

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE FÍSICA

ESTUDIO DEL MOVIMIENTO DEL PARASITO PLASMODIUM FALCIPARUM
EN ESTADO DE MEROZOITO

NATHALIE VALESKA CASANOVA MORALES

ESTUDIO DEL MOVIMIENTO DEL PARASITO
PLASMODIUM FALCIPARUM EN ESTADO DE DE
MEROZOITO

Trabajo de graduación presentado a la Facultad de Ciencia, en cumplimiento parcial
de los requisitos exigidos para optar al grado de Ingeniero Físico

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE

SANTIAGO – CHILE

2010

ESTUDIO DEL MOVIMIENTO DEL PARASITO PLASMODIUM
FALCIPARUM EN ESTADO DE DE MEROZOITO

NATHALIE VALESKA CASANOVA MORALES

Este trabajo de Graduación fue elaborado bajo la supervisión de los profesores guía Sr. Roberto Bernal y Sr. Francisco Melo del Departamento de Física de la Universidad de Santiago de Chile y ha sido aprobado por los miembros de la Comisión Calificadora,

Dr. ENRIQUE CERDA

Dr. EUGENIO HAMM

PROFESOR GUIA

Dr. ROBERTO BERNAL

PROFESOR GUIA

Dr. FRANCISCO MELO

DIRECTOR

Dr. ALVARO SAN MARTÍN

© NATHALIE VALESKA CASANOVA MORALES.

Se autoriza la reproducción parcial o total de esta obra, con fines académicos, por cualquier forma, medio o procedimiento, siempre y cuando se incluya la cita bibliográfica del documento.

'Nunca el hombre está vencido, su derrota es siempre breve, un estímulo que mueve (...)' (Patricio Mans 1978)

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar esta etapa no puedo dejar de pensar en quienes me acompañaron en este proceso ayudándome a cumplir mis objetivos. Quiero reconocer a mis primeros mentores de física, Carlos Casanova U quien dedico incontables fin de semanas de explicaciones y enseñanzas y aquellos que me ayudaron a perfilar mi elección sobre la física experimental Tito Cortez mi profesor del colegio y a Ricardo Pesse por dejarme participar en 3° y 4° medio en el programa *'Incentivar la física experimental en enseñanza media'*. Agradecer también a mis profesores guía y mis grandes referentes en la investigación científica Francisco Melo y Roberto Bernal, por la oportunidad de empezar la investigación de pre-grado en el área de la biofísica y por entregarme nuevos horizontes permitiéndome realizar mi tesis de ingeniería en la universidad de Montpellier 2, Francia.

A los profesores responsables de mi investigación en Francia Catherine Braun-Breton, Gladys Massiera y Manouk Abkarian darles las gracias por su paciencia comprensión y apoyo, tanto en lo experimental, en lo computacional y lo relacionado con la vida misma. Por darme la oportunidad de seguir con mis estudios de Doctorado en el mismo tema de esta tesis. A Emilie Vialla y Laurence Berry-Sterkers por entregarme sus conocimientos del cultivo de los parásitos. También muy personalmente quiero agradecer a Diana Penarete por su amistad y por instruirme rigurosamente en la biología relacionada con este parásito.

A César y Maritza Casanova por su importante ayuda en las redacciones e imágenes respectivamente.

Debo corresponder a mis profesores de universidad y en particular a los que contribuyeron con mi formación integral. A Iranio Chávez y Peggy Kuruz por enseñarme a danzar la vida. Reconocer a aquellos que me acompañaron diariamente

en el departamento de física y formaron parte de mi desarrollo, en especial a Manuel Meza y Nelson Flores por brindarme ayuda cuando lo necesite. A Erika Inostroza por su admirable forma de ser. A mis compañeros y amigos con los cuales pase largas horas de estudio y vida Desiree Salas, Romina Muñoz, Victor Duarte, Marco Ossandon, David Espindola, Alejandro Riveros, Sergio Palma, César Ayala, Samuel Gutiérrez, Antonella Rescaglio, Daniela Briceño. Agradecer a Aylinne Roman y Francisco Santibañez por responder siempre a mis dudas computacionales, compartiendo conmigo sus conocimientos de Matlab y su amistad. A Carlos Bolvaran y Carlos Astorga por compartir conmigo sus valiosas formas de ver y vivir la vida. A Javiera Jofré, Sofía Gonzalez y Karen Arancibia por estar siempre presentes en cada paso.

Finalmente quisiera agradecer a mis padres Carlos Casanova U. y Herma Morales H. por darme todas las herramientas que un hijo necesita para plantearse frente a la vida. A mis hermanos Carlos, Herma y César por compartir conmigo el día a día .A Francisco Díaz por confiar en mí y ser mi compañero. A mis tíos, mis primos y mis abuelos; mi familia, mis amigos por ser mi pilar fundamental y mi motivación para cumplir mis metas.

LABORATORIOS Y PROFESORES

Esta investigación fue realizada con tres equipos de trabajo los cuales serán detallados a continuación.

UNIVERSITE DE MONTPELLIER II - FRANCE



PROFESORES	LABORATORIOS
Manouk Abkarian Gladys Massiera	Laboratoire des Colloïdes Verres et Nanomatériaux (LCVN - UMR 5587) 
Catherine Braun-Breton	Laboratoire de Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques (DIMNP - UMR 5235) 

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE



PROFESORES	LABORATORIO
Francisco Melo Roberto Bernal	Laboratorio de física no lineal

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN.....	2
Capítulo 2. ESTADO DE ARTE Y OBJETIVOS.....	5
2.1 Plasmodium falciparum	7
2.2 Estado de merozoito.....	8
2.3 Movimiento del merozoito.....	10
2.4 Objetivos de la investigación.....	12
Capítulo 3. MATERIALES Y METODOS	13
3.1 Cultivo de Parásitos	13
3.1.1 Sincronización de las formas jóvenes	14
3.1.2 Sincronización formas maduras.....	14
3.2 Cámara de Observación.....	15
3.3 Drogas	17
Capítulo 4. ANALISIS DEL MOVIMIENTO	18
4.1 Descripción Del Programa	18
4.2 Validación Del Programa	20
4.2.1 Rotación continua en sentido horario	20
4.2.2 Rotación aleatoria.....	24
4.2.3 Merozoito inmóvil.....	27
Capítulo 5. EXPERIENCIAS.....	28
5.1 Control	28
5.2 Pendimetalina	32

Capítulo 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	34
Capítulo 7. GLOSARIO	37
Capítulo 8. REFERENCIAS	41
ANEXOS.....	44
A. Protocolos de preparación y cultivo.....	44
A.1 Protocolo 1. Sorbitol (GIBCO)	44
A.2 Protocolo2. Gelofusina (Braun Medicals)	45
A.3 Protocolo 3. Lavado de Sangre (EFS).....	45
A.4 Protocolo 4. Medio de cultivo	46
A.5 Protocolo 5. Identificación de la roseta.....	46
A.6 Protocolo 6. Pendimetalina (SIGMA)	46
B. Recomendaciones	47
B.1 Recomendaciones para un buen cultivo	47

INDICES DE FIGURAS Y GRÁFICOS

Figuras

Figura 1.- 1A) