

T
638.3
\$55

NO SALE A
DOMICILIO



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA
AMAZONIA PERUANA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Escuela de Formación Profesional
de Biología

**"ADAPTACIÓN AL CULTIVO *IN VITRO* DE CEPAS NATIVAS DE
PLASMODIUM FALCIPARUM DE LA AMAZONÍA PERUANA"**

TESIS

Requisito para optar el título profesional de

BIOLÓGO

AUTOR:

Bach. CLAUDIA JEANNETTE SILVA MORENO

DONADO POR:

CLAUDIA J. SILVA MORENO IQUITOS- PERU

Iquitos, 22 de 03 de 2013

2012



382

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO

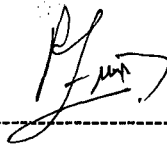
AUTOR: Bach. Claudia Jeannette Silva Moreno.

SUSTENTADA ANTE EL SIGUIENTE JURADO CALIFICADOR:



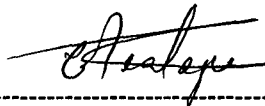
Blga. Blanca Díaz Bardales. Dr.

Presidenta



Blgo. Álvaro Tresierra Ayala. Dr.

Miembro



Blga. Carmen Reategui Bardales. M.Sc

Miembro



Blgo. Jorge Marapara del Aguila. Dr.

ASESOR



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela de Formación Profesional de Biología

Plaza Serafín Filomeno S/N Telef. 23-6121, Anexos 13 y 20

IQUITOS - PERÚ



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Iquitos, a los Veintinueve días del mes de Setiembre del 2009 y siendo las 11:05 a.m horas, el Jurado Calificador y Dictaminador que suscribe, designado con R.D. N° 033-2004-DEFP-B-FCB-UNAP, presidido e integrado por:

Blga. BLANCA MARÍA DIAZ BARDALES Dra.

Blgo. ALVARO TRESIERRA AYALA Dr.

Blga. CARMEN TERESA REATEGUI BARDALES

Se constituyó en la Sala de Conferencias de la Facultad de Ciencias Biológicas, para calificar la tesis titulada: "ADAPTACIÓN AL CULTIVO *IN VITRO* DE CEPAS NATIVAS DE *Plasmodium falciparum* DE LA AMAZONÍA PERUANA", que realizó la Br. en Ciencias Biológicas CLAUDIA JEANNETTE SILVA MORENO de la Promoción II-2002, graduada de Bachiller con R.R. N° 0166-2005-UNAP de fecha 20 de Enero del 2005.

Después de sustentada la Tesis, la bachiller fue sometida a un interrogatorio sobre el tema en cuestión, habiendo absuelto en forma satisfactoria las observaciones y objeciones que fueron formuladas por los miembros del Jurado Calificador y Dictaminador.

Luego de la deliberación y votación, el Jurado Calificador y Dictaminador dio como veredicto Aprobada la Tesis por Unanimidad quedando la candidata apta para ejercer la profesión de Biólogo, previo otorgamiento del Título Profesional por la autoridad Universitaria competente, y su correspondiente inscripción en el Colegio de Biólogos del Perú.

Terminado el acto, la Presidenta del Jurado Calificador y Dictaminador levantó la sesión siendo las 12:05 p.m horas y en fe de lo cual, todas los integrantes del Jurado Calificador y Dictaminador suscriben la presente Acta por triplicado.

PRESIDENTE

MIEMBRO
MIEMBRO

DEDICATORIA

A mis amados padres:

Gilberto y Adita, quienes hicieron posible con su amor, comprensión y sacrificio, inculcándome responsabilidad y superación que culminará esta primera meta de mi vida.

A mis hermanos:

Para poder dejar en ellos un incentivo de seguir adelante, y decirles que nuestros objetivos de vida se deben cumplir si amerita sacrificio

Bach. Claudia Jeannette Silva Moreno.

AGRADECIMIENTOS

- Al Laboratorio de Investigación de Productos Naturales Antiparasitarios (LIPNAA-UNAP), por la valiosa oportunidad de permitirme realizar la presente investigación.
- A la Dra. Lastenia Ruíz Mesia, Directora del laboratorio de Investigación de Productos Naturales Antiparasitarios (LIPNAA-UNAP), por su confianza y apoyo desinteresado en el transcurso de este trabajo.
- Al Dr. Moisés Sihuíncha Maldonado por haberme involucrado en este campo de la investigación, y haberme dado su amistad
- Al Dr. Jorge Marapara del Aguila, por la desinteresada colaboración y asesoramiento en el desarrollo del presente.
- Al señor Norberto Tangoa, por haberme proporcionado las muestras iniciales para la estandarización de la técnica empleada en este trabajo, con total desinterés.

INDICE GENERAL

	Pagina
PORTADA INTERNA	
JURADOS Y ASESORES	i
COPIA DEL ACTA DE SUSTENTACION	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
INDICE GENERAL	v
INDICE DE FIGURAS	viii
ANEXOS	ix
RESUMEN	x
I INTRODUCCION	1
II ANTECEDENTES	3
2.1 Generalidades de malaria	3
2.2 Epidemiología de la Malaria	3
2.3 Ubicación Taxonómica	4
2.4 Ciclo Biológico de <i>Plasmodium falciparum</i>	4
2.5 Grupos sanguíneos	7
2.5.1 El Sistema ABO	8
2.6 Relación entre los Grupos Sanguíneos y la Malaria	10
2.7 Evolución y Modificaciones del cultivo <i>in vitro</i> de <i>Plasmodium falciparum</i>	11

2.8	Estudios de Adaptación al cultivo <i>in vitro</i> de <i>Plasmodium falciparum</i>	14
2.9	Formación de Gametogénesis en cultivo <i>in vitro</i> de <i>Plasmodium Falciparum</i>	15
2.10	Usos de los cultivo <i>in vitro</i> de <i>Plasmodium falciparum</i>	16
III	MATERIALES Y METODOS	18
3.1	MATERIALES	18
3.1.1	Material Biológico	18
3.1.2	Material de Laboratorio	18
3.1.3	Equipos	19
3.1.4	Reactivos	19
3.1.5	Medio de Cultivo	20
3.1.6	Otros	20
3.2.	MÉTODOS	21
3.2.1	Área de Estudio	21
3.2.2	Obtención de Sangre Total de Donantes de Sanos	23
3.2.3	Obtención de la muestra de sangre parasitada	23
3.2.4	Cultivo <i>in vitro</i> de Estadios Intraeritrocitarios de <i>Plasmodium Falciparum</i>	24
3.3.4.1	Preparación del Material Biológico	24
3.3.4.1.1	Separación del Plasma	24
3.3.4.1.2	Separación de Eritrocitos	24
3.3.4.1.3	Separación de Eritrocitos Infectados	25
3.3.4.2	Adaptación al cultivo <i>in vitro</i> de <i>Plasmodium falciparum</i>	25
3.3.4.3	Congelamiento de Cepas Adaptadas	26

3.3	ANALISIS DE DATOS	27
IV.	RESULTADOS	28
4.1	Comportamiento de las cepas nativas de <i>P. falciparum</i> en el cultivo <i>in vitro</i>	28
4.2	Relación entre la densidad parasitaria y la parasitemia del cultivo	29
4.3	Relación entre la Parasitemia de los cultivos y el grupo sanguíneo empleado	30
4.4	Crecimiento de diferentes cepas en determinados Grupos Sanguíneos	31
4.5	Perfil de crecimiento de determinadas cepas en los tres Grupos sanguíneos diferentes	33
V	DISCUSION	35
5.1	Comportamiento de las cepas nativas de <i>P. falciparum</i> en el cultivo <i>in vitro</i>	35
5.2	Relación entre la densidad parasitaria y la parasitemia del cultivo	36
5.3	Relación entre la Parasitemia de los cultivos y el grupos sanguíneo Empleado	37
VI	CONCLUSIONES	40
VII	RECOMENDACIONES	41
VIII	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	42

INDICE DE FIGURAS

Figura 01	:	Ciclo de vida de <i>Plasmodium falciparum</i>	7
Figura 02	:	Residuos de aminoácidos críticos de las enzimas GTA y GTB17	8
Figura 03	:	Diagrama que muestra las cadenas de carbohidratos que determinan los grupos sanguíneos del sistema ABO	9
Figura 04	:	Flujograma de metodología de trabajo	22
Figura 05	:	Porcentajes de cepas nativas que fueron refractarias al crecimiento y aquellas que crecieron en las condiciones de cultivo <i>in vitro</i>	28
Figura 06	:	Gametogénesis de cepas nativas de <i>Plasmodium falciparum</i> en Cultivo <i>in vitro</i>	29
Figura 07	:	Correlación y Regresión Lineal entre la densidad parasitaria y la parasitemia alcanzada a los 8 días de cultivo en las cepas nativas de <i>P. falciparum</i>	30
Figura 08	:	Perfil de crecimiento de la cepas nativas en 8 días de cultivo	31
Figura 09	:	Perfil de crecimiento de cuatro cepas nativas en plasma y eritrocitos de determinado grupo sanguíneo del sistema	32
Figura 10	:	Perfil de crecimiento de dos cepas nativas en plasma y eritrocitos de tres grupos sanguíneos del sistema ABO	33

ANEXOS

ANEXO I	:	AREA DE ESTUDIO	49
ANEXO II	:	CONSENTIMIENTO INFORMADO DE DONANTES	
		VOLUNTARIOS DE SANGRE	50
ANEXO III	:	PREPARACION SE SOLUCIONES DIVERSAS	52
3.1		Preparación de Medio RPMI-1640 incompleto	52
3.2		Solución de Congelamiento de la cepa	53
3.3		Solución Madre Giemsa	53
ANEXO IV	:	CONTEO DE LA PARASITEMIA DEL CULTIVO	54
4.1		Realización del frotis	54
4.2		Cálculo de la parasitemia	54
4.3		Tabla de dilución de la parasitemia	54
ANEXO V	:	Tabla de muestras ingresadas al cultivo	56
ANEXO V	:	Tabla de muestras para estandarización de técnica	56
ANEXO VI	:	Curvas de crecimiento de las cepas nativas de	
		<i>P. falciparum</i>	57
ANEXO VII	:	RESULTADOS DE ANALISIS CON SPSSv 12.0	61
ANEXO VIII	:	CONTAMINANTES DE CULTIVO	62

RESUMEN

La malaria representa un problema de salud que afecta a millones de personas al año en diferentes países del trópico. De las especies que infectan al hombre, *P. falciparum* es el causante de la mayoría de las muertes. Por lo que para su control es fundamental realizar estudios con fines de desarrollar nuevos fármacos efectivos, el desarrollo de vacunas, estudios bioquímicos y moleculares que permitan identificar nuevos blancos de ataque al parásito. Para poder lograr estos propósitos es fundamental contar con cepas adaptadas al cultivo *in vitro*. En ese sentido en este estudio se tuvo como objetivo fundamental adaptar cepas nativas de *P. falciparum* al cultivo *in vitro* en diferentes grupos sanguíneos del sistema ABO. Las muestras de sangre infectadas por *P. falciparum* fueron obtenidas de cuatro comunidades de la Microrred de Salud Sur, las muestras fueron procesadas y manipuladas para su cultivo *in vitro* con técnicas estándares adaptadas a nuestro laboratorio. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente con el programa SPSS v 12.0. La mayoría de las muestras cultivadas mostraron crecimiento *in vitro* (84%) y el resto (16%) fueron refractarias al crecimiento. Algunas de las cepas se caracterizaron por ser gametogénicas permanentes a lo largo del proceso de cultivo, mientras que otras solo mostraron esta particularidad cuando variaban las condiciones normales de cultivo. Se ha encontrado correlación y regresión lineal significativas entre la densidad parasitaria y la parasitemia alcanzada a los ocho días de cultivo (Correlación de Pearson=0.828, $p<0.01$; $R^2=0.664$, $p<0.01$). Las parasitemias de las cepas cultivadas *in vitro* mostraron incrementos en función al tiempo de cultivo en todos los grupos sanguíneos estudiados, con diferencias que no fueron estadísticamente significativas ($F_c= 1.006$ y $p=0.370$).

Palabras clave: Adaptación, Cultivo *in vitro*, cepas, *P. falciparum*, grupo sanguíneo.

I. INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad causada por parásitos hemáticos del género *Plasmodium* y se transmiten al humano por la picadura de mosquitos del género *Anopheles*. De las 100 especies de *Plasmodium* conocidas solamente cuatro infectan al hombre: *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum*. (Atías y Neghmer, 1985).

Se estima que en el mundo ocurren más de 247 millones de infecciones (datos del 2006) y 880,000 personas mueren al año, según la Organización Mundial de la Salud. El mayor número de casos se observa en niños africanos quienes se infectan con *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) (OMS, 2009).

La enfermedad se distribuye en todos los continentes, con predominio en las zonas tropicales. En Sudamérica: Brasil, Perú y Colombia son los países más afectados con cerca de un millón de casos por año (OMS, 2009). En nuestro país, para el año 2008 se ha reportado un total de 37903 casos de malaria, siendo 33415 (88.2 %) por *P. vivax* y 4488 (11.8 %) de malaria por *P. falciparum*. Asimismo, el mayor número de casos de malaria (21372) ocurrió en la DISA Loreto. Por esta razón la Amazonía peruana y particularmente la región Loreto es considerada de muy alto riesgo para esta enfermedad (DGE, 2009).

En el Perú, esta enfermedad re-emergió entre los años 1998 a 2002 en áreas donde ya estaba controlada, actualmente la prevalencia ha disminuido considerándose como hipoendémica en muchas zonas. Esta enfermedad se presenta como un gran problema de salud, debido a la aparición de anofelinos resistentes a insecticidas, multidrogoresistencia de los plasmodios a las drogas antimaláricas y la ausencia de vacunas que confieran una protección a la enfermedad (OMS, 2009; Ferreira, 2001).

Con la finalidad de contribuir a solucionar este problema de salud, el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales Antiparasitarios de la Amazonía (LIPNAA-UNAP), está enfatizando sus investigaciones en la búsqueda, selección, evaluación y

purificación de sustancias antimaláricas de origen natural que tienen antecedentes etnobotánicos, las que necesitan ser probadas para verificar dicha actividad en cultivos *in vitro* de cepas de *Plasmodium falciparum*.

Debido a que en nuestro país no se contaba con cepas de *P. falciparum* con las que se puedan hacer las evaluaciones *in vitro*, pese a que se han realizado la adaptación de 10 muestras de *P. falciparum* en el Instituto Nacional del Perú (PARDAVÉ *et al.* , 1998), y peor aún no realizaron otros estudios con estos aislados, los que en la actualidad se perdieron, por lo que se vio la necesidad de armar un Banco de cepas de esta especie de nuestra zona, ya que hay mucha variabilidad de genotipos del parásito en las diferentes áreas endémicas de malaria y las respuestas de estos no son las mismas. Al tener el Banco de cepas nativas se podrían realizar diversos estudios: a) inmunológicos, para determinar los mecanismos de invasión del parásito a los eritrocitos (BAUM *et al.* 2003), así también observar la actividad neutralizante de los anticuerpos en pruebas de inhibición del crecimiento del parásito *in vitro* (BOLAD *et al.*, 2003); b) bioquímicos, para buscar nuevos mecanismos de acción de diversos fármacos; c) genéticos y moleculares, para encontrar los genotipos del parásito existentes en la zona (RANJIT y SHARMA, 1999). Para lograr dicho propósito, fue necesario realizar estudios que nos permitieron establecer las condiciones de adaptación al cultivo *in vitro* del parásito obtenido de pacientes que padecen malaria. Por lo cual, este trabajo de investigación tuvo como objetivo principal realizar la adaptación al cultivo *in vitro* de cepas nativas de *Plasmodium falciparum* de la Amazonía Peruana, utilizando plasmas y eritrocitos de los grupos sanguíneos del sistema ABO, para determinar en cual de ellos tiene mejor crecimiento.

II. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades de la malaria

La malaria es una enfermedad parasitaria transmisible. Los agentes etiológicos que causan la enfermedad fueron identificados por Laveran en 1889 y posteriormente en 1987 Ross demostró que los mosquitos del género *Anopheles* son los vectores que transmiten estos parásitos. La transmisión se da de una persona enferma a otra sana a través de la picadura del mosquito hembra (OMS, 2009).

En la actualidad, se conocen más de cien especies del género *Plasmodium*, de las cuales, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium malariae* infectan al hombre (Sherman, 1999). También se han identificado aproximadamente 380 especies de mosquitos del género *Anopheles*, de las cuales 60 pueden transmitir el parásito (OMS, 2009).

De las 4 especies de protozoarios que causan la malaria, *Plasmodium falciparum* es el más peligroso. Puede mostrar un cuadro clínico muy variado que incluye escalofríos, fiebre, sudoración, tos, diarrea, dificultad respiratoria, cefalea, entre otros síntomas. El paciente que no recibe tratamiento puede mostrar ictericia, defectos de coagulación, shock, insuficiencia renal y hepática, encefalopatía aguda, edema pulmonar y cerebral coma y muerte. Estas complicaciones se deben a que los glóbulos rojos infectados por esta especie de parásito se adhieren a las paredes de los vasos sanguíneos, limitando el suministro de nutrientes y oxígeno a los órganos (OMS, 2009).

