conteo de oocinetos por debajo de dichas concentraciones. Por arriba de 1 UI/ml de sangre, la cantidad de rosetas de exflagelación disminuyó. b) Correlación entre el número de rosetas de exflagelación y oocinetos por campo a 400X en cultivos realizados con 2.5 UI/ml de sangre y sin utilizar columnas de CF-11. La línea negra representa la regresión lineal no afín a la ordenada al origen de las dos variables ($R^2 = 0.43$) las cuales presentan un coeficiente de correlación de Pearson del 0.66. La línea gris representa una relación 1:1 entre las rosetas de exflagelación y el número de oocinetos. Cada punto en la gráfica (b) representa un cultivo independiente realizado con un sólo ratón.

En experimentos subsecuentes se encontró que 2.5 UI de heparina por ml de sangre es la concentración mínima a la cual no se formaban coágulos en el cultivo, presentando en promedio (9.6 ± 6.5) rosetas de exflagelación por campo a 400X y (4.3 ± 6.5) oocinetos por campo a 400X pasadas 24 h de cultivo; por lo tanto, ésta fue la concentración de heparina utilizada. No obstante, y como era de esperarse, la correlación entre el número de rosetas de exflagelación y la cantidad de oocinetos producidos en el cultivo fue relativamente baja (figura 6b) implicando que existió un cierto grado de incertidumbre en cuanto al número esperado de oocinetos en un cultivo.

6.2. Purificación de oocinetos utilizando un sustrato de adhesión/invasión

6.2.1 Prueba de concepto

Con el fin de probar que la metodología propuesta es factible para realizar purificaciones de oocinetos partiendo de un cultivo en el cual están presentes (por más de tres órdenes de magnitud) otros tipos celulares como eritrocitos y otras fases del parásito, se procedió a recubrir laminillas Lab-Tek de 4 pozos con un gel delgado de ECM gel colocando 100 μ l de ECM gel (7.37 mg/ml) por pozo (55.6 μ l/cm²) para después colocar 800 μ l del cultivo con 1.22×10^6 oocinetos por pozo e incubar por (30, 60, 90 y 120) min a (19 a 20) °C. Se observó que la recuperación de oocinetos presenta una relación positiva con respecto al tiempo de incubación, mientras que las células contaminantes permanecen constantes (figura 7a). En un segundo experimento bajo las mismas condiciones pero incubando solamente por 120 min y contando los oocinetos adheridos después de (3, 6, 8 o 10) lavados, se observó que después de 10 lavados con PBS se eliminaron el 99.3 % de las células contaminantes y sólo se perdió el 18.8 % de los oocinetos al décimo lavado con respecto al tercer lavado, sin embargo, debido a la gran cantidad de células contaminantes, sólo se alcanzó una purificación de oocinetos del 50 % (figura 7c). Al observar las laminillas al microscopio, se encontró que los oocinetos estaban tanto en la superficie, como dentro del ECM gel, sugiriendo que los oocinetos lograron no sólo adherirse, sino también invadir al sustituto de matriz extracelular. En estos experimentos se utilizó el ECM gel sin diluir para formar geles delgados, pero en experimentos subsecuentes el ECM gel se diluyó 1/2, 1/5, 1/10 e incluso 1/100 para solamente recubrir la superficie sin la formación de un gel propiamente dicho. Esto posiblemente ocasione que una mayor cantidad de oocinetos se pierda durante los lavados debido a que ya no están dentro del gel sino solamente adheridos a la superficie, quedando expuestos a las corrientes que se generan durante el retiro y colocación del PBS para lavar a los eritrocitos. Esto implicaría que la pendiente de la gráfica de la figura 7c para los oocinetos se vuelva más negativa, aunque esto no se cuantificó.

A los 120 min de incubación se lograron recuperar el 1.32 % de los oocinetos de partida. Una proyección lineal de la recuperación de oocinetos con respecto al tiempo (asumiendo que el 100 % de los oocinetos son capaces de adherirse) indica que se necesitan aproximadamente 10 mil minutos para aproximarse al 100 % de recuperación. En este experimento nunca se alcanzó una saturación. Además, solamente se lograron purificaciones del 50 % después de 120 min de incubación y después de 10 lavados con PBS. Por esta razón, se procedió a

realizar modificaciones de la metodología para tratar de mejorar el rendimiento y pureza de los oocinetos.

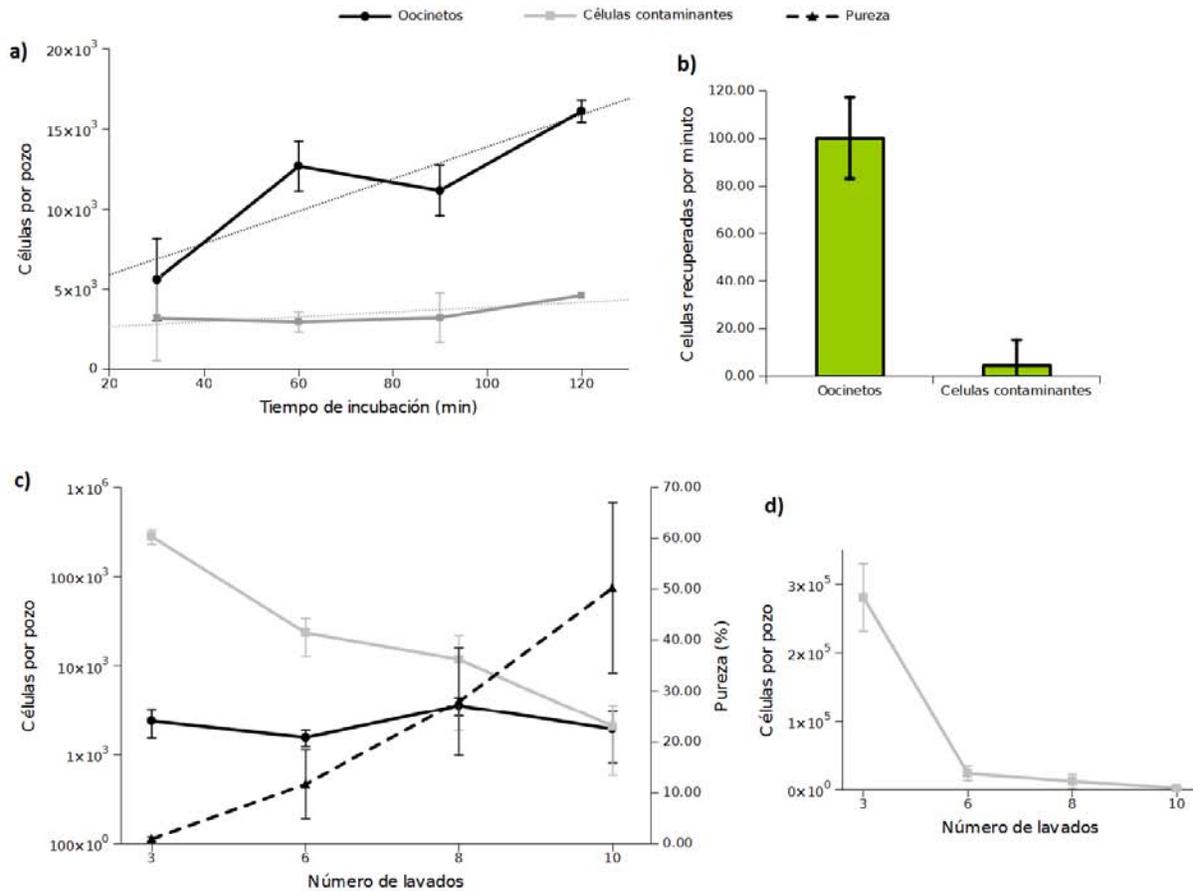


Figura 7. Purificación de oocinetos mediante ECM gel, tiempo de incubación y número de lavados. **a)** La recuperación de oocinetos presentó una relación positiva con respecto al tiempo (pendiente de la recta $\neq 0$, prueba de T, $p = 0.0098$) mientras que las células contaminantes permanecieron constantes después de realizar 10 lavados con PBS (pendiente de la recta = 0, prueba de T, $p = 0.3503$). De manera similar, la proporción de oocinetos sobre células contaminantes fue dependiente del tiempo ($X^2 = 1461.28$, $p < 0.0001$). **b)** Gráfica de las pendientes del inciso (a). En promedio se recuperaron 100 oocinetos por minuto de incubación y únicamente 4.6 células contaminantes son retenidas en el mismo tiempo. **c)** Después de incubar el cultivo de oocinetos sobre ECM gel por 120 min, se cuantificó el número de células por pozo después de (3, 6, 8 o 10) lavados con PBS, encontrándose que la cantidad de oocinetos permaneció constante con respecto al número de lavados (en cada lavado se eliminaron aproximadamente 114 oocinetos) (pendiente de la recta = 0, prueba de T, $p = 0.104$) mientras que el número de células contaminantes va disminuyendo, encontrándose una dependencia entre la relación de células contaminantes sobre oocinetos con respecto al número de lavados (prueba de independencia, $X^2 = 163.336$, $p < 0.0001$). Nótese la escala logarítmica del eje y. **d)**

Gráfica mostrando la curva de las células contaminantes del inciso (c) pero en escala lineal. La eliminación de las células contaminantes presentó un comportamiento de decaimiento exponencial ($R^2 = 0.98$); en los primeros lavados se eliminó la mayoría de las células contaminantes y después del lavado 6 la eliminación resultó cada vez menor. Resultados de dos experimentos independientes para cada experimento (a-b y c-d) con dos réplicas experimentales cada uno. El número de células por pozo se calculó contando el número de células por campo a magnificaciones de 200X o 400X (10 campos por pozo) y multiplicando por el número de campos que ocupa un pozo (153 campos cuadrados por pozo a 200X y 592 campos cuadrados por pozo a 400X). En (a), (c) y (d), las barras de error representan la desviación estándar. En (b), las barras de error representan el error estándar.

6.2.2. Extracción y resuspensión de los oocinetos adheridos o embebidos en el ECM gel

Una vez realizada la prueba de concepto y antes de tratar de perfeccionar la metodología, fue pertinente encontrar un método que permitiera la extracción de los oocinetos del ECM gel. Tener a los oocinetos pegados a un sustrato puede ser conveniente para cultivarlos, aplicarles tratamientos, observarlos en un microscopio, tal vez utilizando fluoróforos o inmunofluorescencia; o tal vez solamente sean de interés algunos factores solubles en el medio de cultivo producidos por los oocinetos. Pero, en muchos otros casos quizá sea más conveniente tener a los oocinetos en suspensión, por ejemplo, para infectar mosquitos o para introducirlos en un citómetro de flujo.

El ECM gel puede degradarse por proteasas como la tripsina o la colagenasa, pero también por la dispasa II, la cual es menos agresiva que la tripsina (Sinclair, et al., 2013) lo que resulta conveniente para este método de purificación. No obstante, el ECM gel, que gelifica por arriba de 20 °C en minutos, puede licuarse a 4 °C en un lapso de 12 h a 24 h. En primera instancia se trató de resuspender a los oocinetos colocándolos a 4 °C y pipeteando con PBS frío para tratar de disgregar el gel, o centrifugando tubos de fondo cónico recubiertos con ECM gel (ver más abajo) a 4 °C con el raciocinio de que la tensión mecánica generada por la centrifugación o los pipeteos disgregarán el gel y liberará a los oocinetos. Aunque fue posible desprender el gel con los oocinetos de la superficie, se encontró que los oocinetos quedaban embebidos por grumos muy grandes de gel a pesar de estar a 4 °C. Debido a esto, se estandarizó la resuspensión de los oocinetos utilizando dispasa II.

Para optimizar el uso de la dispasa II, se realizaron reacciones de degradación del ECM gel (0.75 mg/ml) con un rango de (1 a 7.8) U/ml de dispasa II a 37 °C, como indica el proveedor, y a 20 °C (los oocinetos no soportan los 37 °C). Aunque la dispasa II degradó al ECM gel a concentraciones desde 1 U/ml a 20 °C y por 30 min de incubación, se decidió utilizarla para experimentos posteriores a 2.4 U/ml, concentración a la cual se forman más productos de degradación (figura 8) y el gel pierde suficiente resistencia mecánica como para desprenderse de la superficie y poder ser pipeteado. Posteriormente se buscó el tiempo mínimo de incubación con 2.4 U/ml de dispasa II a 20 °C para disgregar el ECM gel. El ECM gel fue degradado parcialmente desde los 0 min, pero a partir de 20 min de incubación, el análisis del gel de poliacrilamida mediante densitometría indicó la aparición de más productos de degradación, por lo que se utilizó a esta concentración y por este tiempo de incubación en experimentos posteriores (figura 8).

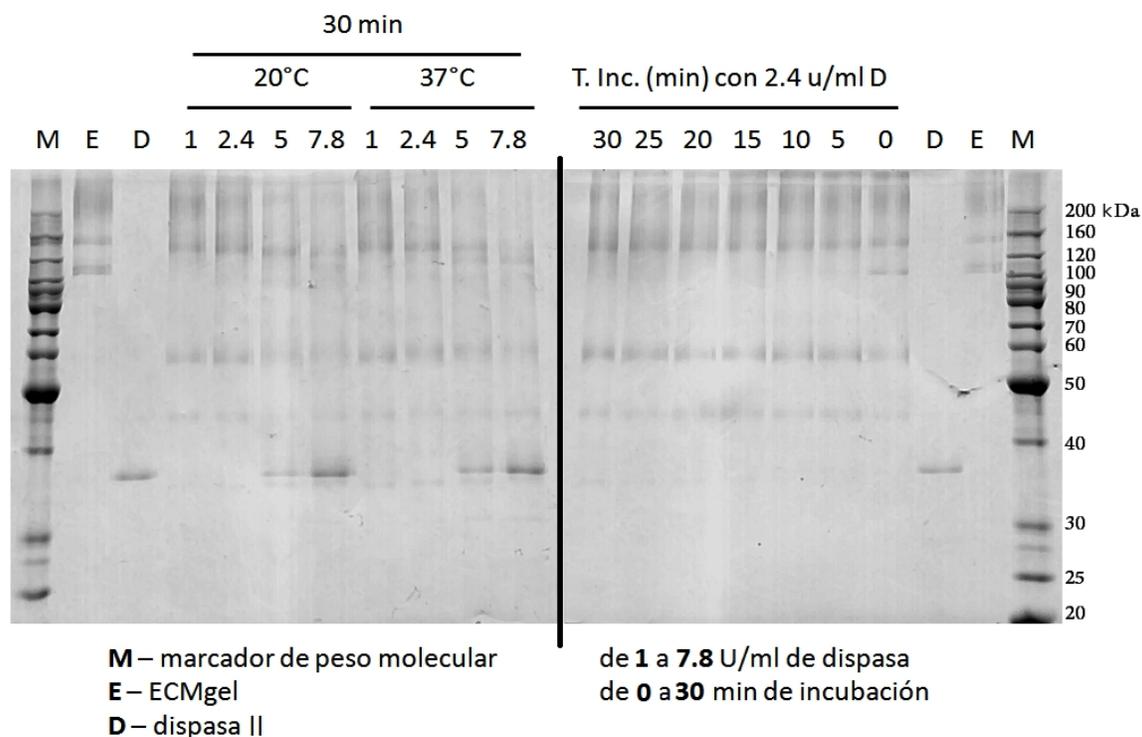


Figura 8. Análisis de degradación del ECM gel por la dispasa II. En el gel de poliacrilamida de la izquierda se observa que la dispasa II degradó al ECM gel (0.75 mg/ml) a partir de 1 U/ml a 20 °C. A 7.8 U/ml, tanto a 20 °C como a 37 °C, casi todas las proteínas del ECM gel se degradaron. El gel de poliacrilamida de la derecha se realizó con 2.4 U/ml de dispasa II a 20 °C por distintos tiempos de incubación. Aunque se observaron productos de degradación del ECM gel incluso a los 0 min de incubación (en segundos, desde que se colocó la dispasa II sobre el ECM gel y se bloqueó la reacción parcialmente con EDTA y congelación) se decidió utilizarla

realizando incubaciones de (15 a 25) min, momento en el cual es fácil desprender al ECM gel de la superficie. Resultado representativo de tres experimentos independientes.

Aún utilizando dispasa II, frecuentemente los oocinetos se encontraban recubiertos por masas amorfas de ECM gel, las cuales se disgregaban al agregar EDTA a una concentración final de 4 mM. El EDTA en este escenario presenta dos funciones: la primera es disgregar los cúmulos de ECM gel que rodean al oocineto y la segunda es inactivar a la dispasa II. Al quelar los iones divalentes con EDTA, los componentes del ECM gel pierden cohesividad y la dispasa II se inactiva al quedar desprovista del ión Zn^{2+} en su sitio activo y de los iones Ca^{2+} que mantienen su estructura terciaria y previenen la autólisis. Es probable que los cúmulos de oocinetos con ECM gel observados al tratar de licuar el gel a 4 °C pudiesen haberse disgregado solamente con EDTA, sin embargo esto no se probó.

Gran parte del interés en desarrollar una nueva metodología de purificación de oocinetos es lograrlo sin utilizar agentes que puedan resultar estresantes para el oocineto, por esta razón utilizar dispasa II y EDTA se manejó con precaución. Una vez encontradas las concentraciones mínimas de dispasa II y EDTA, así como el tiempo de incubación mínimo, se procedió a verificar la viabilidad de los oocinetos después de realizar estos tratamientos y después de una centrifugación a 720 g por 8 min y a 4 °C para eliminar tanto a la dispasa II como al EDTA. Para ésto, oocinetos purificados y tratados con dispasa II y EDTA se mezclaron con una tinción vital de bromuro de etidio y naranja de acridina que permite detectar oocinetos con membranas dañadas (teñidos de rojo-naranja por el bromuro de etidio), oocinetos con la cromatina condensada (núcleos visibles y teñidos de verde por el naranja de acridina) u oocinetos viables (teñidos de verde y sin el núcleo visible). Como se muestra en la figura 9, no se encontraron diferencias en la viabilidad en los oocinetos tratados con dispasa II y EDTA (viabilidad del $85.42 \% \pm 7.44 \%$ (media \pm ee) en el control sin dispasa II y EDTA contra $82.53 \% \pm 12.99 \%$ (media \pm ee) en el tratamiento con dispasa II y EDTA; prueba de T, $p = 0.715$). El tamaño del efecto es relativamente bajo (Δ de Glass = 0.39), existiendo una muy baja posibilidad (1.24 : 1) de encontrar un oocineto muerto después del tratamiento con dispasa II y EDTA con respecto al control.

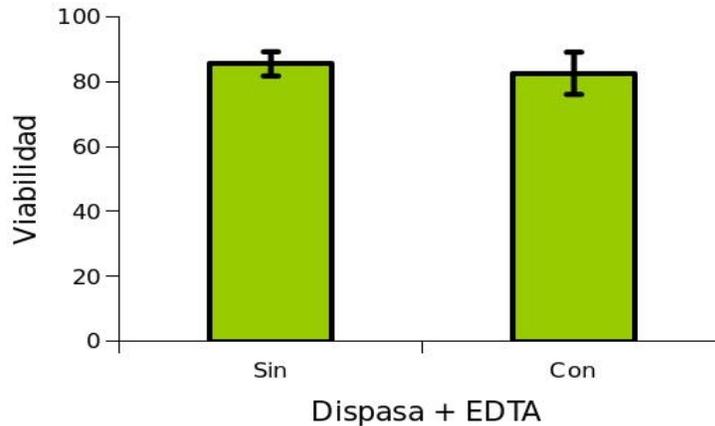


Figura 9. Viabilidad de los oocinetos purificados teñidos con la doble tinción vital de bromuro de etidio y naranja de acridina. Los oocinetos una vez purificados se trataron con 2.4 U/ml de dispassa II a 20 °C por 20 min y con 4 mM de EDTA para después centrifugar a 720 g por 5 min a 4 °C. Los oocinetos testigo fueron purificados pero no se trataron con dispassa II, EDTA ni se centrifugaron. Los oocinetos se consideraron inviables si se encontraban teñidos de rojo (permeabilidad de la membrana) o si presentaban la cromatina condensada (en muerte celular programada). Resultados de cuatro experimentos independientes con la sangre de un ratón cada uno. Las barras de error representan el error estándar.

6.2.3. Distintos sustratos de adhesión y concentración del ECM gel

Después de la purificación de oocinetos en laminillas Lab-Tek, y como se verá más abajo, concluimos que para mejorar el rendimiento de la purificación era necesario aumentar la superficie a la cual los oocinetos pudieran adherirse. El principal impedimento para aumentar la superficie fue la cantidad de ECM gel que se necesita para recubrirlo, a menos de que sea posible diluirlo, o en su defecto, utilizar otros sustratos de adhesión, la metodología resulta inútil a gran escala. Por ésto resultó importante probar distintos sustratos de adhesión, así como distintas diluciones del ECM gel.

Primero se probó realizar purificaciones con células Sua5.1 adheridas en cajas de 24 pozos y colocando el cultivo de oocinetos sobre éstas para permitir que se adhirieran o incluso las invadieran. Se encontró que las células Sua5.1 se desprendían, y después de 5 o 6 lavados ya no quedaba nada en el pozo. Para evitar ésto, las células Sua5.1 fueron fijadas con metanol o con formaldehído al 1 % en PBS y lavadas con agua destilada para dejarlas secar y después colocar el cultivo de oocinetos. A pesar de que con estos tratamientos ya no se desprendieron las células después de varios lavados, tampoco se encontraron

oocinetos adheridos, descartando la posibilidad de utilizar estas células para la purificación.

Además de las células Sua5.1 se probaron revestimientos de laminillas Lab-Tek con gelatina, col IV, laminina, una mezcla de col IV y laminina y ECM gel, e incubando el cultivo de oocinetos por 2 h. Entre los lavados con PBS para eliminar a las células contaminantes se monitoreaba la pureza del cultivo, encontrándose que antes de poder eliminar a la mayoría de los eritrocitos, los oocinetos ya se habían eliminado también en todos los pozos recubiertos con gelatina, col IV y laminina (figura 10a), mientras que en los pozos recubiertos con ECM gel, aún había oocinetos (figura 10b). Es importante mencionar que las laminillas Lab-Tek tienen pozos con una superficie pequeña con relación a la altura, lo que ocasiona que las células se asienten unas sobre otras en el fondo del pozo formando una capa celular gruesa en la cual los oocinetos permanecen rodeados por eritrocitos. En estas condiciones los oocinetos tienen poca probabilidad de encontrar la superficie para adherirse. Se razonó que utilizando superficies más grandes y alturas más pequeñas, la capa celular que se forma después de aproximadamente 15 min sería más delgada; por ende los oocinetos estarían, en promedio, más cerca de la superficie de adhesión a comparación con pozos con una superficie pequeña y mucha altura. Debido a esto, se repitió el experimento pero ahora utilizando cajas Petri de 60 mm de diámetro (28.27 cm^2) y 15 mm de alto.

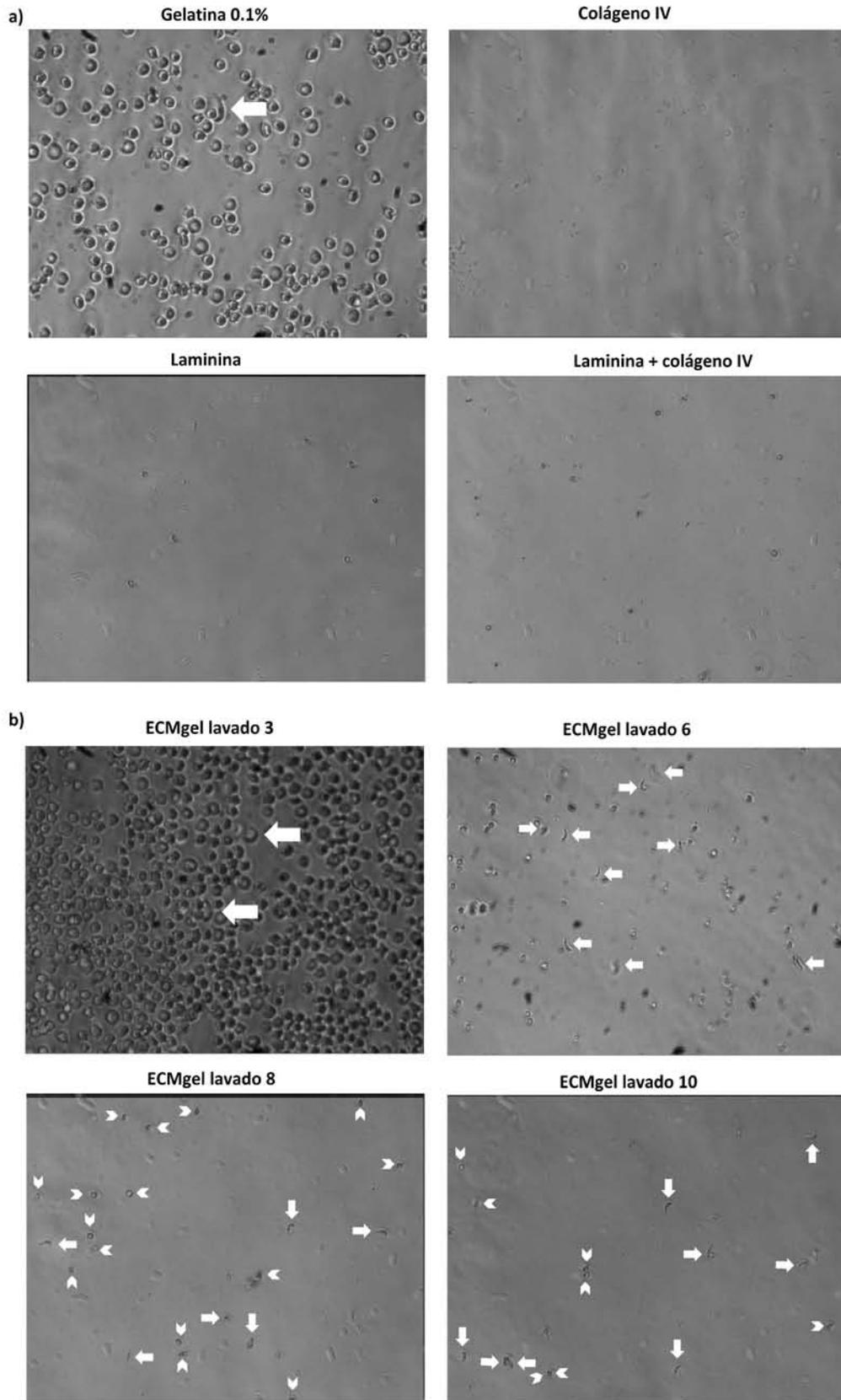


Figura 10 (pie de figura en siguiente página).

Figura 10 (página anterior). Imágenes representativas de purificaciones realizadas con distintos sustratos. Los oocinetos fueron incubados por 2 h en laminillas Lab-Tek de 4 pozos. **a)** La imagen de la purificación con gelatina se tomó al tercer lavado y a una magnificación de 400X, el resto se tomaron a los 10 lavados y a una magnificación de 200X. Después de 10 lavados no se encontraron oocinetos en ningún pozo recubierto con estas proteínas. **b)** Imágenes representativas de una purificación realizada con un gel delgado de ECM gel sin diluir. La primera imagen se tomó a una magnificación de 400X y el resto a 200X. Las flechas apuntan a oocinetos y las cabezas de flechas apuntan a eritrocitos cuando se consideró pertinente colocarlas. A los 6 lavados se encuentran 9 oocinetos y bastantes eritrocitos, a los 8 lavados se encuentran 6 oocinetos y 15 eritrocitos, a los 10 lavados se encuentran 8 oocinetos y 7 eritrocitos.

Adicionalmente a los sustratos ya mencionados, se incluyó BSA y cajas sin ningún sustrato como testigos, además de distintas diluciones del ECM gel. La ficha técnica del ECM gel menciona que debe diluirse con medio MEM y que es posible diluirlo hasta 3 veces sin perder la capacidad de formar geles. Por debajo de esta dilución, en cambio, sólo se logran recubrimientos de la superficie. Aparte del medio MEM se probó medio RPMI-Ooc y ECM buffer por conveniencia de utilizar el mismo medio de cultivo en el cual están los oocinetos, para el caso del RPMI-Ooc o para dejar secar el ECM gel diluido con ECM buffer y tener la posibilidad de utilizar cajas recubiertas con varias semanas o meses de antelación. Al observar las cajas recubiertas con ECM gel diluido con los distintos medios utilizando un microscopio invertido de contraste de fases, se encontró que con medio MEM la apariencia del gel era uniforme, mientras que con RPMI-Ooc y con ECM buffer, el ECM gel presentaba una apariencia grumosa. Al dejar secar las cajas, el ECM gel diluido con ECM buffer formó una película más uniforme en contraste con el ECM gel diluido con MEM y con RPMI-Ooc, los cuales presentaron muchos cristales, además de que aparentemente el grosor de la película disminuía radialmente. Una vez rehidratado el ECM gel con RPMI-Ooc (simulando al cultivo de oocinetos), los geles volvieron a su apariencia normal con excepción del ECM gel que fue diluido con RPMI-Ooc, el cual presentaba todavía cristales (figura 11d).