2.2. Epidemiología de la malaria

La malaria, junto con el SIDA y la tuberculosis son las tres enfermedades infecciosas más comunes y letales del mundo. Particularmente la Malaria afecta a 247 millones de individuos anualmente (según datos del 2006), de los cuales, mueren

aproximadamente 880,000 de personas principalmente niños menores de 5 años que viven en Sub-Saharia de África (OMS, 2009).

Esta ampliamente distribuida en el mundo entero pero se confina principalmente en África, Asia y América Latina. Los problemas para controlar la malaria en estos países se agravan por la inadecuada infraestructura de los centros de salud y la pobre condición socioeconómica de sus habitantes. En los últimos años la situación se ha puesto más compleja con el aumento de la resistencia a drogas que comúnmente son usadas para combatir el parásito causante de la enfermedad (CDC 2009, OMS 2009).

La malaria es actualmente endémica en 90 países con pequeñas tasas de transmisión y su distribución varía enormemente de país a país y dentro de ellos mismos (OMS, 2009).

2.3 Ubicación Taxonómica (Levine, 1988)

Reino	Eucariota
Subreino	Protozoa
Superphylum	Alveolata
Phylum	Apicomplexa
Orden	Haemosporida
Familia	Plasmodiidae
Género	<i>Plasmodium</i>

Especies que infectan al hombre:

- Plasmodium falciparum*
- Plasmodium vivax*
- Plasmodium ovale*
- Plasmodium Malariae*

2.4. Ciclo biológico de *Plasmodium falciparum*

Los parásitos que causan la Malaria presentan ciclos biológicos similares. Requieren de dos hospederos para completar el ciclo: el hospedero definitivo es un mosquito del

género *Anopheles*, donde se reproducen sexualmente (esporogonia) y el hospedero intermediario es el humano, donde se multiplican asexualmente (esquizogonia) en las fases exoeritrocítica y eritrocítica (Rhodain y Pérez, 1985).

Para que se dé la reproducción sexual es necesario que el mosquito hembra del género *Anopheles* ingiera sangre de un hospedero infectado por *Plasmodium*. En el tubo digestivo del mosquito se inicia el ciclo sexuado. La fecundación de un gameto hembra (macrogametocito con 16 a 23 μm de \emptyset) por un gameto macho (microgametocito con 9 a 11 μm de \emptyset) da como resultado la formación de un cigoto, este proceso tiene lugar en el estómago del mosquito entre 20 minutos hasta 2 horas después de la ingesta de sangre (Rhodain y Pérez, 1985).

El cigoto se alarga, se mueve, y por lo tanto se denomina ooquineto (18 a 24 μm de \emptyset). Esta formación tiene un complejo apical apto para la penetración celular. El ooquineto atraviesa la pared estomacal del mosquito pasando entre dos células del estómago o a través de las células, se redondea, se adhiere a la cara externa de esta pared y se convierte en ooquiste. Los ooquistes sobresalen en la parte externa del estómago del mosquito que puede alojar centenares de ooquistes (Rhodain y Pérez, 1985).

El desarrollo del ooquiste (40 o 80 μm de diámetro) conduce a la producción asexuada de numerosos esporozoitos (alrededor de 10.000) haploides, delgados, filiformes (15 μm de largo), con complejo apical. Al liberarse del ooquiste se dispersan en el cuerpo del mosquito y se desplazan a las glándulas salivares del mosquito que pueden llegar a contener de 100 hasta 70.000 esporozoitos (Rhodain y Pérez, 1985).

La duración del ciclo evolutivo en el mosquito depende del mosquito mismo, de la temperatura y de la especie de *Plasmodium* (7 días para *P. vivax*, hasta alrededor de 35 días para *P. malariae*, 14 para *P. falciparum*) (Rhodain y Pérez, 1985).

El ciclo en el ser humano presenta dos fases de multiplicación asexuada, o esquizogonia. La primera tiene lugar en los hepatocitos (esquizogonia exoeritrocitaria) y la segunda en los glóbulos rojos (esquizogonia eritrocitaria). Los esporozoitos presentes en las glándulas salivares del mosquito son inyectados con la saliva del insecto en el momento de la picadura. En una media hora, los esporozoitos abandonan el sistema vascular penetrando al interior de las células parenquimatosas del hígado.

Estas células, especializadas en la destrucción de partículas extrañas y localizadas en la periferia de los capilares hepáticos, son las células de Kupffer. Sin embargo, los esporozoitos escapan a la destrucción. En condiciones experimentales, los esporozoitos son capaces de penetrar al interior de los macrófagos y de destruirlos. Después de atravesar las células de Kupffer, los esporozoitos se instalan en los hepatocitos donde, en menos de 48 horas, alcanzan el tamaño de un ooquiste (40 μm). Esta fase diferencia *P. falciparum* y *P. malariae* de *P. vivax* y *P. ovale* (Sherman, 1999).

Para las cuatro especies se observa una multiplicación asexual; pero para *P. vivax* y *P. ovale* algunos esporozoitos pasan por una fase de espera antes de empezar la multiplicación asexual. Este estadio, llamado hipnozoito, puede permanecer meses antes de iniciar la división asexual (Sherman, 1999).

La multiplicación asexual en el hígado conduce a la producción de miles de merozoitos en cada célula infectada (10,000 para *P. falciparum* hasta 30,000 para *P. vivax*). La ruptura de estas células, llamadas esquizontes hepáticos, liberan los merozoitos (tercera forma que presenta un complejo apical) en la sangre, donde se desarrolla el ciclo asexual en el interior de los eritrocitos. Esta fase es responsable de la sintomatología dominante del paludismo. El lapso de tiempo entre la picadura y la aparición de los merozoitos en los eritrocitos se llama período prepatente. Su duración depende de la especie plasmodial: desde los 5,5 días en el caso de *P. falciparum* hasta los 15 días para *P. malariae* (Sherman, 1999).

Para que el merozoito inicie el proceso de reconocimiento inicial y la fijación a la membrana eritrocitaria requieren receptores específicos en la superficie del eritrocito. Así, en primer lugar el merozoito toca la superficie del eritrocito y las roptrias (complejo apical del merozoito) descargan sus sustancias que juegan un papel activo en la invasión del eritrocito logrando que este se invagine, de esta forma el merozoito penetra y abandona su capa de protección y desarrolla una vacuola parasitófora donde el parásito evoluciona en forma de trofozoito y esquizonte – una forma plurinuclear que conduce a nuevos merozoitos (de 4 a 36 a 48-72 horas dependiendo de la especie). (Sherman, 1999; Peters, 1987).

De esta manera se repite el ciclo eritrocítico cuando los merozoitos son liberados por ruptura del eritrocito infectado y parasitan nuevos glóbulos rojos. Al romperse, el eritrocito libera productos del metabolismo del parásito y del mismo eritrocito, que son responsables de la sintomatología en general y del paroxismo palúdico en particular dependiendo de la especie, ya que la periodicidad de estos ataques nos indican con bastante aproximación la especie involucrada. (Sherman, 1999; Atias 1985)

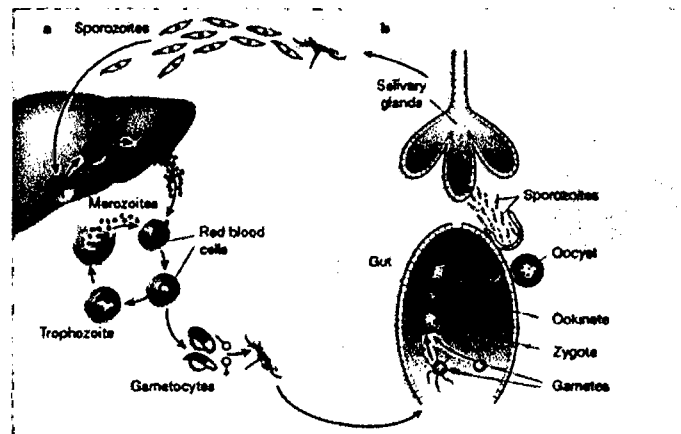


Figura 01. Ciclo Biológico de *Plasmodium falciparum*

2.5. Grupos sanguíneos

Se han identificado 39 genes que codifican antígenos de sistemas de grupos sanguíneos, el número total de variantes alélicas de estos genes suman 924 (Blood Group Antigen Gene Mutation Database, 2007). Entre los sistemas de grupos sanguíneos tenemos: ABO, Chido Rodgers (Ch/Rg), Colton (CO), Cromer (CROM), Diego (SLC4A1, banda 3), Dombrock (DO), Duffy (DARC), Gerbich (Ge), GIL, H/h, I (Ii), Indian (IN), JMH (John Milton Hagen), Kell y XK (Kel/XK; Cellano), Kidd (JK), Knops (KN), Landsteiner-Wiener (LW), Lewis (Le), Lutheran (Auberger), MNS (glicoforina A, B y E), OK, relacionado a P (Glob collection and glob system), RAPH (MER2), Rh, Scianna (Sc), T/Tn, Xg y Yt (Cartwright). (BLOOD GROUP ANTIGEN GENE MUTATION DATABASE 2007).

2.5.1 El sistema ABO

Los antígenos del sistema ABO no son productos genéticos primarios, son los productos de las reacciones catalíticas de enzimas llamadas glicosiltransferasas. El sistema ABO es el resultado del polimorfismo de estructuras de carbohidratos complejos de glicoproteínas y glicolípidos expresados en la superficie de los eritrocitos. Las estructuras inmunodominantes de los antígenos A y B, GalNAc alfa 1->3(Fuc alfa 1->2) Gal- y Gal alfa 1->3 (Fuc alfa 1->2) Gal-, respectivamente, son sintetizados por una serie de reacciones. Las N-acetiltransferasas A y B son codificadas por alelos funcionales (alelos A y B) de un solo gen del locus ABO, las cuales catalizan la última etapa del proceso de síntesis. La enzima N-acetilgalactosaminiltransferase (GTA) usa el sustrato UDP-GalNAc para convertir el antígeno H aceptor en el antígeno A, mientras que la enzima galactosiltransferasa (GTB) emplea el sustrato donador UDP-galactosa para transformar el antígeno H aceptor en el antígeno B. GTA y GTB solo difieren en la identidad de cuatro residuos críticos de aminoácidos (Yamamoto y Hakomori, 1990, Yamamoto y McNeill, 1996, Patenaude *et al.* 2002).

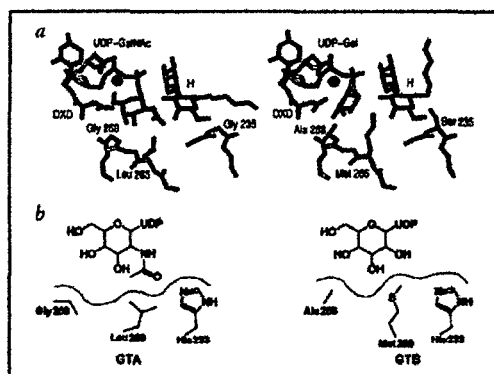


Figura 02. Residuos de aminoácidos críticos de las enzimas GTA y GTB

Mientras que la transferasa codificada por el alelo O no es funcional; por lo tanto, el sustrato aceptor (antígeno H: Fuc alfa 1->2 Gal-) permanece sin modificación en este grupo sanguíneo y los determinantes A y B están ausentes (Figura 02). El antígeno H es un glucoesfingolípido (esfingolípido con carbohidratos unidos a la ceramida). Debido a que este compuesto carece de ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico) se le denomina globósido.

Los individuos con el tipo de sangre A pueden aceptar sangre de donantes de los tipos A y O. Los individuos con el tipo de sangre B pueden recibir sangre de donantes de los tipos B y O. Los individuos del Tipo AB son denominados los aceptores universales. Los individuos de tipo O pueden recibir sangre de donantes de tipo O. El tipo O es llamado el donante universal. No se forman anticuerpos contra el antígeno H, pero sí contra los demás.

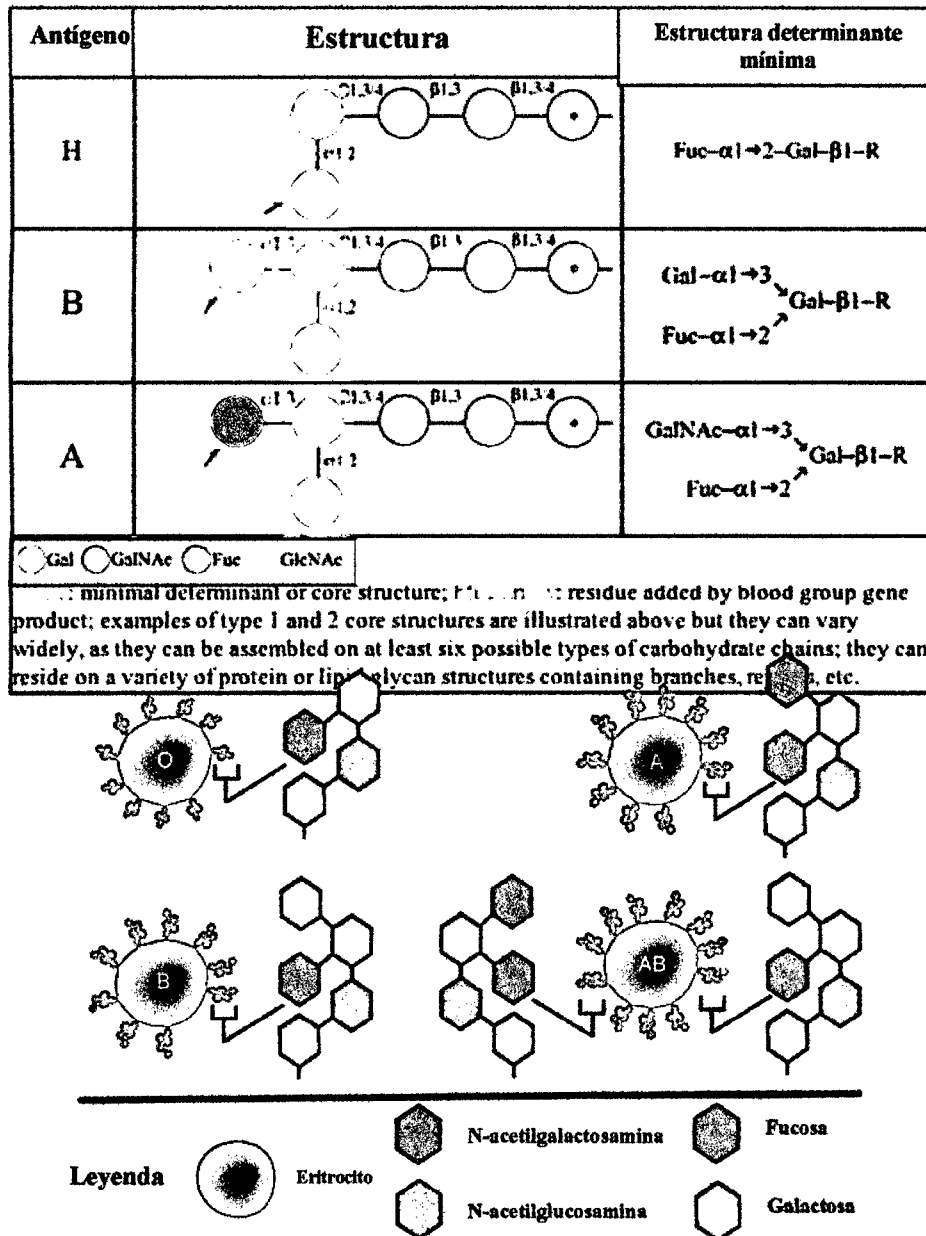


Figura 03. Diagramas que muestran las cadenas de carbohidratos que determinan los grupos sanguíneos del sistema ABO.

La distribución de los grupos A, B, O y AB varía a través del mundo de acuerdo a la población. También, muestra variaciones en subpoblaciones humanas. En el caso de nativos sudamericanos predomina el grupo O hasta con el 100%, entre los aborígenes australianos es frecuente el grupo A (55.6%)

2.6 Relación entre grupos sanguíneos y la Malaria

Montoya et al. (1994), analizaron en cuatro grupos étnicos de Colombia la posible relación entre el grupo sanguíneo de los individuos y la presencia de malaria causada por *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum*. Con respecto al grupo sanguíneo del sistema ABO, encontraron que los antígenos de este sistema no son determinantes para que los individuos muestren resistencia o susceptibilidad a la infección. Lo contrario observaron con los grupos sanguíneos del sistema MNS, Ss y Duffy en el que, los individuos que no presentan estos antígenos (MNS, Ss y Duffy) son resistentes a la infección causada por los plasmodios.

Singh et al. (1995), evaluaron la susceptibilidad a la infección por plasmodios de acuerdo al grupo sanguíneo del sistema ABO en pacientes hindúes. Sus resultados muestran que las personas de los grupos A, B y O son igualmente susceptibles a la infección. Mientras que las personas que presentan el grupo AB tuvieron con menor frecuencia los parásitos de la malaria. Asimismo, observaron que infecciones causadas por *P. falciparum* fueron poco frecuentes en personas de los grupos A y O.

Fischer et al. (1998), observaron que la frecuencia de malaria grave en Zimbawe es similar entre pacientes que presentan los grupos sanguíneos del sistema ABO, por lo tanto no hay un grupo en particular que evite la infección de malaria grave, asimismo también observaron que la malaria grave es más frecuente en personas que presentan el grupo sanguíneo A, es decir que son más susceptibles en padecer esta infección mostrando complicaciones debido a la formación de rosetas las cuales obstruyen los capilares afectando así a muchos órganos pudiendo llegar a causar coma y hasta muerte, de estas personas.

Barragán et al. (2000), probaron la capacidad de inhibición de formación de rosetas que tienen los sueros inmunes de pacientes de Gabón que padecieron malaria los cuales pertenecen a los distintos grupos sanguíneos del sistema ABO, observándose que los sueros de los pacientes del grupo sanguíneo O son más efectivos en evitar la formación de estas rosetas a diferencias de los sueros de los pacientes que pertenecieron al grupo sanguíneo A o B.

Unecke (2007), compiló la información sobre la relación entre la infección por malaria grave y el grupo sanguíneo, y en la mayoría de los trabajos se observa que las personas del grupo sanguíneo O son los que presentan mayor resistencia a la infección de malaria grave, y por otro lado las personas que presentan el grupo sanguíneo A, B y AB son más susceptibles a padecer malaria grave y esto se debe por la facilidad que tiene el parásito ante estos eritrocitos de estos grupos en agruparlos formando rosetas.

2.7. Evolución y modificaciones del cultivo *in vitro* de *P. falciparum*

Trager y Jensen (1976), lograron mantener al parásito de la malaria en cultivos continuo *in vitro* utilizando el medio de cultivo RPMI-1640 el cual fue suplementado con suero humano del grupo sanguíneo AB. Para este trabajo después de diluir eritrocitos parasitados conteniendo la cepa que se estableció en este cultivo, la cual fue aislada a partir de sangre de mono *Aotus*, se mantuvieron las siguientes condiciones en cultivo: se creó una atmósfera de 7% de CO₂ y de 1 a 5% de O₂ y se agregó eritrocitos humanos cada 3 a 4 días para mantener la parasitemia, estos eritrocitos fueron los mismos con los cuales se diluyó la muestra parasitada inicial del grupo sanguíneo AB, la razón de la utilización de estos eritrocitos fue para que no causará aglutinación con los eritrocitos del mono. Al final de este estudio obtuvieron como resultado que, a partir de la estandarización del cultivo continuo, se podía mantener 25 ciclos del parásito *Plasmodium falciparum*.

Wasim y Crum (1977), compararon el crecimiento de *Plasmodium falciparum in vitro* utilizando otros suplementos alternativos al plasma humano como la albúmina

humana y la albúmina comercial, obteniendo como resultados crecimiento similares del parásito con la utilización de los suplementos que dan soporte al cultivo.

Zolg et al. (1982), hicieron una modificación en las condiciones de cultivo *in vitro* de *Plasmodium falciparum* estandarizadas por Trager y Jensen 1976, para optimizar el crecimiento del parásito, esta modificación consiste en enriquecer el medio de cultivo RPMI-1640 con TES (methyl-2-aminoethane sulfonic acid), y metilcelulosa sin adicionar glucosa, obteniéndose resultados muy buenos ya que de esta manera se alcanzaron porcentajes de parasitemia final de hasta 2 veces más elevados que los que se obtienen con el método de cultivo original de Trager y Jensen. Por otro lado, identificaron a dos de los factores críticos en el soporte que da el plasma al crecimiento *in vitro* del parásito, estos son la hipoxantina y glutatión, los que van hacer posible que se supere la variabilidad nutricional que existe entre lotes de plasma.

Jensen, (1979), evaluaron el rol que cumplen el pH, la glucosa y el lactato en el cultivo *in vitro* de *Plasmodium falciparum*, observando que la tasa de utilización de la glucosa y la producción aumenta de acuerdo al incremento de la parasitemia como resultado hay influencia de estas variaciones en los rangos de pH del medio de cultivo, el cual fue determinado como uno de los parámetros críticos del cultivo durante este estudio, ya que cuando los rangos de este parámetro varían mucho pueden inhibir el crecimiento del parásito, mucho más que la variabilidad de las tasas metabólicas de producción de lactato y consumo de glucosa. Por tal motivo determinaron que hay rangos de pH y de tasas metabólicas que se les considera óptimos para el buen desenvolvimiento del cultivo.

Crammer et al. (1997), reportan la variación del método de cultivo convencional de Trager y Jensen, donde a uno de los componentes del cultivo, el suero, es reemplazado por el Albumax II, demostrándonos en su estudio que el parásito invade, desarrolla y multiplica en los eritrocitos muy bien o mejor que en el medio de cultivo convencional, así también determinaron que la inclusión de hipoxantina en el medio de cultivo es indispensable para el crecimiento del parásito en corto tiempo y esto es gracias a que

su uso hace posible la superación de la variabilidad del soporte que da el suero en el cultivo.

Mitamura et al. (1998), efectuaron la purificación y la caracterización de factores esenciales del suero humano que son necesarios para la proliferación *in vitro* de *Plasmodium falciparum*.

Kamei et al. (1998), Compararon el efecto de los sueros de gatos, perros, conejos y humanos en el crecimiento de *Plasmodium falciparum* en cultivos *in vitro* y sus resultados muestran que los medios de cultivo suplementados con suero de gato al 3% y suero de humano al 10% tuvieron mejores efectos en el crecimiento del parásito con respecto a los otros tipos de suero empleados.

He et al. (1998), probaron que empleando 24 mM de NaHCO_3 en el medio de cultivo RPMI-1640 se mantiene el pH del cultivo dentro del rango fisiológico y esto resulta apropiado para cultivar *in vitro Plasmodium falciparum* en una atmósfera que contenga 5% de CO_2 ,

Deharo et al. (2000), aseveran que el éxito del cultivo *in vitro* de estadios intraeritrocitarios de *Plasmodium falciparum* está basado en cuatro aspectos fundamentales: el conocimiento del ciclo biológico intraeritrocitario del parásito, el uso del medio de cultivo RPMI (Roswell Park Memorial Institute) suplementado con 10 a 20% de suero o plasma humano, la regeneración del medio de cultivo a través de cambios frecuentes, la reducción de la tensión de oxígeno (2-10%) y el incremento del CO_2 (3-5%).

Li et al. (2003), lograron establecer un nuevo método de cultivo *in vitro* de *Plasmodium falciparum*, donde obtienen altas parasitemias que son necesarias para muchos estudios donde se necesitan altas cantidades de parásitos como por ejemplo los estudios de malaria cerebral; todo se logró a través del uso de un bioreactor de fibra que mantiene saludables los eritrocitos a un hematocrito del 100% por la constante rotación controlada del medio de cultivo.

2.8. Estudios de adaptación al cultivo *in vitro* de *Plasmodium falciparum*

Pardavé et al. (1998), adaptaron al cultivo *in vitro* 10 muestras de pacientes del Perú con malaria, los cultivos fueron realizados con la técnica de Trager y Jensen, empleando medio RPMI 1640 Hepes, Gentamicina, suplementado con 10% de plasma humano del grupo sanguíneo "O", 5% de hematocrito e incubados a 37 °C, los cambios del medio de cultivo se realizaron cada 24 horas.

Saito-Ito et al. (2001), utilizaron las cepas referenciales de *Plasmodium falciparum*, haciendo el cultivo de las mismas bajo las siguientes condiciones convencionales: agregando 25mM de HEPES, 24 mM de NaHCO₃, 10.3 mM de D-glucosa, 10 mg/l de hipoxantina, 30 mg/l de sulfato de gentamicina y un hematocrito de 1 % con el medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con suero al 10 % inactivado y en una atmósfera 5% de O₂, 5% de CO₂, y 90% de N₂ a 37°C, todo esto para analizar la variabilidad genética que tienen los distintos clones de *Plasmodium falciparum*.

Hijar et al. (2002), cultivaron *in vitro* varias cepas referenciales de *Plasmodium falciparum*, usando medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con L-glutamina, plasma humano y eritrocitos humanos del grupo "O" Rh⁺. Usaron una mezcla de gases de 5% de O₂, 10% de CO₂ y 85% de N₂. Los cultivos fueron incubados a 37°C y el medio de cultivo fue renovado diariamente.

Ohnishi et al. (2001), cultivaron *in vitro* la cepa FVO (Falciparum-Vietnam-Oaknoll) de *Plasmodium falciparum*, empleando medio RPMI 1640 a pH 7.3, 25 mM de Hepes, 23.8 mM de bicarbonato de sodio, 2.1 mM de L-glutamine y 0.367 mM de hipoxantina, suplementando el medio de cultivo con 10% de suero de caballo inactivado en una atmósfera de 2% de O₂, 8% de CO₂ y 90% de N₂.

Imrie et al. (2004), cultivaron *in vitro* cepas nativas de *Plasmodium falciparum* obtenidas en Papua Nueva Guinea utilizando medio RPMI suplementado con 5% de suero humano, manteniendo un hematocrito de 5%.

2.9. Formación de gametogénesis en cultivo

Jensen et al. (1979), produjeron gametocitos de *Plasmodium falciparum* en cultivo continuo, pero no tuvieron mucho éxito ya que a partir del tercer y cuarto día de cultivo la parasitemia se paralizó y los gametocitos que maduraron a los 8 días aproximadamente no fueron funcionales, es decir no son infectivos para el mosquito y esto es importante para otros estudios.

Ifediba y Vanderberg (1981), verificaron que la inducción de gametocitos ocurre más fácilmente cuando los cultivos son mantenidos por extensos períodos de tiempo sin adición de eritrocitos frescos no infectados y esto es intensificado cuando la concentración de eritrocitos es reducida en este período y cuando los cultivos viejos con gametocitos maduros son usados para iniciar nuevos cultivos. Por otro lado comprobaron que la hipoxantina ayuda a desarrollar gametocitos maduros funcionales es decir que son infectivos para mosquitos, ya que muchas veces la inducción de gametocitos no necesariamente produzca gametocitos infectantes para los mosquitos.

Trager et al. (1981), notaron que los gametocitos aparecen en condiciones no favorables de cultivo *in vitro* como cuando no se adiciones nuevos eritrocitos, estas observaciones fueron comparadas con la demostración del trabajo de Ifediba y Vanderberg.

Trager, (1987), afirman que el AMP cíclico y los corticoides son buenos estimulantes para la formación de gametocitos en cultivo, pero que también se postula que algunos clones de *P. falciparum* tienen predisposición genética a formar gametocitos en cultivo.

Williams, (1999), utilizó una nueva alternativa de producción de gametocitos en cultivo *in vitro*, utilizando una monocapa de eritrocitos con una célula y un tejido adhesivo, e inclusión de eritrocitos jóvenes para el conteo de gametocito, pero que sugieren que este medio tiene un factor soluble que estimula la formación de gametocitos. La naturaleza bioquímica de este factor permanece desconocido, pero

piensan que puede ser una simple acumulación de metabolitos de productos de desecho como ácido láctico o un complejo de macromoléculas resultantes.

Schuster, (2002), afirma que la formación de gametocitos en cultivo aumenta cuando se realiza cambios de medio de cultivo sin agregar eritrocitos frescos para el crecimiento; y que algunas condiciones de cultivo afectan la gametocitogénesis de *P. falciparum*, así tenemos que aislados nuevos es más probable que formen gametocitos, que las muestras de llevan largos períodos de tiempo en cultivo, y por otro lado no sólo la hipoxantina es necesaria para la inducción y maduración de gametocitos para que sean infectantes para los mosquitos, sino también hay otros componentes reportados como el carbonato de amonio o bicarbonato de amonio pero no el cloruro de amonio o acetato de amonio con o sin concavalina A.

2.10 Usos del cultivo *in vitro* de *P. falciparum*

Baum et al. (2002), demostraron que la Glicoproteína A (GYPA), es usada por el parásito de la malaria humana *Plasmodium falciparum*, como un receptor de membrana del eritrocito preferido por el parásito para la invasión de eritrocitos, y esto podría ser un agente de selección de los clones que se encuentren en un determinado aislamiento.

Baum et al. (2003), muestran que en el mecanismo de invasión de *Plasmodium falciparum* al eritrocito, depende básicamente o es facilitada por de la existencia de la sialoglicoproteína glicoforina A (GYPA), situada en la membrana del eritrocito (es uno de los muchos de los receptores primarios en el eritrocito) y del antígeno 175 (EBA-175) del estadio eritrocitario merozoito del parásito (uno los muchos antígenos que tiene el parásito que cuenta con una buena capacidad inmunogénica).

Bolad et al. (2003), estudiaron el potencial de actividad neutralizante de los anticuerpos hacia el parásito *Plasmodium falciparum*, esto fue posible a través de pruebas de inhibición del crecimiento *in vitro* (GIA) de aislados de *Plasmodium falciparum* obtenidos de niños asintomáticos de Burkina Faso, demostrando que la

actividad inhibitoria del crecimiento *in vitro* fue más baja por inmunoglobulinas autólogas comparadas con las inmunoglobulinas de otros individuos. Así mismo observaron que todas las infecciones asintomáticas están compuestas de múltiples clones de parásitos genéticamente distintos gracias al análisis de genotipificación y GIA de aislados de 14 días consecutivos de seguimiento, donde muestran que hay clones que persisten desde el día 0 de la infección hasta el día 14 en la misma persona y algunas veces aparece un nuevo clon en el día 14 y frecuentemente se observó que los aislados del día 14 fueron inhibidos efectivamente por Inmunoglobulina autóloga del día 14 en comparación al del día 0. Sin embargo la presencia de clones de parásitos persistentes en niños asintomáticos indica que el parásito puede desarrollar una relativa resistencia para neutralizar la respuesta inmune.

Ranjit y Sharma (1999), investigaron la diversidad genética de *Plasmodium falciparum* de distintos aislamientos de la India, a través de la técnica de PCR amplificaron la región de los genes de los antígenos MSA-1, MSA-2 y CSP (antígeno 1 de la superficie del merozoito, antígeno 2 de la superficie del merozoito y la proteína circumsporozoita, respectivamente) candidatos para la vacuna de malaria; y observaron que en la región hiperendémica (Orisa) no solo mostró un elevado numero de formas variantes del gen, es decir de muchos genotipos; sino también un número elevado de casos con alelos mixtos comparados con regiones que no tienen hiperendemicidad.

Druilhe et al. (1998), identificaron que un aislamiento realizado a partir de una muestra sanguínea de un paciente con malaria esta compuesto de una mezcla de diferentes clones del parásito, y que ésta diversidad no solo es producto de la superimposición de múltiples infecciones ocasionadas por parásitos genéticamente distintos inoculados por varias picaduras de los mosquitos vectores, como se observa en lugares con alta endemicidad de malaria, sino que en este estudio comprobaron que un solo inculo de un mosquito contribuye a observar polimorfismos de los aislados, por lo que en áreas de baja endemicidad y en cortos períodos de exposición haya una alta probabilidad de infección por la diversidad genética.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1. Material biológico

- Eritrocitos humanos de pacientes residentes en la jurisdicción de la Microrred Sur del Ministerio de Salud parasitados con cepas nativas de *Plasmodium falciparum*.
- Eritrocitos humanos de personas sanas de los grupos sanguíneos A, B y O con factor Rh +.
- Plasma humano de personas sanas de los grupos sanguíneos A, B y O con factor Rh +.

3.1.2. Material de Laboratorio

- Bolsas colectoras de sangre con anticoagulante.
- Criotubos estériles de 1.5 mL.
- Filtros de membrana de 47mm x 0,22 μ m.
- Fiolas de 1000 mL.
- Frascos estériles de cultivo de 25.0 cm² cuello inclinado.
- Frascos estériles de cultivo de 75.0 cm² cuello inclinado.
- Gasa o algodón.
- Guantes.
- Jeringas desechables de 1 mL, 5 mL, y 50 mL, con agujas de 25G y 20G.
- Láminas porta-objetos.
- Mascarillas descartables.
- Matraz Erlenmeyer de 500 y 1000 mL.
- Pipetas de plástico estériles de 1 mL, 5 mL y 10 mL.
- Pipetas Pasteur.
- Pipetas graduadas.
- Probetas de 500 y 1000 mL.

- Puntas estériles amarillas de 2-200 μL .
- Puntas estériles azules de 100-1000 μL .
- Tubos al vacío con EDTA tripotásico de 3 mL.
- Tubos de ensayo de 5 y 10 mL.
- Tubos estériles de plástico para centrifugación de 15 mL.
- Tubos estériles de plástico para centrifugación de 50 mL.
- Vela.