Diluyentes

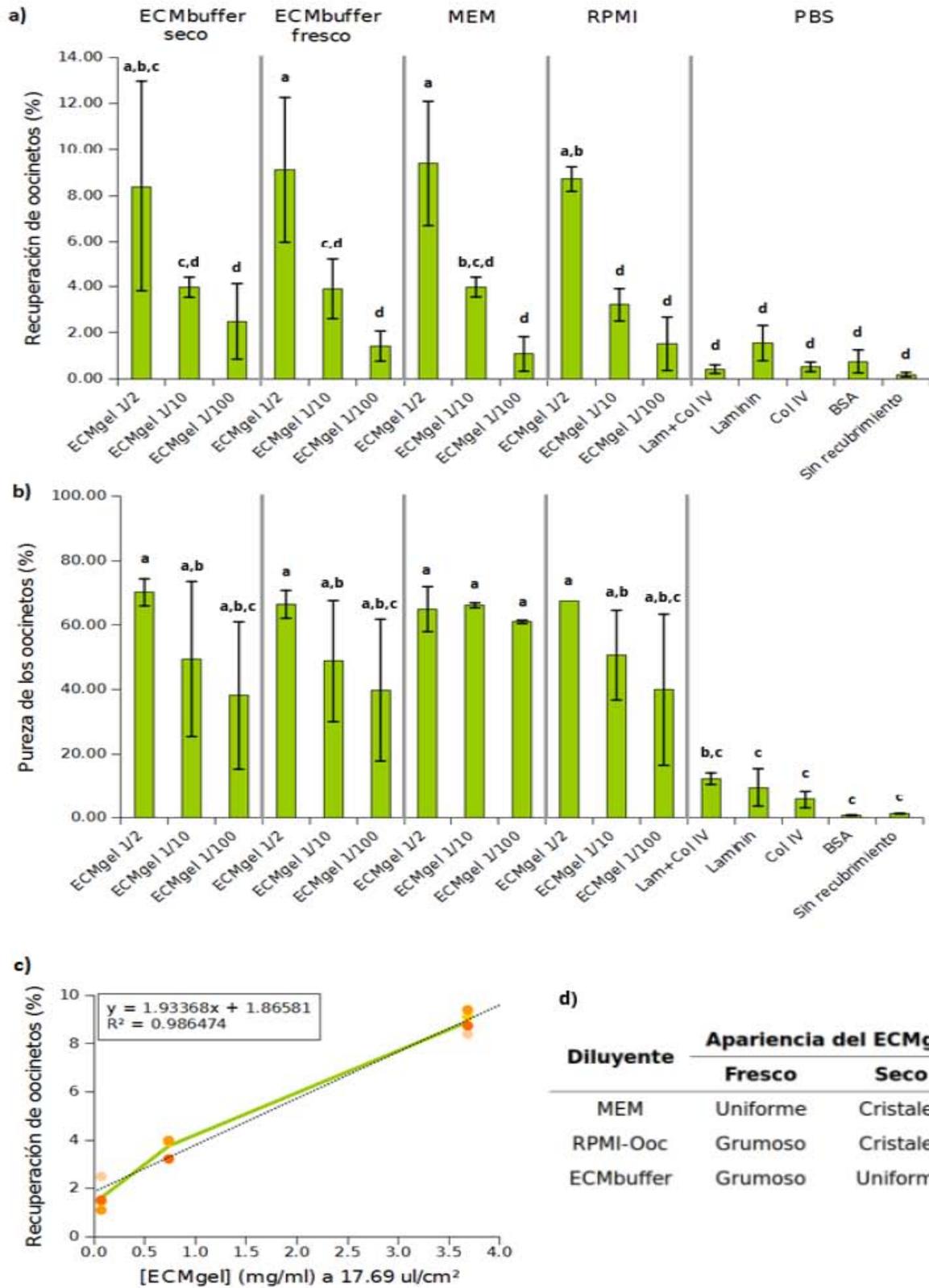


Figura 11 (pie de figura en página siguiente).

Figura 11 (figura en página anterior). Purificación de oocinetos con distintos sustratos y con distintas concentraciones de ECM gel en varios diluyentes. a) Porcentaje de recuperación de oocinetos con distintos diluyentes y concentraciones de ECM gel. Las barras con letras distintas son significativamente distintas (ANOVA, $p < 0.01$, prueba *post hoc* de SNK comparando las medias de todas las combinaciones posibles, tamaño del efecto $\eta^2 = 0.724$). b) Pureza de los oocinetos utilizando distintas concentraciones de ECM gel en varios diluyentes. Existió una tendencia, aunque no significativa de que mientras más diluido el ECM gel, la pureza es menor. En los tratamientos con col IV, laminina, BSA y en el control negativo, la pureza fue significativamente aún menor (ANOVA, $p < 0.05$, prueba *post hoc* de SNK, tamaño del efecto: $\eta^2 = 0.621$). Esto se debe a que hay menos oocinetos en las cajas post purificación pero los eritrocitos se mantienen relativamente constantes ($4 \times 10^3 \pm 6 \times 10^2$ erit.). c) Los valores para cada diluyente y dilución del ECM gel del inciso (a) se graficaron para obtener la relación entre el porcentaje de recuperación y la concentración del ECM gel, independientemente del diluyente con el cual se diluyó el ECM gel. d) Diferencias entre la formación de geles utilizando distintos diluyentes. La recuperación y pureza de los oocinetos es similar entre los distintos diluyentes a pesar de la formación de grumos. Los geles diluidos con MEM y RPMI-Ooc y secos no se utilizaron posteriormente debido a que los cristales permanecían incluso después de rehidratar los geles. Resultados de tres experimentos independientes con la sangre de un ratón para cada experimento y partiendo de un número inicial de 9.58×10^4 oocinetos por tratamiento. Las barras de error representan el error estándar. En (c) los puntos indican los valores obtenidos para cada diluyente y dilución, la línea verde es la línea promedio de las cuatro soluciones y la línea punteada es la regresión lineal de la curva.

Con estas cajas recubiertas (salvo en las que el ECM gel diluido con MEM y RPMI-Ooc se dejó secar) se realizó por triplicado la purificación de oocinetos (9.58×10^4 oocinetos iniciales/caja) obteniendo los resultados de la figura 11. El porcentaje de recuperación no difiere entre los distintos diluyentes, pero sí entre las concentraciones del ECM gel (ANOVA, $p < 0.01$, tamaño del efecto: $\eta^2 = 0.724$). Las cajas recubiertas con laminina, col IV, BSA o sin recubrimiento, lograron recuperaciones similares a las obtenidas con ECM gel diluido 1/100 (el lote del ECM gel utilizado para este experimento contenía 7.37 mg de proteína/ml). Aunque en promedio se recuperaron menos oocinetos, los resultados no son significativamente distintos al realizar la comparación de las medias de las 136 combinaciones posibles mediante una prueba *post hoc* de Student-Newman-Keuls (SNK).

En vista de que no hubo diferencias entre los distintos diluyentes utilizados, pero sí entre las distintas concentraciones de ECM gel a pesar de ser diluidos con distintos diluyentes, es posible considerar a los tratamientos con los diluyentes como una sola población y así obtener una curva promedio de porcentaje de recuperación de oocinetos vs. concentración de ECM gel. En promedio se recuperaron $1.93 \% \pm 0.24 \%$ (media \pm ee) más oocinetos por cada incremento de

1 mg/ml de ECM gel a una densidad de $17.69 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ de superficie ($R^2 = 0.99$) (figura 11c).

A diferencia de la figura 7c, en promedio se obtuvieron purezas más elevadas ($65.76 \% \pm 4.10 \%$ (media \pm ee) en cajas de Petri y después de 6 lavados con PBS vs. $50.29 \% \pm 16.73 \%$ (media \pm ee) en laminillas Lab-Tek de 4 pozos y después de 10 lavados). Esto es importante, y lo más seguro es que se deba a la forma de la caja o pozo de cultivo. En las laminillas Lab-Tek fue muy complicado retirar todo el medio de cultivo de los pozos porque se adhirió (debido a la tensión superficial) a las orillas rectangulares donde quedan muchos eritrocitos, de hecho fue posible invertir la laminilla Lab-Tek sin derramar el líquido. En las cajas de 24 pozos y cajas Petri, que son circulares, las únicas orillas son el ángulo de 90° entre la base y las paredes del cilindro y aunque se quedaron algunos eritrocitos en esta área, aún después de retirar todo el medio de cultivo o PBS, fue mucho más fácil ir eliminándolos durante lavados posteriores. Mientras que en las laminillas Lab-Tek se necesitaron 10 lavados para alcanzar purificaciones del 50 %, en las cajas de Petri solamente se necesitaron 6 lavados para alcanzar purificaciones entre el 60 % y el 70 %.

Para corroborar esta noción, se procedió a recubrir cubreobjetos de vidrio de 13 mm de diámetro (los cuales no presentan ningún ángulo por ser planos) con ECM gel diluido 1/10 y colocando los oocinetos sobre estos en cajas de 24 pozos para incubar por 3 h y realizar la purificación. Los lavados de los cubreobjetos se realizaron retirando todo el cultivo de oocinetos del pozo y remplazándolo con PBS, para posteriormente retirar a los cubreobjetos de la caja de 24 pozos y, mientras se sujetaban con una pinza de relojero en posición vertical, lavar con 0.5 ml de PBS. Se necesitaron entre 2 y 3 lavados para alcanzar purezas por encima del 95 %. Los contaminantes celulares en los cubreobjetos resultaron ser otras fases del parásito, probablemente cigotos y no se encontró ningún eritrocito en aproximadamente el 60 % de las purificaciones (7 purificaciones con la sangre de ratones distintos). El motivo de que en el 40 % restante de las purificaciones sí se encontraran eritrocitos fue debido a que el cultivo se diluyó, lo que causa la aglutinación de la sangre (ver figura 12).

Llama la atención la gran variabilidad en los resultados de la figura 11. Esto podría deberse, como se verá más adelante, a la relación de los eritrocitos por oocinetos y probablemente a otras variables que no se han identificado. A pesar de que en cada cultivo hay una cantidad más o menos constante de eritrocitos, la cantidad de oocinetos varía en mayor medida entre cultivos, esto provoca que la

relación de eritrocitos por oocinetos cambie, lo que a su vez genera interferencia en la purificación; si la relación eritrocitos por oocineto es alta, los oocinetos tienen una menor probabilidad de encontrar la superficie a comparación de si la relación eritrocitos por oocineto es baja (ver figura 14 en la siguiente sección).

6.2.4. Recuperación y pureza partiendo de densidades distintas de oocinetos

Cuando se coloca el cultivo de oocinetos sobre el contenedor recubierto con ECM gel en la cual van a ser purificados, los eritrocitos y los oocinetos se sedimentan en el fondo después de aproximadamente 15 min, formando una capa cuyo grosor depende de cuantas células se hayan colocado de inicio. Cuando el cultivo se coloca directamente, las células están muy concentradas y la capa celular es gruesa. En estas condiciones se razonó que los oocinetos tendrían dificultad para encontrar la superficie de adhesión y mientras más se diluyera el cultivo de oocinetos, mayor sería la probabilidad de que los oocinetos encontraran al ECM gel y por consiguiente mayor sería el porcentaje de recuperación de oocinetos, es decir, se hipotetizó que la cantidad de oocinetos de inicio presenta una relación inversamente proporcional al porcentaje de recuperación. Para probar esto se realizaron diluciones del cultivo con distintas cantidades iniciales de oocinetos y se colocaron en cajas de Petri de 28.27 cm² recubiertas con ECM gel diluido 1/10 con ECM buffer e incubados por 3 h. Después de realizar 6 lavados con PBS, los oocinetos se desprendieron con dispasa II y EDTA y se fijaron con formaldehído al 1 % en PBS para realizar los conteos de recuperación y pureza.

La cantidad total de oocinetos recuperados presentó una relación logarítmica con respecto al número inicial (curva de mejor ajuste $R^2 = 0.807$, error estándar de la regresión (s) = 28283.8) (figura 12a y d), sin embargo, se encontró una gran variabilidad entre experimentos (ver tabla 2), principalmente por arriba de 300,000 y 600,000 oocinetos, cuando se alcanzó una fase de meseta en la cual no se recuperaron más oocinetos a pesar de aumentar la cantidad inicial. Interesantemente y contrario a lo que se esperaba, el porcentaje de recuperación presentó una forma de “U” invertida (curva de mejor ajuste: función cuadrática $R^2 = 0.794$, $s = 3.797$) seguida de una cola que se acerca a la asíntota (figura 12b y d) y más aún, la pureza parece seguir un comportamiento invertido al porcentaje de recuperación, en donde además se observa una aglutinación de las células cuando se diluye la sangre entre 50 y 100 veces (o diluciones entre 10 y 20 veces del cultivo, que presenta la sangre diluida 1/5 veces) (figura 12c y d). La razón de este comportamiento no se logró esclarecer, pero se piensa que uno o varios

factores de la sangre (seguramente anticuerpos polivalentes de la clase IgM, que pueden interaccionar hasta con 5 antígenos simultáneamente formando por lo tanto conglomerados muy grandes (Stanley 2002)), influyen en la conglomeración de las células entre sí y el ECM gel; conforme se diluye la sangre, una mayor cantidad de oocinetos, aunque también de otras células contaminantes, logran adherirse entre sí mismas y al gel, diluir aún más la sangre del cultivo ocasiona que se revierta nuevamente este comportamiento. La disminución en el porcentaje de recuperación de oocinetos puede atribuírsele a que no se recuperan más oocinetos a pesar de aumentar la concentración inicial, por lo tanto disminuyendo el rendimiento, sin embargo ésta no debe ser la única razón ya que esto no explica por qué la pureza se comporta como una imagen invertida del porcentaje de recuperación, además de que no explica la aglutinación de células observada. Esto posiblemente esté generando la alta variabilidad observada entre los experimentos, ya que fuera de la cantidad de oocinetos obtenida en cada cultivo, así como la cantidad de eritrocitos, lo demás permaneció constante.

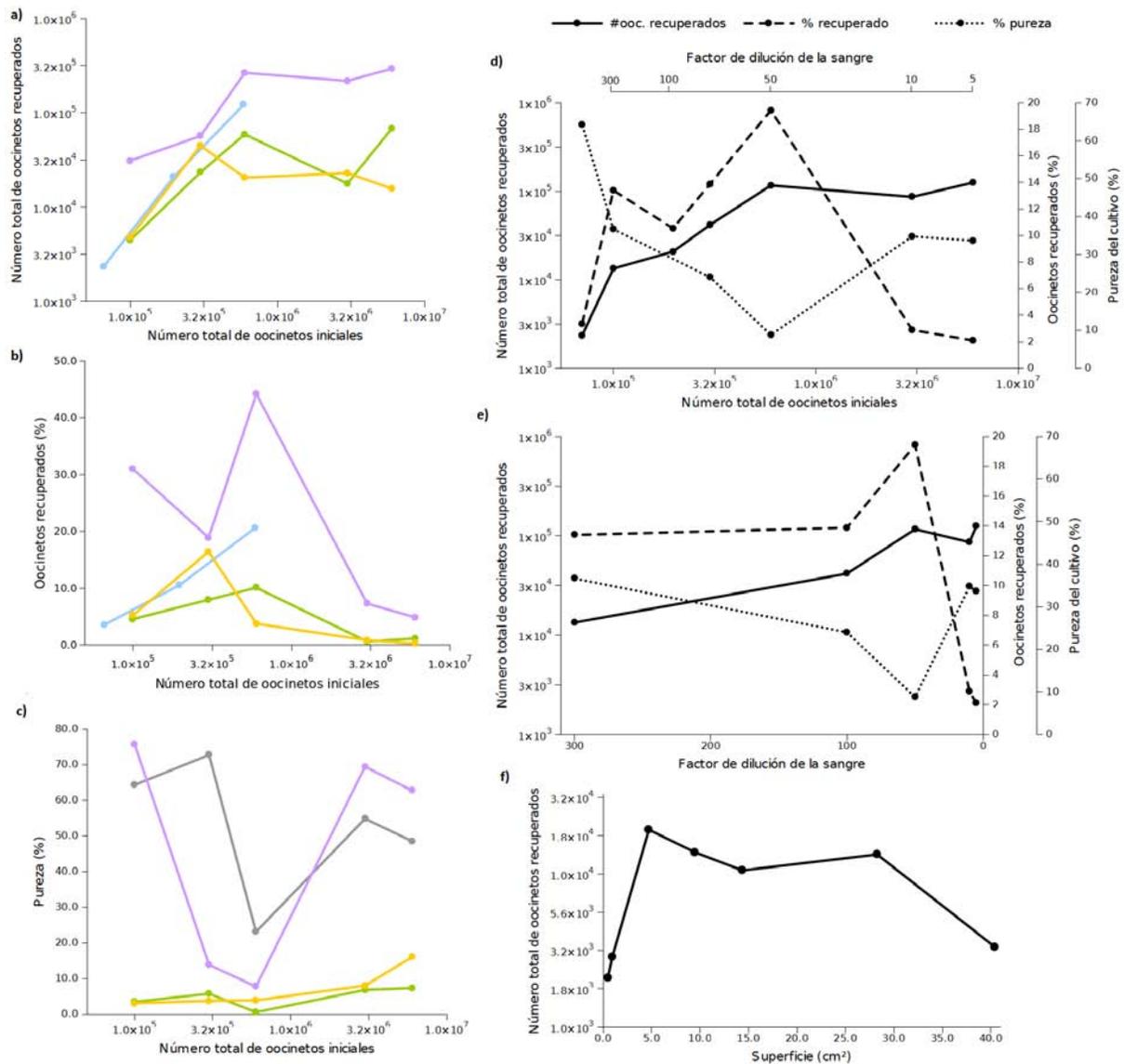


Figura 12. Gráficas de recuperación y pureza partiendo de cantidades distintas de oocinetos. Los oocinetos fueron purificados partiendo de distintas cantidades de oocinetos iniciales diluidos con el mismo volumen final de RPMI-Ooc (20 % SFBdc). Cada línea en (a), (b) y (c), representa un experimento independiente con la sangre de un sólo ratón. En todos los experimentos, con excepción del experimento 1 (tabla 2) el cultivo de oocinetos presentó de (9 a 10) x 10⁶ oocinetos, a partir de los cuales se realizaron las diluciones para comenzar con distintas cantidades de oocinetos iniciales. **d)** Promedio de todos los experimentos de la tabla 2 o de las curvas de (a), (b) y (c). **e)** Mismos datos de la gráfica (d) pero representando el factor de dilución de la sangre en vez del número inicial de oocinetos en el eje x y omitiendo los datos del experimento 1 de la tabla 2, los cuales se realizaron con otra dilución. **f)** Los datos de la gráfica (d) se transformaron para representar el área ocupada por 1 x 10⁵ oocinetos normalizados. Nótese que el eje x en (a), (b), (c) y (d) está representado en escala logarítmica, al igual que el primer eje y en (a), (d), (e) y (f). Se omitieron las barras de error en (d), (e) y (f) por fines de claridad ya que las desviaciones de la media son inmensas.

Tabla 2. Purificación en ECMgel partiendo de distintas cantidades de oocinetos.

| Oocinetos iniciales x 1000 | Oocinetos recuperados x 1000 / % recuperación / % pureza | | | | | Promedios |
|----------------------------------|--|----------------------|---------------|----------------------|---------------------|-----------------------|
| | Experimento 1 | Experimento 2 | Experimento 3 | Experimento 4 | Experimento 5 | |
| 6000 | | 68.10 / 1.16 / 7.32 | - / - / 48.5 | 293 / 4.89 / 62.73 | 15.7 / 0.29 / 16 | 125.60 / 2.11 / 33.64 |
| 3000 | | 17.80 / 0.61 / 6.79 | - / - / 54.84 | 218 / 7.28 / 69.42 | 23 / 0.84 / 8 | 86.27 / 2.91 / 34.76 |
| 600 | 122.0 / 20.6 / - | 59.00 / 10.09 / 0.51 | - / - / 23.08 | 265 / 44.17 / 7.72 | 20.5 / 3.75 / 3.86 | 116.62 / 19.65 / 8.79 |
| 300 | | 23.30 / 7.98 / 5.73 | - / - / 72.73 | 56.7 / 18.91 / 13.83 | 48.8 / 16.43 / 3.73 | 42.93 / 14.44 / 24.01 |
| 200 | 20.8 / 10.5 / - | | | | | 20.80 / 10.50 / - |
| 100 | | 4.44 / 4.56 / 3.43 | - / - / 64.29 | 31 / 30.99 / 75.76 | 4.75 / 5.22 / 3.04 | 13.40 / 13.59 / 36.63 |
| 66 | 2.34 / 3.29 / - | | | | | 2.34 / 3.29 / - |

Resultados obtenidos purificando oocinetos con distintas cantidades inicialmente en ECMgel diluido 1/10 por 3 horas en cajas de Petri de 28.27cm². El número de oocinetos recuperados y la pureza se obtuvieron utilizando un hemocitómetro con gradilla de Neubauer. Cada experimento se realizó con la sangre de un solo ratón.

Este comportamiento es muy semejante al observado por Heidelberger y Kendall en las reacciones de precipitina (Heidelberger y Kendall, 1935) en donde la relación de anticuerpo : antígeno modifica la formación de precipitados; conforme se diluye la cantidad de antígeno, la precipitación aumenta hasta llegar a un máximo en el cual se alcanza la equivalencia anticuerpo : antígeno. Diluyendo aún más el antígeno, la formación de precipitado disminuye (figura AII.4). En el caso de la interacción de anticuerpos con antígenos insolubles (p.ej. células), Heidelberger y Kabat (1936) encontraron que en vez de precipitaciones se obtienen aglutinaciones, pero manteniéndose el mismo efecto de zona descrito para las reacciones de precipitina (Heidelberger y Kabat, 1936). Este efecto de autoaglutinación de la sangre se ha observado en personas infectadas con *P. falciparum* (Nayak, et al., 2014; Roberts, et al., 2000) y se ha asociado con la presencia de anticuerpos IgM, los cuales probablemente reaccionan ante cambios en el patrón de sialilación en los antígenos I o i del eritrocito parasitado (Nayak, et al., 2014), provocando redes aglutinadas de eritrocitos. Estas reacciones frecuentemente se exacerban al disminuir la temperatura en la llamada aglutinación fría (Stanley, 2002) (la purificación de oocinetos se realiza a 20 °C no a los 37.8 °C del ratón (“MPD - Phenotype Strain Survey Data Listing – Metabolism”, 2009)). La aglutinación también puede incrementarse con la presencia de gelatina (que es colágeno hidrolizado, el ECM gel presenta colágeno IV) y puede inhibirse agregando albúmina a la mezcla de eritrocitos (Ludewig y Chanutin, 1949). Probablemente sea posible inhibir la aglutinación utilizando albúmina, sin embargo esto no se probó en el presente trabajo.

Es notable que el efecto de dilución la sangre del cultivo de oocinetos se parezca tanto a la reacción de aglutinina de Heidelberger y Kabat (1936) ya que no se está agregando ningún anticuerpo a la mezcla de células, simplemente se está diluyendo. Sin embargo, puede explicarse a través de un efecto de repartición de los anticuerpos (u otras moléculas multivalentes) y los antígenos (las células) en dos fases, una soluble y una insoluble que se precipita al fondo. Como se muestra en la figura 13, al diluir el cultivo de oocinetos se está diluyendo tanto a las células como a los factores aglutinantes (o aglutininas), sin embargo, los factores aglutinantes permanecen en solución y cada vez menos concentrados. Las células, por el contrario, aunque también son diluidas, al sedimentarse al fondo del pozo o caja, presentan la misma concentración en su microambiente pero se encuentran rodeadas por una menor cantidad de factores aglutinantes, los cuales están repartidos entre las células sedimentadas y el medio de cultivo.

Partir de distintas cantidades de oocinetos iniciales es equivalente a mantener la cantidad de oocinetos constantes y variar el área de adhesión. Por lo tanto, para analizar cómo se comporta la recuperación de oocinetos cuando son sembrados en superficies cada vez mayores, se transformaron los datos de la tabla 2 para mantener la cantidad de oocinetos constante a 1×10^5 y en cambio variar el área de recuperación. Lo que se observa en la figura 12e es una relación positiva con respecto a la superficie al inicio de la curva, sin embargo, debido al efecto de la dilución observado en los otros incisos de la misma figura, el rendimiento en la recuperación comienza a disminuir pasada cierta área por oocineto, resultando en una curva parecida a una parábola (regresión cuadrática: $R^2 = 0.513$, $s = 5644.53$). Esto resulta ser contra intuitivo, lo esperado sería una relación lineal y positiva, sin embargo, para lograr que una misma cantidad de oocinetos recubra una superficie muy grande, inevitablemente es necesario diluir el cultivo.

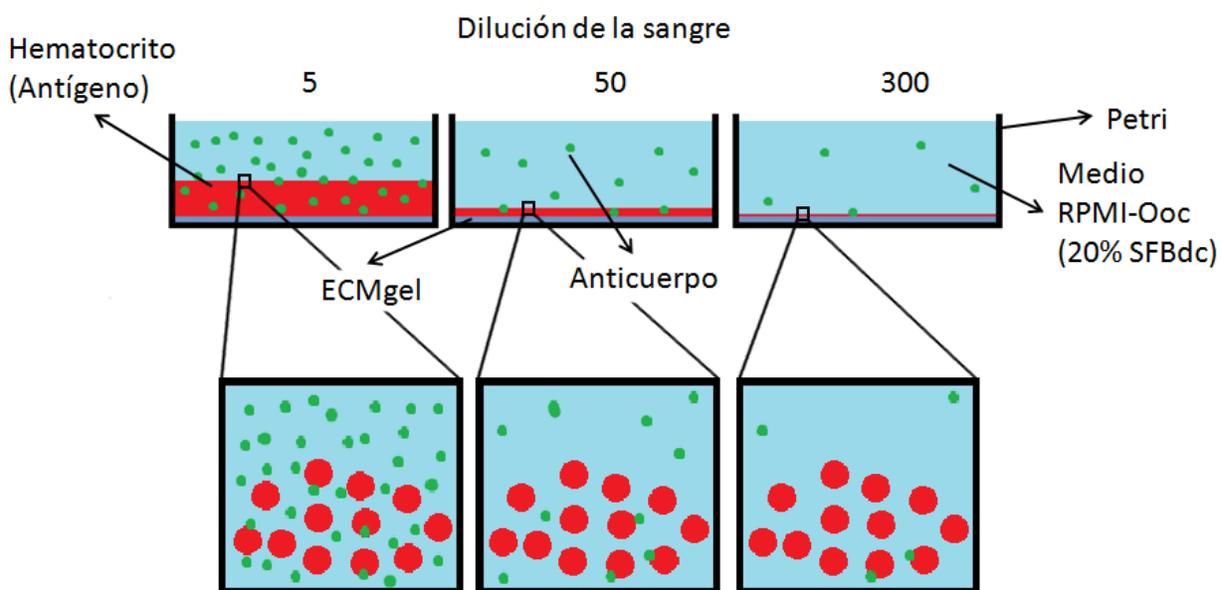


Figura 13. Repartición de los factores aglutinantes en dos fases: una celular y una soluble.

Cuando se diluye un cultivo de oocinetos manteniendo un volumen constante, a pesar de que se están diluyendo todos los componentes proporcionalmente, las células se separan del medio de cultivo formando una fase sedimentada en la cual las células se encuentran a una densidad de sí mismas constante aunque el volumen del sedimento sea menor. Por el contrario, los factores aglutinantes se encuentran más diluidos ya que se encuentran repartidos en el volumen total (sedimento + medio de cultivo). Como los factores aglutinantes pueden pasar libremente entre la fase sedimentada y la fase soluble, a diferencia de las células, al diluir el cultivo las células sedimentadas se encuentran en concentraciones cada vez menores de los factores aglutinantes dentro de su propia fase.

En la figura 12a y 12d se observa que a partir de $\approx 6 \times 10^5$ oocinetos se alcanza una fase de meseta en la cual el número de oocinetos recuperados permanece constante a pesar de aumentar el número inicial de oocinetos, implicando que se llegó a un límite o saturación en el sistema. Una de las posibilidades es que se hayan agotado los oocinetos capaces de adherirse al ECM gel. No obstante, se realizaron tres purificaciones independientes en las cuales los oocinetos que no lograron adherirse durante una primera purificación, se volvieron a colocar en cajas de Petri recubiertas con ECM gel. Después de tres horas de incubación, en esta segunda purificación se recuperó una cantidad adicional de oocinetos (y similar a la primera purificación) que no se adhirieron en la primera. Esto descarta el que se hayan agotado los oocinetos con capacidades adhesivas, a menos de que la proporción de oocinetos que no lograron adherirse en la primera purificación hayan madurado durante el tiempo de la segunda purificación. Sin embargo, Warburg y Schneider (1993) observaron que incluso los cigotos y las retortas son capaces de adherirse al ECM gel (Warburg y Schneider, 1993) lo que implica que todos los oocinetos deberían de tener capacidades adhesivas, incluso hasta después de transformarse en ooquistes. Asumiendo que este no es el caso, probablemente se esté observando un límite cinético en el cual la velocidad de formación del producto (Ooc + Sustrato \rightarrow OocSustrato) llegó al máximo posible durante las 3 horas de incubación, en donde no es posible recuperar más oocinetos en el mismo tiempo a pesar de aumentar la cantidad inicial de los mismos.