3.1.3. Equipos

- Agitador magnético IKA.
- Autoclave ALL AMERICAN.
- Balanza Analítica OHAUS.
- Baño-maría VWR.
- Bomba al vacío.
- Cámara de Bioseguridad Tipo II LABCONCO.
- Centrífuga Universal HETTICH.
- Congelador de -40 a -86 $^{\circ}\text{C}$ REVCO.
- Estufa básica para cultivo (37 $^{\circ}\text{C}$) VWR.
- Lector de ELISA OPSYS MR.
- Microscopio compuesto ZEISS.
- Potenciómetro METROHM.
- Refrigerador INRESA.

3.1.4. Reactivos

- Agua bidestilada.
- Bicarbonato de sodio anhidro p.a.
- Citrato de sodio p.a.
- Cloruro de sodio p.a.
- Dextrosa p.a.
- D-sorbitol p.a.
- Etanol al 70%.

- Fosfato de potasio monobásico anhidro p.a.
- Fosfato de sodio dibásico anhidro p.a.
- Gentamicina p.a.
- Giemsa.
- Glicerolyte (57 g de glicerina, 1.6 g de lactato de sodio, y buffer compuesto de 30 mg de Cloruro de potasio, con 51.7 mg de fosfato de sodio monobásico y 124.2 mg de fosfato de sodio dibásico; con pH aproximado de 6.8, ajustado con ácido fosfórico
- Hidróxido de Potasio.
- Hielo seco.
- Hipoclorito de Sodio.
- L-Glutamina p.a.
- Metanol Absoluto.
- Mezcla gaseosa (5% de O₂, 5% de CO₂ y 90% de N₂).

3.1.5. Medio de Cultivo

- Medio de cultivo RPMI 1640 cuya composición se detalla en el anexo III.

3.1.6. Otros

- Auxiliar de pipeteo PIPETUS®.
- Contómetro manual de células VWR.
- Desecador con llave de paso.
- Kit para cuantificación de Hemoglobina.
- Kit para diagnóstico de HIV.
- Kit para diagnóstico de HVB.
- Kit para diagnóstico de Sífilis.
- Kit para sistema ABO.
- Micropipeta de 200 -1000 µL.
- Micropipeta de 5 -50 µL.

- Micropipeta de 50 -200 μ L.
- Micropipeta multicanal de 50- 200 μ L.

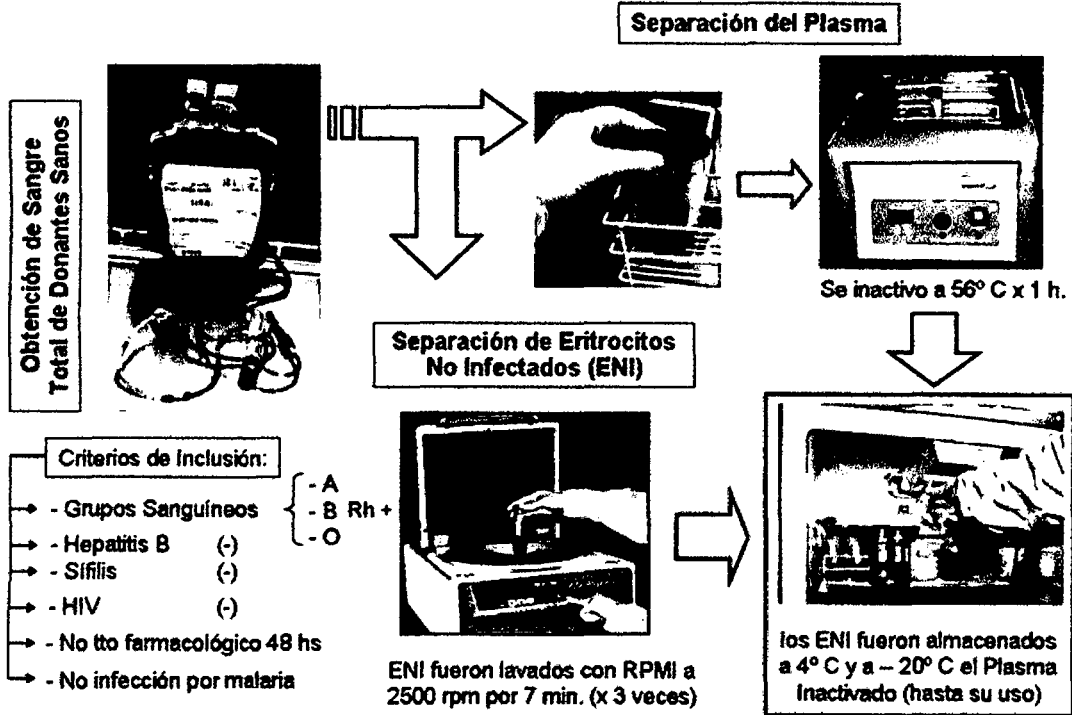
3.2. MÉTODOS

3.2.1 Área de estudio

Está localizada al sur de Iquitos, en el Distrito de San Juan, considerado foco de transmisión de malaria causada por *P. falciparum* y *P. vivax*. Los habitantes de las comunidades rurales en San Juan tienen infecciones por *P. falciparum* y *P. vivax*, principalmente detectadas en la estación de lluvias (enero a julio).

Las comunidades en las cuales se realizó este estudio fueron seleccionadas por la prevalencia de malaria causada por *P. falciparum* y la buena aceptación por los pobladores. Las comunidades están separadas por aproximadamente 2 km y son atendidos por una Posta de Salud del Ministerio de Salud. Entre estas comunidades están Zungarococha (N=896, 73°21'06"/03°49'35"), Puerto Almendra (N= 236, 73°22'42"/03°49'56"), Ninarumi (N=496, 73°23'19"/03°50'41") y Llanchama (N=217, 73°25'01"/03°51'23") (Branch et al, 2005). El ambiente y el nivel de ingresos son similares. El pueblo de Zungarococha está más desarrollado y es donde está localizada la Posta de Salud. Todos estos pueblos se sostienen principalmente de la agricultura y la pesca. En cada pueblo la mayoría de las casas están construidas por material rústico y generalmente son contiguas unas de otras (más del 70% de las casas están separadas menos de 6 metros entre sí). Las casas están localizadas generalmente a menos de 100 metros de los ríos o cochas y el bosque, y no presentan barreras para el ingreso de zancudos.

PREPARACIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO



ADAPTACION AL CULTIVO IN VITRO

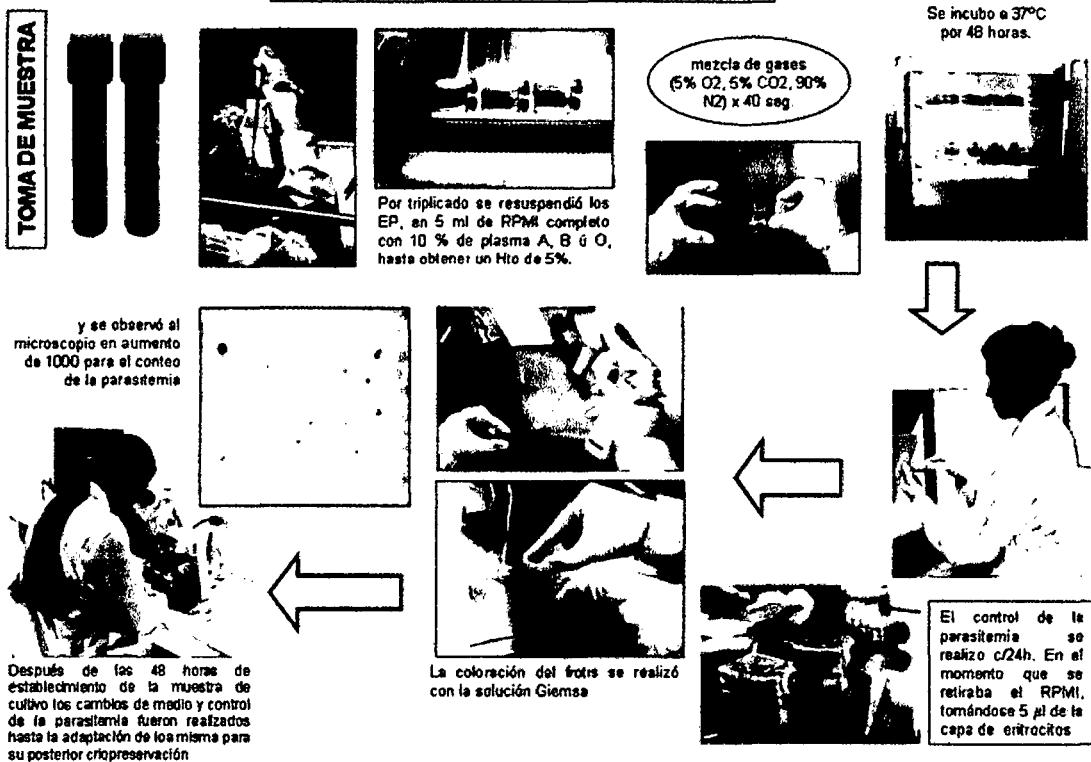


Figura 04. Flujograma de metodología de trabajo

3.2.2. Obtención de sangre total de donantes sanos

El plasma y los eritrocitos no parasitados fueron obtenidos previa firma de un consentimiento informado (ver ANEXO II) de 15 donantes voluntarios, los cuales cumplieron con los siguientes criterios de inclusión:

- Pertenecer a los grupos sanguíneos A, B ó O,
- Tener entre 18 y 48 años,
- Ser seronegativos a sífilis, hepatitis B y virus de la inmunodeficiencia humana,
- Presentar el factor Rh +,
- No haber recibido tratamiento farmacológico 48 horas previos a la toma de la unidad de sangre, y
- No haber presentado infección por malaria.

De los donantes que resultaron aptos, se tomó una unidad de sangre en el Banco de Sangre del Hospital Regional de Loreto en bolsas colectoras con anticoagulante, luego fueron trasladadas en forma inmediata a temperatura de refrigeración al LIPNAA para su procesamiento.

3.2.3. Obtención de las muestras de sangre parasitada

Se tomaron un volumen total de 3 mL de sangre a cada paciente, en tubos al vacío con anticoagulante, previa firma de un consentimiento informado (ver ANEXO II). Dichas muestras fueron obtenidas de 18 pacientes con malaria que fueron proporcionadas por los puestos y centros de salud de la micro red sur del Ministerio de Salud, a través del proyecto MIGIA (Malarial Genetics and Immunologics in the Amazonia).

Los pacientes tuvieron que cumplir con los siguientes criterios de inclusión:

- Diagnóstico de laboratorio por gota gruesa positivo a *Plasmodium falciparum*,
- No haber recibido tratamiento antimalárico previo a la toma de la muestra de sangre,
- Ser seronegativos a sífilis, hepatitis B y virus de la inmunodeficiencia humana,
- Presentar el factor Rh +,
- Ser mayor de 18 años;

Estas muestras fueron transportadas inmediatamente al Laboratorio de Investigación de Productos Naturales Antiparasitarios de la Amazonía (LIPNAA), a temperatura de refrigeración, para su procesamiento inmediato.

3.2.4. Cultivo *in vitro* de estadios intraeritrocitarios de *Plasmodium falciparum*

Se utilizó la metodología de trabajo desarrollada por Trager y Jensen (1976), con sus respectivas modificaciones, que se indican detalladamente a continuación:

3.2.4.1. Preparación del Material Biológico

3.2.4.1.1. Separación del Plasma

1. Para este estudio se utilizó 5 unidades de sangre de cada grupo sanguíneo obtenidos a partir de diferentes donantes, éstas se dejaron reposar de 10 a 24 horas a 4° C hasta que sedimenten los eritrocitos. Luego se separó el plasma en tubos de 50 mL y fue inactivado a 56° C por 30 minutos en baño maría, agitando cada 10 minutos.
2. Después el plasma inactivado se centrifugó a 1500 rpm y el sobrenadante obtenido se colocó en tubos rotulados y se almacenó a -20 °C hasta el momento de su uso.

3.2.4.1.2. Separación de eritrocitos

1. Después de homogenizar la bolsa de sangre se colocó en tubos de centrifuga estériles de 50 mL y fueron centrifugados ab 2500 rpm por 10 minutos.
2. Se recuperó el plasma para su almacenamiento y la capa de leucocitos se descartó, dejando sólo los eritrocitos.
3. Se agregó medio RPMI incompleto (ver ANEXO III) hasta doblar el volumen de eritrocitos.
4. Luego se centrifugó a 2500 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se repitió este proceso dos veces.
5. Se eliminó el sobrenadante de la última centrifugación y se añadió medio RPMI incompleto hasta doblar el volumen de eritrocitos

sedimentados, de tal manera que se obtuvo una suspensión de eritrocitos al 50 %.

6. Luego los tubos fueron rotulados y almacenados a 4°C para ser utilizados en los cultivos.

3.2.4.1.3. Separación de eritrocitos infectados

Las muestras de sangre obtenidas de los pacientes con malaria por *P. falciparum* fueron procesadas como se describe a continuación:

1. Se centrifugó los tubos vacutainer a 1500 rpm durante 7 minutos.
2. Luego se descartó el plasma y leucocitos.
3. Los eritrocitos se lavaron tres veces con medio RPMI incompleto, para ello se añadió medio RPMI en un volumen igual al de los eritrocitos, se centrifugó a 1500 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante.

3.2.4.2. Adaptación al cultivo *in vitro* de cepas nativas

1. Los eritrocitos parasitados y no parasitados fueron resuspendidos por triplicado en 5 mL de medio RPMI completo, con 10 % de plasma A, B ú O respectivamente, hasta obtener un hematocrito de 5%. Para este procedimiento se utilizó frascos de cultivo celular.
2. Se gasificó los frascos de cultivo con la mezcla de gases (5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂) por 40 segundos utilizando una pipeta Pauster, y luego para dejar en la estufa a 37 °C por 48 horas.
3. Después de las 48 horas se retiró el frasco de cultivo de la estufa, con cuidado para no mezclar el medio con el tapete de eritrocitos formado en la parte inferior, y se colocó en la cámara de flujo laminar.
4. Luego se retiró el medio de cultivo e inmediatamente se tomó 5 µL de eritrocitos concentradas para realizar el conteo de la parasitemia (Ver ANEXO 4.1.1)

5. Se realizó la coloración con la solución Giemsa (ver preparación en ANEXO 3.3) se observó al microscopio en aumento de 1000X para el conteo de la parasitemia (ver cálculo de parasitemia ANEXO 4.1.2)
6. Para el cálculo de la parasitemia se consideró todas las formas del parásito, siendo importante el registro de las formas más prevalentes, así como la morfología de las mismas y la presencia de gametocitos en el cultivo continuo por algunas semanas. Si la parasitemia era menor a 0.8% se contó más de 5000 eritrocitos en toda la lámina (Gutiérrez, 2003).
7. El cambio de medio de cultivo se realizó cada 24 horas, anotando en las fichas de registro las observaciones, para evaluar la adaptación. Esto se realizaba hasta que se obtenga una parasitemia de 3%. Para mantener la parasitemia se añadió a los cultivos eritrocitos no parasitados de los respectivos grupos sanguíneos, según la tabla de dilución (ANEXO 4.1.3). Las muestras mantenidas en cultivo que no llegaron al 1% de parasitemia durante 40 días eran descartadas.

3.2.4.3. Congelamiento de cepas nativas.

Se procedió a criopreservar para posteriores estudios las cepas que se hayan adaptado, siguiendo el protocolo que a continuación se detalla:

1. Se verificó que la parasitemia del cultivo este en 4% y que existan por lo menos un 80% de parásitos en el estadio de "anillo".
2. Se tomó todo el contenido del cultivo, trasvasándolo a un tubo estéril de 15 mL y se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos.
3. Al sedimento de eritrocitos se añadió, gota a gota y agitando con suavidad, 4 volúmenes de Glicerolyte estéril.
4. Se distribuyeron 0,5 mL de esta suspensión en criotubos y se congelaron inmediatamente a -86 °C.

3.3. ANALISIS DE DATOS

Los parámetros estadísticos descriptivos e inferenciales tales como el promedio, desviación estándar, frecuencias, porcentajes, correlación, regresión lineal, ANOVA, prueba HSD de Tukey se evaluaron utilizando el programa estadístico SPSS v 12.

Los gráficos que muestran los resultados obtenidos fueron generados en el programa Excell del paquete Microsoft Office 2003.

IV. RESULTADOS

4.1 Comportamiento de las cepas nativas de *P. falciparum* en el cultivo *in vitro*

De acuerdo al crecimiento de las cepas nativas de *P. falciparum* en el cultivo *in vitro* con eritrocitos y plasma de los grupos sanguíneos del sistema ABO (ver ANEXO VI) las podemos clasificar en dos grupos. El primer grupo, estuvo constituido por aquellas cepas que fueron refractarias al crecimiento *in vitro*, es decir sus parasitemias disminuyeron en función al tiempo de cultivo hasta no ser detectables al examen microscópico, este tipo de cepas representa el 16% de las muestras sometidas al cultivo *in vitro* (Figura 05). El segundo grupo, que es el más numeroso (84%), esta representado por cepas que mostraron crecimiento en las condiciones de cultivo *in vitro*; en otras palabras, sus parasitemias aumentaron en relación al tiempo de cultivo. Gran parte de estas muestras se criopreservaron (58% del total de muestras cultivadas), pero también un número significativo de muestras que crecieron fueron perdidas por contaminación, causadas por hongos levaduriformes y filamentosos (26% del total de muestras cultivadas) (Ver Fotos en ANEXO VIII).

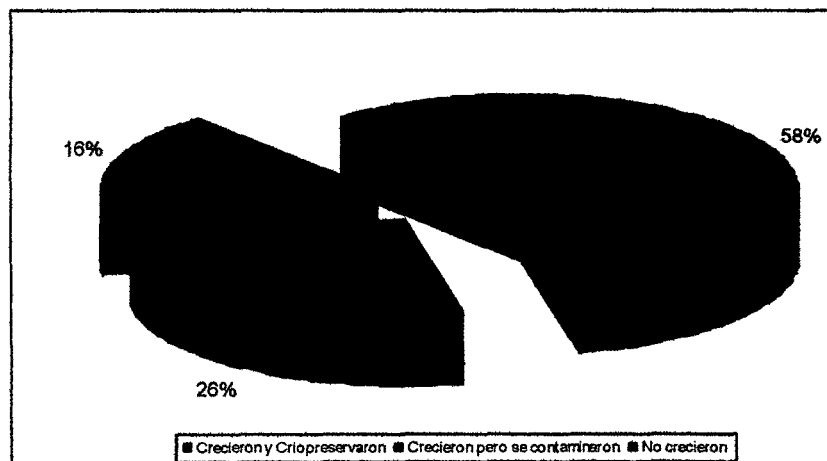


Figura 05. Porcentaje de cepas nativas de *P. falciparum* que fueron refractarias al crecimiento y aquellas que crecieron en las condiciones de cultivo *in vitro*.

Las cepas nativas de *P. falciparum* se diferencian en su capacidad para formar gametos en el cultivo *in vitro*. De acuerdo a la capacidad gametogénica se ha observado dos clases de cepas. La primera clase de cepas se caracterizan por hacer gametogénesis de manera transitoria sólo cuando las condiciones del cultivo son adversas (no cambiar el medio de cultivo en 24 horas, no añadir eritrocitos no infectados frescos, etc) y dejan de producir gametos cuando se restablecen las condiciones normales del cultivo como buen pH, T⁹ eritrocitos infectados frescos. La segunda clase de cepas se destacan por presentar gametogénesis constantemente a lo largo del periodo de cultivo bajo condiciones normales, este comportamiento se reproduce en los tres grupos sanguíneos evaluados, observándose un incremento notable en la parasitemia de los gametos, que en algunos casos puede superar el 1% tal como podemos observar en la Figura 06.

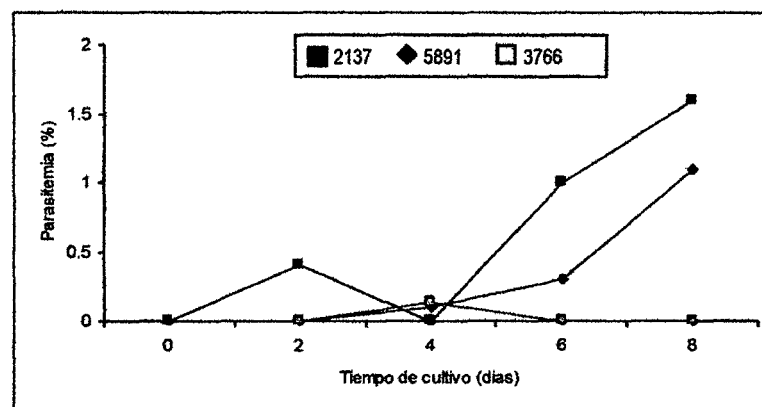


Figura 06. Gametogénesis de cepas nativas de *P. falciparum* en el cultivo *in vitro*.

4.2 Relación entre la densidad parasitaria y parasitemia del cultivo

El crecimiento *in vitro* de las cepas nativas de *P. falciparum* depende de la densidad parasitaria con la que ingresa la muestra sanguínea al cultivo. Se observó una relación directa entre la densidad parasitaria y la parasitemia alcanzada por los aislados a los ocho días de cultivo *in vitro* (excluyendo los datos encerrados en el círculo rojo por ser muy dispersos, Figura 07, Ver ANEXO V), al realizar un análisis de correlación de estas variables se registra una alta correlación igual a 0.828 y estadísticamente significativa

con un $p < 0.01$ (Ver ANEXO VII). Además, mediante un análisis de regresión lineal se pone en evidencia la relación directa entre estas variables con un $R^2 = 0.664$ y cuya ecuación es estadísticamente significativa ($p < 0.01$) (Figura 07 y ANEXO VII). En otras palabras, cuando la densidad parasitaria de la muestra ingresada al cultivo es alta, se observa que a los ocho días de cultivo también se obtiene una mayor parasitemia (más crecimiento *in vitro* de las cepas). Se registra lo contrario cuando la densidad parasitaria es baja, en estos casos la parasitemia lograda a los ocho días de cultivo también es baja.

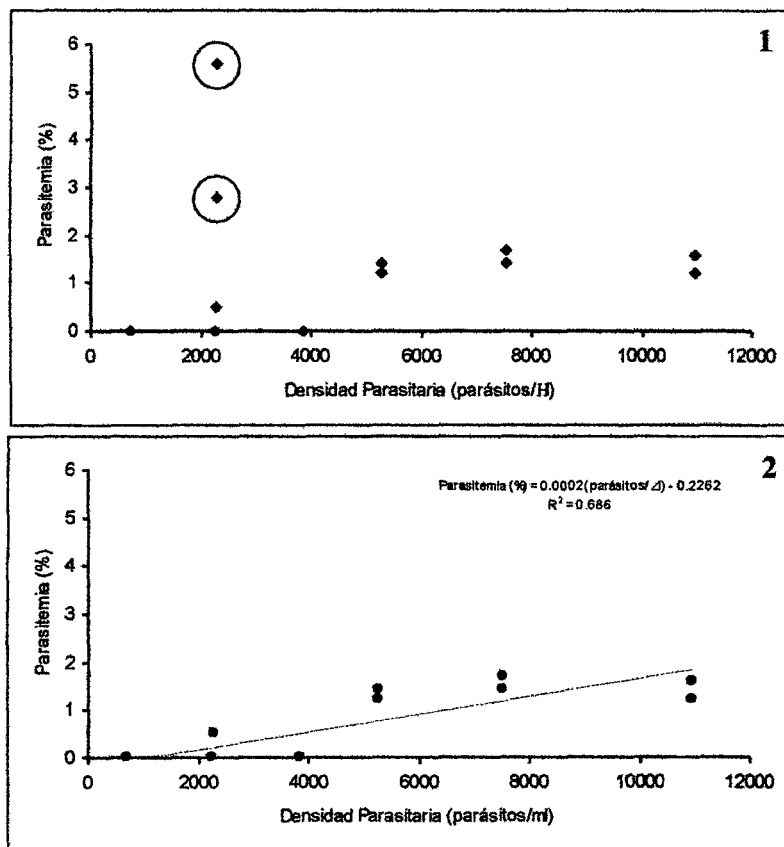


Figura 07. Correlación y Regresión Lineal entre la densidad parasitaria y la parasitemia alcanzada a los 8 días de cultivo en las cepas nativas de *P. falciparum*.

4.3 Relación entre la parasitemia de los cultivos y el grupo sanguíneo empleado

Haciendo un análisis panorámico del proceso de adaptación al cultivo *in vitro* de las cepas que mostraron crecimiento *in vitro*, se nota que la parasitemia se incrementa en función al tiempo de cultivo, obteniéndose en general las mayores parasitemias en el

octavo día de cultivo (Figura 08). El incremento de la parasitemia en el día 8 con respecto al día del inicio del cultivo se incrementó en valores de 17 a 560 veces.

Un patrón de crecimiento similar se observa cuando se considera los grupos sanguíneos de manera individual. En los tres grupos sanguíneos evaluados, se observa un incremento gradual de la parasitemia en función al tiempo del cultivo, mostrando variaciones en las parasitemias de las cepas por día de cultivo dentro de cada grupo y entre los grupos sanguíneos. Estas diferencias observadas en el crecimiento no fueron estadísticamente significativas mediante un análisis de varianza ($F_c=1,006$ $p=0,370$)

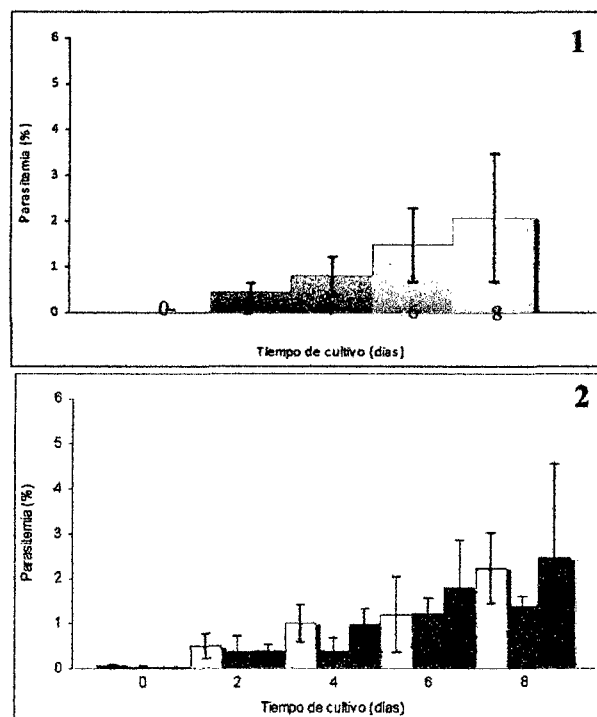


Figura 08. Perfil de crecimiento de las cepas nativas con respecto a los días de cultivo, los experimentos se realizaron por triplicado, las barras indican el rango del promedio más y menos una desviación estándar. **1**, relación total del crecimiento de cepas nativas con respecto a los días de cultivo. **2**, relación del crecimiento de las cepas por grupo sanguíneo.

4.4 Crecimiento de diferentes cepas en determinados grupos sanguíneos

Existen variaciones en los perfiles de crecimiento de las cepas nativas de *P. falciparum* dentro de cada grupo sanguíneo y entre los grupos sanguíneos del Sistema ABO. Tal como se manifestó líneas arriba, estas diferencias (Figura 09)

son evidentes y más marcadas en el grupo sanguíneo A en los días sucesivos de cultivo, siendo mayor las diferencias en el octavo día de cultivo.

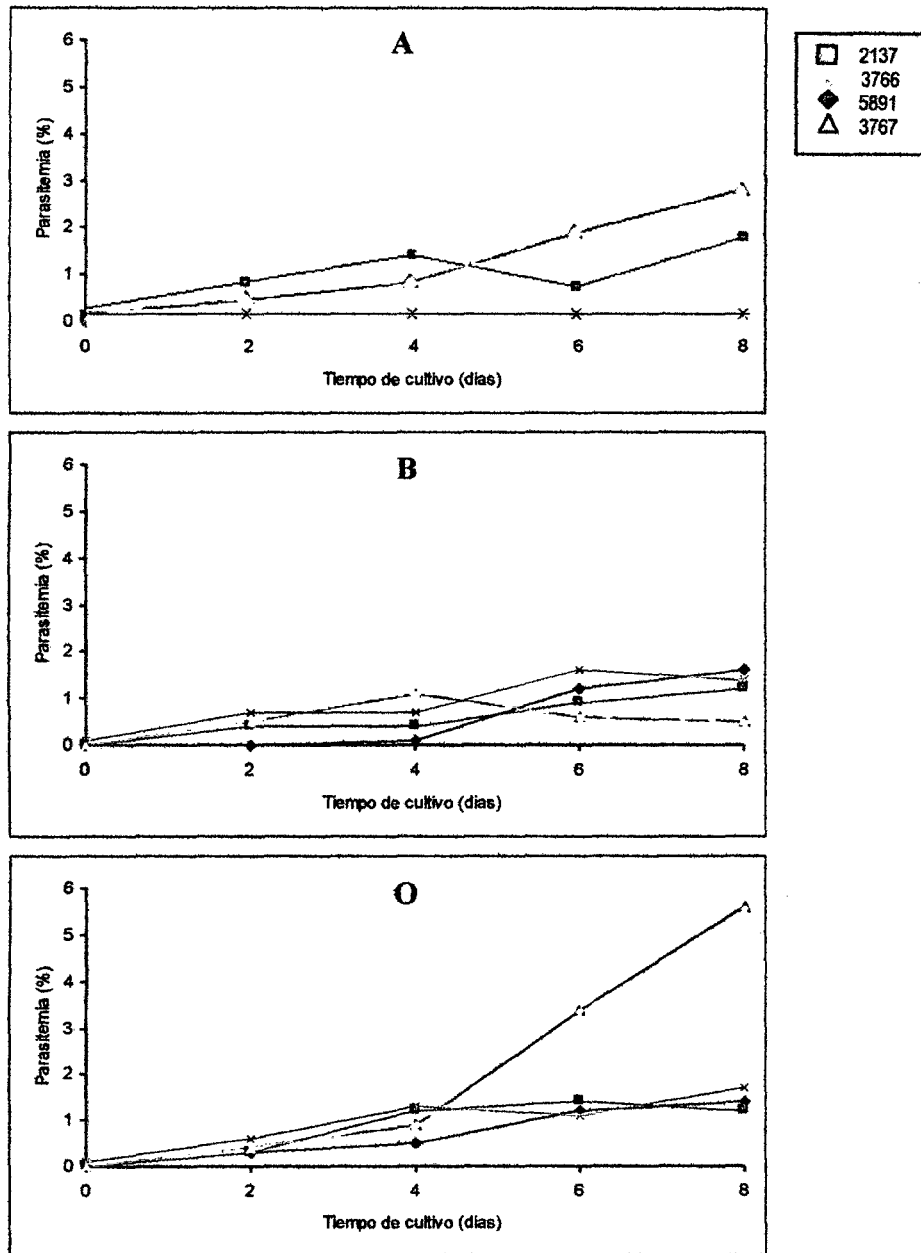


Figura 09. Perfil de crecimiento de cuatro cepas nativas en plasma y eritrocitos de determinado grupo sanguíneo del sistema ABO.

Sin embargo, las cepas cultivadas con plasma y eritrocitos de los grupos sanguíneo B y O mostraron perfiles de crecimiento muy similares hasta el octavo día de

cultivo, a excepción de una cepa cultivada en el grupo O que mostró una mayor parasitemia en el octavo día de cultivo comparando con las otras cepas.

4.5 Crecimiento de determinadas cepas en tres grupos sanguíneos diferentes

El crecimiento de las cepas en cada uno de los plasmas y eritrocitos del sistema ABO probados fue variable. En la Figura 10, se muestra los perfiles de crecimiento obtenidos para dos cepas (3767 y 2137). En el primer caso se observa que las parasitemias logradas hasta el cuarto día de cultivo son muy similares en los tres grupos sanguíneos, observándose posteriormente diferencias marcadas en las parasitemias alcanzadas, aumentando significativamente en los grupos O y A, siendo mayor en el primero y disminuyendo en el grupo B.

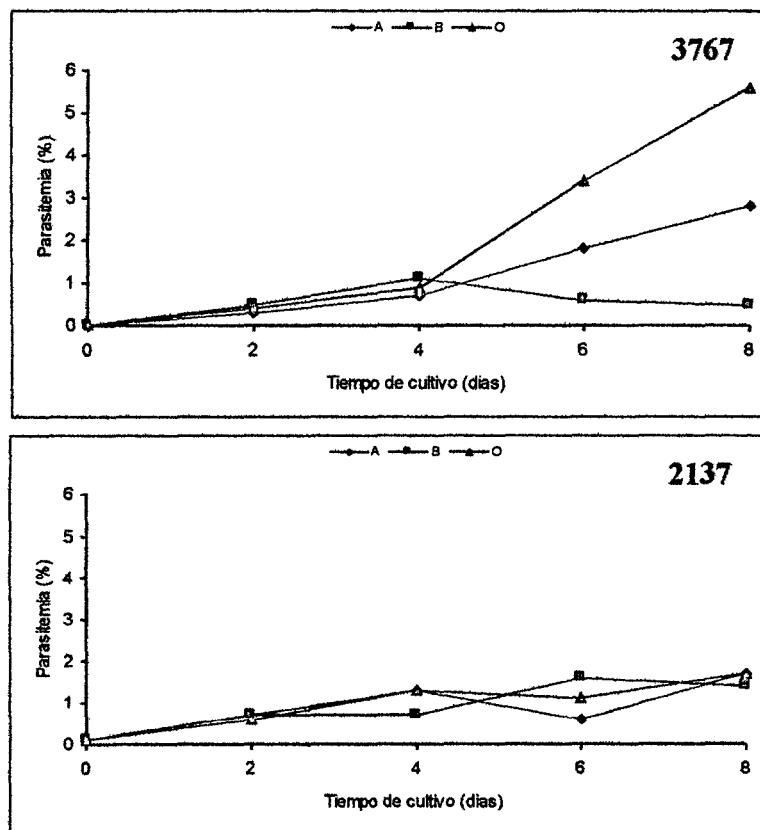


Figura 10. Perfil de crecimiento de dos cepas nativas en plasma y eritrocitos de tres grupos sanguíneos del sistema ABO.