Otra posibilidad es que se haya saturado el sustrato de adhesión, pero no por oocinetos (ya que microscópicamente se observa que los oocinetos están bastante separados entre sí) sino por eritrocitos u otras fases del parásito débilmente adheridos al ECM gel. Además, aumentar la concentración inicial de oocinetos implica aumentar proporcionalmente la cantidad de eritrocitos y por ende, el volumen del paquete celular que se sedimenta. Si el volumen del paquete celular (más específicamente la altura) aumenta, se intuyó que el tiempo de búsqueda del oocineto por el sustrato también aumenta, impidiéndole a los oocinetos encontrar el sustrato en un tiempo determinado. La cantidad de eritrocitos es un factor importante durante la purificación (figura 14) y se hablará más sobre esto en párrafos posteriores.

Una manera de probar estas suposiciones sería repetir el experimento pero ahora realizando una cinética. También se podrían realizar dos purificaciones simultáneas, una en la cual los oocinetos se incubaran por 6 horas seguidas en un sólo recipiente con ECM gel, y otra en la cual los oocientos se incubaran por 3 h, para posteriormente volver a colocar el cultivo, con los oocinetos que no se

lograron adherir, en una nueva caja con ECM gel y así comparar el número total de oocinetos recuperados en cada tratamiento (6 h continuas o 3 + 3 h en cajas secuenciales). Con éste experimento se podría comenzar a dilucidar el porqué se satura la recuperación de oocinetos por arriba de cierta cantidad de oocinetos; si la cantidad final de oocinetos a las 6 h de incubación (Ooc_{f6}) es igual a la cantidad final de oocinetos a las 3 + 3 h de incubación (Ooc_{f3+3}), es decir, $Ooc_{f6} = Ooc_{f3+3}$, podría concluirse que, en efecto los oocinetos necesitaron de las tres horas adicionales para madurar (tal vez los oocinetos inmaduros sí son capaces de adherirse pero no son capaces de moverse), o que el tiempo de búsqueda incrementó al aumentar la altura del paquete celular. Pero, si resulta que $Ooc_{f6} < Ooc_{f3+3}$, podría entonces concluirse que la fase de meseta se debe a un límite cinético o a una saturación de los espacios de adhesión, y que al cambiar a los oocinetos a una nueva caja después de 3 h, se está reiniciando la reacción.

En el cultivo *in vitro*, no siempre se obtiene la misma cantidad de oocinetos de partida, los cuales pueden variar considerablemente (figura 5). Los eritrocitos también pueden variar de un ratón infectado a otro (figura 3 y AII.1) de manera que la relación de eritrocitos por oocineto varía incontrolablemente de cultivo a cultivo. Durante la purificación, los oocinetos se encuentran rodeados por eritrocitos y la cantidad de estos varía entre tres o cuatro (a veces más de 20) órdenes de magnitud (ver Apéndice II). Para probar si esta variación en la relación de eritrocitos/oocineto genera inconsistencias en la purificación de oocinetos entre cultivos, un cultivo de oocinetos se mezcló con eritrocitos provenientes de un ratón sano para generar relaciones cada vez mayores de eritrocitos por oocineto (E/Ooc) y determinar posteriormente el rendimiento y pureza de la purificación después de 3 h de incubación en cajas de Petri revestidas con 500 μ l ECM gel diluido 1/10 y después de 6 lavados con PBS para eliminar a los eritrocitos.

En la figura 14 se observa que la recuperación de oocinetos así como la pureza, disminuyen rápidamente al incrementarse la relación E/Ooc (curva de mejor ajuste para la recuperación de oocinetos: $Ooc_f = e^{(-\ln(x^b)+a)}$ donde Ooc_f = oocinetos recuperados, x = relación E/Ooc del cultivo $b = 1.74 Ooc_f Ooc_i / E$ y $a = 22.57 Ooc_f$ (o $a = 15.27 \%$ para la pureza), $R^2 = 0.701$, $s = 1131.55$). La razón de este comportamiento se le atribuyó a un efecto de obstrucción, en donde los oocinetos tienen una mayor dificultad en encontrar el sustrato cuando hay muchos eritrocitos, de manera que se obtienen rendimientos más bajos conforme aumenta la relación de eritrocitos por oocineto. A su vez, la gran cantidad de eritrocitos ocasiona que sea más complicado alcanzar purezas elevadas con el mismo número de lavados (figura 14).

Adicionalmente, al graficar el porcentaje de recuperación y la pureza con respecto a la relación E/Ooc de 46 purificaciones distintas utilizando un valor constante de eritrocitos (figura AII.1), se observa un comportamiento similar al presentado en la figura 14, reforzando las evidencias de la existencia del fenómeno. No obstante, éste es un análisis retrospectivo y debe tenerse precaución al realizar alguna inferencia del resultado, sobre todo por el sesgo o prejuicio de utilizar una cantidad de eritrocitos constante entre las distintas purificaciones. Ver gráficas adicionales en la figura AII.2.

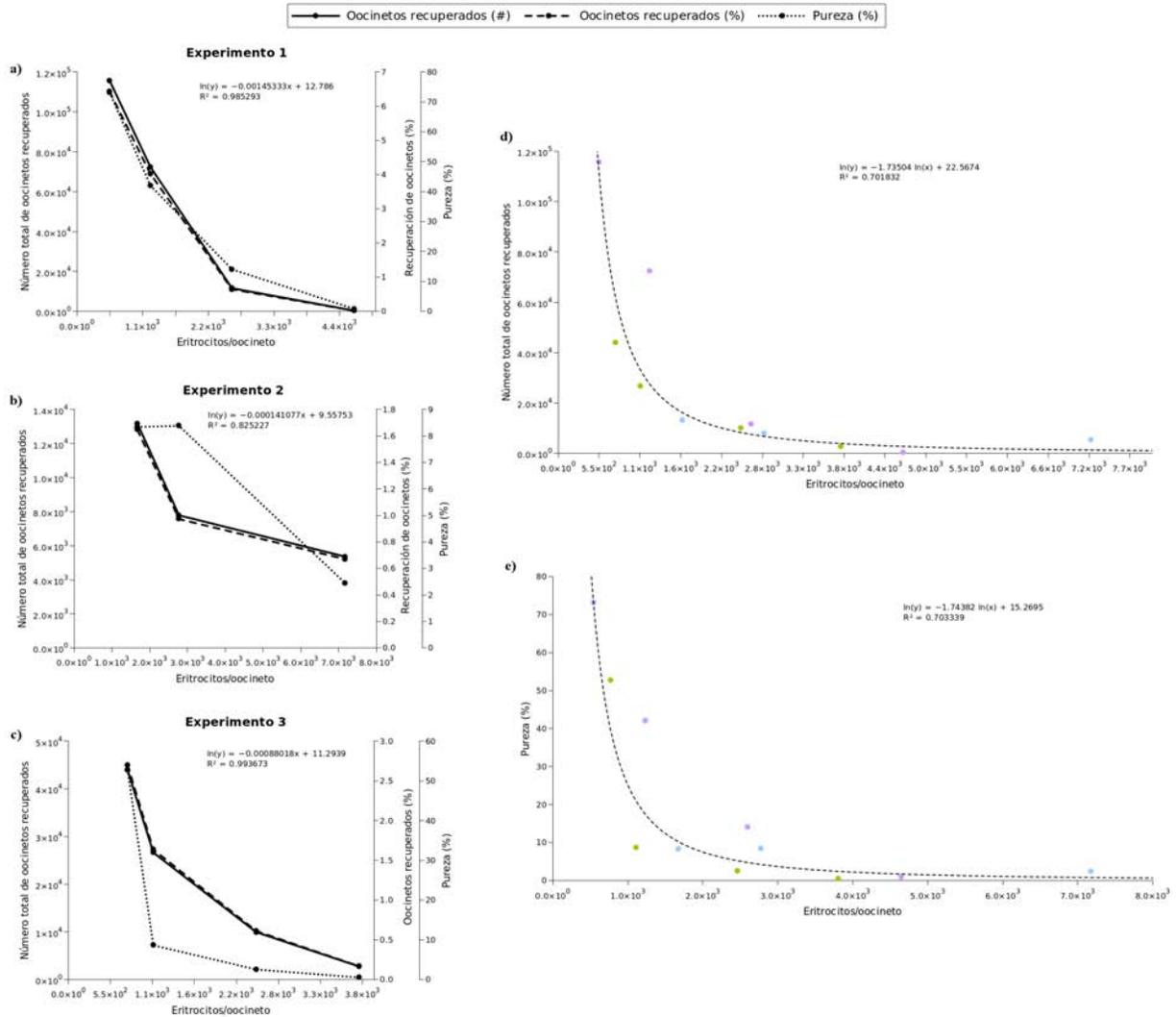


Figura 14. Dependencia del número de eritrocitos por oocineto en el rendimiento y pureza de la purificación. Para probar qué efecto presenta la relación eritrocitos/oocineto (E/Ooc), un cultivo de oocinetos se mezcló con eritrocitos de un ratón sano para formar relaciones de E/Ooc cada vez mayores. El cultivo de oocinetos se colocó sobre cajas de Petri de 28.27 cm² recubiertas con ECM gel diluido 1/10. Pasadas las 3 h de incubación, las cajas se lavaron 6 veces con PBS y se desprendieron los oocinetos con el protocolo de dispsa II/EDTA. En las gráficas (a), (b), y (c) se observa que a mayor E/Ooc, menor es la recuperación de oocinetos y la pureza. En los tres experimentos, una curva exponencial es la que mejor se ajusta a los datos de recuperación ($R^2 > 0.80$). En las gráficas (d) y (e) se muestran los datos agrupados para la recuperación de oocinetos totales y pureza respectivamente. La curva de mejor ajuste para los datos agrupados resultó de una regresión potencial ($R^2 > 0.70$). En (d) y (e), los puntos morados representan el experimento 1, los puntos azules el experimento 2 y los puntos verdes el experimento 3. Resultado de tres experimentos independientes con la sangre de un ratón infectado y un ratón sano cada uno. En el experimento 1 se colocaron 1.8×10^6 oocinetos por caja, en el exp. 2 se colocaron 8×10^5 ooc. por caja y en el exp. 3 se colocaron 1.6×10^6 oocinetos por caja al inicio de la purificación.

6.2.5. Recubrimiento de tubos de fondo cónico con ECM gel para la purificación de oocinetos.

Adicionalmente a la utilización de laminillas Lab-Tek, cajas de pozos o cajas de Petri como soporte físico para purificar a los oocinetos, se probaron tubos de fondo cónico (Falcon) de 15 ml recubiertos con ECM gel 1/10 para purificar a los oocinetos. La idea de utilizar tubos para purificar oocinetos surgió como un esfuerzo para facilitar la purificación de oocinetos. Con las cajas de Petri y otros contenedores se requieren numerosos lavados para eliminar a los eritrocitos, aunado a que después se requieren otros lavados para desprender a los oocinetos de la superficie y colocarlos en un tubo de fondo cónico para centrifugarlos y eliminar la dispa II y el EDTA. Si todo pudiese hacerse en un sólo tubo, el método podría agilizarse aún más. Para esto, se procedió a recubrir los tubos con ECM gel implementando una técnica de revestimiento basada en centrifugación en el eje de rotación (mejor conocido como “*centrifugal casting*” en la industria metalúrgica (Kamlesh, 2015), ver figura AII.5a), donde en este caso, el tubo con el ECM gel líquido se hace girar sobre su eje longitudinal para provocar que el ECM gel forme una capa uniforme en toda la superficie interna del tubo, donde gelifica durante la centrifugación (figura 15).

Recientemente, Yuan et al, (2015) utilizaron un método similar para re-plegar proteínas desnaturalizadas por calor o generadas recombinantemente utilizando un dispositivo que llamaron vórtice de fluido, el cual hace girar sobre el eje de rotación un tubo de vidrio conteniendo las proteínas a re-plegar (figura AII.5b). La tensión cortante (“*shear-stress*”) generada por la centrifugación provee la energía suficiente para estructurar a las proteínas a su conformación nativa (Yuan, et al., 2015).

El revestimiento de la superficie interna del tubo se llevó a cabo colocando 500 μ l de ECM gel diluido 1/10 con ECM buffer a 4 °C en el tubo de fondo cónico y colocándolo en el aparato construido para hacerlo girar a ≤ 5000 rpm durante 5 min a TA. Después de la gelificación durante la centrifugación, se observó una capa de gel distribuida por toda la superficie interna del tubo, además de un líquido sobrante que no gelificó (probablemente el diluyente). La capa de gel obtenida no fue uniforme y se encontraron muchos grumos distribuidos por toda la superficie. Es probable que esto se deba a que el aparato construido es aún muy rudimentario y a pesar de haberse tomado todas las precauciones para que estuviera correctamente alineado, durante la rotación el tubo bascula de un lado a

otro. Probablemente perfeccionando la centrifuga en el eje de rotación se logren obtener revestimientos uniformes.

Posteriormente al recubrimiento del tubo, el cultivo de oocinetos, diluido 3 veces con RPMI-Ooc con 20 % de SFBdc (la sangre queda diluida 15 veces en 15 ml), se colocó en el tubo y se incubó en posición horizontal por tres o cuatro horas, girando el tubo 45° cada 15 min, o girándolo a una revolución por hora en un agitador giratorio (esto no se probó). Girar el tubo permite que las células sedimentadas se revuelvan y que los oocinetos presenten una mayor probabilidad de encontrar el ECM gel. Pasado el tiempo de incubación, se decanta el medio de cultivo con los eritrocitos y se lava el tubo con PBS de 4 a 6 veces para después agregar la dispa II durante 30 min, el EDTA y centrifugar a 720 g por 10 min a 4 °C para formar la pastilla de oocinetos purificados.

Se realizaron 6 purificaciones con los tubos de fondo cónico, los cuales presentan una superficie de adhesión de 31.26 cm², encontrándose que la recuperación de oocinetos y la pureza no fue distinta con respecto a las purificaciones con cajas de Petri, que presentan una superficie de adhesión de 28.27 cm² (prueba de T, p = 0.616, con un tamaño del efecto de: g de Hedge = 0.18). Con el tubo se obtuvieron recuperaciones de 4.37 % ± 2.37 % (media ± ee) y n = 6, contra recuperaciones con la caja de Petri de 5.72 % ± 1.12 % (media ± ee) y n = 49, implicando que la posibilidad de recuperar más oocinetos en la caja de Petri con respecto al tubo es de 1.33 : 1 (razón de posibilidad). Estas diferencias no significativas podrían atribuírsele a que la centrífuga en el eje de rotación construida dista de ser perfecta a comparación, por ejemplo, con el dispositivo construido por Yuan et al, (2015).



Figura 15 (pie de figura en siguiente página).

Figura 15 (página anterior). Elaboración de la funda para centrifugación en el eje de rotación y montaje del aparato. (a): Material necesitado: tornillo cabeza de gota 2'' x 3/16'', tuerca de 3/16'', 2 rondanas metálicas y una rondana de madera de 3/16'', broca de 3/16'', broca de 15/64'', broca saca bocados de 1 1/4'', broca de 7/64'', cianoacrilato (Kola Loca), 2 tablas de madera, segueta, nivel, tubo Falcon de 50ml, tubo Falcon de 15 ml, resina de poliuretano (PMC-790 Smooth-ON o similar) (c), valero 6303 3RS C3, papel lija, 6 tornillos allen de 1'' x 7/64'', 3 tornillos de 1 1/4'' x 15/64'', vaselina, película de parafina (Parafilm), papel, silicon, taladro o Dremel mototool con ajuste de velocidad, soporte universal, pinza de tres dedos, pinza de dos dedos para tubo de ensaye y ECM gel diluido 1/10 con ECM buffer. **(b):** se colocan las rondanas de metal y la rondana de madera apretadas con la tuerca, se pegan las rondanas y la tuerca con cianoacrilato. **(d):** con la broca sacabocados se hace una ranura circular sin atravesar la madera en el centro de la misma. **(e):** se coloca parafilm y papel cortado sobre la ranura con el fin de que el tubo Falcon de 50 ml entre en la ranura a presión. **(f):** se coloca el tornillo cabeza de gota con las rondanas en el orificio de la tabla realizado previamente. **(g):** al tubo Falcon de 50 ml se le corta el cono final con una segueta y se lijan los extremos para que queden perpendiculares. **(h):** con la broca adecuada se realizan 3 orificios en el tubo Falcon de 50 ml separados equidistantemente en dos alturas distintas del tubo y se colocan los tornillos allen. Posteriormente se coloca dentro del tubo Falcon de 50 ml el tubo Falcon de 15 ml y se centra y sujeta con los tornillos allen como se muestra en los incisos **(h)**, **(i)** y **(j)**. **(k):** a la otra tabla se le realizan dos orificios en las orillas de un extremo y otro orificio en el centro del otro extremo, se introducen los tornillos de 1 1/4'' x 15/64'' y se balancea la tabla con niveles girando los tornillos. **(l)**, **(m):** se ensambla el molde, se nivela perfectamente y se agrega la resina de poliuretano mezclando 2 partes de A (amarillo en (c)) con una parte de B (azul en (c)) siguiendo las instrucciones del proveedor, vertiéndola en el tubo Falcon de 50 ml hasta la marca de 25 ml para después introducir el Falcon de 15 ml. Se deja curar la resina durante 48 h. **(n)**, **(o)**, **(p):** después de retirar los moldes obtenemos el producto final. **(q):** se ensambla el aparato en un soporte universal como se muestra y se agregan 500 µl de ECM gel diluido 1/10 con ECM buffer para cubrir los 31.26 cm² del interior del tubo Falcon de 15 ml. Se pone a girar a ≤ 5000 rpm y se deja gelificar el ECM gel a temperatura ambiente por 5 min durante la rotación. Posteriormente se agrega el cultivo de oocinetos, se deja incubando en rotación lenta a 20 °C con un mezclador de sangre por ≈ 3 h y se decanta el cultivo con las células contaminantes. Se lava con PBS de 4 a 8 veces y se llena el tubo con dispasa II a 2.4 U/ml para incubar por 25 min, se agrega EDTA 4 mM y se centrifuga a 720 g por 8 min para formar una pastilla de oocinetos y recuperarlos del tubo.

6.2.6. Aspectos adicionales en la optimización de la purificación de oocinetos

Con el fin de optimizar y simplificar la purificación de oocinetos se exploraron otras variables del sistema. En vista de que los eritrocitos contaminantes presentan una influencia marcada en la purificación de oocinetos, se especuló que el rendimiento de la purificación mejoraría agitando el cultivo de oocinetos durante

la incubación, al permitir que los oocinetos que se encuentran lejos de la superficie de adhesión tengan una mayor probabilidad de encontrar el ECM gel, consiguientemente disminuyendo el tiempo de búsqueda del oocineto por el sustrato. Además de que no es seguro que los oocinetos puedan desplazarse eficazmente en el paquete celular que se forma al fondo del contenedor. Esto porque la capa celular es muy poco viscosa a diferencia del paquete celular parcialmente deshidratado y gelatinoso que se forma durante la digestión. Por otra parte, al agitar el cultivo, es probable que los eritrocitos que están ocupando el espacio del sustrato vuelvan a entrar en suspensión, y que liberen los espacios de adhesión.

Para probar el efecto de la agitación sobre el rendimiento del método, se sembró el cultivo de oocinetos sobre cajas de Petri de 60 mm de diámetro recubiertas con ECM gel diluido 1/10 con ECM buffer y dejadas secar. Las cajas se agitaron gentilmente cada (15 a 20) min durante las 3 h de incubación. Las cajas testigo permanecieron inmóviles durante dicho tiempo. Después de 6 lavados con PBS se recuperaron los oocinetos con dispa II y se contaron en una hemocitómeto con gradilla de Neubauer. La recuperación de oocinetos incremento (2.74 ± 0.96) (media \pm ee) veces con la agitación, sin embargo los resultados no fueron significativos (prueba de T de dos colas, $t = 2.84$, $p = 0.065$, $n = 4$ cultivos independientes con la sangre de un ratón cada uno). A pesar de esto, el tamaño del efecto fue lo suficientemente grande (d de Cohen = 0.90) como para tomar en consideración a la agitación durante la purificación, sobretodo porque solamente existe una probabilidad del 44.1 % de aceptar correctamente que existe un efecto, asumiendo que en realidad hay un efecto (error del tipo II). Es decir, el experimento carece del poder estadístico suficiente. Para asegurar que el efecto observado no se debe al azar, el experimento debería de repetirse entre 8 y 10 veces. La pureza también se elevó (1.74 ± 0.43) (media \pm ee) veces (prueba de T de dos colas, $t = 4.06$, $p = 0.056$, d de Cohen = 1.00) debido a que las células contaminantes permanecieron aproximadamente constantes bajo los dos tratamientos (aunque en promedio las células contaminantes disminuyeron al agitar el cultivo (0.75 ± 0.54) (media \pm ee) veces, el resultado no fue significativo; prueba de T de dos colas, $t = 1.37$, $p = 0.304$, d de Cohen = -0.27).

Por otra parte, tomando como antecedentes los trabajos de Carter et al. (2003) y Kim et al. (2010), se probó utilizar perlas magnéticas de neodimio grado N35 de 3 mm de diámetro para aumentar el rendimiento de la técnica bajo el fundamento de que la hemozoina es paramagnética mientras que la oxihemoglobina no. El campo magnético generado por los imanes jalarían a los oocinetos hacia el ECM gel,

disminuyendo el tiempo de búsqueda del oocineto por el sustrato. Para esto, se colocaron las perlas magnéticas en una caja de 24 pozos sin tapa (12 perlas por pozo formando un prisma rectangular de 3 perlas de alto por 2 perlas de base por 2 perlas de cara lateral) y sobre ésta, otra caja de 24 pozos recubierta con ECM gel y con el cultivo de oocinetos, de manera que la cara inferior de la caja con el ECM gel y los oocinetos reposara directamente sobre los imanes (figura 16). Después de 3 h de incubación, los oocinetos en los pozos se lavaron 8 veces con PBS para eliminar a los eritrocitos y se contó la cantidad de oocinetos por campo a 400X muestreando un total de 30 campos por pozo.

En tres experimentos independientes realizados de esta manera (con dos réplicas cada uno), se observaron diferencias significativas (prueba de T de una cola, $t = -3.117$ $p = 0.045$) en la cantidad de oocinetos recuperados pero en el sentido opuesto al hipotetizado; es decir, se recuperaron más oocinetos sin utilizar los imanes que utilizándolos. La diferencia entre las medias fue de 0.56 desviaciones estándar favoreciendo la recuperación de oocinetos sin utilizar los imanes (d de Cohen = -1.8). Aunque el tamaño del efecto resultó ser grande, el resultado es marginalmente significativo, existiendo la posibilidad de cometer un error del tipo I; sobretodo porque se esperaba que la recuperación de oocinetos aumentara con base en los experimentos de Carter et al. (2003) y Kim et al. (2010), cuando en realidad disminuyó. El hecho de que se hayan recuperado menos oocinetos al utilizar los imanes posiblemente radique en que no sólo los oocinetos son atraídos por el imán, también las otras fases del parásito (excepto los merozoítos por carecer de hemozoina) son atraídas (Kim, et al., 2010). Estas fases pueden superar en número a los oocinetos hasta por dos órdenes de magnitud en el cultivo de oocinetos, ocupando por lo tanto los sitios de adhesión que le corresponderían a los oocinetos. Probar la hipótesis con imanes más grandes y potentes (grado N42 o N52, como sugiere Kim et al. (2010)) y uno por pozo en vez de varios apilados para obtener campo magnético más fuerte y uniforme, probablemente magnificaría el efecto observado (figura 16, imán de la derecha).

Aunado a estos experimentos, también se probó realizar micropurificaciones recubriendo cajas de 24 pozos o cubreobjetos de 13 mm de diámetro con (20 o 10) μ l de ECM gel diluido 1/5 en ECM buffer, respectivamente, para colocar 5 μ l del cultivo de oocinetos (conteniendo 1 μ l de sangre) diluido a un volumen final de 1 ml por pozo e incubando por 3 h. Después de realizar los lavados con PBS, se encontraron entre 5 y 10 oocinetos por campo a 200X. Con base en este experimento, en teoría podrían realizarse microcultivos extrayendo un microlitro de la cola del ratón, cultivarla en RPMI-Ooc y posteriormente purificar a los

oocinetos para fines de microscopía e inmunofluorescencia sin la necesidad de sacrificar a un ratón. Considerando un promedio de 7.41×10^6 oocinetos/ml de sangre (figura 5b sin columna de CF-11), en un microlitro de sangre hay 7.41×10^3 oocinetos, y si consideramos un porcentaje de recuperación promedio de 5.72 (obtenido de 46 purificaciones realizadas en cajas de Petri) en promedio se obtienen 424 oocinetos por pozo.

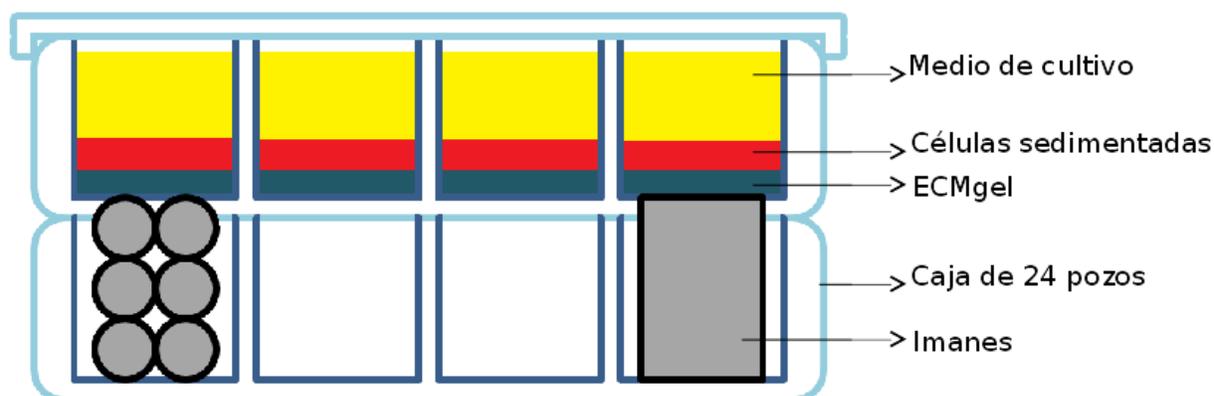


Figura 16. Dispositivo para purificar oocinetos utilizando imanes. En una caja de 24 pozos sin tapa se colocaron imanes esféricos de 3 mm de diámetro de neodimio grado N35 y sobre esta caja se colocó otra caja de 24 pozos recubierta con ECM gel y con el cultivo de oocinetos. El instrumento no incrementó la recuperación de oocinetos, por el contrario la disminuyó. Es posible que cambiando la forma del imán (un sólo imán cilíndrico en vez de perlas apiladas) y un imán más potente p. ej. N52 o N42 en vez de N35 (Kim et al., 2010), con un campo magnético más fuerte, se incremente el rendimiento de la purificación, aunque las otras fases del parásito serían atraídas de igual manera, volviendo a la técnica contraproducente si es que la interpretación del experimento es la correcta.

El método de purificación desarrollado simula, en gran medida, un evento de invasión natural pero *in vitro*, en el cual el oocineto se encuentra en condiciones similares al bolo alimenticio hasta que encuentra la superficie de adhesión. Después es lavado a un pH similar al intracelular (aunque el PBS usado para realizar los lavados no se acerca a las condiciones citoplasmáticas a las cuales debe enfrentarse *in vivo*). Finalmente es cultivado en un medio semejante a la hemolinfa del mosquito (figura 17). Esto podría significar que los oocinetos, al mismo tiempo de ser purificados, estén pasando por condiciones semejantes a las cuales debe enfrentarse durante su trayectoria del bolo alimenticio a la lámina basal (saltándose la invasión intracelular). Esta metodología, por lo tanto,

representa un método más “natural” u “orgánico” para obtener oocinetos puros, que además refleja la condición fisiológica normal de los oocinetos para estudiarlos posteriormente.

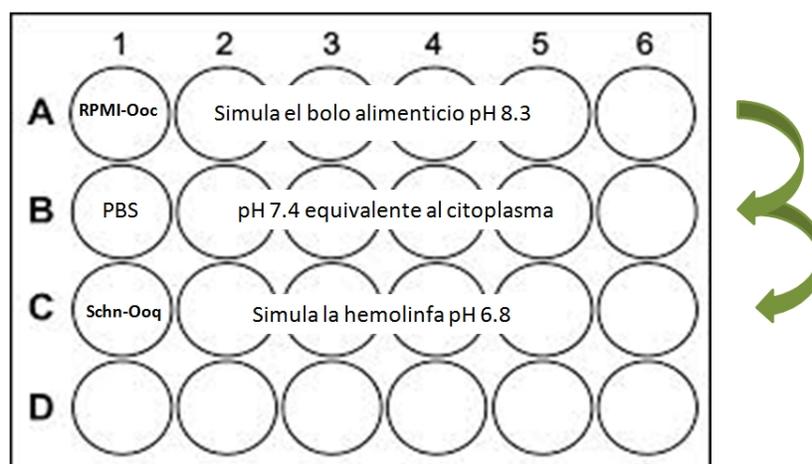


Figura 17. Simulación de un evento de invasión *in vitro*. Ya sea que el cultivo de oocinetos se purifique en pozos, cajas de Petri, tubos de fondo cónico, o cubreobjetos (como en este caso), se está simulando un evento de invasión *in vitro* en el cual el oocineto se encuentra en medio RPMI-Ooc, que es equivalente a las condiciones que encuentra en el bolo alimenticio junto con los eritrocitos y otras células contaminantes, para después encontrar, adherirse e invadir el sustituto de matriz extracelular. Después, con los lavados con PBS a pH fisiológico, el oocineto entra en contacto con condiciones semejantes al de las células epiteliales, para después ser cultivado bajo condiciones semejantes a las de la hemolinfa del mosquito al añadir medio Schn-Ooq.