En el caso de la cepa 2137 se observa un patrón de crecimiento diferente a las demás cepas. En el segundo y octavo día de cultivo se observa que las parasitemias

son muy similares en los tres grupos sanguíneos evaluados, mientras que en los días de cultivo cuatro y seis se observan variaciones no muy marcadas en las parasitemias logradas en cada grupo sanguíneo.

V. DISCUSION

Este trabajo ha permitido establecer la mayoría de las condiciones necesarias para lograr la adaptación al cultivo *in vitro* de cepas nativas de *P. falciparum* en la amazonía peruana. El procedimiento básico de esta técnica fue establecido por Trager y Jensen en 1976. Las diferencias entre el protocolo original y el que establecimos en el Laboratorio LIPNAA radican en algunos componentes empleados en el cultivo *in vitro*, en nuestro caso usamos plasma de los grupos sanguíneos A, B ó O y no suero del grupo sanguíneo AB, asimismo la mezcla de gases utilizada contenía 5% de O₂, 5% de CO₂ y 90% de N₂, mientras que en el protocolo original el cultivo se realizó con una mezcla de gases con mayor contenido de CO₂ (5% de O₂, 88% de N₂ y 7% de CO₂). Condiciones similares a la que empleamos en el laboratorio también han sido utilizadas en otros estudios de adaptación al cultivo *in vitro* de cepas de *P. falciparum* (Pardavé *et al.* 1998, Collins *et al.* 1997).

5.1 Comportamiento de las cepas nativas de *P. falciparum* en el cultivo *in vitro*

Hemos encontrado diferencias en el crecimiento *in vitro* de las cepas de *P. falciparum*. Un grupo de muestras se caracterizó por no mostrar crecimiento (3140 en todos los grupos del sistema ABO; 3767 en el grupo B), mientras que la mayoría se adaptó al cultivo *in vitro* (Figura 05). Varios factores pueden influir para que las cepas no se adapten al cultivo *in vitro*, entre ellas podemos citar la densidad parasitaria (mayor densidad parasitaria mas probabilidades de éxito en la adaptación al cultivo), la diversidad genética de cepas en la muestra de sangre (mayor diversidad aumenta la probabilidad de que una o mas de las variantes genéticas se adapte (n) a las condiciones "adversas" de cultivo *in vitro*), la viabilidad del parásito que depende si es que el paciente ha recibido tratamiento antimalárico antes de la toma de muestra, las condiciones de toma de muestra, transporte y tiempo transcurrido entre la hora de colecta y la hora de inicio del cultivo de las cepas. También en el proceso de cultivo los factores que influyen en el crecimiento *in vitro* de las cepas son las variaciones de la temperatura de incubación (por cortes de fluido eléctrico), cambio frecuente de lotes de plasma durante el cultivo de una cepa. Otra posibilidad es que la cepa sea refractaria al crecimiento *in vitro*, que según Schuster (2002) existen cepas de *P.*

falciparum que presentan esta característica, esto se debe en parte a que las cepas sufren cambios una vez iniciado su cultivo.

Respecto a la producción de gametos en las condiciones de cultivo *in vitro* se ha observado diferencias entre las cepas (Figura 06). Una clase se caracterizó por mostrar gametogénesis de manera transitoria y la otra clase mostró este fenómeno permanentemente durante el cultivo. De acuerdo con Schuster FL. (2002) este tipo de comportamiento existe en las diferentes cepas de *P. falciparum*. Generalmente la producción de gametos se suele observar con mayor probabilidad en cepas que están en las etapas iniciales del proceso de adaptación al cultivo *in vitro* y esta capacidad es perdida cuando las cepas son cultivadas por largos periodos de tiempo (Carter y Beach 1977). Además, existen cepas de *P. falciparum*, como las identificadas en este estudio, que producen constantemente gametos independientemente del tiempo de cultivo *in vitro*, varias de estas cepas han sido aisladas y caracterizadas previamente (Chin y Collins 1980, Trager 1987). También varios factores químicos y biológicos que se presentan en el proceso del cultivo *in vitro* influyen en la formación de gametos. Estos factores son, el cambio de medio de cultivo en intervalos mayores de 24 horas permite que se acumule en el medio de cultivo productos de desecho tóxicos de la actividad metabólica del parásito y de los eritrocitos, particularmente hay aumento en la concentración de ácido láctico, que al disociarse genera la acumulación de protones en el medio, de tal manera que puede superarse la capacidad amortiguadora del sistema tampón bicarbonato: ácido carbónico empleado en el medio, por lo que el pH disminuye (Ifediba y Vanderberg, 1981; Trager *et al.* 1981; Williams, 1999, Schuster, 2002). Las cepas productoras de gametos en las condiciones *in vitro* ya sea de manera natural, como las identificadas en este estudio, o inducidas por modificaciones de los parámetros del cultivo, son de gran importancia para las investigaciones de la malaria relacionadas con el desarrollo de vacunas que bloquean la transmisión de la enfermedad.

5.2 Relación entre la densidad parasitaria y parasitemia del cultivo

En el estudio realizado se ha encontrado una relación directa de la parasitemia que alcanzan las cepas a los ocho días de cultivo y la densidad parasitaria presente en la

muestra de sangre (Figura 07). Esta relación es lógica, de tal manera que al existir un mayor número de parásitos por volumen de sangre en la muestra inicial, existe más probabilidades de la presencia de más parásitos viables que tengan la capacidad de adaptarse a las condiciones de cultivo, lo contrario ocurriría con muestras que presentan bajas densidades parasitarias. Asimismo, en densidades altas de parásitos es posible que existan un mayor número de genotipos o variantes y por ende más opciones de poder invadir los eritrocitos y desarrollarse bajo estas condiciones.

5.3 Relación entre la parasitemia de los cultivos y el grupo sanguíneo empleado

Se ha observado que las parasitemias de las cepas se incrementan gradualmente en función al tiempo de cultivo, mostrándose este comportamiento en general de manera independiente al grupo sanguíneo de los plasmas y eritrocitos del sistema ABO empleados (Figuras 08, 09 y 10). Aunque se detectaron variaciones entre los grupos sanguíneo evaluados, obteniéndose en general un mayor crecimiento en los plasmas y eritrocitos del grupo sanguíneo O. Al análisis estadístico de los datos no mostraron diferencias significativas. Es decir, los plasmas y eritrocitos de los tres grupos sanguíneos evaluados proporcionan las condiciones para el desarrollo *in vitro* del parásito. Las pequeñas diferencias observadas pueden deberse a la composición variable de los nutrientes presentes en los plasmas empleados (que depende del estado nutricional del donante), el contenido de hemoglobina y otros factores nutritivos presentes en los eritrocitos utilizados en los cultivos (Trager y Jensen 1976). Debido a que las diferencias que existen en los lotes de plasma influyen en el cultivo *in vitro* de *P. falciparum* y estas variaciones no son convenientes al hacer estudios de drogas antimaláricas, pruebas inmunológicas, ensayos bioquímicos y/o moleculares, por ello es conveniente utilizar pools de sueros, plasmas y eritrocitos para evitar estas variaciones. Otra alternativa podría ser la utilización del reactivo Albumax I y II que garantizan una composición constante de los nutrientes en el medio de cultivo entre los diferentes lotes preparados y han sido empleadas con éxito en la adaptación de cepas al cultivo *in vitro* (Crammer *et al.* 1997, Srivastava *et al.* 2007).

Como se manifestó previamente, los parásitos no muestran una dependencia marcada de la parasitemia alcanzada en el desarrollo *in vitro* con el grupo sanguíneo de los



382

eritrocitos empleados. Esto nos indica que los antígenos que determinan los grupos sanguíneos del sistema ABO no están implicados al menos directamente, en el proceso de invasión de los eritrocitos por parte de los merozoitos, tampoco en el desarrollo intraeritrocitario del parásito. Estos resultados obtenidos en las condiciones del cultivo *in vitro* para *P. falciparum*, concuerdan con los resultados obtenidos en varios estudios *in vivo*, en el que no se ha encontrado relación de la susceptibilidad a la infección por *P. falciparum* y el grupo sanguíneo de las personas (Montoya *et al.* 1994, Singh *et al.* 1995, Fischer *et al.* 1998, Barragán *et al.* 2000 y Uenecke. C. J. 2007).

En el caso de los eritrocitos del grupo sanguíneo A, se sabe que son correceptores en la formación de rosetas, fenómeno que consiste en la unión de un eritrocito infectado con varios eritrocitos no infectados a través de interacciones moleculares mediadas por la proteína PfEMP1, se postula que este fenómeno es un mecanismo de evasión del sistema inmunitario (Barragan *et al.* 2000), porque favorece la rápida invasión de los eritrocitos adheridos por parte de los merozoitos que se liberan del eritrocito infectado sin mayor exposición a los anticuerpos presentes en el plasma, en consecuencia se espera que la parasitemia en este caso en particular sea mayor. En nuestro estudio, hemos observado este fenómeno de formación de rosetas al realizar los cultivos con el grupo A, siendo las parasitemias que se alcanzan en este grupo relativamente mayores que los registrados en el grupo B, pero con respecto al grupo O muestra valores similares en algunos días de cultivo y difiere en otros (Figura 10). Por lo que la formación de rosetas aparentemente no influye significativamente en el desarrollo *in vitro* de las cepas de *P. falciparum* en nuestro estudio.

La invasión del eritrocito humano por parte del parásito es un proceso complejo. Diversos estudios muestran que las proteínas expresadas en organelos y en la superficie de los merozoitos de *P. falciparum* y ciertas proteínas receptoras presentes en las membranas de los eritrocitos son necesarias para que ocurra el proceso de unión e inicio de la invasión de los eritrocitos por los merozoitos. La interacción entre las proteínas de ambos tipos de células es de manera específica y estabilizada fundamentalmente por interacciones no covalentes. Actualmente se han identificado 57 proteínas expresadas en los merozoitos que están relacionadas con el proceso de

invasión de los eritrocitos. Estas se encuentran presentes en diferentes estructuras del merozoito, así en su superficie se han identificado 28 proteínas, entre ellas se encuentran la familia de proteínas de superficie del merozoito (MSP-1, MSP-2, MSP3, etc), GLURP, entre otras. En la roptria y en el cuello del roptria hay 19 proteínas tales como RAP1, RAP2, RAP3, RAMA, etc, y en el micronema se han identificado 10 proteínas, entre ellas se encuentran EBA-140/BAEBL, EBA-175, EBA-181/JESEBL, AMA-1 entre otras. En los eritrocitos, también se han identificado algunas proteínas receptoras que interactúan con varias de las proteínas del parásito mencionadas. En la unión inicial entre estas células interactúan MSP-1 asociado con MSP-6 y MSP-7 del merozoito con la proteína Band3 del eritrocito. Asimismo, las proteínas EBA-140/BAEBL, EBA-175 y EBA 181/JESEBL al ser liberados del micronema del merozoito interactúan respectivamente con las proteínas receptoras Glicoforina C, Glicoforina A y receptor W resistente a tripsina de la membrana del eritrocito (Malaria Parasite Metabolic Pathway, 2007).

VI. CONCLUSIONES

1. Se ha logrado adaptar al cultivo *in vitro* cepas nativas de *P. falciparum*.
2. Se identificaron cepas que presentan el fenómeno de gametogénesis permanente y transitoria en nuestras condiciones de cultivo *in vitro*.
3. Existe correlación significativa entre la densidad parasitaria de la muestra y la parasitemia que alcanzan los cultivos.
4. La adaptación al cultivo *in vitro* de las cepas de *P. falciparum* no muestra diferencias significativas cuando se emplea plasma y eritrocitos de los diferentes grupos sanguíneos del sistema ABO.

VII. RECOMENDACIONES

1. Debe efectuarse la genotipificación de las cepas de *P. falciparum* a fin de conocer la diversidad genética que presentan.
2. Realizar ensayos de invasión de los eritrocitos para identificar los receptores y vías de invasión que utilizan las cepas de *P. falciparum* de la amazonía peruana.
3. Emplear mezclas de plasmas y eritrocitos de preferencia del grupo sanguíneo O, debido a que este grupo sanguíneo es más frecuente en la población y así evitar variaciones entre lotes de estos componentes.
4. Realizar ensayos similares evaluando otros grupos sanguíneos como el sistema MNS que representan a las glicoforinas del eritrocito

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATIAS ANTONIO, NEGHER AMADOR (1985). Parasitología Clínica. 2da. Edición. Editorial Publicaciones Técnicas de Mediterráneo. Santiago. pág. 514.
- BARRAGÁN A, KREMSNER PG, WAHLGREN M and CARLSON J (2000). Blood group A Antigen is a coreceptor in *Plasmodium falciparum* rosetting. *Infection and Immunity*. 68(35):2971-2795.
- BAUM J, PINDER M and CONWAY DJ (2003). Erythrocyte invasion phenotypes of *Plasmodium falciparum* in the Gambia. *Infection and Immunity*. 71(4):1856-1863.
- BAUM J, WARD RH and CONWAY DJ (2002). Natural Selection on the Erythrocyte Surface. *Molecular Biology*. 19(3): 223-229.
- BLOOD GROUP ANTIGEN GENE MUTATION DATABASE (2007). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mhc/xslcgi.fcgi?cmd=bgmut/systems>.
- BOLAD A, NEBIÉ I, CUZIN-QUATTARA N, TRAORE A, EPOSITO F and BERZINS K (2003). Antibody-mediated *in vitro* growth inhibition of field isolates of *Plasmodium falciparum* from asymptomatic children in Burkina Faso. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 68(6):. 728-733.
- BRANCH O, CASAPIA WM, GAMBOA DV, HERNANDEZ JN, ALAVA FF, RONCAL N, ALVAREZ E, PEREZ EJ, GOTUZZO E. (2005). Clustered local transmission and asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria infections in a recently emerged, hypoendemic Peruvian Amazon community. *Malaria Journal*. 4(27):1-16.
- CARTER R and BEACH R (1977). Gametogenesis in culture by gametocytes of *Plasmodium falciparum*. *Nature* 270:240-241.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2009). <http://www.cdc.gov/>.

- CHIN W and COLLINS WE (1980). Comparative studies of three strains of *Plasmodium falciparum* isolated by the culture method of Trager and Jensen. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 29(6):1143-1146.
- COLLINS W, GRADY K, MILLET P, SULLIVAN J, MORRIS C, GALLAND G, RICHARDSON B and YANG C (1997). Adaptation of a strain of *Plasmodium falciparum* from a Montagnard Refugee to *Aotus* Monkeys. *The Journal of Parasitology*, 83(6):1174-1177.
- CRAMER SL, MAGOWAN C, LIANG J, COPPEL L and COOKE BM (1997). An alternative to serum for cultivation of *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 91: 363-365.
- DEHARO E, GAUTRET PH, MUÑOZ V y SAUVAIN M (2000). Técnicas de laboratorio para la selección de sustancias antimaláricas. Talleres gráficos Pérez. La Paz-Bolivia. pág. 187.
- DRUILHE P, DAUBERSIES P, PATARAPOTIKUL J, GENTIL C, CHENE L, CHONGSUPHAJASIDDHI T, MELLOUK S and LANGSLEY G (1998). A primary malarial infection is composed of a very wide range of genetically diverse related parasites. *The American Society for Clinical Investigations*, 101(9): 2008-2016.
- FERREIRA, A.; DO LAGO MORAES DE ÁVILA, S. (2001). Diagnóstico Laboratorial. Avaliação de Métodos de Diagnóstico Das Principais Doenças Infecciosas e Parasitárias e Auto-Imunes. Correlação Clínico Laboratorial. 2^{da} edic. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro. pág. 430
- FISCHER PHILIP R.; BOONE PAUL (1998). Short Report: Severe Malaria associated with blood Group. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 58(1): 122-123.
- GUTIERREZ S y ARRÓSPIDE N (2003). Manual de Procedimientos de Laboratorio para el diagnóstico de Malaria. Serie de Normas Técnicas Nº 39. Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Salud.(INS) Artes & Diseños Laser S.R..LTDA. Lima. pág.100
- HE S, SAITO-ITO A, TANABE K and MATSUMURA T (1998). Inappropriate use of CO₂-Bicarbonate buffer for cultivating *P. falciparum*. *Oral Sessions/ Parasitology International* 47 (Suppl). O-0160. 133-281.

- HIJAR G, PADILLA C, HELLEN C, BANIC D and ZALIS M (2002). Cultivo *in vitro* y caracterización molecular de cepas referenciales de *Plasmodium falciparum*. *Resúmenes del I Congreso Científico Internacional. Rev. Perú Med. Exp Salud Pública*; 19 (Supl). S9-10.
- IFEDIBA T and VANDERBERG JP (1981). Complete *in vitro* maturation of *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Nature*. 294: 364-367.
- IMRIE H, FERGUSON D and DAY KP (2004). Human serum haptoglobin is toxic to *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *Molecular & Biochemical Parasitology*. 33: 93-98.
- JENSEN JB (1979). Observations on Gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum* from Continuous Culture. *Journal of Protozoology*, 26(1): 129-132.
- KAMEI K, SAKAMOTO Y and SHIBUYA T (1998). Use of cat and dog serum in the cultivation of *Plasmodium falciparum*. *Oral Sessions / Parasitology International* 47 (Suppl). O-0161. 133-281.
- LEVINE N. (1988). The Protozoan Phylum Apicomplexa. Boca Raton, Vols. 1 and 2.
- LI T, GLUSHAKOVA S and ZIMMERBERG J (2003). A new method for culturing *Plasmodium falciparum* shows replication at the highest erythrocyte densities. *The Journal of Infectious Diseases*. 187: 159-162.
- MALARIA PARASITE METABOLIC PATHWAY, (2007).
<http://sites.huji.ac.il/malaria/FramInvasion.html>.
- MITAMURA I, HANADA K, NISHIJIMA M and HORII T (1998). Molecular Identification of essential factor(s) in serum for the proliferation of *Plasmodium falciparum* at the erythrocytic stage. *Oral Sessions / Parasitology International* 47 (Suppl.). 133-281. O-0363
- MONTOYA F, RESTREPO M, MONTOYA AE and ROJAS W (1994). Blood groups and malaria. *Revista do Instituto do Medicina Tropical do Sao Paulo* 36(1):33-38.

DIRECCIÓN GENERAL DE EPIDEMIOLOGÍA (DGE) del MINSA (2009). Semana Epidemiológica 53 del 2008, <http://www.dge.gob.pe>.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SALUD (OMS 2009), Epidemiología de la malaria. <http://www.who.int/es/>.

OHNISHI Y, NISHIMURA K, UMEDA Y (2001). Relationship between partial inhibition of glycolysis and hemolysis after induction of gametocytogenesis in synchronous cultures of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology International*; 50(1):1-7.

PARDAVÉ B, ARCE C and CABEZAS C (1998). Isolation and "in vitro" maintenance of *Plasmodium falciparum*. Poster Sessions/ *Parasitology International* 47 (Supp.) 297. P-0651.

PATENAUDE SI, SETO NO, BORISOVA SN, SZPACENKO A, MARCUS SL, PALCIC MM and EVANS SV. (2002). The structural basis for specificity in human ABO (H) blood group biosynthesis. *Nature Structural Biology*. 9(9):685-90.

PETERS (1987). Chemoterapy and drug resistance in malaria. 2vol. Academic Press London.

RANJIT M and SHARMA Y (1999). Genetic Polimorphism of falciparum malaria vaccine candidate antigen genes among fiels isolates in india. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 61(1):103-108.

RHODAIN Y PEREZ (1985). Précis d'entomology mediacle et vétérinaire. Ed. Maloine, Paris.

SAITO-ITO A, AKAI Y, HE S, KIMURA M and KAWABATA M (2001). A rapid, simple and sensitive flow cytometric system for detection of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology International*. 50: 249-257.

SCHUSTER FL (2002). Cultivation of *Plasmodium* spp. *Clinical Microbiology Reviews*. 15(3):355-364.

- SHERMAN W (1999). *Malaria: Parasite biology, Pathogenesis and protection*. First edition American Society for Microbiology. Washington D.C.
- SINGH N, SHUKLA MM, UNIYAL VP and SHARMA VP. (1995). ABO blood groups among malaria cases from district Mandla, Madhya Pradesh. *Indian Journal of Malariology*. 32(2):59-63.
- SRIVASTAVA K, SINGH S, SINGH P and PURI SK. 2007. *In vitro* cultivation of *Plasmodium falciparum*: Estudies with modified medium supplement with Albumax II and various animal sera. *Experimental Parasitology* 116:171-174.
- TRAGER W (1987). The cultivation of *Plasmodium falciparum* aplications in basic and appllied reserch on malaria. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 81 (5):511-529.
- TRAGER W and JENSEN JB (1976). Human malaria parasites in continuous culture. *Nature*. 263 (5580):767-769.
- TRAGER W, TERSHAKOVEC M, LYANDVERT L, STANLEY LN and GUBERT E (1981). Clones of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* obtained by microscopic selection: They characterization with regard to knobs, chloroquine sensitivity, of formation of gametocytes. *Proceeding of Natl. Academy Science. USA*. 78 (10):6527-6530.
- UNECKE CJ (2007). *Plasmodium falciparum* malaria and ABO blood group: is there any relationship?. *Parasitology Research*. 100(4):759-765.
- WASIM AS and CRUM SMR (1977). Fatty acid-free bovine albumin as plasma replacement for *in vitro* cultivation of *Plasmodium falciparum*. *The journal of Parasitology*.63 (3):583-584.
- WILLIAMS JL (1999). Stimulation of *Plasmodium falciparum* gametogenesis by conditioned medium from parasite cultures . *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 60 (1):7-13.
- YAMAMOTO F and HAKOMORI S. (1990). Sugar-nucleotide donor specificity of histo-blood group A and B transferases is based on amino acid substitutions. *Juornal of Biology Chemistry*.265 (31):19257-19262.

YAMAMOTO F and MCNEILL PD. (1996) Amino acid residue at codon 268 determines both activity and nucleotide-sugar donor substrate specificity of human histo-blood group A and B transferases. *In vitro* mutagenesis study. *Journal of Biology Chemistry*. 271(18):10515-10520.

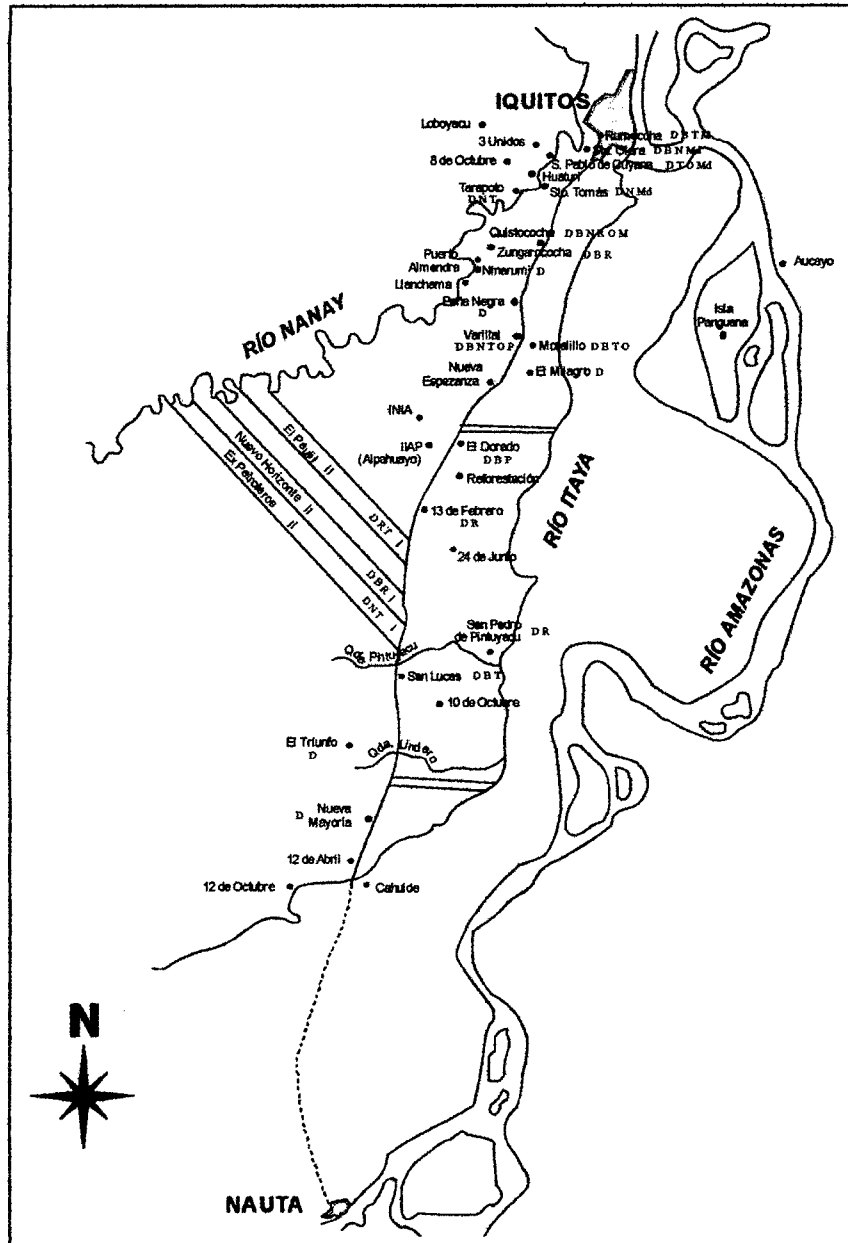
ZOLG W, MACLEOD AJ, DICKSON IH and SCAIFE JG (1982). *Plasmodium falciparum*: Modificatons of the *in vitro* culture conditions improving parasitic yields. *The journal of Parasitology*. 68:1072-1080.

ANEXO

ANEXO I

Área de estudio. Mapa de las zonas de recolección de muestras.

Zungarococha	73°21'06"/03°49'35"
Puerto Almendra	73°22'42"/03°49'56"
Ninarumi	73°23'19"/03°50'41"
Llanchama	73°25'01"/03°51'23"



ANEXO II

CONSENTIMIENTO INFORMADO

La malaria es una enfermedad infecciosa, que causa alrededor de 300 millones de enfermos por año a nivel mundial y que de 1.5 a 2.5 millones de personas fallecen como producto de la malaria grave principalmente menores de 5 años, según datos de la organización mundial de la Salud; en nuestra región el impacto socioeconómico se ve reflejado en los pobladores, cuyo rendimiento disminuye para sus labores y que hacerlos cotidianos al padecer la enfermedad hasta el tiempo de convalecencia, en las mujeres gestantes tenemos pérdidas de sus bebés, y el tratamiento que es cubierto por el gobierno con programas de malaria gratuitos, donde se tiene que destinar una fuerte inversión de dinero; que de solucionarse este problema controlando la enfermedad, sería beneficioso para nuestro país ya que ese presupuesto sería utilizado para otros fines

Por todas estas razones este trabajo pretende adaptar *in vitro* cepas de *Plasmodium falciparum*, para poder estudiar a nivel de biología molecular e inmunología, así como para poder evaluar extractos antimaláricos de nuestra región y de esta forma poder encontrar una forma de control de esta enfermedad; para esto necesitamos un abastecimiento constante de unidades de sangre, para garantizar la viabilidad de los cultivos por lo que le solicitamos su donación voluntaria de una unidad de sangre.

Si Ud. accede a la donación se le tomará una muestra de sangre de 3ml. Para realizar pruebas de tamizaje de sangre entre ellas tenemos de VIH, HBs, RPR, grupo sanguíneo, cuyos resultados serán absolutamente confidenciales. El personal que tomará estas muestras tiene amplia experiencia.

Este procedimiento es generalmente inocuo, pero en ocasiones puede causar una pequeña equimosis que no representa peligro para Ud. El procedimiento es gratuito y el beneficio que tendrá serán sus resultados de estas pruebas.

Si Ud. acepta participar en la investigación, deberá firmar el presente CONSENTIMIENTO INFORMADO; pero tiene todo el derecho a retirarse del estudio después de haber consentido participar en él por las razones que crea conveniente.

Luego de estas pruebas, si saliera apto según los criterios de inclusión de este proyecto, se procederá a la toma de su unidad de sangre, con su total disposición.

Si desea mayor información del Proyecto, Ud. puede ponerse en contacto con la Bach. Blgo. Claudia Silva Moreno al teléfono 264649, Laboratorio de Bioensayos, Laboratorio de Investigación de Productos Naturales antiparasitarios de la Amazonía. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana

Compromiso

Yo,....., con DNI.....,
con domicilio en....., me comprometo a participar de este estudio, y
estoy de acuerdo con todas condiciones establecidas para la toma de muestras.

ANEXO III

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DIVERSAS

3.1. Preparación de Medio RPMI incompleto:

- Un litro de medio RPMI preparado *contiene*:

Nitrato de Calcio.4H ₂ O	0.1
Sulfato de Magnesio (anhidro)	0.04884
Cloruro de Potasio	0.4
Cloruro de Sodio	6.0
Fosfato de Sodio dibásico (anhidro)	0.8
L-arginina	0.2
L-asparagina (anhidro)	0.05
L-ácido aspártico	0.02
L-cisteína.2HCl	0.0652
L-ácido Glutámico	0.02
L-glutamina	0.3
Glicina	0.01
L-histidina	0.015
Hidróxi-Lprolina	0.02
L-iso-leucina	0.05
L-leucina	0.05
L-lisina.HCl	0.04
L-metionina	0.015
L-fenilalanina	0.015
L-prolina	0.02
L-serina	0.03
L-treonina	0.02
L-triptofano	0.005
L-tirosina.2Na.2H ₂ O	0.02883
L-valina	0.02
D-biotina	0.0002
Cloruro de colina	0.003
Acido Fólico	0.001
Mio-inositol	0.035
Niacinamida	0.001
Acido p-amino benzoico	0.001
Acido D-pantoténico (hemicalcio)	0.00025
Piridoxina.HCl	0.001
Riboflavina	0.0002
Tiamina.HCl	0.001
Vitamina B-12	0.000005
D-glucosa	2.0
Glutation (reducido)	0.001

HEPES	5.958
Rojo de fenol (sodio)	0.0053

- Además se le agrega por separado:
2,00 g de bicarbonato de sodio o 27ml de una solución al 7,5%
450 mg de Hipoxantina
20 mg de gentamicina
- Todo esto se disolverá por agitación en un matraz de Erlenmeyer conteniendo 900 ml de agua destilada desionizada todos los componentes del medio exceptuando el bicarbonato de sodio, luego de un tiempo adicionar este para equilibrar el pH del medio,
- Enrazar en una fiola hasta 1000 ml de agua bidestilada desionizada
- Esterilizar con un filtro de de nitrocelulosa de 0,22um con una bomba al vacío. Todo esto en una cabina de flujo laminar.
- Se agita luego, para colocar una pequeña cantidad en una incubadora a 37°C, durante 24 horas, todo esto para el control de calidad. Y el resto almacenar a temperatura de refrigeración.

3.2 Solución de congelación (Deharo *et al.*; 2000)

- Disolver en 72 ml de agua bidestilada desionizada:
3.024g de D-sorbitol
28 ml de glicerol
0.65 g de Cloruro de sodio

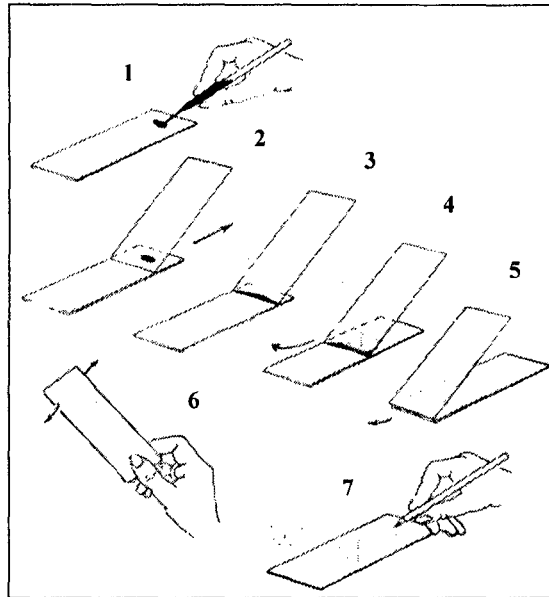
3.3 Solución madre Giemsa

- Colocar en un matraz de 250 ml, 50 ml de glicerina y agregar 0,76 g de polvo Giemsa.
- Calentar a 60 °C hasta su completa solubilización.
- Luego agregar 50 ml de metanol y dejar en la oscuridad por 5 días. Transcurrido el tiempo filtrar con papel de filtro y almacenar en un frasco oscuro.
- Esta solución madre, se utiliza para preparar el colorante al 10 % disolviéndolo en Buffer PBS pH 7,4.

ANEXO IV

4.1 CONTEO DE LA PARASITEMIA DEL CULTIVO

4.1.1 Realización del frotis..



- Fijar el frotis rápidamente con metanol durante un minuto. Dejar secar a temperatura ambiente y colorear con la solución de giemsa al 10 %, para proceder al atención con colorante Giemsa(ver anterior), por 15 minutos. Lavar y secar las láminas. Observar al microscopio con objetivo de 100 X y realizar el conteo de los eritrocitos parasitados.