Por último, el cultivo de oocinetos comienza con la extracción de la sangre del ratón y colocándola a 20 °C por 20 h a 24 h en medio RPMI-Ooc, tiempo en el cual se retira el cultivo y se coloca sobre las cajas recubiertas con ECM gel para la purificación, incubando entre 2 h y 4 h más. Considerando esto, se probó colocar la sangre de ratón infectada directamente sobre cajas recubiertas con ECM gel para cultivarlas por 24 h a 28 h y posteriormente realizar los lavados para purificar a los oocinetos. De esta manera se evitaría la transferencia del cultivo desde el matraz donde se incubaron los oocinetos a las cajas de purificación, permitiendo realizar el cultivo y purificación de oocinetos en un único recipiente. Al realizar este experimento con cuatro repeticiones partiendo de la sangre de un ratón cada uno, se observó que después de 24 h a 28 h no había oocinetos en la preparación final. En un experimento no se encontró nada en el pozo después de

los lavados, ni siquiera el ECM gel. En otros dos experimentos sí se encontró el ECM gel pero ningún oocineto, en cambio había unas esferas muy grandes (aproximadamente (50 a 60) μm de diámetro). Estos cuerpos esféricos parecían en ocasiones presentar protuberancias. El ECM gel alrededor de las esferas se veía como en forma de red y “jalada” hacia los cuerpos esféricos. Después de 24 h post purificación, estos cuerpos esféricos eran aún más grandes (entre (100 y 150) μm de diámetro). En el cuarto y último experimento se encontró todo un conglomerado de eritrocitos y parásitos que no se lograron disgregar. Hasta el momento no se sabe qué son estos cuerpos esféricos que crecen en tamaño, probablemente sean conglomerados muy densos de parásitos con eritrocitos, ECM gel y probablemente leucocitos. Es muy improbable que sean ooquistes debido a que naturalmente, el desarrollo de los ooquistes toma entre 10 d y 15 d para alcanzar diámetros de (50 a 60) μm . Además de estas observaciones se encontró en todos los casos que el revestimiento de ECM gel presentaba una forma distinta a la que normalmente se observa en un microscopio invertido con contraste de fases. Es probable que las proteasas del suero de ratón y los leucocitos estén degradando o modificando al ECM gel de alguna manera. En estas condiciones, el suero del ratón se encuentra en contacto con el ECM gel por 24 h a 28 h a diferencia de 2 h a 4 h durante la purificación convencional desarrollada.

6.2.7. Infección de mosquitos con oocinetos purificados.

Para determinar si los oocinetos purificados mediante ECM gel son aún capaces de invadir a los mosquitos, y para confirmar que los oocinetos purificados pueden formar ooquistes, se alimentaron mosquitos *A. albimanus* con oocinetos sin purificar y con oocinetos purificados. Se realizaron dos experimentos independientes en donde el cultivo de oocinetos que expresan constitutivamente la proteína verde fluorescente se separó en dos alícuotas; una para alimentar a los mosquitos directamente y la otra para purificar a los oocinetos y alimentar a los mosquitos posteriormente. Los oocinetos se purificaron en cajas de Petri de 63.62 cm^2 recubiertas con ECM gel diluido 1/5 con ECM buffer e incubando por 4 h para después lavar a los eritrocitos con PBS e incubar por 25 min con dispasa II a 2.4 U/ml. Para bloquear la reacción parcialmente (Alvarez, et al., 2006) y evitar la formación de conglomerados de ECM gel, se agregó EDTA a una concentración final de 4 mM y se lavó la caja 4 veces con 4 ml de PBS a 4 °C pipeteando vigorosamente. Después de la centrifugación de los oocinetos purificados y de los oocinetos no purificados, la concentración de oocinetos de ambas alícuotas se

ajustó a 900 oocinetos/ μ l para el primer experimento y a 350 oocinetos/ μ l para el segundo experimento. Además se ajustó el hematocrito a 5 % en todos los casos para que las alimentaciones fuesen equivalentes. El hematocrito se ajustó con la sangre de un ratón sano. 12 h post alimentación, se tomaron 5 mosquitos de cada grupo para verificar la presencia de oocinetos en el bolo alimenticio.

En el primer experimento fue evidente que los mosquitos alimentados con oocinetos purificados presentaban una menor cantidad de oocinetos (aunque no se cuantificaron), por lo que se sospecha que se sobre-estimó la cantidad de oocinetos purificados o viceversa. En el segundo experimento, ambos grupos presentaban la misma cantidad de oocinetos en el bolo alimenticio (175 ooc/ μ l) a las 12 h post alimentación. La gran mayoría de los oocinetos ya se encontraban en el tejido epitelial pero seguía habiendo oocinetos en el bolo alimenticio (no se cuantificó la proporción de oocinetos que había en el tejido o en el bolo alimenticio). Interesantemente, un 20 % de los oocinetos en el bolo alimenticio de los mosquitos alimentados con oocinetos purificados ya se encontraban en fase de *ookinete* (*transforming ookinete*, que ocurre cuando surge una protuberancia en el oocineto cuando comienza a diferenciarse a ooquiste (Carter, et al., 2007)) (figura 18). Probablemente estos oocinetos comenzaron su diferenciación ectópicamente en el bolo alimenticio y no invadieron el epitelio intestinal, explicando la disminución de la prevalencia, abundancia e intensidad en este grupo (figura 19).

Considerando solamente el segundo experimento, en el cual se tuvo la certeza de haber alimentado a los moscos con la misma cantidad de oocinetos, la prevalencia (que se calcula como el número de hospederos infectados sobre el número total de hospederos muestreados por 100) en los moscos alimentados con oocinetos purificados disminuyó 3.95 veces, mientras que la abundancia (que se calcula como el número de parásitos sobre el número total de hospederos muestreados) disminuyó 4.64 veces con respecto a los moscos alimentados con oocinetos sin purificar. La intensidad de la infección (que es el cociente entre el número de parásitos sobre el número de hospederos infectados) sólo disminuyó 1.17 veces. La diferencia entre la distribución acumulativa de la cantidad de ooquistes por mosco entre los dos tratamientos fue significativa (Komologórov-Smirnov $p < 0.05$). Varios investigadores se han planteado la hipótesis de que los componentes de la lámina basal le indican al oocineto que debe de comenzar a diferenciarse (p ej. ver: Arrighi y Hurd, 2002) por lo que es probable que con éste método de purificación basado en un sustituto de matriz extracelular, los oocinetos se condicionen a la diferenciación hacia ooquiste y por lo tanto se diferencien en el bolo alimenticio del mosquito.

Mosquitos alimentados con oocinetos

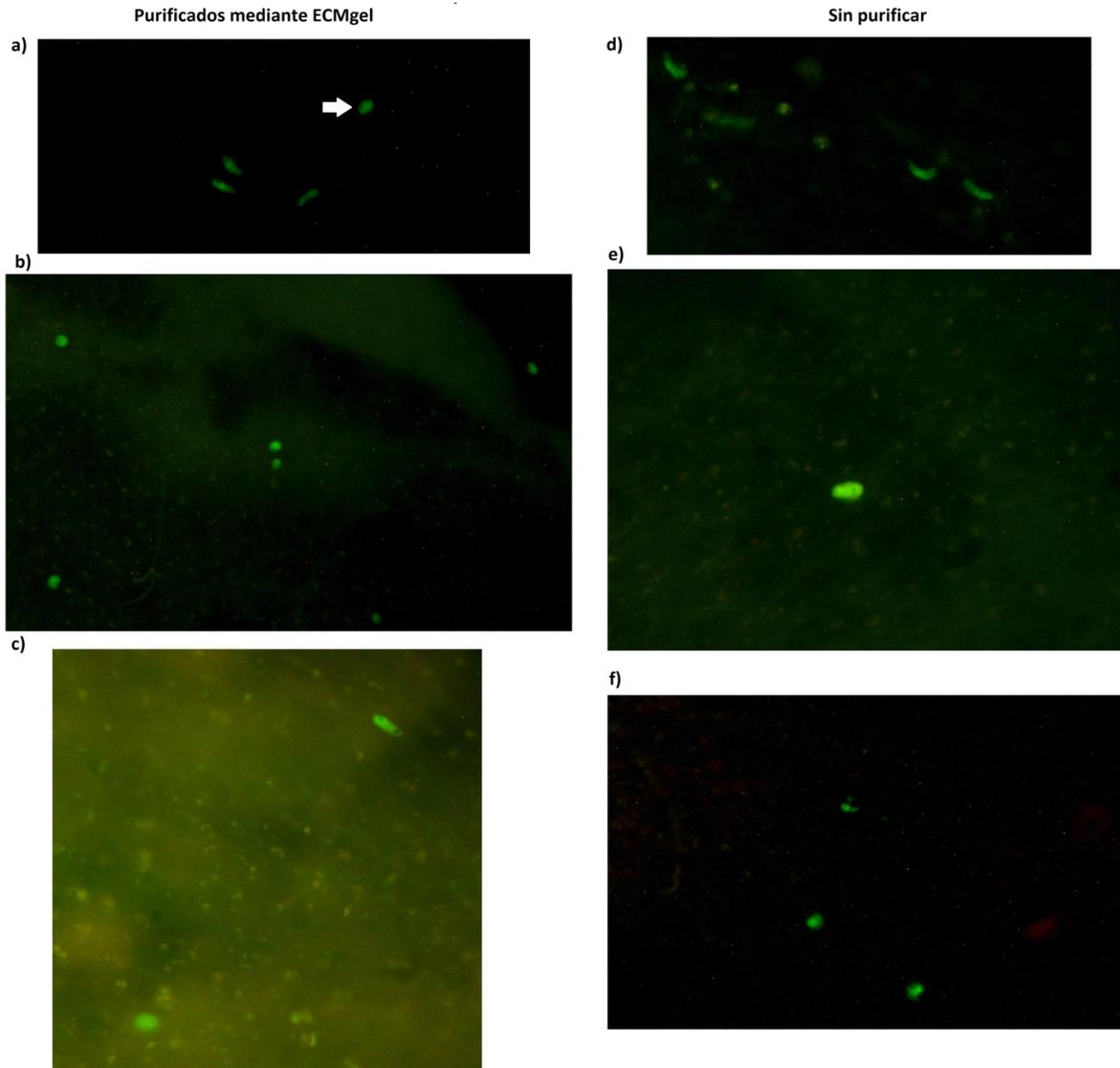


Figura 18. Infección de mosquitos con oocinetos purificados. Oocinetos en el bolo alimenticio a las 12 h post alimentación (hpa) en mosquitos alimentados con oocinetos purificados (**a**) y sin purificar (**d**). La flecha en (a) apunta a un took. Ooquistes en el epitelio intestinal de mosquitos alimentados con oocinetos purificados (**b**) y sin purificar (**e**) a las 48 hpa. Ooquistes y al parecer oocinetos en el epitelio intestinal de mosquitos alimentados con oocinetos purificados (**c**) y sin purificar (**d**) a las 72 hpa. Nótese que en el bolo alimenticio de los mosquitos alimentados con oocinetos sin purificar a las 12 hpa (d) hay otras fases del parásito mientras que en el bolo alimenticio de los mosquitos alimentados con oocinetos purificados a las 12 hpa (a) solamente hay oocinetos (y tooks). Imágenes representativas de dos experimentos independientes.

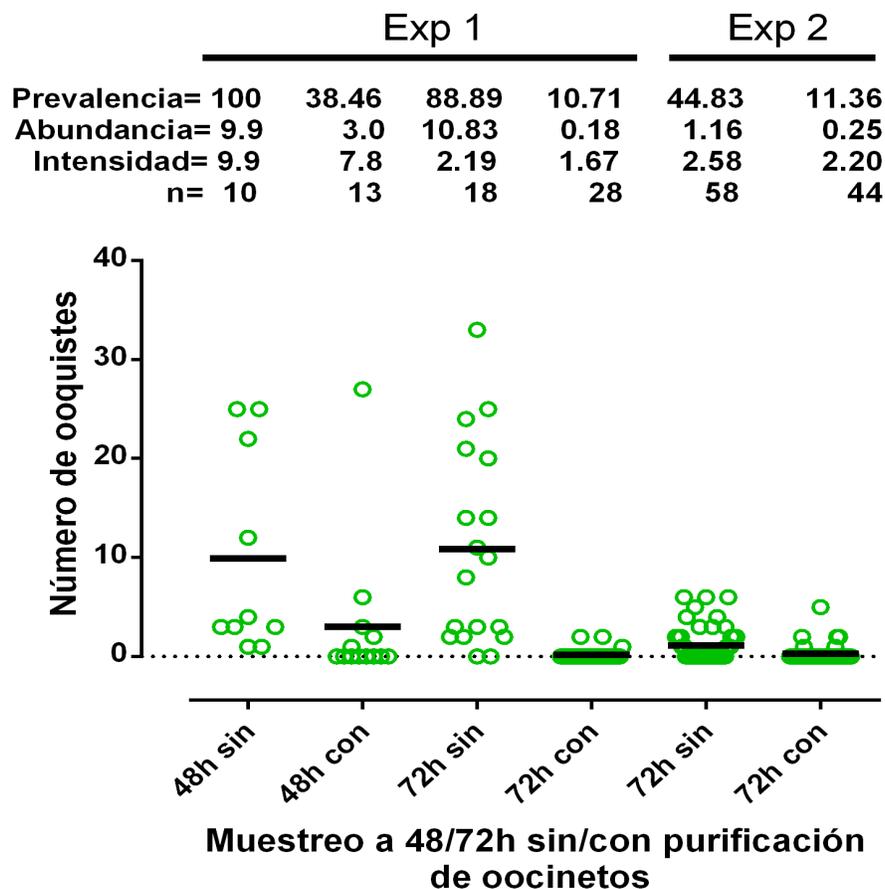


Figura 19. Número de ooquistes en intestinos de mosquitos alimentados con oocinetos purificados mediante ECM gel y sin purificación. Además de la muestra tomada a las 12 h para ambos experimentos, en el experimento 1 se tomó muestra a las 48 h y a las 72 h, sin embargo la cantidad inicial de oocinetos no fue la misma para los dos tratamientos debido a un error metodológico. En el experimento 2 los moscos se alimentaron con 350 ooc/ μ l y a las 12 h se encontraron 175 ooc/ μ l en los dos grupos. Solamente se compararon los grupos de 72 h sin purificación y con purificación del experimento 2 debido a que son los únicos grupos equivalentes. Las diferencias fueron significativas (prueba de Komologórov-Smirnov $p < 0.05$). Los puntos representan el numero de ooquistes en un sólo mosquito y las barras representan la media.

7. Conclusiones

A pesar de que el método de purificación de oocinetos utilizando un sustituto de matriz extracelular ya había sido implementado en 1993 por Warburg y Schneider como un resultado paralelo a su intención de cultivar ooquistes (Warburg y Schneider, 1993), en este trabajo se desarrolló y optimizó dicho método al punto de

poder predecir el rendimiento y la pureza partiendo de distintas condiciones iniciales en el cultivo de oocinetos, las cuales, en la praxis, presentan cierto grado de variación. El rendimiento y la pureza del cultivo presentan una relación positiva y lineal con respecto al tiempo de incubación (figura 7a y 7b), al número de lavados (únicamente para la pureza) (figura 7c y 7d) y a la concentración del ECM gel (figura 11c) utilizado para revestir las superficies; mientras que el buffer o medio de cultivo para diluir al ECM gel no presenta ninguna relación (figura 11a). Se comprobó que es posible utilizar convenientemente superficies tanto de plástico como de vidrio revestidas con ECM gel fresco o seco, estas últimas siguieron funcionando después de varios meses de refrigeración. El revestimiento de superficies con los componentes más abundantes de la lámina basal como el colágeno tipo IV y la laminina no permitió la recuperación de oocinetos (figuras 10a y 11a) por sí mismos, probablemente debido a la carencia de otros componentes de la lámina basal como la fibronectina, glicoproteínas y proteoglicanos. La interacción de estas moléculas con el oocineto no se ha estudiado tan extensamente como es el caso del colágeno y la laminina, por lo que se debe llevar a cabo más investigación al respecto.

La relación de eritrocitos por oocineto, que se puede traducir como el grado de contaminación del cultivo de oocinetos, resultó ser una variable de gran influencia tanto para la recuperación de oocinetos como para la pureza de la preparación, observándose que el rendimiento cae exponencialmente al aumentar dicha relación (figura 14), de manera que en los casos en los cuales se obtienen muy pocos oocinetos de partida, la mejor opción sería suspender la purificación. Con respecto a la cantidad de oocinetos que van a ser sembrados para su purificación, se observó que la recuperación de oocinetos (en números absolutos) aumenta logarítmicamente al incrementar la cantidad inicial de oocinetos, hasta que se alcanza un límite en el cual no es posible recuperar más. Este fenómeno ocasiona que la cantidad de oocinetos recuperados (en términos relativos porcentuales) presente una relación cuadrática con respecto al número inicial de oocinetos, seguido por una cola con comportamiento asintótico (figura 12). El efecto de diluir el cultivo de oocinetos es también en cierta medida el responsable de dichas observaciones, las cuales se hacen más evidentes al analizar la pureza de la preparación de oocinetos; en donde presenta una relación que parece estar invertida con respecto al porcentaje de recuperación, y que se caracteriza por las evidentes aglutinaciones de eritrocitos en las diluciones en las cuales se obtiene un mayor porcentaje de recuperación, imposibilitando por lo tanto la purificación adecuada de los oocinetos. En caso de que sea necesario diluir a los oocinetos

previamente a la purificación, debe evitarse diluir la sangre entre 50 y 100 veces (o el cultivo entre 10 y 20 veces) para evitar las aglutinaciones de eritrocitos.

La metodología de purificación puede escalarse para realizar micropurificaciones con tan sólo un microlitro de la sangre infectada de un ratón sin la necesidad de sacrificarlo. Además puede escalarse para realizar macropurificaciones de varios ratones con el inconveniente de gastar más ECM gel para recubrir superficies muy grandes. La recuperación de oocinetos presenta una relación positiva con la superficie disponible (figura 12f) a menos de que se diluya el cultivo, obteniendo entonces un fenómeno de aglutinación. Los oocinetos que no lograron adherirse al ECM gel en una primera purificación, pueden volverse a sembrar sobre el ECM gel para recuperar más, en un escenario en donde la agitación gentil del cultivo incrementó (aunque no significativamente) la recuperación de oocinetos. Aunado a esto, es posible obtener a los oocinetos purificados en suspensión mediante el protocolo que involucra la digestión del ECM gel mediante dispasa II y EDTA para evitar la formación de conglomerados. Este protocolo resultó en un método fácil y conveniente de purificación de oocinetos basado en el revestimiento de tubos de fondo cónico mediante centrifugación en el eje de rotación, permitiendo realizar todos los pasos en un sólo contenedor. Lamentablemente, no se logró realizar la purificación de oocinetos que fueron cultivados desde las cero horas de cultivo (es decir desde la maduración de los gametocitos y formación de los cigotos) por razones aún no conocidas. Tampoco se logró aumentar el rendimiento de la técnica empleando imanes de neodimio (figura 16).

Los oocinetos purificados mediante esta metodología fueron infectivos para los mosquitos, aunque en una menor medida con respecto a los oocinetos no purificados (figuras 18 y 19). Probablemente estas diferencias radiquen en que los oocinetos purificados mediante ECM gel ya entraron en contacto con los componentes de la lámina basal, condicionándolos a la diferenciación celular hacia ooquistes y provocando que los oocinetos se comenzaran a diferenciar en el bolo intestinal del mosquito (figura 18).

Por último, los oocinetos purificados y resuspendidos con dispasa II y EDTA no presentaron una menor viabilidad (medida con tinciones vitales) con respecto a los oocinetos solamente purificados (figura 9). Es probable que al medir otros aspectos de la fisiología celular del oocineto, sí se encuentren diferencias en los oocinetos tratados con dispasa II, EDTA y una sola centrifugación. Por ejemplo, no tenemos la certeza de que la membrana plasmática del oocineto no haya sido alterada por el tratamiento con dispasa II, o que el equilibrio iónico intracelular

no haya sido modificado por el tratamiento con EDTA. El motivo más fuerte para desarrollar y optimizar esta metodología radica en la obtención de oocinetos puros mínimamente manipulados, y en todo caso, siempre en condiciones que permitan no solo la supervivencia, sino también el desarrollo del oocineto, evitando la utilización de agentes químicos y físicos que puedan alterar su fisiología (figura 17). La comprobación de la alteración fisiológica del oocineto no se logró llevar a cabo en el presente trabajo y tendrá que realizarse en trabajos subsecuentes. Un aspecto adicional que debería tomarse en consideración en ensayos posteriores, es la determinación del grado de oxidación de los oocinetos durante los lavados con PBS para eliminar a las células contaminantes. Al retirar el medio de cultivo o PBS del contenedor, los oocinetos adheridos podrían entrar en contacto con una presión parcial de oxígeno mayor, lo que podría ocasionarles un choque oxidante.

En perspectiva, a pesar de estas posibles fuentes de estrés, se estableció un método sencillo y reproducible de purificación de oocinetos que permitirá realizar estudios bioquímicos, moleculares y celulares en condiciones muy cercanas a las basales del oocineto, con un mínimo grado de manipulación. Además de que probablemente, en trabajos subsecuentes, sea posible aumentar el rendimiento del cultivo de ooquistes y de esporozoítos *in vitro*, lo que permitiría incrementar el escaso conocimiento que se tiene del ooquiste, así como el desarrollo de vacunas que eviten la transmisión utilizando esporozoítos.

La aportación de esta investigación es que los oocinetos pueden purificarse de los otros componentes celulares del cultivo mediante el recubrimiento de superficies sólidas con ECM gel, sobre las cuales el cultivo de oocinetos es incubado. El ECM gel es invadido exclusivamente por los oocinetos, y las células contaminantes pueden descartarse bajo el fundamento de que, a diferencia de los otros componentes celulares del cultivo de oocinetos, los oocinetos son células especializadas para moverse e invadir tejidos. En esta técnica se aprovechan las características biológicas del oocineto para purificarlo (adhesión e invasión), en vez de utilizar métodos físicos o químicos, lo que permite mantener condiciones de cultivo apropiadas para el desarrollo del oocineto. Aunque no se lograron obtener en promedio purificaciones mayores al 80 % (excepto utilizando cubreobjetos y probablemente con cualquier superficie que no presente ángulos), la purificación mediante esta metodología resultó ser mucho más simple que otras reportadas en la literatura y requiere un mínimo entrenamiento para llevarlo a cabo. A pesar de que en promedio toma entre 4 h o 5 h, al menos 3 h son utilizadas en el tiempo de incubación.

Durante el desarrollo y optimización del método se llegó a la conclusión de que, entre todas las variantes que se probaron, no existe una mejor o peor manera de realizar la purificación utilizando ECM gel como sustrato de adhesión, en cambio, la metodología puede ajustarse, *mutatis mutandis*, a las necesidades del experimentador. Por ejemplo: si se necesitan muy pocos oocinetos, lo recomendable es utilizar el ECM gel muy diluido y superficies pequeñas, o incubando por 1 h o 2 h en vez de 3 h o 4 h. Si, por el contrario, se necesitan muchos oocinetos, lo recomendable sería utilizar el ECM gel más concentrado, tratando a su vez de aumentar la superficie de adhesión o aumentando el tiempo de incubación. Si los oocinetos se necesitan en suspensión, el método más sencillo sería utilizar los tubos de fondo cónico, para después desprender a los oocinetos mediante dispa II y EDTA. Pero, si no es posible realizar una centrifugación en el eje de rotación para recubrir el tubo, pueden utilizarse cajas de Petri. Si se necesita cultivar a los oocinetos durante un largo periodo de tiempo, o agregarles tratamientos específicos, lo recomendable sería utilizar cajas de Petri o cajas con pozos. Si se necesitan montar a los oocinetos en una laminilla para observarlos al microscopio, lo ideal sería utilizar cubreobjetos recubiertos con ECM gel (ver protocolos sugeridos en el Apéndice III). Como se muestra en estos ejemplos teóricos, la metodología resultó ser muy flexible, y permite realizar los cambios y ajustes necesarios *ad hoc* a cada diseño experimental.

8. Referencias

- Adini A., and Warburg A. 1999. "Interaction of *Plasmodium gallinaceum* Ookinetes and Oocysts with Extracellular Matrix Proteins." *Parasitology* 119: 331–36.
- Akman-Anderson L., Olivier M., and Luckhart S. 2007. "Induction of Nitric Oxide Synthase and Activation of Signaling Proteins in *Anopheles* Mosquitoes by the Malaria Pigment, Hemozoin." *Infection and Immunity* 75 (August): 4012–19. doi:10.1128/iai.00645-07.
- Akman-Anderson L., Vodovotz. 2008. "Bloodfeeding as an Interface of Mammalian and Arthropod Immunity." *Insect Immunology* Academic Press.
- Al-Olayan E.M., Williams G.T., and Hurd H. 2002. "Apoptosis in the Malaria Protozoan, *Plasmodium berghei*: A Possible Mechanism for Limiting Intensity of Infection in the Mosquito." *International Journal for Parasitology* 32: 1133–43.
- Ali M. Al-Olayan E.M., Lewis S., Matthews H., and Hurd H. 2010. "Naturally Occurring Triggers That Induce Apoptosis-Like Programmed Cell Death in *Plasmodium berghei* Ookinetes." *PLoS ONE* 5. doi:10.1371/journal.pone.0012634.
- Alvarez V.M., Von Der Weid I., Seldin L., and Santos A.L.S. 2006. "Influence of Growth Conditions on the Production of Extracellular Proteolytic Enzymes in *Paenibacillus peoriae* NRRL BD-62 and *Paenibacillus polymyxa* SCE2." *Letters in Applied Microbiology* 43 (6): 625–30. doi:10.1111/j.1472-765X.2006.02015.x.
- Angrisano F., Yan-Hong T., Sturm A., McFadden G.I., and Baum J. 2012. "Malaria Parasite Colonisation of the Mosquito Midgut – Placing the *Plasmodium* Ookinete Centre Stage." *International Journal for Parasitology* 42: 519–27.
- Arambaje S., Grant K., Pardo I., Ranford-Cartwright L., and Hurd H. 2009. "Malaria Ookinetes Exhibit Multiple Markers for Apoptosis-like Programmed Cell Death in Vitro." *Parasites & Vectors* 2: 32.
- Arrighi R.B.G., and Hurd H. 2002. "The Role of *Plasmodium berghei* Ookinete Proteins in Binding to Basal Lamina Components and Transformation into Oocysts." *International Journal for Parasitology* 32: 91–98.
- Arrighi R.B.G., Gareth L., Vassiliki M., Siden-Kiamos I., and Christos L. 2005. "Laminin and the Malaria Parasite's Journey Through the Mosquito Midgut." *Journal of Experimental Biology* 208: 2497-2502. doi:10.1242/jeb.01664.
- Axis-Shield. 2012. "Density Gradient Media" Ninth edition.
- Axis-Shield. 2013. "Purification of Malarial Parasites (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium berghei*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium yoelii*)." *Application Sheet C41, 6th Edition*.
- Axis-Shield. "Analyzing Nycodenz Density Gradient Media."
- Baker D.A. 2010. "Malaria Gametocytogenesis." *Molecular and Biochemical Parasitology* 172 (2): 57–65. doi:10.1016/j.molbiopara.2010.03.019.
- Bannister L.H., and Sherman I.W. 2009. "*Plasmodium*." In *eLS*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Bartoloni A., and Zammarchi L. 2012. "Clinical Aspects of Uncomplicated and Severe Malaria." *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases* 4 (1). doi:10.4084/MJHID.2012.026.
- Baton L.A., and Ranford-Cartwright L.C. 2005a. "How Do Malaria Ookinetes Cross the Mosquito Midgut Wall?" *Trends in Parasitology* 21: 22–28. doi:10.1016/j.pt.2004.11.001.
- Baton L.A., and Ranford-Cartwright L.C. 2005b. "Spreading the Seeds of Million-Murdering Death: Metamorphoses of Malaria in the Mosquito." *Trends in Parasitology* 21: 573–80.
- Baton L.A., and Ranford-Cartwright L.C. 2005c. "Do Malaria Ookinete Surface Proteins P25 and P28 Mediate Parasite Entry into Mosquito Midgut Epithelial Cells?" *Malaria Journal* 4 (1): 15. doi:10.1186/1475-2875-4-15.

- Becker K., Tilley L., Vennerstrom J.L., Roberts D., Rogerson S., and Ginsburg H. 2004. "Oxidative Stress in Malaria Parasite-Infected Erythrocytes: Host-parasite Interactions." *International Journal for Parasitology*, Annual Scientific Meeting of the Australian Society for Parasitology, Darwin, Carlton Hotel, The Esplande, 2003. Highlights., 34 (2): 163–89. doi:10.1016/j.ijpara.2003.09.011.
- Benedict M. 2014. *Methods in Anopheles Research*. 4th ed. MR4. <https://www.mr4.org/Publications/MethodsInAnophelesResearch.aspx>.
- Berger J. 2007. "Phenylhydrazine Haematotoxicity." *Journal of Applied Biomedicine* 5: 125–30.
- Billker O., Lindo V., Panico M., Etienne A.E., Paxton T., Dell A., Rogers M., Sinden R.E., and Morris H.R. 1998. "Identification of Xanthurenic Acid as the Putative Inducer of Malaria Development in the Mosquito." *Nature* 392: 289–92.
- Blanco A.R., Paez A., Gerold P., Dearsly A.L., Margos G., Schwarz R.T., Barker G., Rodriguez M.C., and Sinden R.E. 1999. "The Biosynthesis and Post-Translational Modification of Pbs21 an Ookinete-Surface Protein of *Plasmodium berghei*." *Molecular and Biochemical Parasitology* 98 (2): 163–73. doi:10.1016/S0166-6851(98)00162-5.
- Bounkeua V., Fengwu L., and Vinetz J.M. 2010. "In Vitro Generation of *Plasmodium falciparum* Ookinetes." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 83 (December): 1187–94. doi:10.4269/ajtmh.2010.10-0433.
- Boysen K.E., and Matuschewski K. 2011. "Arrested Oocyst Maturation in *Plasmodium* Parasites Lacking Type II NADH:Ubiquinone Dehydrogenase." *Journal of Biological Chemistry* 286 (September): 32661–71. doi:10.1074/jbc.M111.269399.
- Canning E.U., and Sinden R.E. 1973. "The Organization of the Ookinete and Observations on Nuclear Division in Oocysts of *Plasmodium berghei*." *Parasitology* 67: 29–40. doi:10.1017/S0031182000046266.
- Carter V., Hazel C., Underhill B.A., Williams J., and Hurd H. 2003. "Isolation of *Plasmodium berghei* Ookinetes in Culture Using Nycodenz Density Gradient Columns and Magnetic Isolation." *Malaria Journal* 2: 35.
- Carter V., Nacer A.M.L., Underhill B.A., Sinden R.E., and Hurd H. 2007. "Minimum Requirements for Ookinete to Oocyst Transformation in *Plasmodium*." *International Journal for Parasitology* 37: 1221–32.
- Carter V., Shoichi S., Meiji A., and Dessens J.T. 2008. "PbSR Is Synthesized in Macrogametocytes and Involved in Formation of the Malaria Crystalloids." *Molecular Microbiology* 68: 1560–69. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06254.x.
- Casas-Martínez M., y Orozco-Bonilla A. 2006. "Diversidad Y Distribución Geográfica Del Género *Anopheles* En El Sur de México." *CONABIO Biodiversitas* 67: 12–15.
- "Centrifugal Casting [SubsTech]." 2015. Accessed August 1 2015. http://www.substech.com/dokuwiki/doku.php?id=centrifugal_casting.
- Chernyshev A.V., Tarasov P.A., Semianov K.A., Nekrasov V.M., Hoekstra A.G., and Maltsev V.P. 2008. "Erythrocyte Lysis in Isotonic Solution of Ammonium Chloride: Theoretical Modeling and Experimental Verification." *Journal of Theoretical Biology* 251: 93–107. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2007.10.016.
- Coatney G.R., and Roudabush R.L. 1936. "A Catalog and Host-Index of the Genus *Plasmodium*." *The Journal of Parasitology* 22: 338–53. doi:10.2307/3271859.
- Crampton J., Beard C., and Louis C. 1997. "The Molecular Biology of Insect Disease Vectors A Methods Manual," 578. doi:10.1007/978-94-009-1535-0.
- Dearsly A.L., Nicholas J., and Sinden R.E. 1987. "Sexual Development in *Plasmodium berghei*: The Use of Mitomycin c to Separate Infective Gametocytes in Vivo and Ookinetes in Vitro." *International Journal for Parasitology* 17: 1307–12. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0020-7519(87)90096-8.

- Dessens J.T., Beetsma A.L., Dimopoulos G., Wengelnik K., Crisanti A., Kafatos F.C., and Sinden R.E. 1999. "CTRP Is Essential for Mosquito Infection by Malaria Ookinetes." *The EMBO Journal* 18 (22): 6221–27. doi:10.1093/emboj/18.22.6221.
- Dessens J.T., Saeed S., Tremp A.Z., and Carter V. 2011. "Malaria Crystalloids: Specialized Structures for Parasite Transmission?" *Trends in Parasitology* 27: 106–10.
- Dessens J.T., Sidén-Kiamos I., Mendoza J., Vassiliki M., Khater E., Vlachou D., Xiao-Jin X., et al. 2003. "SOAP, a Novel Malaria Ookinete Protein Involved in Mosquito Midgut Invasion and Oocyst Development." *Molecular Microbiology* 49: 319–29. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03566.x.
- Dimopoulos G. 2003. "Insect Immunity and Its Implication in Mosquito–malaria Interactions." *Cellular Microbiology* 5: 3–14. doi:10.1046/j.1462-5822.2003.00252.x.
- Escalante A.A., Krief S., Pacheco M.A., Mugisha L., André C., Halbwax M., Fischer A., et al. 2010. "On the Diversity of Malaria Parasites in African Apes and the Origin of *Plasmodium falciparum* from Bonobos." *PLoS Pathog* 6. doi:10.1371/journal.ppat.1000765.
- Flanagan J.P., and Lessler M.A. 1970. "Controlled Phenylhydrazine-Induced Reticulocytosis in the Rat." *The Ohio Journal of Science* 70: 300–304.
- Foggie T., and Achee N. 2009. "Standard Operating Procedures: *Aedes aegypti* Colony - Insectary." Uniformed Services University. <https://www.usuhs.edu/sites/default/files/media/pmb/pdf/insectarysop.pdf>.
- Franke-Fayard B., Trueman H., Ramesar J., Mendoza J., Van der Keur M., Van der Linden R., Sinden R.E., Waters A.P., and Janse C.J. 2004. "A *Plasmodium berghei* Reference Line That Constitutively Expresses GFP at a High Level throughout the Complete Life Cycle." *Molecular and Biochemical Parasitology* 137 (1): 23–33. doi:10.1016/j.molbiopara.2004.04.007.
- Freyvogel T.A. 1966. "Shape, Movement in Situ and Locomotion of Plasmodial Ookinetes." *Acta Tropica* 23 (3): 201–22.
- Fukuda S., and Schmid-Schönbein G.W. 2002. "Centrifugation Attenuates the Fluid Shear Response of Circulating Leukocytes." *Journal of Leukocyte Biology* 72 (July): 133–39.
- Gholizadeh S., Djadid N., Basseri H., Zakeri S., and Ladoni H. 2009. "Analysis of von Willebrand Factor A Domain-Related Protein (WARP) Polymorphism in Temperate and Tropical *Plasmodium vivax* Field Isolates." *Malaria Journal* 8: 137.
- Ghosh A.K., Coppens I., Gårdsvoll H., Ploug M., and Jacobs-Lorena M. 2011. "*Plasmodium* Ookinetes Coopt Mammalian Plasminogen to Invade the Mosquito Midgut." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (41): 17153–58. doi:10.1073/pnas.1103657108.
- Gilmore A.P. 2005. "Anoikis." *Cell Death & Differentiation* 12 (S2) 1473-1477. doi: 10.1038/sj.cdd.4401723
- Hall N., Karras M., Raine J.D., Carlton J.M., Kooij T.W.A., Berriman M., Florens L., et al. 2005. "A Comprehensive Survey of the *Plasmodium* Life Cycle by Genomic, Transcriptomic, and Proteomic Analyses." *Science* 307 (January): 82–86. doi:10.1126/science.1103717.
- Hedrick P.W. 2011. "Population Genetics of Malaria Resistance in Humans." *Heredity* 107 (4): 283–304. doi:10.1038/hdy.2011.16.
- Heidelberger M., and Kabat E.A. 1936. "Chemical Studies in Bacterial Agglutination. III. A Quantitative Theory of Bacterial Agglutination." *Experimental Biology and Medicine* 35 (November): 301–3. doi:10.3181/00379727-35-8948p.
- Heidelberger M., and Kendall F.E. 1935. "A Quantitative Theory of the Precipitin Reaction : II. A Study of an Azoprotein-Antibody System." *The Journal of Experimental Medicine* 62: 467–83.
- "Heparin Unit Definition | Drugs.com." 2015. Accessed August 1 2015. <http://www.drugs.com/dict/heparin-unit.html>.
- Hernández-Romano J., Rodríguez M.H., Pando V., Torres-Monzón J.A., Alvarado-Delgado A., Lecona A.N.V., Argotte R.R., Martínez-Barnetche J., and Rodríguez M.C. 2011. "Conserved Peptide

- Sequences Bind to Actin and Enolase on the Surface of *Plasmodium berghei* Ookinetes.” *Parasitology* 138 (11): 1341–53. doi:10.1017/S0031182011001296.
- Hitachi. 2003. “Easy Preparation of Density Gradient Using Nycodenz.” *Himac Application* 109.
- Horrocks P., and Merrick C. 2015. “Throwing the Switch: Gametocytogenesis in Malaria Parasites.” *BugBitten*. Accessed August 1 2015. <http://blogs.biomedcentral.com/bugbitten/2014/04/01/throwing-the-switch-gametocytogenesis-in-malaria-parasites/>.
- Hughes C.S., Postovit L.M., and Lajoie G.A. 2010. “Matrigel: A Complex Protein Mixture Required for Optimal Growth of Cell Culture.” *PROTEOMICS* 10: 1886–90. doi:10.1002/pmic.200900758.
- Hurd H., Al-Olayan E., and Butcher G.A. 2003. “In Vitro Methods for Culturing Vertebrate and Mosquito Stages of *Plasmodium*.” *Microbes and Infection* 5 (4): 321–27. doi:10.1016/S1286-4579(03)00034-0.
- Ishino T., Orito Y., Chinzei Y., and Yuda M. 2006. “A Calcium-Dependent Protein Kinase Regulates *Plasmodium* Ookinete Access to the Midgut Epithelial Cell.” *Molecular Microbiology* 59: 1175–84. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.05014.x.
- Izadi E. 2015. “How (and Why) Chemists Figured out How to Unboil an Egg.” *The Washington Post*, January 28. <http://www.washingtonpost.com/news/speaking-of-science/wp/2015/01/28/how-and-why-chemists-figured-out-how-to-unboil-an-egg/>.
- Janse C., Ramesar J., and Waters A. 2004. “*Plasmodium berghei*: General Parasitological Methods.” *Leiden University Medical Center*.
- Janse C.J., Mons B., Rouwenhorst R.J., Van der Klooster P.F.J., Overdulve J.P., and Van der Kaay H.J. 1985a. “In Vitro Formation of Ookinetes and Functional Maturity of *Plasmodium berghei* Gametocytes.” *Parasitology* 91: 19–29. doi:10.1017/S0031182000056481.
- Janse C.J., Rouwenhorst R.J., Van der Klooster P.F.J., Van der Kaay H.J., and Overdulve J.P. 1985b. “Development of *Plasmodium berghei* Ookinetes in the Midgut of *Anopheles atroparvus* Mosquitoes and in Vitro.” *Parasitology* 91: 219–25. doi:10.1017/S0031182000057322.
- Janse C.J., and Waters A.P. 1995. “*Plasmodium berghei*: The Application of Cultivation and Purification Techniques to Molecular Studies of Malaria Parasites.” *Parasitology Today* 11: 138–43. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0169-4758(95)80133-2.
- Jayaraman V., Bulusu V., and Balaram H. 2012. “Crosstalk between Purine Nucleotide Metabolism and Mitochondrial Pathways in *Plasmodium falciparum*.” *Current Science* 102: 757–66.
- Kamlesh. 2015. “Centrifugal Casting.” Accessed August 1 2015. <http://efoundry.iitb.ac.in/TechnicalPapers/dissertations/Kamlesh-CentrifugalCasting.pdf>.
- Kan A., Yan-Hong T., Angrisano F., Hanssen E, Rogers K.L, Whitehead L., Mollard V.P, et al. 2014. “Quantitative Analysis of *Plasmodium* Ookinete Motion in Three Dimensions Suggests a Critical Role for Cell Shape in the Biomechanics of Malaria Parasite Gliding Motility.” *Cellular Microbiology* 16 (5): 734–50. doi:10.1111/cmi.12283.
- Kaneko O., Templeton T.J., Iriko H., Tachibana M., Otsuki H., Takeo S., Sattabongkot J., Torii M., and Tsuboi T.. 2006. “The *Plasmodium vivax* Homolog of the Ookinete Adhesive Micronemal Protein, CTRP.” *Parasitology International* 55 (3): 227–31. doi:10.1016/j.parint.2006.04.003.
- Kapoor G., and Banyal H.S. 2009. “Glutathione Reductase and Thioredoxin Reductase: Novel Antioxidant Enzymes from *Plasmodium berghei*.” *Korean J Parasitol* 47: 421–24.
- Keeley A., and Soldati D. 2004. “The Glideosome: A Molecular Machine Powering Motility and Host-Cell Invasion by Apicomplexa.” *Trends in Cell Biology* 14 (10): 528–32. doi:10.1016/j.tcb.2004.08.002.
- Kim C., Wilson E., and DeRisi J.. 2010. “Improved Methods for Magnetic Purification of Malaria Parasites and Haemozoin.” *Malaria Journal* 9: 17.

- Kooij T.W.A., Janse C.J., and Waters A.P. 2006. “*Plasmodium* Post-Genomics: Better the Bug You Know?” *Nat Rev Micro* 4: 344–57.
doi:http://www.nature.com/nrmicro/journal/v4/n5/supinfo/nrmicro1392_S1.html.
- Kotsyfakis M., Ehret-Sabatier L., Sinden-Kiamos I., Mendoza J., Sinden R.E., and Louis C. 2005. “*Plasmodium berghei* Ookinetes Bind to *Anopheles gambiae* and *Drosophila melanogaster* Annexins.” *Molecular Microbiology* 57 (1): 171–79. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04664.x.
- Kreier J.P. 1977. “The Isolation and Fractionation of Malaria-Infected Cells.” *Bulletin of the World Health Organization* 55: 317–31.
- Kumar S., Molina-Cruz A., Gupta L., Rodrigues J., and Barillas-Mury C. 2010. “A Peroxidase/Dual Oxidase System Modulates Midgut Epithelial Immunity in *Anopheles gambiae*.” *Science* 327 (March): 1644–48. doi:10.1126/science.1184008.
- Lal K., Prieto J.H., Bromley E., Sanderson S.J., Yates J.R., Wastling J.M., Tomley F.M., and Sinden R.E. 2009. “Characterisation of *Plasmodium* Invasive Organelles; an Ookinete Microneme Proteome.” *PROTEOMICS* 9 (5): 1142–51. doi:10.1002/pmic.200800404.
- Leclerc M.C., Hugot J.P., Durand P., and Renaud F.. 2004. “Evolutionary Relationships between 15 *Plasmodium* Species from New and Old World Primates (including Humans): An 18S rDNA Cladistic Analysis.” *Parasitology* 129 (Pt 6): 677–84.
- Lecona A.N., Rodríguez M.H., Argotte R.S., Alvarado A., and Rodríguez M.C. 2010. “*Plasmodium berghei* Ookinetes Glide and Release Pbs25 and Circumsporozoite Thrombospondin-Related Protein on Solid Surface Substrata.” *Journal of Parasitology* 96 (1): 216–18. doi:10.1645/GE-2193.1.
- Lee D.H., Park J.C., and Suh H.. 2001. “Effect of Centrifugal Force on Cellular Activity of Osteoblastic MC3T3-E1 Cells in Vitro.” *Yonsei Med J* 42: 405–10.
- Leite M., Quinta-Costa M., Leite P.S., and Guimarães J.E. 1999. “Critical Evaluation of Techniques to Detect and Measure Cell Death--Study in a Model of UV Radiation of the Leukaemic Cell Line HL60.” *Analytical Cellular Pathology: The Journal of the European Society for Analytical Cellular Pathology* 19 (3-4): 139–51.
- Li F., Templeton T.J., Popov V., Comer J.E., Tsuboi T., Torii M., and Vinetz J.M. 2004. “*Plasmodium* Ookinete-Secreted Proteins Secreted through a Common Micronemal Pathway Are Targets of Blocking Malaria Transmission.” *Journal of Biological Chemistry* 279 (25): 26635–44. doi:10.1074/jbc.M401385200.
- Liu K., Peng-cheng L., Liu R., and Wu X. 2015. “Dual AO/EB Staining to Detect Apoptosis in Osteosarcoma Cells Compared with Flow Cytometry.” *Medical Science Monitor Basic Research* 21 (February): 15–20. doi:10.12659/MSMBR.893327.
- Ludewig S., Chanutin A. 1949. “Factors Influencing the Agglutination of Red Blood Cells, Red Blood Cells Stroma, and Lymphocytes.” *Journal of Biological Chemistry* 179: 271-278.
- Lundahl J., Halldén G., Hallgren M., Sköld C.M., and Hed J. 1995. “Altered Expression of CD11b/CD18 and CD62L on Human Monocytes after Cell Preparation Procedures.” *Journal of Immunological Methods* 180: 93–100. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)00303-E](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(94)00303-E).
- Mannuzza F.J., Flaherty P., Ilsley S.R., and Kramer M.L. 2004. Coated membrane for assessing the invasive capacity of a cell. US6740501 B2, filed August 29, 2001, and issued May 25, 2004. <http://www.google.com.ar/patents/US6740501>.
- Marquardt W.H. 2004. *Biology of Disease Vectors*. Elsevier Science.
- Mathias D.K., Pastrana-Mena R., Ranucci E., Tao D., Ferruti P., Ortega C., Staples G.O., et al. 2013. “A Small Molecule Glycosaminoglycan Mimetic Blocks *Plasmodium* Invasion of the Mosquito Midgut.” *PLoS Pathog* 9 (11): e1003757. doi:10.1371/journal.ppat.1003757.

- Matthews H., Ali M., Carter V., Underhill A., Hunt J., Szor H., and Hurd H.. 2012. "Variation in Apoptosis Mechanisms Employed by Malaria Parasites: The Roles of Inducers, Dose Dependence and Parasite Stages." *Malaria Journal* 11: 297.
- Merrick C.J., and Duraisingh M.T. 2010. "Epigenetics in *Plasmodium*: What Do We Really Know?" *Eukaryotic Cell* 9 (8): 1150–58. doi:10.1128/EC.00093-10.
- Moll K. 2013. "Freezing and Thawing of Asexual *Plasmodium* spp." In *Methods In Malaria Research*, 6th ed., 17–18. EVIMalaR.
- Mons B., Boorsma E.G., and Van der Kaay H.J. 1985. "Studies on the Loss of Sexual Capacity in the ANKA Isolate of *Plasmodium berghei* and the Reversibility of the Process." *Annales De La Société Belge De Médecine Tropicale* 65 Suppl 2: 1–6.
- Mouse Phenome Database. 2009. "Phenotype Strain Survey Data Listing – Metabolism Temperature." Accessed September 6 2015. <http://phenome.jax.org/db/q?rtn=meas/catlister&req=Cmetabolism&reqstrainedid=5>.
- Mueller H.M. 2006. "Instructions for the Culture of My *Anopheles gambiae* Cell Lines." http://openwetware.org/wiki/Kafatos:Instructions_for_Anopheles_gambiae_cell_lines.
- Müller S. 2004. "Redox and Antioxidant Systems of the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*." *Molecular Microbiology* 53: 1291–1305. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04257.x.
- Munderloh U.G., and Kurtti T.J. 1987. "The Infectivity and Purification of Cultured *Plasmodium berghei* Ookinetes." *The Journal of Parasitology* 73: 919–23. doi:10.2307/3282511.
- Murayama K., Fujimura T., Morita M., and Shindo N.. 2001. "One-Step Subcellular Fractionation of Rat Liver Tissue Using a Nycodenz Density Gradient Prepared by Freezing-Thawing and Two-Dimensional Sodium Dodecyl Sulfate Electrophoresis Profiles of the Main Fraction of Organelles." *ELECTROPHORESIS* 22: 2872–80. doi:10.1002/1522-2683(200108)22:14<2872::aid-elps2872>3.0.co;2-d.
- Nacer A., Underhill A., and Hurd H. 2008. "The Microneme Proteins CTRP and SOAP Are Not Essential for *Plasmodium berghei* Ookinete to Oocyst Transformation in Vitro in a Cell Free System." *Malaria Journal* 7: 82.
- Nadjm B., and Behrens R.H. 2012. "Malaria:: An Update for Physicians." *Infectious Disease Clinics of North America*, Tropical Diseases, 26 (2): 243–59. doi:10.1016/j.idc.2012.03.010.
- Nayak M.D., Sushma B., Chethan M., Shashikiran U. 2014. "Cold Agglutinins Associated With *Plasmodium falciparum* Malaria: A Case Report." *International Journal of Scientific and Research Publications* 4 (3).
- Nzila A., and Mwai L.. 2010. "In Vitro Selection of *Plasmodium falciparum* Drug-Resistant Parasite Lines." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65 (3): 390–98. doi:10.1093/jac/dkp449.
- Olszewski K.L., Mather M.W., Morrisey J.M., Garcia B.A., Vaidya A.B., Rabinowitz J.D., and Llinas M. 2010. "Branched Tricarboxylic Acid Metabolism in *Plasmodium falciparum*." *Nature* 466: 774–78.
- Painter H.J., Campbell T.L., Llinás M. 2011. "The Apicomplexan AP2 Family: Integral Factors Regulating *Plasmodium* Development." *Molecular and Biochemical Parasitology* 176: 1-7.
- Patra K.P., and Vinetz J.M. 2012. "New Ultrastructural Analysis of the Invasive Apparatus of the *Plasmodium* Ookinete." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 87 (3): 412–17. doi:10.4269/ajtmh.2012.11-0609.
- Pembrey R.S., Marshall K.C., and Schneider R.P. 1999. "Cell Surface Analysis Techniques: What Do Cell Preparation Protocols Do to Cell Surface Properties?" *Applied and Environmental Microbiology* 65 (7): 2877–94.
- "Precipitin Reaction." 2015. Accessed August 1 2015. <http://what-when-how.com/molecular-biology/precipitin-reaction-molecular-biology/>.

- Raibaud A., Lupetti P., Paul R.E., Mercati D., Brey P.T., Sinden R.E., Heuser J.E., and Dallai R. 2001. "Cryofracture Electron Microscopy of the Ookinete Pellicle of *Plasmodium gallinaceum* Reveals the Existence of Novel Pores in the Alveolar Membranes." *Journal of Structural Biology* 135 (1): 47–57. doi:10.1006/jsbi.2001.4396.
- Recio-Tótoro B. 2012. "Comparación de los compuestos biofósfatos de bajo peso molecular en oocinetos de *Plasmodium berghei* sometidos a condiciones de estrés oxidante." Tesis. México: Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Roberts D.J., Pain A., Kai O., Kortok M., Marsh K. 2000. "Autoagglutination of Malaria-Infected Red Blood Cells and Malaria Severity." *The Lancet* 355 (9213): 1427-1428. doi:10.1016/S0140-6736(00)02143-7.
- Rodríguez M.C., Gerold P., Dessens J., Kurtenbach K., Schwartz R.T., Sinden R.E., and Margos G. 2000. "Characterisation and Expression of Pbs25, a Sexual and Sporogonic Stage Specific Protein of *Plasmodium berghei*." *Molecular and Biochemical Parasitology* 110 (1): 147–59. doi:10.1016/S0166-6851(00)00265-6.
- Rodríguez M.C., Margos G., Compton H., Ku M., Lanz H., Rodríguez M.H., and Sinden R.E. 2002. "*Plasmodium berghei*: Routine Production of Pure Gametocytes, Extracellular Gametes, Zygotes, and Ookinetes." *Experimental Parasitology* 101: 73–76.
- Roll Back Malaria Partnership (RBM). 2008. "Global Malaria Action Plan." www.rollbackmalaria.org.
- Ross R. 1902. "Researches on Malaria." *Noble Lecture*.
- Saeed S., Carter V., Tremp A.Z., and Dessens J.T. 2010. "*Plasmodium berghei* Crystalloids Contain Multiple LCCL Proteins." *Molecular and Biochemical Parasitology* 170: 49–53.
- Secretaría de Salud. 2015. "Semana 53 Del 28 de Diciembre Al 3 de Enero." *Boletín Epidemiológico* 31.
- Shahabuddin M., and Costero A. 2001. "Spatial Distribution of Factors That Determine Sporogonic Development of Malaria Parasites in Mosquitoes." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31: 231–40.
- Shah S. 2010. "The Fever: How Malaria Has Ruled Humankind for 500,000 Years". *Farrar, Straus and Giroux*.
- Shim H., and Fairlamb A.H. 1988. "Levels of Polyamines, Glutathione and Glutathione-Spermidine Conjugates during Growth of the Insect Trypanosomatid *Crithidia fasciculata*." *Journal of General Microbiology* 134: 807–8 17.
- Siden-Kiamos I., Vlachou D., Margos G., Beetsma A., Waters A.P., Sinden R.E., and Louis C. 2000. "Distinct Roles for pbs21 and pbs25 in the in Vitro Ookinete to Oocyst Transformation of *Plasmodium berghei*." *Journal of Cell Science* 113 (October): 3419–26.
- Sinclair J.A., Henderson C., Tettey J.N.A., and Grant M.H. 2013. "The Influence of the Choice of Digestion Enzyme Used to Prepare Rat Hepatocytes on Xenobiotic Uptake and Efflux." *Toxicology in Vitro* 27 (1): 451–57. doi:10.1016/j.tiv.2012.07.012.
- Sinden R.E. 1974. "Excystation by Sporozoites of Malaria Parasites." *Nature* 252: 314–314.
- Sinden R.E. 2004. "A Proteomic Analysis of Malaria Biology: Integration of Old Literature and New Technologies." *International Journal for Parasitology, Malaria: A Grand Challenge*, 34 (13–14): 1441–50. doi:10.1016/j.ijpara.2004.10.005.
- Sinden R.E., Hartley R.H., and Winger L. 1985. "The Development of *Plasmodium* Ookinetes in Vitro: An Ultrastructural Study Including a Description of Meiotic Division." *Parasitology* 91: 227–44. doi:doi:10.1017/S0031182000057334.
- Sinden R.E. 1984. "The Biology of *Plasmodium* in the Mosquito." *Experientia* 40: 1330–43.
- Sinden R.E., and Billingsley P.F. 2001. "*Plasmodium* Invasion of Mosquito Cells: Hawk or Dove?" *Trends in Parasitology* 17: 209–11.