4.1.2 Cálculo de la parasitemia

$$P = \frac{GRP \times 100}{GRT}$$

- P = Parasitemia (expresada en porcentaje %)
GRP = Glóbulos rojos parasitados
GRT = GR totales (suma de GR parasitados y no parasitados)

4.1.3 Tabla de dilución de la parasitemia (Deharo, et al.; 2000)

% de parasitemia	8	6	4	2
Cantidad de GR a eliminar	$\frac{3}{4}$	$\frac{2}{3}$	$\frac{1}{2}$	0

ANEXO V
Tabla de muestras ingresadas al cultivo

Código	Lugar de Procedencia	Edad del Paciente	Sexo	DX Mic.	Grupo sanguíneo	Densidad (Parásitos/μl)	Fecha de siembra
3135	Llanchama	16	M	+/2F		716	03-Nov-04
3140	Llanchama	14	M	+F		2238	03-Nov-04
3770	Ninarumi	19	M	++F	O+	5285	24-Nov-04
2137	Puerto Almendras	36	M	+++F	A+	9180	15-Dec-04
3766	Libertad (Rio Nanay)	11	F	++F	O+	3690	16-Nov-04
3767	Punchana (Iquitos)	36	M	+F	O+	2881	17-Nov-04
5891	Santa Clara	53	M	+F		3920	12-Jul-04

Tabla de muestras procesadas para estandarización de la técnica

CODIGO	DENSIDAD PARASITARIA	PARASITEMIA
3718†	5500	1,6
3717†	500	1,3
3719†	3560	0,5
3720†	9254	1,9
3725†	4237	0,4
2627†	30970	4
3135*	716	6,8
3140	2238	0,1
3770*	5285	4,1
3773†	3564	2,9
3774†	6656	4,5
3777†	3801	2,5
2137†	7522	12
3779*	8850	4,3
3780†	3120	1,2
3201†	9120	1,5
3766*	3840	8,2
3767*	2287	6
5891*	3000	4

† cepas que se contaminaron en dos fechas el 30/08/04 y el 01/12/04 a pesar de haber presentado crecimiento y haber realizado replicas

* Cepa que se cripreservó

Cepa que no creció

ANEXO VI

Curvas de crecimiento de las cepas nativas de *P. falciparum*

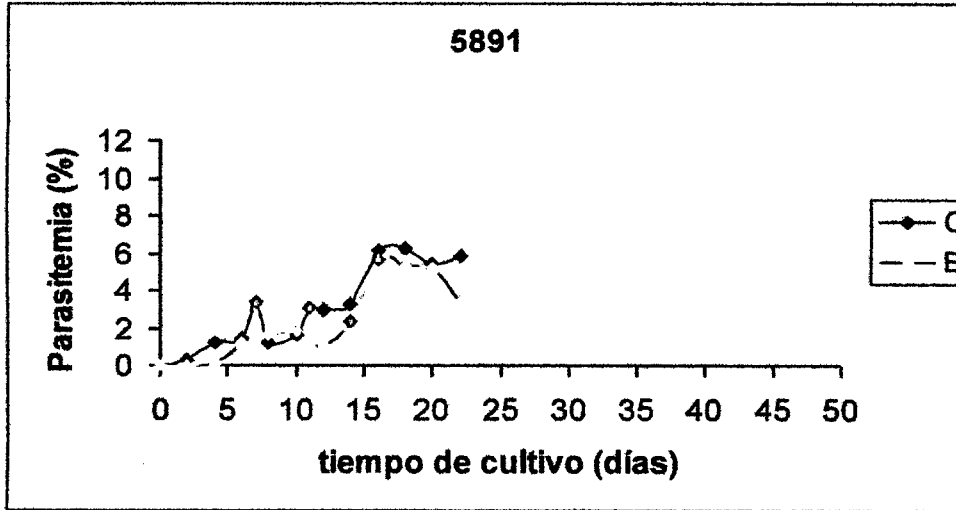


Figura 11. Crecimiento de la muestra 5891 adaptadas al cultivo *in vitro* empleando plasma y eritrocitos de los grupos sanguíneos "O" y "B"

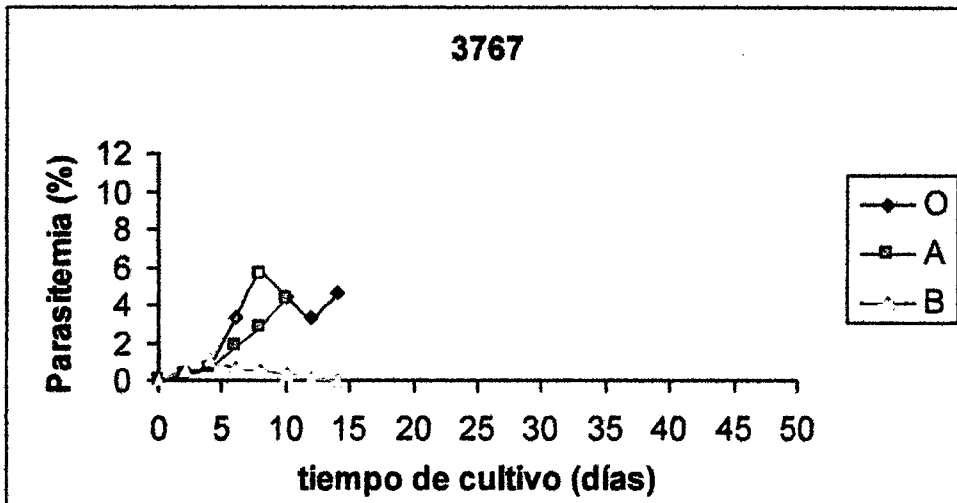


Figura 12. Crecimiento de la muestra 3767 adaptadas al cultivo *in vitro* empleando plasma y eritrocitos de los grupos sanguíneos "O", "A" y "B".

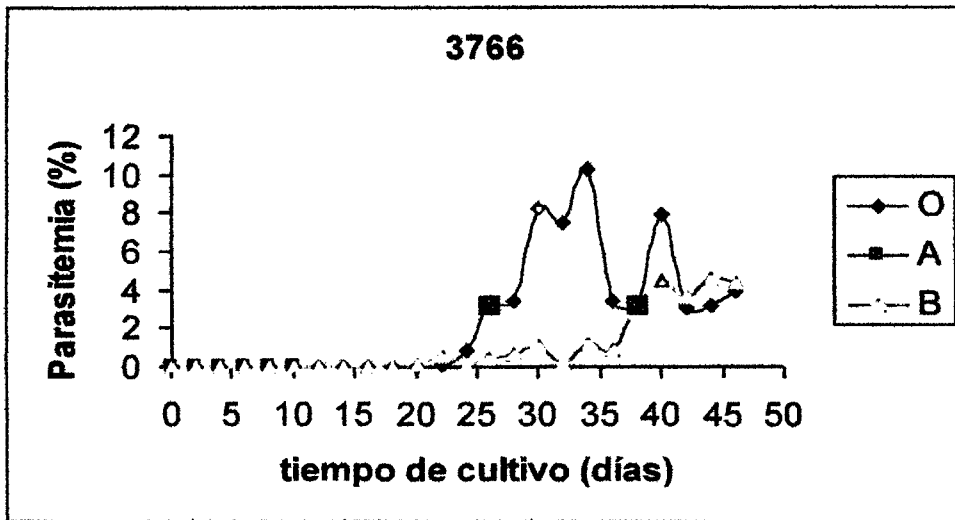


Figura 13. Crecimiento de la muestra 3766 adaptadas al cultivo *in vitro* empleando plasma y eritrocitos de los grupos sanguíneos "O", "A" y "B".

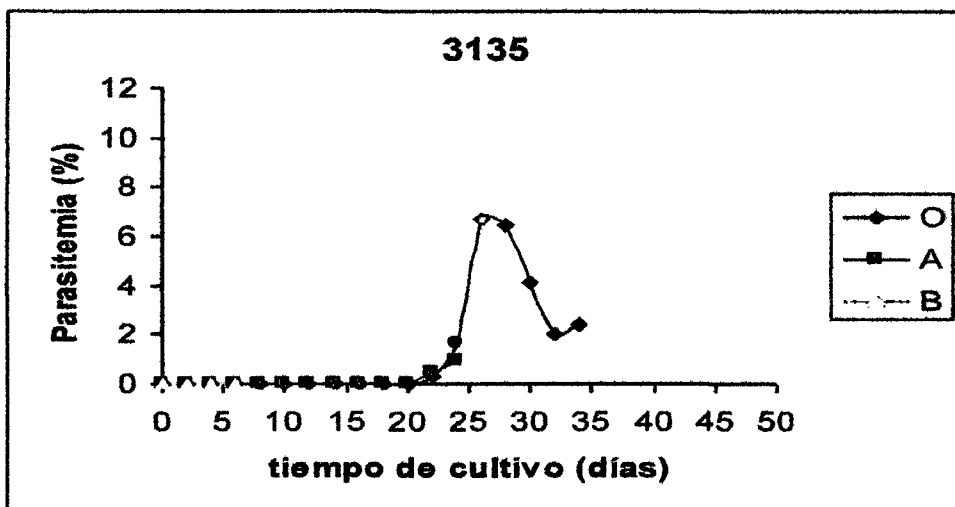


Figura 14. Crecimiento de la muestra 3135 adaptadas al cultivo *in vitro* empleando plasma y eritrocitos de los grupos sanguíneos "O", "A" y "B".

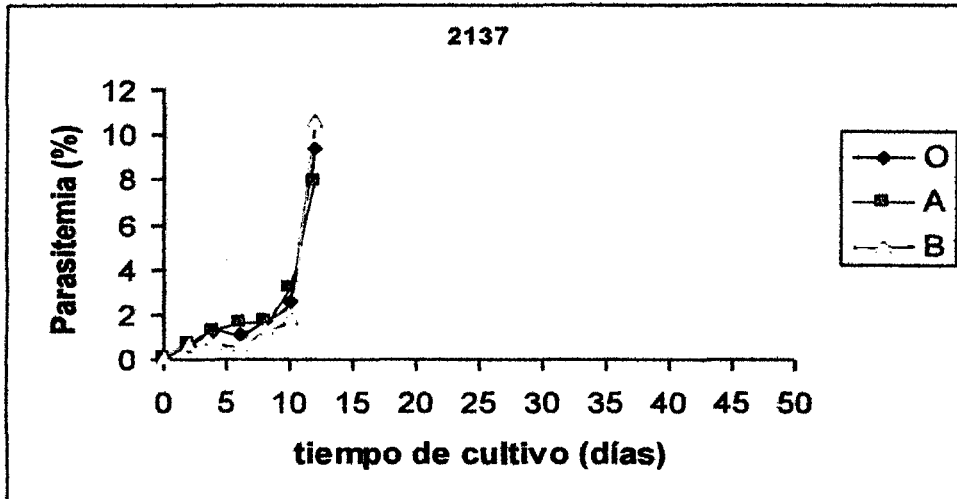


Figura 15. Crecimiento de la muestra 2137 adaptadas al cultivo *in vitro* empleando plasma y eritrocitos de los grupos sanguíneos "O", "A" y "B".

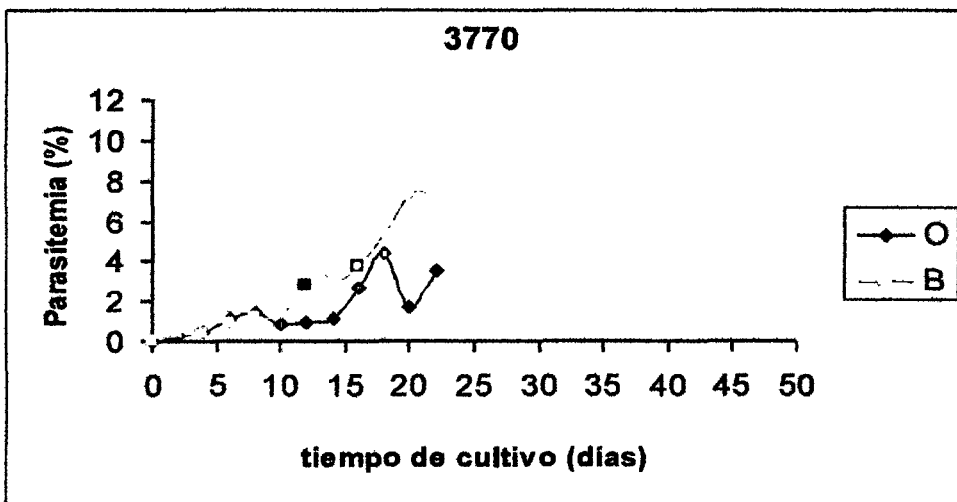


Figura 16. Crecimiento de la muestra 3770 adaptadas al cultivo *in vitro* empleando plasma y eritrocitos de los grupos sanguíneos "O" y "B".

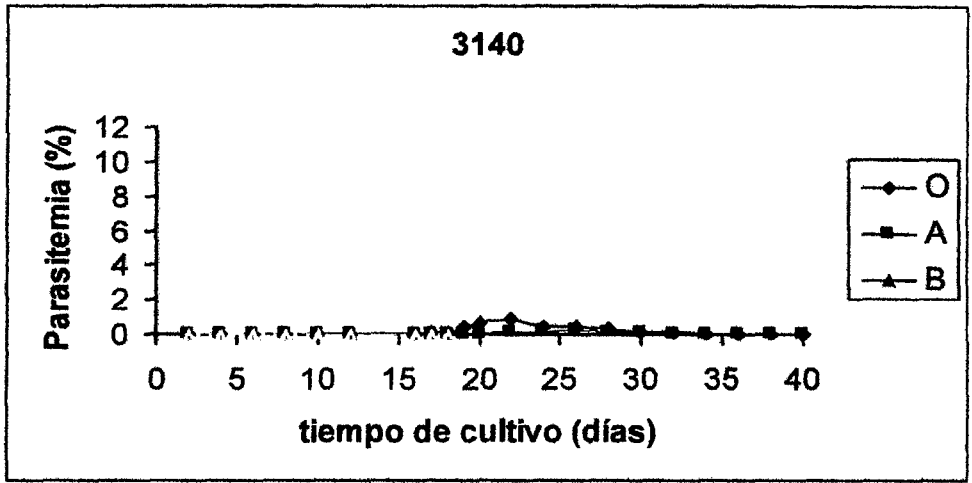


Figura 17. Crecimiento de la muestra 3140 adaptadas al cultivo *in vitro* empleando plasma y eritrocitos de los grupos sanguíneos "O", "A" y "B".

ANEXO VII

Resultados de análisis con SPSS v 12.0

Análisis de Correlación entre la densidad parasitaria y la parasitemia de las cepas a los 8 días de cultivo.

Tipo de Variable		DP	P
Independiente			
Densidad Parasitaria (DP)	Correlación de Pearson	1	0.828 *
	Significancia (2 colas)		0.000
	N	16	16
Dependiente			
Parasitemia (P)	Correlación de Pearson	0.828*	1
	Significancia (2 colas)	0.000	
	N	16	16

- La correlación es significativa en el nivel 0.001 (2 colas)

Análisis de Regresión Lineal entre la densidad parasitaria y la parasitemia de las cepas a los 8 días de cultivo.

Resumen del Modelo

Modelo	R	R ²	R ² ajustado	Error estándar del estimado
1	0.828	0.686	0.664	0.428000

Coefficientes (a)

Modelo		Coefficients no estandarizados		Coefficientes estandarizados	t	P
		B	Error estándar	Beta		
1	Constante	-.226	.194		-1.163	.264
	Densidad Parasitaria	.000	.000	.828	5.531	.000

a. Variable dependiente: Parasitemia

Resultados del Análisis de Varianza (ANOVA) del crecimiento en un periodo de 8 días de las cepas en los tres grupos sanguíneos.

Variación	Suma de Cuadrados	df	Cuadrado de la Media	Fc	p
Entre Grupos	1.463	2	0.731	1.006	0.370
Dentro Grupos	66.136	91	0.727		
Total	67.559	93			

ANEXO VIII

CONTAMINANTES DE LOS CULTIVOS

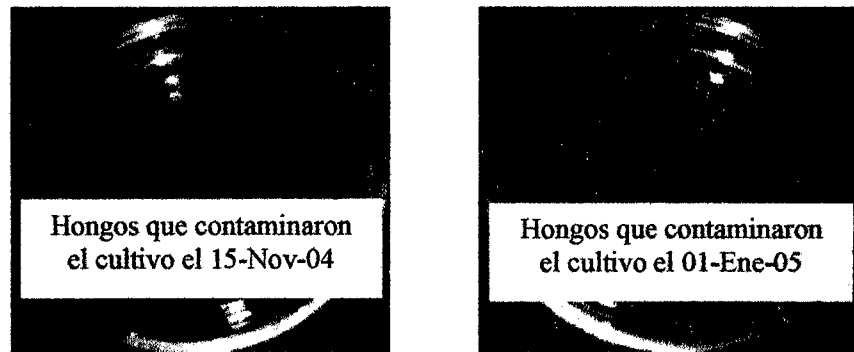


Figura 18. Algunos contaminantes del cultivo *in vitro* de *P. falciparum*