- Smith R.C., and Jacobs-Lorena M. 2010. "Chapter 4 - *Plasmodium*–Mosquito Interactions: A Tale of Roadblocks and Detours." In *Advances in Insect Physiology*, edited by J. Simpson Stephen, Volume 39:119–49. Academic Press.
- Smith R.C., Vega-Rodríguez J., and Jacobs-Lorena M. 2014. "The *Plasmodium* Bottleneck: Malaria Parasite Losses in the Mosquito Vector." *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 0 (April).
- Sripawat K., Kaewpongsri S., Suwanarusk R., Leimanis M., Lek-Uthai U., Phyo A., Snounou G., Russell B., Renia L., and Nosten F. 2009. "Effective and Cheap Removal of Leukocytes and Platelets from *Plasmodium vivax* Infected Blood." *Malaria Journal* 8: 115.
- Stanley J. 2002. "Essentials of Immunology and Serology." *Cengage Learning* 564pp. ISBN: 978-0-7668-1064-8.
- Sturm A., Mollard V.P., Cozijnsen A., Goodman C.D., and McFadden G.I. 2015. "Mitochondrial ATP Synthase Is Dispensable in Blood-Stage *Plasmodium berghei* Rodent Malaria but Essential in the Mosquito Phase." *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Sullivan D., and Krishna S. 2006. "Malaria: Drugs, Disease and Post-Genomic Biology". *Springer*.
- Talman A.M., Domarle O., McKenzie F.E., Arie F., and Robert V.. 2004. "Gametocytogenesis : The Puberty of *Plasmodium falciparum*." *Malaria Journal* 3 (1): 24. doi:10.1186/1475-2875-3-24.
- Templeton T.J., Keister D.B., Muratova O., Procter J.L., and Kaslow D.C. 1998. "Adherence of Erythrocytes during Exflagellation of *Plasmodium falciparum* Microgametes Is Dependent on Erythrocyte Surface Sialic Acid and Glycophorins." *The Journal of Experimental Medicine* 187 (May): 1599–1609. doi:10.1084/jem.187.10.1599.
- The Tree of Life Web Project. Accessed August 25 2013. <http://tolweb.org/Plasmodium/68071>.
- Thompson A., Taylor B. N. 2008. The NIST guide for the Use of the International System of Units (SI). NIST Special Publication 811. National Institute of Standards and Technology. Accessed November 3 2015. <http://physics.nist.gov/Pubs/SP811/sec07.html>.
- Tomas A.M., Margos G., Dimopoulos G., Van Lin L.H., de Koning-Ward T.F., Sinha R., Lupetti P., et al. 2001. "P25 and P28 Proteins of the Malaria Ookinete Surface Have Multiple and Partially Redundant Functions." *The EMBO Journal* 20 (15): 3975–83. doi:10.1093/emboj/20.15.3975.
- Trottein F., Triglia T., and Cowman A.F. 1995. "Molecular Cloning of a Gene from *Plasmodium falciparum* That Codes for a Protein Sharing Motifs Found in Adhesive Molecules from Mammals and Plasmodia." *Molecular and Biochemical Parasitology* 74: 129–41. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0166-6851(95)02489-1.
- Tsuboi T., Kaslow D.C., Gozar M.M., Tachibana M., Cao Y.M., and Torii M. 1998. "Sequence Polymorphism in Two Novel *Plasmodium vivax* Ookinete Surface Proteins, Pvs25 and Pvs28, That Are Malaria Transmission-Blocking Vaccine Candidates." *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)* 4 (12): 772–82.
- Vega-Rodríguez J., Franke-Fayard B., Dinglasan R.R., Janse C.J., Pastrana-Mena R., Waters A.P., Coppens I., Rodríguez-Orengo J.F., Jacobs-Lorena M., Serrano A.E. 2009. "The Glutathione Biosynthetic Pathway of *Plasmodium* is Essential for Mosquito Transmission." *PloS Pathogens* 5. doi:doi:10.1371/journal.ppat.1000302.
- Venkatesan M., Amaratunga C., Campino S., Auburn S., Koch O., Lim P., Sambunny U., et al. 2012. "Using CF11 Cellulose Columns to Inexpensively and Effectively Remove Human DNA from *Plasmodium falciparum*-Infected Whole Blood Samples." *Malaria Journal* 11: 41.
- Vlachou D., Gareth L., Sidén-Kiamos I., Blass C., Sinden R.E., and Louis C. 2001. "Anopheles gambiae Laminin Interacts with the P25 Surface Protein of *Plasmodium berghei* Ookinetes." *Molecular and Biochemical Parasitology* 112: 229–37. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851(00)00371-6.

- Vlachou D., Zimmermann T., Cantera R., Janse C.J., Waters A.P., and Kafatos F.C. 2004. "Real-Time, in Vivo Analysis of Malaria Ookinete Locomotion and Mosquito Midgut Invasion." *Cellular Microbiology* 6: 671–85. doi:10.1111/j.1462-5822.2004.00394.x.
- Vontas J., Siden-Kiamos I., Papagiannakis G., Karras M., Waters A.P., and Louis C. 2005. "Gene Expression in *Plasmodium berghei* Ookinetes and Early Oocysts in a Co-Culture System with Mosquito Cells." *Molecular and Biochemical Parasitology* 139: 1–13.
- Wang X., Mori T., Sumii T., and Lo E.H. 2002. "Hemoglobin-Induced Cytotoxicity in Rat Cerebral Cortical Neurons: Caspase Activation and Oxidative Stress." *Stroke* 33 (July): 1882–88. doi:10.1161/01.str.0000020121.41527.5d.
- Warburg A., and Schneider I. 1993. "In Vitro Culture of the Mosquito Stages of *Plasmodium falciparum*." *Experimental Parasitology* 76: 121–26. doi:http://dx.doi.org/10.1006/expr.1993.1014.
- Wass M.N., Stanway R., Blagborough A.M., Lal K., Prieto J.H., Raine D., Sternberg M.J.E., et al. 2012. "Proteomic Analysis of *Plasmodium* in the Mosquito: Progress and Pitfalls." *Parasitology* 139 (Special Issue 09): 1131–45. doi:10.1017/S0031182012000133.
- Weiss M.M., and Vanderberg J.P. 1977. "Studies on *Plasmodium* Ookinetes: II. In Vitro Formation of *Plasmodium berghei* Ookinetes." *The Journal of Parasitology* 63: 932–34.
- Whitten M. M. A., S. H. Shiao, and E. A. Levashina. 2006. "Mosquito Midguts and Malaria: Cell Biology, Compartmentalization and Immunology." *Parasite Immunology* 28: 121–30. doi:10.1111/j.1365-3024.2006.00804.x.
- World Health Organization (WHO). 2014. "World Malaria Report 2014." http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/report/en/.
- Worthington Enzyme Manual. Neutral Protease (Dispase). Accessed November 9 2015. <http://worthington-biochem.com/DISP/default.html>.
- Yang J., Hooper W.C., Phillips D.J., Tondella M.L., and Talkington D.F. 2002. "Centrifugation of Human Lung Epithelial Carcinoma a549 Cells up-Regulates Interleukin-1beta Gene Expression." *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 9: 1142–43.
- Yuan T.Z., Ormonde C.F.G., Kudlacek S.T., Kunche S., Smith J.N., Brown W.A., Pugliese K.M., et al. 2015. "Shear-Stress-Mediated Refolding of Proteins from Aggregates and Inclusion Bodies." *ChemBioChem* 16 (3): 393–96. doi:10.1002/cbic.201402427.
- Yuda M., Sawai T., and Chinzei Y. 1999. "Structure and Expression of an Adhesive Protein-like Molecule of Mosquito Invasive-Stage Malarial Parasite." *The Journal of Experimental Medicine* 189 (12): 1947–52.
- Yuda M., Yano K., Tsuboi T., Torii M., and Chinzei Y. 2001. "Von Willebrand Factor A Domain-Related Protein, a Novel Microneme Protein of the Malaria Ookinete Highly Conserved throughout *Plasmodium* Parasites." *Molecular and Biochemical Parasitology* 116 (1): 65–72. doi:10.1016/S0166-6851(01)00304-8.
- Zieler H., and Dvorak J.A. 2000. "Invasion in Vitro of Mosquito Midgut Cells by the Malaria Parasite Proceeds by a Conserved Mechanism and Results in Death of the Invaded Midgut Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (October): 11516–21. doi:10.1073/pnas.97.21.11516.
- Zieler H., Nawrocki J.P., and Shahabuddin M. 1999. "*Plasmodium gallinaceum* Ookinetes Adhere Specifically to the Midgut Epithelium of *Aedes aegypti* by Interaction with a Carbohydrate Ligand." *The Journal of Experimental Biology* 202 (March): 485–95.

Apéndice I. Purificación de oocinetos con iohexol

Antes de buscar estrategias alternativas de purificación de oocinetos se empleaba el protocolo de purificación establecido por Rodríguez et al., (2002), el cual involucra la lisis osmótica de los eritrocitos mediante NH_4Cl 0.17 M durante 25 min a 4 °C en agitación suave, la eliminación de los detritos resultantes mediante 4 centrifugaciones diferenciales a (720, 580, 402 y 258) g seguido de la eliminación de las células residuales mediante un colchón de iohexol al 17 % y dos centrifugaciones a 720 g para eliminar al iohexol.

Debido a que el cloruro de amonio causa la modificación de la membrana plasmática de los oocinetos (Hernández-Romano, et al., 2011) y debido a que la formación de pastillas puede provocar que los oocinetos entren en anoxia, seguido de un choque oxidante tras la resuspensión, aunado a que se encontraban con mucha frecuencia conglomerados de oocinetos muertos post-purificación (datos sin publicar), se decidió buscar protocolos alternativos para purificar a los oocinetos.

A parte de los métodos que utilizan columnas magnéticas con o sin anticuerpos (Carter, et al., 2003; Siden-Kiamos, et al., 2000), los cuales no se lograron llevar a cabo, Axis-Shield en la ficha técnica del iohexol, compila varias técnicas de purificación de oocinetos de *Plasmodium* utilizando iohexol (o Nycodenz de Axis-Shield o Histodenz de Sigma) y sugiere el empleo de gradientes continuos de iohexol al 10 % o 20 % generados mediante congelación y descongelación, o el empleo de gradientes discontinuos al 6 %, 11 % y 16 % (Axis-Shield, 2013; Murayama, et al., 2001). Se probaron estas técnicas además de la reportada por Dearsly et al. (1987) la cual involucra la eliminación de las fases asexuales mediante mitomicina C y colchones de iohexol al 12 % para eliminar el resto de las células contaminantes. Ellos encontraron que colchones al 10 % enriquecían a los gametocitos y a los cigotos, mientras que si se empleaba un colchón al 12 % el enriquecido contenía también oocinetos.

Brevemente, para fraccionar las distintas células del cultivo de oocinetos, que contiene eritrocitos, otras fases del parásito, leucocitos y plaquetas (en caso de que no se hayan utilizado columnas de CF-11), se prepararon colchones de iohexol al 10 %, 12 % y 13 %, gradientes discontinuos al 6 %-11 %-16 % y gradientes continuos generados mediante congelación y descongelación de soluciones al 10 % y 20 % (Axis-Shield, 2013; Murayama, et al., 2001; Hitachi, 2003) en buffer Tris 4.95 mM/EDTA 0.417 mM con KCl 2.95 mM a pH 7.5. El cultivo de oocinetos previamente centrifugado y resuspendido en 1ml de PBS fue colocado

sobre dichos gradientes y centrifugados a 720 g por 30 min. Las fracciones obtenidas fueron recolectadas con una pipeta Pasteur y observadas al microscopio para comparar el grado de pureza de los oocinetos. Algunas fracciones fueron colocadas nuevamente sobre otros colchones de iohexol para procurar purificaciones más elevadas. En la tabla AI.1, se muestran los resultados de un intento de purificación prospectivo mediante estos protocolos utilizando un colchón de iohexol al 12 %, un gradiente discontinuo al 6 %, 11 % y 16 % y gradientes continuos generados mediante congelación-descongelación partiendo de una solución homogénea al 10 % o 20 %, sobre los cuales se colocó el cultivo de oocinetos. En cada una de las fracciones obtenidas después de la centrifugación se realizaron observaciones para determinar el gradiente o colchón con una mayor proporción de oocinetos vs células contaminantes así como los componentes celulares de la fracción.

Tabla AI.1. Experimento 1 sin utilizar cloruro de amonio.
 Dos cultivos de oocinetos con la sangre de dos ratones cada uno se mezclaron en un solo tubo y se colocaron 4ml sobre cada gradiente/colchón de iohexol. Los tubos se centrifugaron a 1600g a 20°C por 30min. Se realizaron frotis teñidos con Giemsa para determinar la composición celular de cada fracción obtenida.

| Fracciones | Iohexol | | | |
|-------------------|--|------------------|-------------------------|------------------------|
| | 10% C-D | 20% C-D | 6, 11, 16% | 12.00% |
| 1 | - | - | - | - |
| 2 | Par. > detritos | Par. > erit. | - | Parásitos |
| 3 | Par. > ooc. | Erit. > par. | Par. > erit. > ooc. | Erit. > ooc. |
| 4 | Par. > ooc. | Erit. > ooc. | Erit. > ooc. | Erit. > ooc. |
| 5 | Detritos > erit. > ooc. | Erit. | Erit. > par. > ooc. | Erit. |
| 6 | Detritos | Detritos > Erit. | Erit. > ooc. | Erit. > ooc. |
| 7 | | | Erit. > ooc. | |
| 8 | | | Erit. | |
| Pastilla | | | Erit. > detritos > ooc. | Erit. > ooc. |
| Referencia | Axis-Shield Application sheet for <i>Plasmodium</i> purification | | | Dearsly, et. al., 1986 |

C-D: formación de gradientes de iohexol mediante congelación y descongelación de dos soluciones con concentraciones iniciales.
 Par: parásitos en general menos oocinetos, ooc: oocinetos, erit: Los distintos componentes en cada fracción se representan de mayor abundancia a menor.

En general no se encontraron fracciones con enriquecimientos considerables de oocinetos con excepción del gradiente continuo partiendo de una solución al 20 %, la cual presentó oocinetos solamente en la fracción 4. La elaboración y el manejo de este gradiente es complicado y debe de manipularse con precaución para no alterarlo. En el colchón al 12 % se esperaban dos fracciones, la pastilla y una interfase, pero en cambio se obtuvieron varias fracciones por lo que se procedió a verificar la densidad de las soluciones de iohexol (figura AI.1).

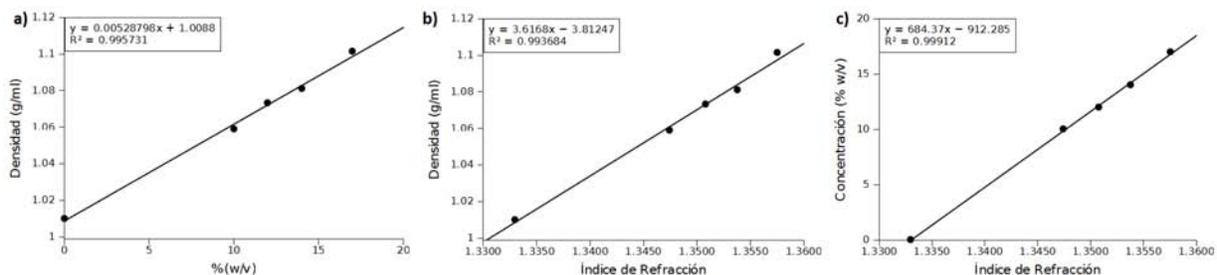


Figura AI.1. Verificación de las soluciones de iohexol mediante gravimetría (a y b) utilizando micropipetas y una balanza analítica, y mediante el índice de refracción (b y c) utilizando un refractómetro manual.

Después de verificar que las soluciones de iohexol estuviesen bien preparadas. Se procedió a realizar otro experimento para refinar la técnica empleando primero un colchón al 12 % y después un colchón al 10 % (tabla A1.2). El razonamiento fue el siguiente: un colchón al 12 % permite el enriquecimiento de gametocitos, cigotos y oocinetos, mientras que un colchón al 10 % separa a los oocinetos de los cigotos y gametocitos, donde los oocinetos formarían una pastilla mientras que los cigotos y gametocitos se encuentran en la interfase. Este no fue el caso (ver tabla AI.2). A pesar de que sí se lograron separar los oocinetos de los eritrocitos, la pastilla formada contenía más oocinetos que la interfase. La interfase posteriormente se introdujo en un colchón al 10 % esperando que los oocinetos se enriquecieran en la pastilla. La mayoría de los oocinetos se encontraron en la interfase y con una pureza del 1.08 %. Posteriormente se procedió a realizar un tercer experimento empleando ahora un colchón al 13 % y después un colchón al 10 %, colocando sobre éste la interfase obtenida en el colchón al 13 %. En ninguno de los colchones empleados se obtuvieron buenas purificaciones de oocinetos (purezas menores al 1 %) (tabla AI.3).

Tabla A1.2. Experimento 2 sin utilizar cloruro de amonio. Un cultivo de oocinetos con la sangre de dos ratones se centrifugó a 720g por 5 min a 20°C y la pastilla se resuspendió en 3ml de RPMI-Ooc. El resuspendido se colocó sobre un colchón de iohexol al 12% y se centrifugó a 720g por 25min a 20°C. Se recolectó la interfase y se diluyó a 1ml para volver a centrifugar ahora sobre un colchón al 10% de iohexol. Se realizaron frotis teñidos con Giemsa para determinar la composición celular de las interfases y las pastillas.

| Colchón al 12% | |
|---|---|
| Pastilla | Interfase |
| Eritrocitos, anillos, trofozoitos y bastantes oocinetos | Gametocitos, esquizontes, cigotos y oocinetos 7% pureza ooc. |
| Colchón al 10% para interfase | |
| Pastilla | Interfase |
| ct= 75.5E+06 | 27.5E+06 |
| ooc= 100.0E+03 | 300.0E+03 |
| Pureza= 0.13% | 1.08% |
| Coefficiente de partición X 100 (%) para las células contaminantes y los oocinetos entre la interfase y la pastilla celular. | |
| ct past= 73.12% | ct int= 26.88% |
| ooc past= 25.00% | ooc int= 75.00% |

ct: células totales contaminantes, ooc: oocinetos, past: pastilla celular, int: interfase.

En el tercer experimento se utilizó un colchón al 13 % con la idea de que el colchón al 12 % no enriqueció a los oocinetos adecuadamente. En esta ocasión se contaron las células totales (CT) contaminantes y el número de oocinetos pre-purificación. La gran mayoría de los oocinetos (56 millones) fueron encontrados en la pastilla del colchón al 13 %. Se hubiese podido continuar realizando experimentos empíricamente hasta mejorar la técnica, pero al considerar que los oocinetos son células especializadas, las cuales son capaces de adherirse e invadir tejidos, mientras que el resto de las células contaminantes son incapaces de realizar este comportamiento, nos condujo a desarrollar la nueva metodología de purificación de oocinetos la cual es el tema central de esta tesis.

Tabla A1.3. Experimento 3 sin utilizar cloruro de amonio. Un cultivo de oocinetos con la sagre de dos ratones se centrifugó a 720g por 5min a 20°C y la pastilla se resuspendió en 1.5ml de RPMI-Ooc para colocar sobre un colchón de iohexol al 13% y centrifugar a 720g por 10min a 20°C. Se recuperó la interfase, se lavó una vez con RPMI-Ooc y se resuspendió en 2ml de medio para volver a colocar sobre un colchón de iohexol, ahora al 10%. Las células de las pastillas e interfases se contaron en un hemocitómetro para determinar el enriquecimiento de los oocinetos.

| Cultivo pre-separación | Iohexol al 13% | | Iohexol al 10% (solo interfase 13%) | |
|----------------------------------|----------------|-----------|-------------------------------------|-----------|
| | Pastilla | Interfase | Pastilla | Interfase |
| CT= 12.0E+09 | 9.6E+09 | 462.0E+06 | 294.0E+06 | 45.5E+06 |
| Ooc= 59.8E+06 | 56.0E+06 | 3.8E+06 | 125.0E+03 | 125.0E+03 |
| Rendimiento — 100.00% | 93.73% | 6.27% | 0.21% | 0.21% |
| Ooc/ct= 0.005 | 0.00582 | 0.00812 | 0.0004252 | 0.002747 |
| Coefficiente de partición | | | Coefficiente de partición | |
| CT I/P= | 0.048 | | 0.155 | |
| Ooc I/P | 0.067 | | 1.000 | |

CT: células totales contaminantes, Ooc: oocinetos, I/P: relación de las células en la interfase sobre la pastilla.

Los valores están determinados en células/ml.

Apéndice II. Gráficas adicionales.

Durante la planeación y el transcurso de la experimentación, se identificaron al menos ocho variables que influyen en el rendimiento del cultivo, tanto en la recuperación de oocinetos como en la pureza de la preparación resultante (tabla AII.1). La influencia en el rendimiento del cultivo, así como su peso se estableció en los resultados, sin embargo no se estableció la relación que pueden presentar las variables de entrada entre sí, ni la relación entre un conjunto de variables de entrada y una de salida. Para tratar de encontrar alguna dependencia (y por lo tanto patrones) entre dos variables de entrada con respecto a una variable de salida, los datos de las 86 purificaciones realizadas durante este trabajo (las cuales se realizaron con distintos valores para cada una de las variables de entrada) se representan en la figura AII.3 en forma de gráficas de burbuja. Las gráficas de burbujas permiten graficar dos variables de entrada en cada eje (x y y) y una variable de respuesta representada como la superficie de las burbujas.

Tabla AII.1. Variables que se lograron identificar durante la planeación y experimentación del método.

| Variables de | |
|--|---------------------------------|
| Entrada | Salida |
| Número de oocinetos iniciales | |
| Superficie por oocineto (cm ² /ooc) | Numero de oocinetos recuperados |
| Tiempo de incubación (h) | |
| Número de lavados | Recuperación de oocinetos (%) |
| Eritrocitos/oocineto | |
| Concentración del ECMgel (mg/ml) | Pureza (%) |
| Concentración SFBdc (%) | |
| Dilución de la sangre | |

Para el caso de la relación E/Ooc, se buscó en la base de datos de las purificaciones realizadas (n = 46, en las cuales se conocía el número inicial de oocinetos) si se conservaba el patrón observado en la figura 14 a pesar de

realizarse cada una bajo condiciones distintas. Debido a que no se contó la concentración de eritrocitos en la mayoría de los cultivos de oocinetos, para realizar las gráficas se consideró la concentración media de eritrocitos en la sangre de 87 ratones entre el tercer y séptimo día post la infección con *P. berghei* (figura AII.1) observándose que en cierta medida el comportamiento sigue presente.

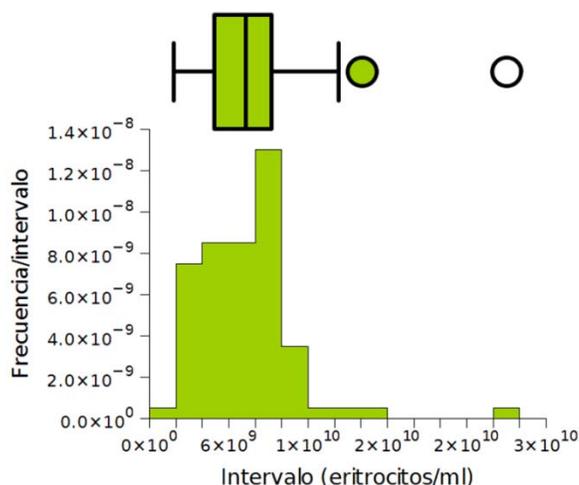


Figura AII.1. Histograma de la concentración de eritrocitos/ml de sangre en ratones infectados con *P. berghei* entre el tercer y séptimo día post la infección de $(1 \text{ a } 5) \times 10^8$ parásitos. La concentración de eritrocitos sigue una distribución normal (Shapiro-Wilk $p = 0.0778$) si se excluyen los dos datos extremos. Para elaborar la gráfica de la figura AII.2 se utilizó la media de la distribución (7.4×10^9 eritrocitos/ml). En la gráfica de caja y bigotes que se presenta arriba del histograma, la caja representa la región intercuartíl y los bigotes representan el máximo y el mínimo de la distribución. El círculo coloreado es un dato posiblemente extremo y el círculo sin colorear es un dato extremo.

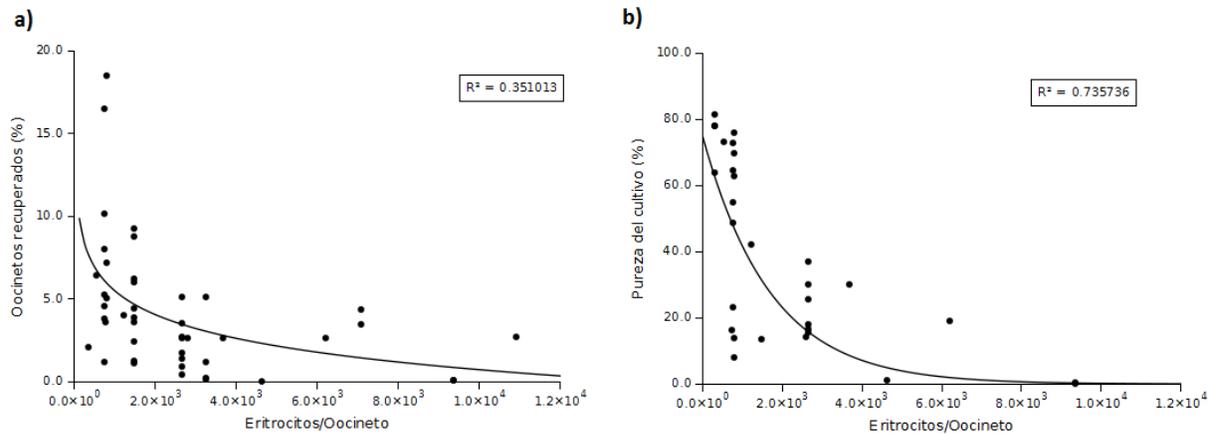
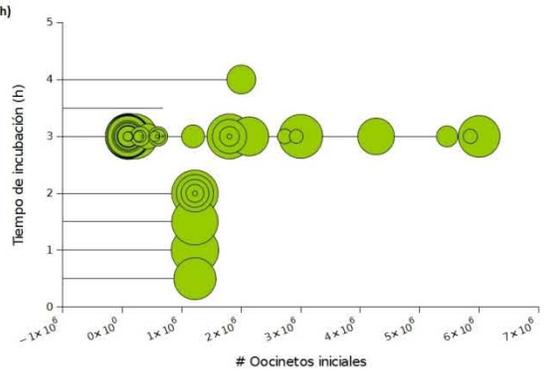
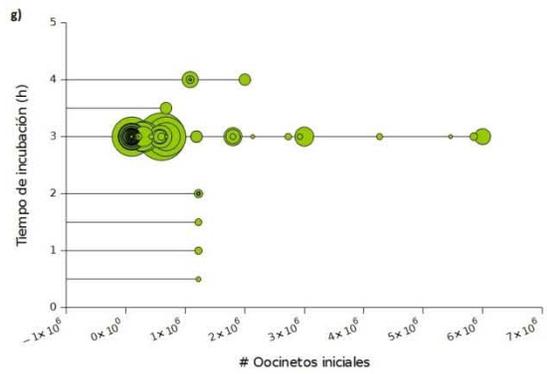
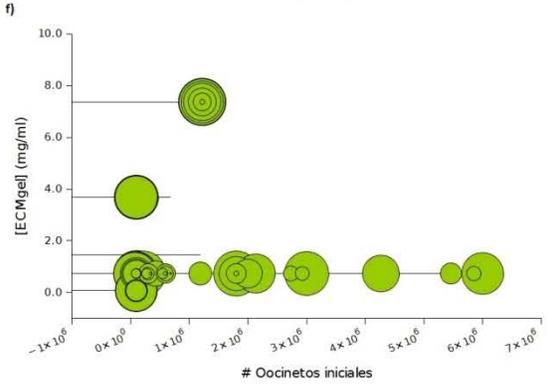
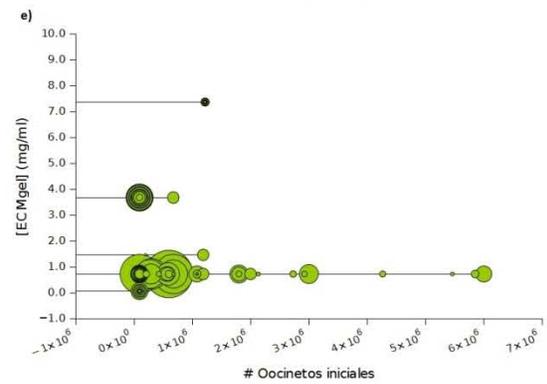
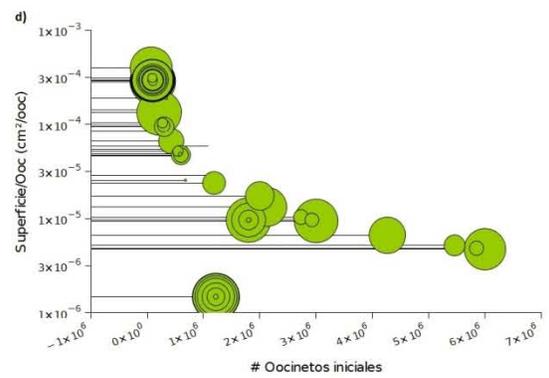
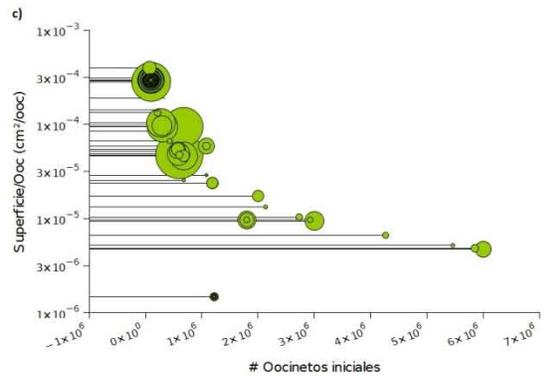
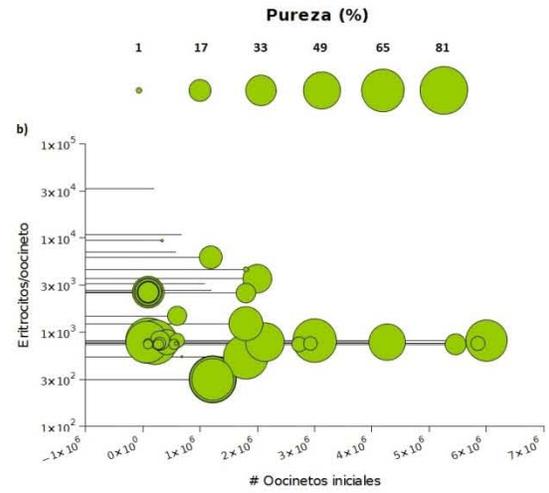
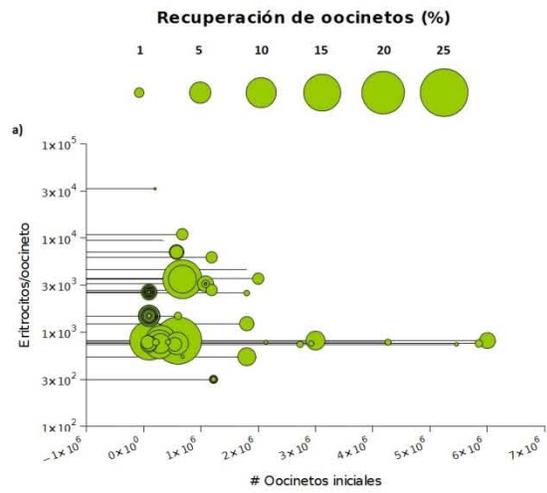
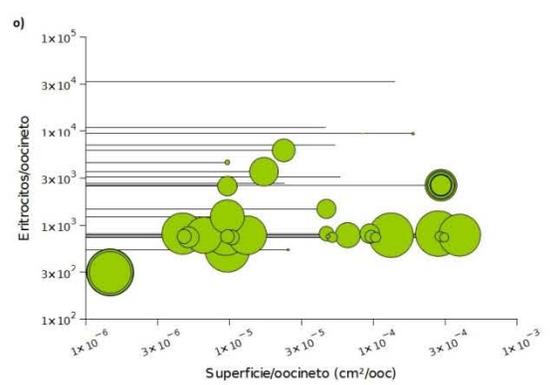
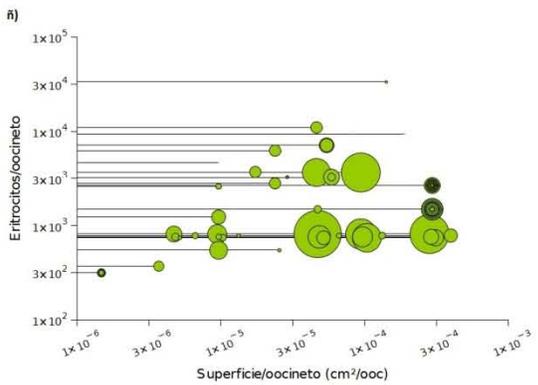
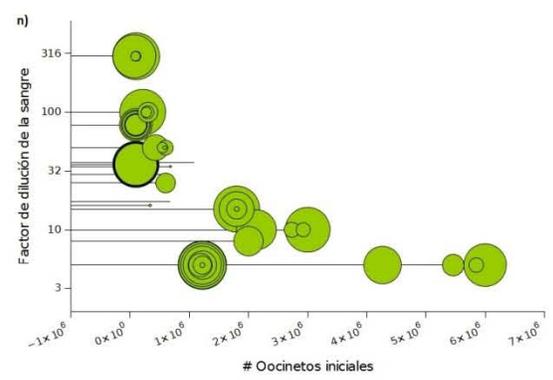
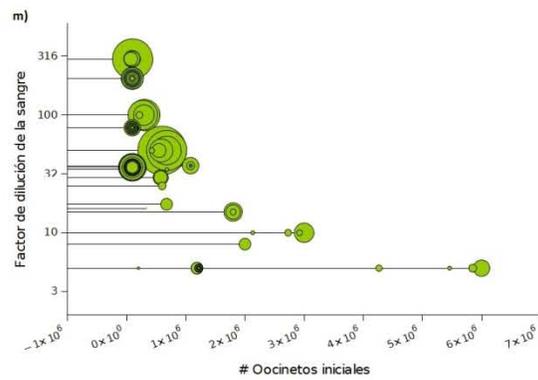
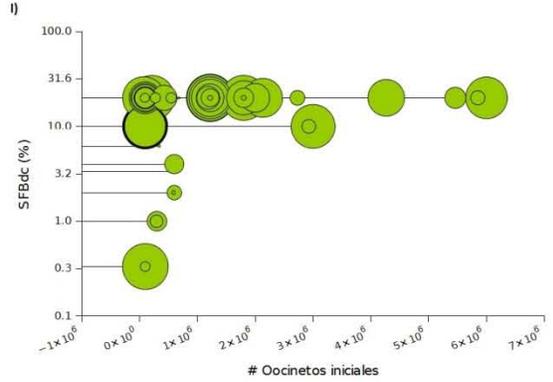
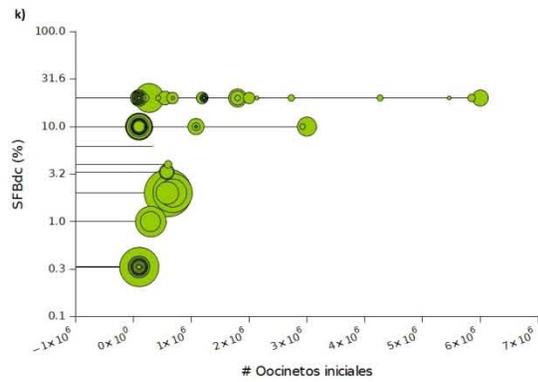
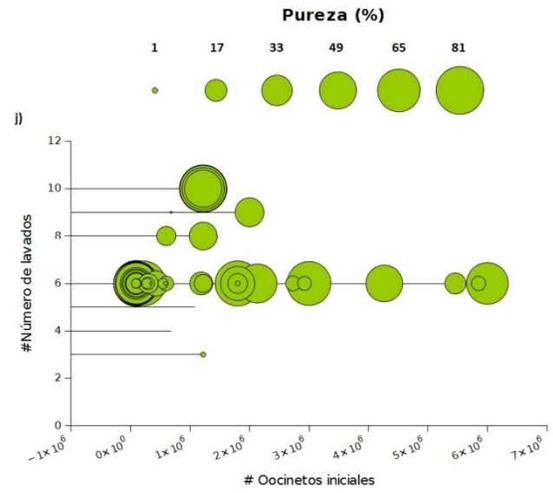
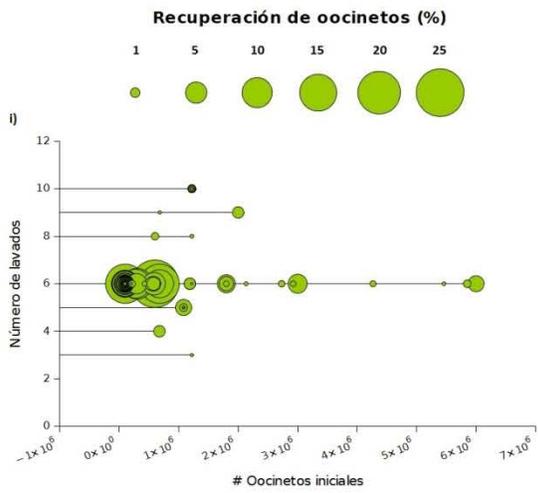
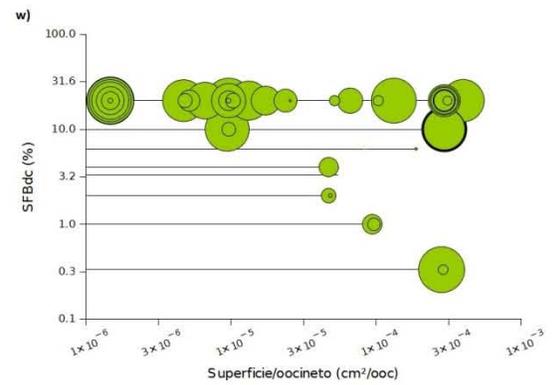
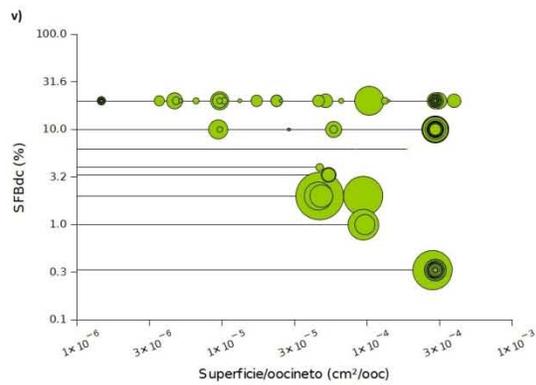
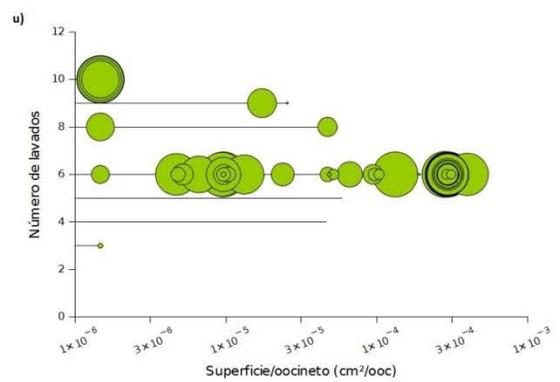
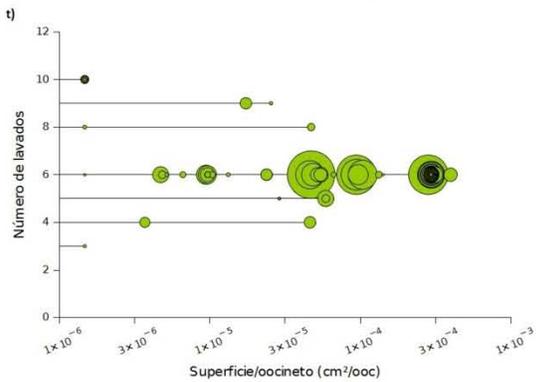
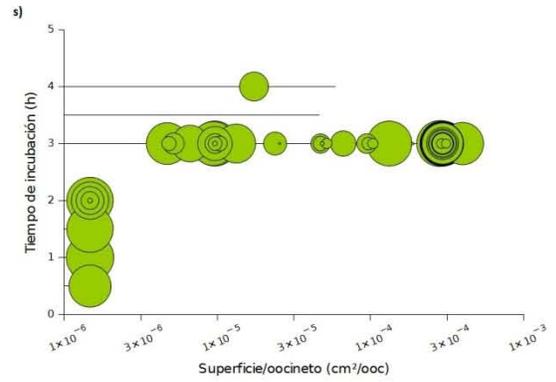
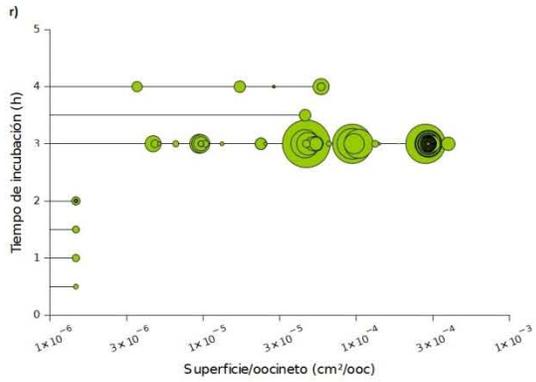
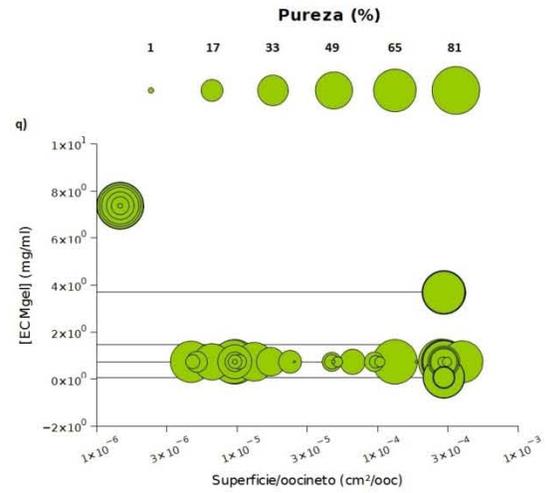
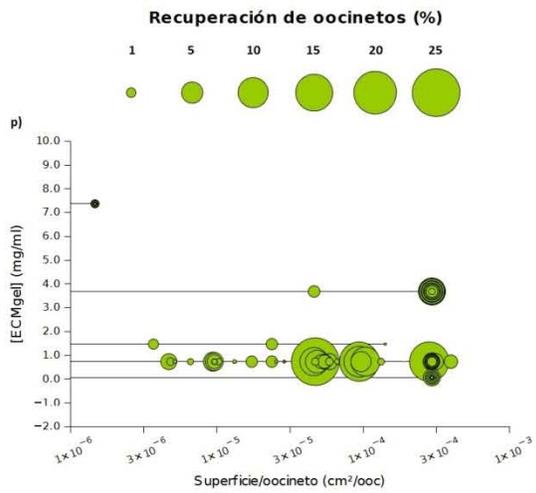


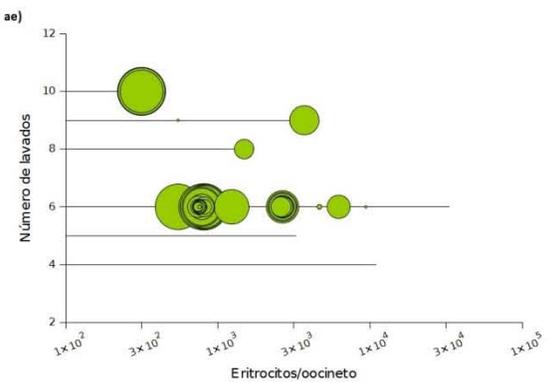
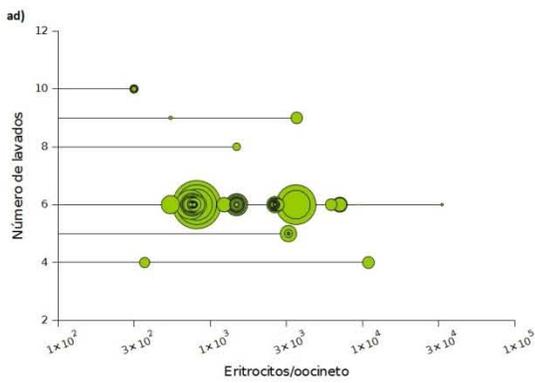
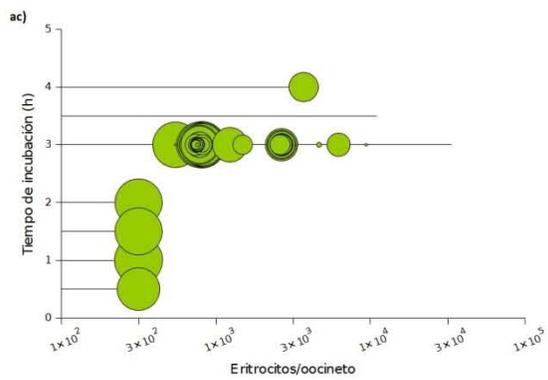
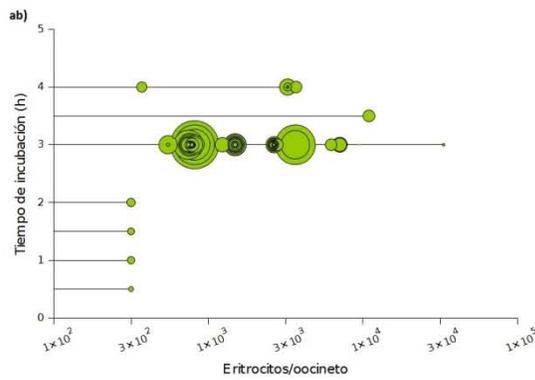
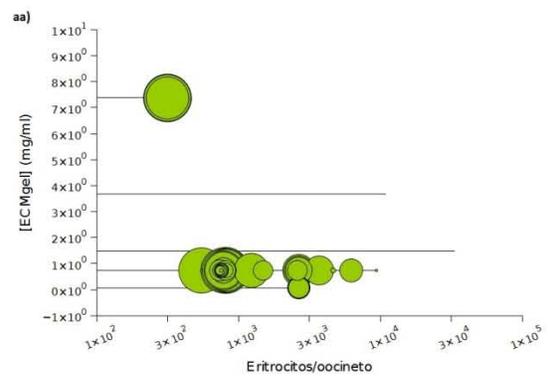
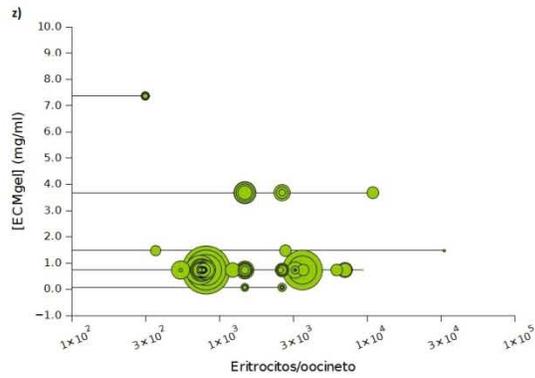
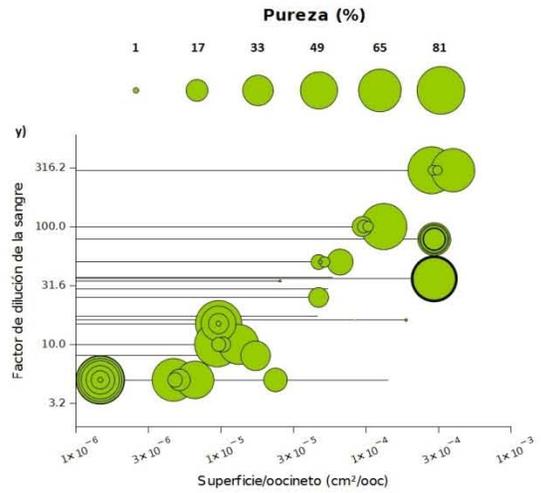
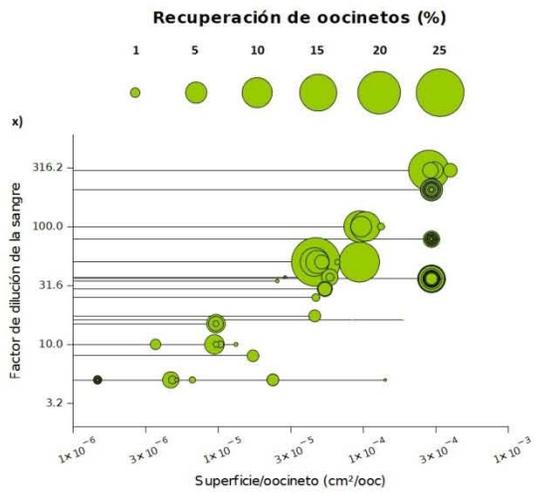
Figura AII.2. Observación a partir de la base de datos la relación entre E/Ooc y el rendimiento y pureza de la purificación. Considerando un promedio de 7.39×10^9 eritrocitos/ml de sangre, obtenido a partir de 87 infecciones de ratones con *P. berghei* entre el tercer y séptimo día post infección, se obtuvo la relación E/Ooc de aquellas purificaciones de oocinetos en las cuales no se contó el número inicial de eritrocitos pero sí el número inicial de oocinetos/ml de sangre y graficando el resultado de la purificación como un punto. Para la gráfica (a) se incluyen 46 y para la gráfica (b) 30 purificaciones distintas realizadas con contenedores, tiempos de incubación, número de lavados y concentración de ECM gel distintas. Se observa que la tendencia es muy parecida con respecto al experimento específicamente diseñado para probar este comportamiento (figura 14).

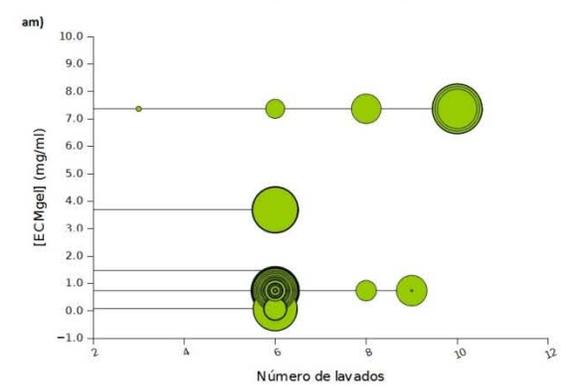
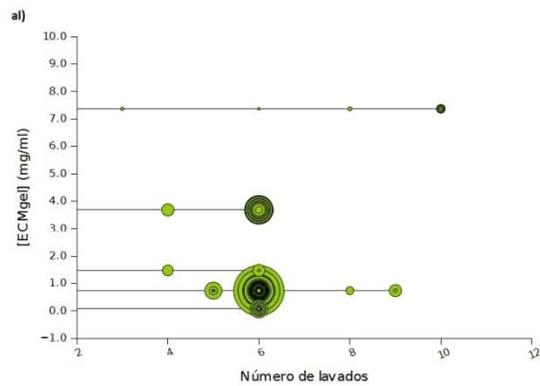
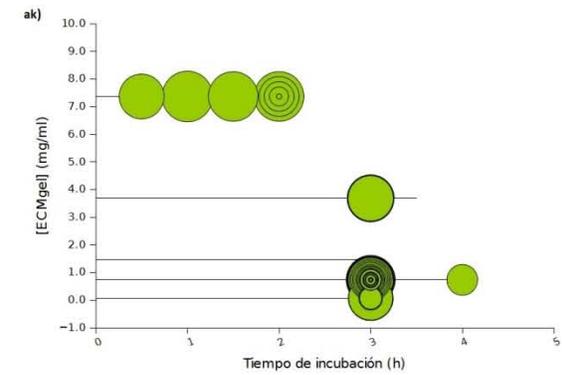
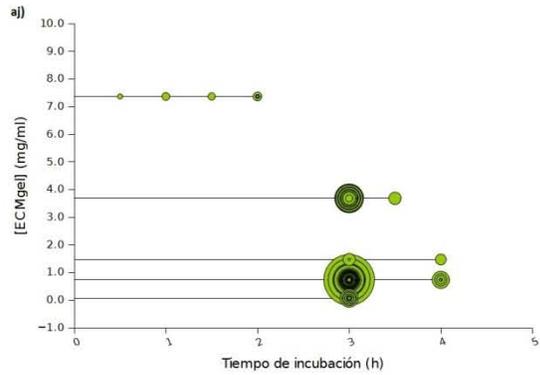
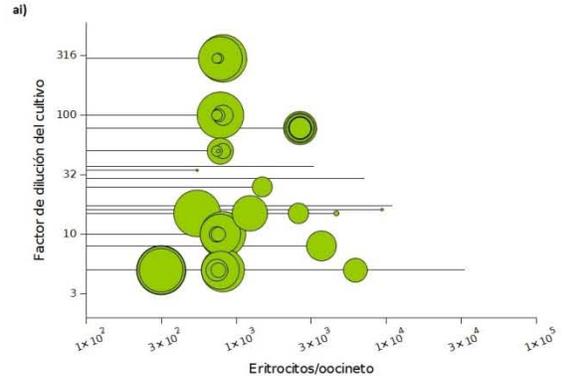
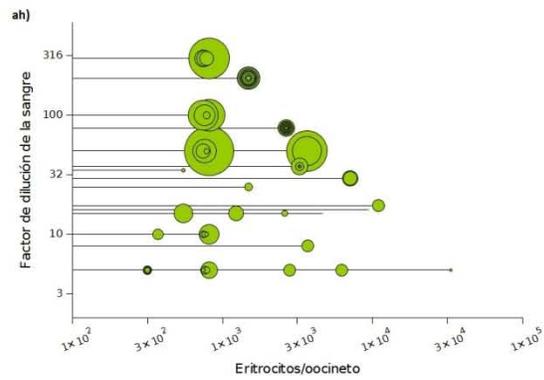
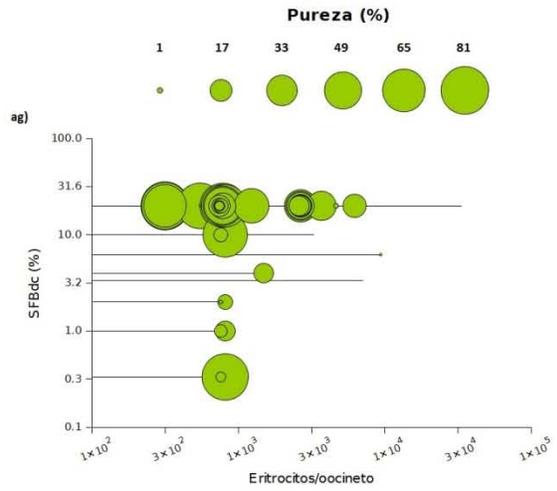
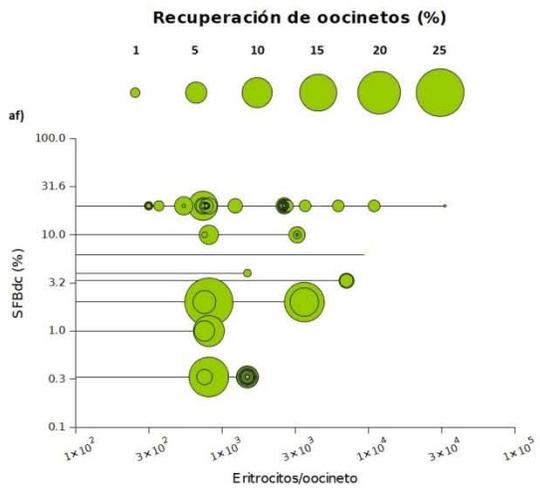
En general, se puede observar en la figura AII.3 que la pureza no se ve tan influenciada por las variables de entrada (las burbujas en promedio presentan el mismo tamaño a lo largo y alto del área del gráfico) a diferencia del porcentaje de recuperación (las burbujas grandes tienden a concentrarse en un área determinada del gráfico). Además de esto, aunque la variación resulta ser muy grande (hay burbujas desde muy pequeñas hasta muy grandes en una misma región del gráfico) en ningún caso se violan las relaciones encontradas y explicadas en los resultados; por el contrario refuerzan lo observado en los experimentos específicamente diseñados para probar las variables independientemente. Interesantemente la concentración del SFBdc (algunas diluciones del cultivo se realizaron sin SFBdc) tienen una influencia en el rendimiento del cultivo y la purificación y la relación entre estas dos variables de salida con respecto a la concentración de SFBdc se encuentra invertida, similar a lo que se encuentra cuando se diluye el cultivo para la purificación (figura 12b, 12c y 12d).

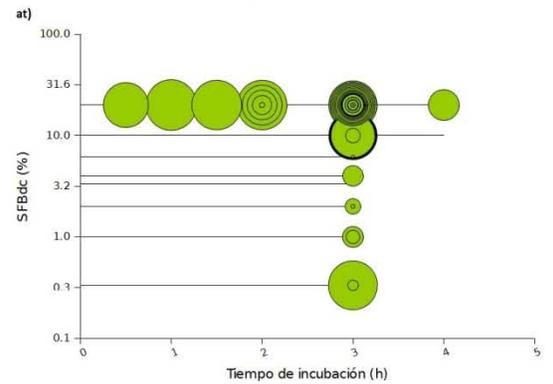
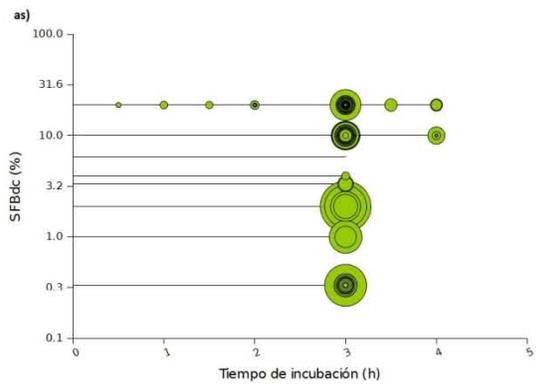
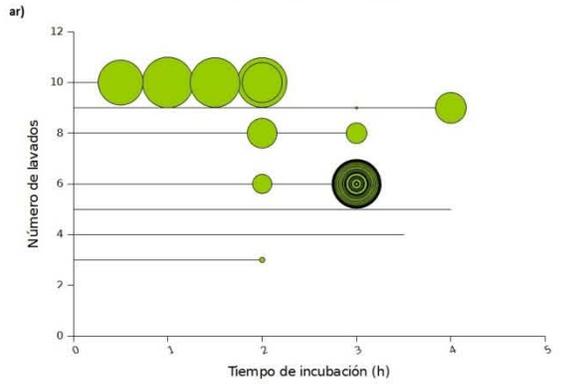
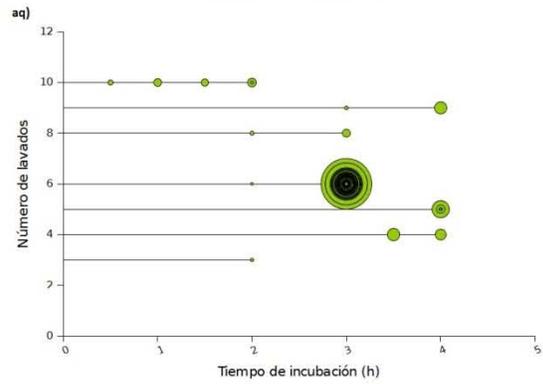
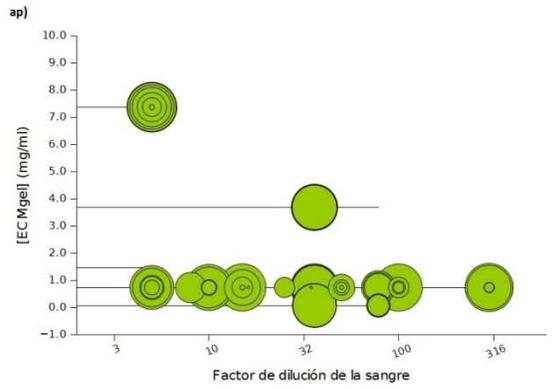
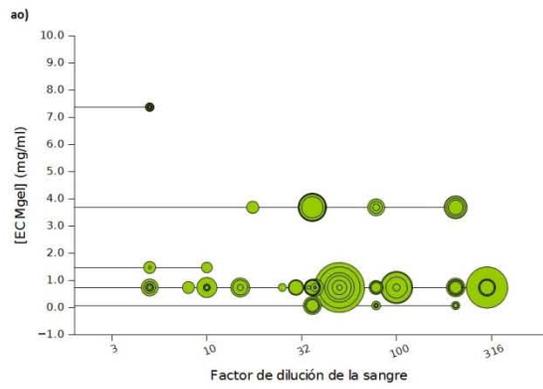
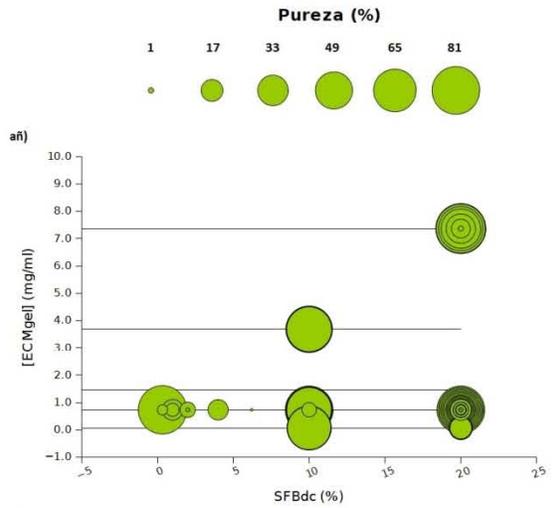
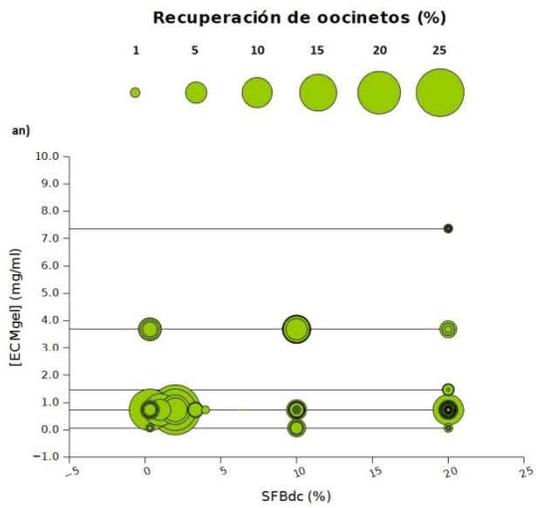












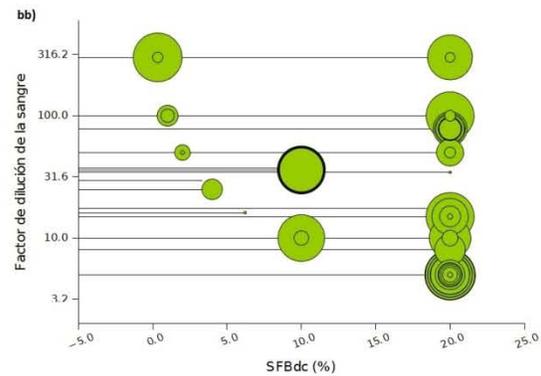
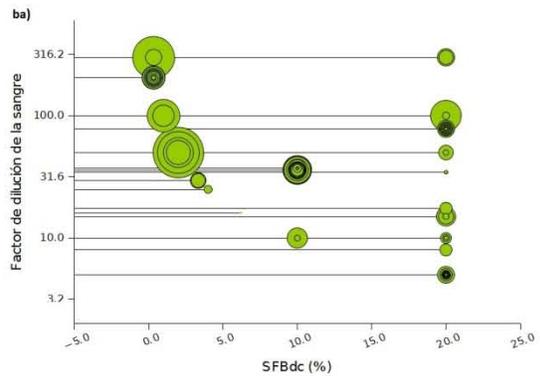
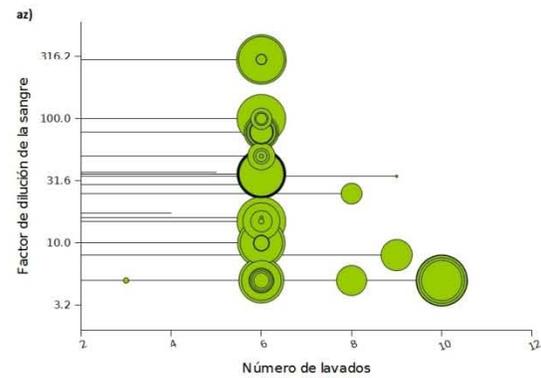
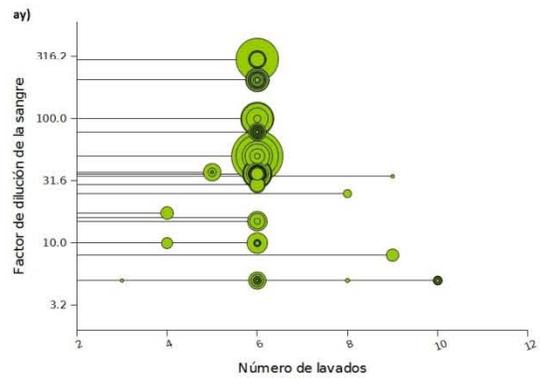
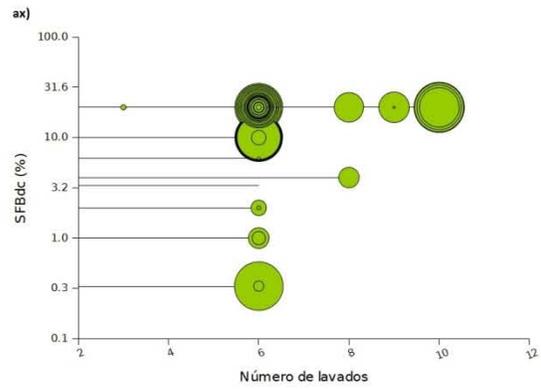
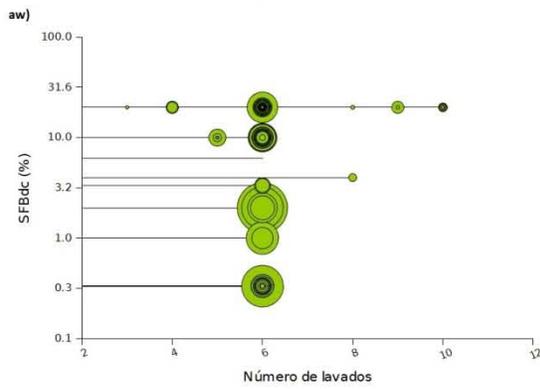
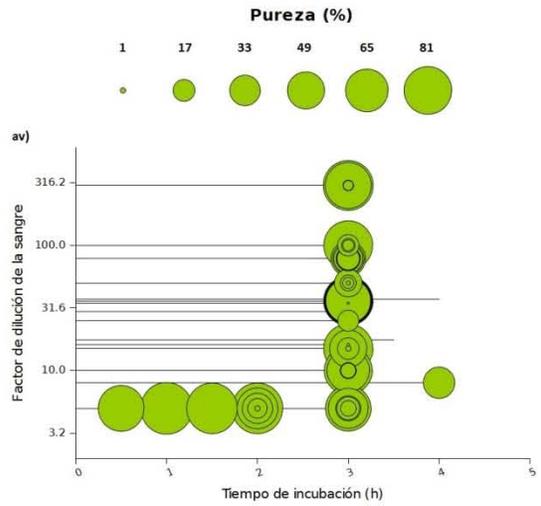
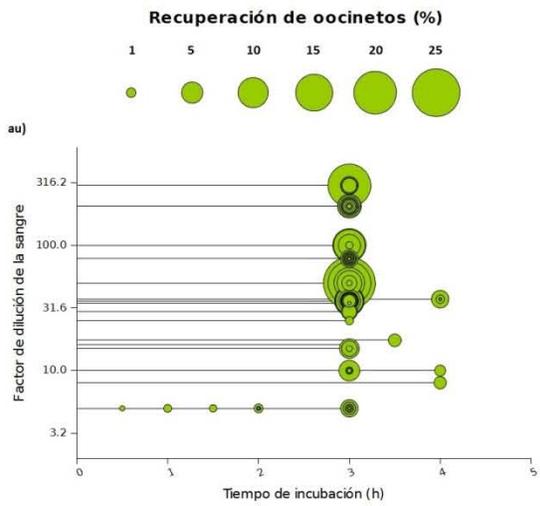


Figura AII.3 (páginas anteriores). Recopilación, en gráficas de burbuja, del total de purificaciones realizadas. Para realizar los gráficos se tomaron los datos de las variables de entrada de la tabla AI 1 y se compararon entre sí gráficamente en los ejes x y y . Las variables de respuesta se representan en forma de burbujas, siendo la superficie directamente proporcional a la pureza o el rendimiento. Cuando existe cierta relación entre las tres variables, las burbujas de mayor o menor tamaño tienden a agruparse en una región del gráfico; cuando no hay relación se obtiene un patrón azaroso.

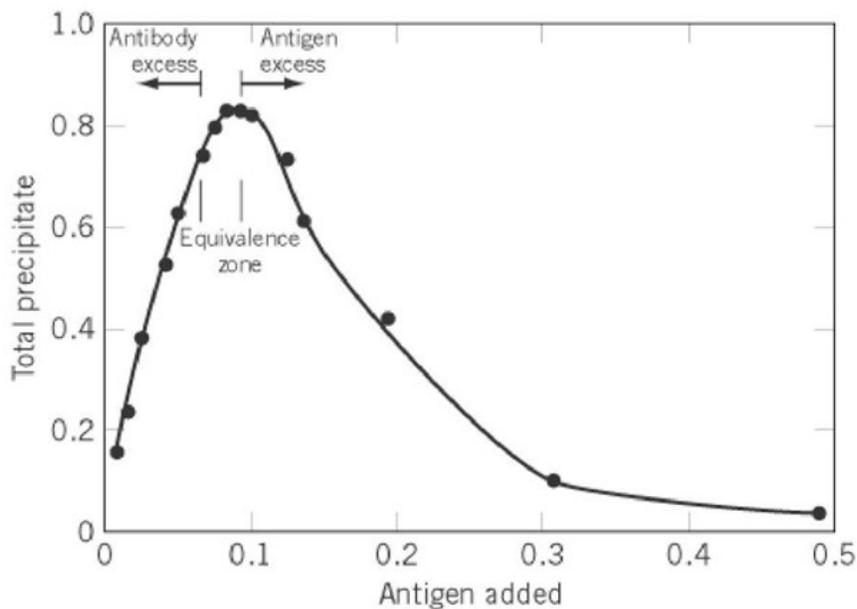


Figura AII.4. Reacción de precipitina. Imagen tomada de <http://what-when-how.com/molecular-biology/precipitin-reaction-molecular-biology/> (“Precipitin Reaction”, 2015).

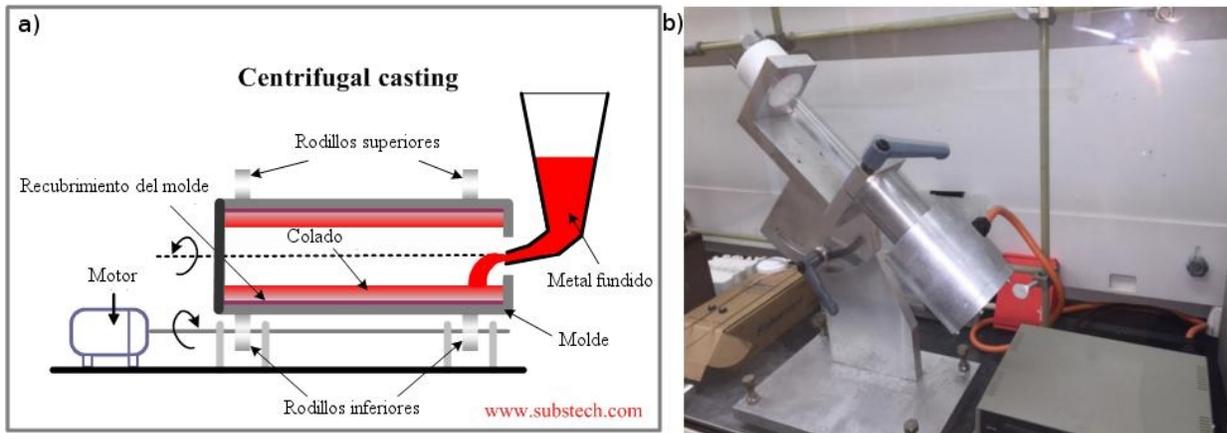


Figura AII.5. Ejemplos de centrifugación en el eje de rotación. a) Centrífuga utilizada para formar recubrimientos metálicos de estructuras con simetría axial. Imagen obtenida y traducida de http://www.substech.com/dokuwiki/doku.php?id=centrifugal_casting (“Centrifugal Casting [SubsTech]”, 2015) b) Dispositivo de vórtice de fluido utilizado por Yuan, et al., (2015) para re-plegar proteínas desnaturalizadas. El dispositivo consiste en un motor que hace rotar un tubo de ensayo conteniendo las proteínas desnaturalizadas. Imagen obtenida de (Izadi, 2015).

Apéndice III. Protocolos sugeridos para la purificación de oocinetos con ECM gel.

El método de purificación de oocinetos desarrollado en este trabajo tiene la ventaja de poderse realizar de diversas maneras y, si se entiende el fundamento y los límites del método, es posible desarrollar variantes que se ajusten a casi cualquier diseño experimental; siendo la creatividad del investigador la mayor limitante. Para realizar la purificación de oocinetos de *P. berghei*, primero es necesario obtener gametocitos y cultivarlos *in vitro* para permitir la maduración, fecundación y formación de los oocinetos. En el primer protocolo se describe el cultivo merogónico del parásito para generar a los gametocitos. En el segundo se describe el cultivo *in vitro* de oocinetos, el resto de los protocolos son las variantes del método de purificación mediante ECM gel que se llevaron a cabo en este trabajo.

AIII.1. Cultivo merogónico para generar gametocitos de Plasmodium berghei (extraído de Rodríguez, et al., 2002)

Organismos:

- *Plasmodium berghei* cepa ANKA clón 2.34 o la variante que expresa constitutivamente la proteína verde fluorescente (GFP) criopreservado o en transmisión continua entre ratón y mosco.
- Ratones cepa BALB/c de 6 a 8 semanas de edad machos.

Materiales:

- Jeringa de 1ml con aguja hipodérmica.
- Laminillas de vidrio y cubreobjetos.
- Cámara de Neubauer.
- Microscopio compuesto.
- Tijeras Metzenbaum.
- Cámara de CO₂.

- Tubos Eppendorf de 1ml y 0.6ml.
- Incubadora a (19 ± 1) °C.

Reactivos y soluciones:

- Agua destilada.
- Aceite de inmersión.
- Tinción de Giemsa al 30% en agua destilada.
- Metanol.
- Etanol al 70%.
- Solucion salina isotónica
- Fenilhidrazina a 6 mg/ml en solución salina.
- Heparina a 25 UI/ml en solución salina.
- RPMI-Ooc.

Metodología:

- 1.- Descongelar un vial de sangre infectada con *P. berghei* e inocular vía intraperitoneal (IP) entre (150 y 300) μ l (entre (2 y 4) $\times 10^8$ parásitos por ratón).
- 2.- Monitorear la parasitemia realizando un frotis con una gotita de sangre extraída de la punta de la cola del ratón realizando un pequeño corte con las tijeras Metzenbaum.
- 3.- Fijar la sangre en el frotis con unas gotas de metanol. Dejar secar.
- 4.- Agregar 1ml de Giemsa al 30% por laminilla e incubar por 10 min.
- 5.- Enjuagar la laminilla con agua destilada y secar el frotis con una toalla de papel presionando la laminilla.

6.- Con un microscopio y con el objetivo de 100X, determinar el porcentaje de parasitemia contando el número de eritrocitos parasitados en un total de 100 eritrocitos totales. Es recomendable hacer el conteo al menos por duplicado.

7.- Verificar la viabilidad de los gametocitos diluyendo 2 μ l de sangre extraída de la cola del ratón con 1 μ l de heparina y 7 μ l de RPMI-Ooc en un tubo Eppendorf de 0.6 ml.

8.- Colocar los 10 μ l en una laminilla, colocar el cubreobjetos e incubar 15 min a 19 °C. Observar en el microscopio con el objetivo de 40X.

9.- Contar el número de rosetas de exflagelación por campo.

10.- Determinar la concentración de eritrocitos diluyendo 1 μ l de sangre extraída de la cola del ratón con 1 μ l de heparina y 998 μ l de solución salina en un tubo Eppendorf de 1 ml. Colocar 10 μ l en la cámara de Neubauer y realizar el conteo de eritrocitos.

11.- Calcular el número de parásitos por mililitro de sangre.

Para mantener al parásito en la fase merogónica, realizar pases inoculando aproximadamente 1×10^5 parásitos por ratón vía IP. El parásito puede mantenerse hasta el pase 8 y por no mas de 15 días en cada ratón para evitar que los gametocitos pierdan la capacidad de formar gametos viables.

Para obtener gametocitos suficientes para realizar el cultivo de oocinetos:

12.- Inocular vía IP 200 μ l de fenilhidrazina por ratón 3 días o 4 días antes del inóculo de $(2 \text{ a } 4) \times 10^8$ parásitos.

13.- Realizar la extracción de la sangre vía punción cardiaca (PC) de un ratón previamente sacrificado en una cámara de CO₂. Esterilizar el pecho del ratón con etanol al 70%. Realizar la punción cardiaca con una jeringa cargada con 10 μ l de heparina.

AIII.2. Cultivo in vitro de oocinetos de Plasmodium berghei (extraído de Rodríguez, et al., 2002)

Materiales:

- Matraz de 50 ml.
- Soporte universal.
- Pinza de tres dedos para soporte universal.
- Jeringa de 10 ml sin aguja ni émbolo.
- Película de parafina.
- Incubadora a (19 ± 1) °C.

Reactivos y soluciones:

- RPMI-Ooc.
- Etanol al 70%.
- Heparina a 250 UI/ml.
- CF-11.
- Fibra de vidrio.
- Algodón.

Metodología:

1.- Verificar la parasitemia y viabilidad de los gametocitos siguiendo el protocolo descrito con anterioridad. El ratón debe tener una parasitemia entre el 15 % y el 25 %, con 7 o más rosetas de exflagelación por campo a 40X.

2.- Si se desea utilizar columna de CF-11 para eliminar leucocitos y plaquetas prepararla de la siguiente manera: colocar la mínima cantidad de algodón en el fondo de la jeringa de 10 ml para evitar que se salga la fibra de celulosa (CF-11) de la jeringa. Colocar hasta la marca de 1 ml fibra de vidrio (opcional). Colocar hasta la marca de 8 ml CF-11 y compactar hasta la marca de 4 ml mediante

golpecitos gentiles contra la mesa. Colocar la jeringa cargada en el soporte universal sujeta con la pinza de tres dedos. Equilibrar la columna con 3ml de RPMI-Ooc.

3.- Sacrificar al ratón en la cámara de CO₂ y extraer la sangre mediante PC con una jeringa de 1ml cargada con heparina como se describió con anterioridad.

4.- Colocar la sangre lo antes posible en la columna de CF-11 y eluir con 3 ml de RPMI-Ooc para recibir el filtrado en el matraz en el cual se colocan 4 ml de RPMI-Ooc.

En caso de no utilizar columnas de CF-11, colocar la sangre directamente en el matraz con 4 ml de RPMI-Ooc.

5.- Tomar 10 µl del cultivo y colocarlos en una laminilla, colocar un cubreobjetos e incubar por 15 min a 19°C para corroborar la activación de los microgametocitos.

6.- Tapar el matraz con película de parafina e incubar de (20 a 24) horas a 19°C para permitir la fecundación y formación de los oocinetos.

7.- Pasado este tiempo de incubación, tomar una muestra de 50 µl del cultivo y diluir en 500 µl de solución salina en un tubo Eppendorf de 1ml para contar a los oocinetos con una cámara de Neubauer.

AIII.3. Purificación de oocinetos con ECM gel en laminillas Lab-Tek

Materiales:

- Laminillas Lab-Tek de 4 u 8 pozos.
- Microscopio invertido.
- Incubadora a $(19 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

Reactivos y soluciones:

- ECM gel.
- Diluyentes: ECM buffer, medio MEM o medio RPMI-Ooc.
- PBS.
- Medio Sch-Ooq.

Metodología:

- 1.- Recubrir las laminillas Lab-Tek con 6 μl o 12 μl de ECM gel para cajas de 8 o 4 pozos respectivamente sin diluir o diluido 1/2, 1/5, o 1/10 con el diluyente deseado.
- 2.- Dejar gelificar el ECM gel por al menos 30 min a TA o a 37 $^\circ\text{C}$. Alternativamente, el ECM gel puede dejarse secar a 37 $^\circ\text{C}$ por 1 h y posteriormente de 12 h a 24 h a 27 $^\circ\text{C}$. Refrigerar a 4 $^\circ\text{C}$ hasta su utilización. Rehidratar el gel con RPMI-Ooc.
- 3.- Agregar el cultivo de oocinetos (aproximadamente 500 μl a las laminillas de 4 pozos o 250 μl a las laminillas de 8 pozos).
- 4.- Incubar el tiempo deseado (entre (1 y 4) horas dependiendo de la cantidad de oocinetos que se deseen recuperar).
- 5.- Retirar el cultivo de oocinetos y realizar 10 lavados o más con un volumen apropiado de PBS. Es recomendable colocar el PBS por una esquina del pozo y retirarlo por la esquina opuesta mediante succión.

6.- Agregar medio Schn-Ooq y observar con el microscopio invertido la presencia y la pureza de los oocinetos.

AIII.4. Purificación de oocinetos con ECM gel en cajas de 24 pozos

Materiales:

- Cajas de 24 pozos
- Microscopio invertido.
- Incubadora a (19 ± 1) °C.

Reactivos y soluciones:

- ECM gel.
- Diluyentes: ECM buffer, medio MEM o medio RPMI-Ooc.
- PBS.
- Medio Sch-Ooq.

Metodología:

- 1.- Recubrir los pozos con 12 μ l a 20 μ l de ECM gel sin diluir o diluido (dependiendo de la cantidad de oocinetos deseados) e incubar al menos 30 min a TA o a 37 °C. Alternativamente, el ECM gel puede dejarse secar a 37°C por 1 h y posteriormente de 12 h a 24 h a 27 °C. Refrigerar a 4 °C hasta su utilización. Rehidratar el gel con RPMI-Ooc.
- 2.- Agregar de 0.5 ml a 3ml del cultivo de oocinetos sin diluir o diluido (evitar diluir el cultivo entre 10 y 20 veces para evitar la aglutinación de los eritrocitos).
- 3.- Incubar de 1 h a 4 h a (19 ± 1) °C.
- 4.- Realizar 10 o más lavados con 1ml de PBS. Colocar el PBS en un extremo del pozo y retirarlo por el extremo opuesto para generar una corriente que arrastre a los eritrocitos contaminantes a un extremo del pozo.
- 5.- Agregar medio Schn-Ooq y observar con un microscopio invertido la presencia y pureza de los oocinetos.

AIII.5. Purificación de oocinetos con ECM gel en cubreobjetos.

Materiales:

- Cajas de 24 pozos
- Cubreobjetos redondos de 13mm de diámetro.
- Laminillas de vidrio.
- Microscopio invertido.
- Pinzas de relojero.
- Jeringa con la punta de la aguja ligeramente doblada a manera de gancho.
- Incubadora a $(19 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

Reactivos y soluciones:

- ECM gel.
- Diluyentes: ECM buffer, medio MEM o medio RPMI-Ooc.
- PBS.
- Medio Sch-Ooq.

Metodología:

- 1.- Colocar los cubreobjetos en los pozos de la caja y recubrirlos con 12 μl de ECM gel diluido o sin diluir.
- 2.- Dejar gelificar el ECM gel por al menos 30 min a TA. Alternativamente, el ECM gel puede dejarse secar a 37°C por 1 h y posteriormente de 12 h a 24 h a 27°C . Refrigerar a 4°C hasta su utilización. Rehidratar el gel con RPMI-Ooc.
- 3.- Agregar de 0.5 ml a 3 ml del cultivo de oocinetos diluido o sin diluir (evitar diluir el cultivo entre 10 y 20 veces para evitar la aglutinación de los eritrocitos).
- 4.- Incubar de 1 h a 4 h a 19°C dependiendo de la cantidad de oocinetos que se deseen.

- 5.- Retirar el cultivo de oocinetos y agregar un volumen equivalente de PBS.
- 6.- Retirar el cubreobjetos con la jeringa y las pinzas de relojero.
- 7.- Lavar tres o cuatro veces el cubreobjetos agregando gota a gota 500 μ l de PBS mientras el cubreobjetos es sujetado con las pinzas en posicion vertical.
- 8.- Colocar el cubreobjeto con los oocinetos en un pozo con medio Schn-Ooq.

AIII.6. Purificación de oocinetos con ECM gel en cajas de Petri

Materiales:

- Cajas de Petri de 30 mm o 60 mm de diámetro.
- Microscopio invertido.
- Incubadora a (19 ± 1) °C.

Reactivos y soluciones:

- ECM gel.
- Diluyentes: ECM buffer, medio MEM o medio RPMI-Ooc.
- PBS.
- Medio Sch-Ooq.
- Dispasa a 2.4 U/ml.
- EDTA a 500 mM

Metodología:

- 1.- Recubrir las cajas de Petri de 60 mm o 90 mm de diámetro con 0.5 ml o 1 ml de ECM gel respectivamente sin diluir o diluido.
- 2.- Dejar gelificar el ECM gel por al menos 30 min a TA. Alternativamente, el ECM gel puede dejarse secar a 37°C por 1 h y posteriormente de 12 h a 24 h a 27 °C. Refrigerar a 4 °C hasta su utilización. Rehidratar el gel con RPMI-Ooc.
- 3.- Agregar 3 ml o 6 ml del cultivo de oocinetos dependiendo del tamaño de la caja, diluido o sin diluir e incubar de 1 h a 4 h a 19 °C dependiendo de la cantidad de oocinetos que se deseen obtener.
- 4.- Retirar el cultivo de oocinetos y realizar de 6 a 8 lavados con 2 ml o 4 ml de PBS. Agregar el PBS por un extremo de la caja y retirarlo por el extremo opuesto.
- 5.- Agregar medio Schn-Ooq y observar con el microscopio invertido la presencia y pureza de los oocinetos.

Alternativamente, los oocinetos pueden resuspenderse realizando el protocolo de dispasa II y EDTA. Para ésto:

6.- Retirar el PBS del último lavado y agregar 2 ml o 4 ml de dispasa II e incubar 30 min a 19°C.

7.- Agregar EDTA a una concentración final de 4 mM. Agitar.

8.- Pipetear varias veces la solución de dispasa II-EDTA para desprender a los oocinetos y el ECM gel restante.

9.- Colocar la suspensión en un tubo Falcon de 15 ml.

10.- Agregar 2 ml de PBS a 4°C y pipetear varias veces para desprender al resto de los oocinetos. Repetir el proceso 4 veces. Colocar el PBS en el mismo tubo en el cual se colocaron a los oocinetos con dispasa II y EDTA.

11.- Centrifugar el tubo a 720 g por 8 min a 4°C.

12.- Retirar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 500 µl o menos de Schn-Ooq.

13.- Contar a los oocinetos en una cámara de Neubauer.

AIII.7. Purificación de oocinetos con ECM gel en tubos Falcon de 15 ml

Materiales:

- Tubos Falcon de 15 ml.
- Centrífuga en el eje de rotación.
- Centrífuga refrigerada para tubos Falcon.
- Incubadora a (19 ± 1) °C.

Reactivos y soluciones:

- ECM gel.
- Diluyentes: ECM buffer, medio MEM o medio RPMI-Ooc.
- PBS.
- Medio Sch-Ooq.
- Dispasa a 2.4 U/ml.
- EDTA a 500 mM

Metodología:

- 1.- Colocar 500 μ l de ECM gel en el tubo Falcon y centrifugarlo en el eje de rotación a aproximadamente 5000 rpm por 5 min para permitir la gelificación del ECM gel.
- 2.- Retirar el líquido sobrante y agregar el cultivo de oocinetos diluido a un volumen final de 15 ml.
- 3.- Incubar el tubo con el cultivo de oocinetos de 3 h a 4 h girando el tubo 1/4 de vuelta cada 15 min o en rotación constante a una revolución por hora.
- 4.- Decantar el cultivo de oocinetos y realizar de 4 a 8 lavados con 15 ml de PBS decantándolo.
- 5.- Agregar 15 ml de dispasa II e incubar 30 min a 19°C.

- 6.- Agregar EDTA a una concentración final de 4 mM. Agitar el tubo.
- 7.- Centrifugar a 720 *g* por 8 min a 4 °C.
- 8.- Retirar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 500 μ l o menos de Schn-Ooq.
- 9.- Contar a los oocinetos en una cámara de Neubauer.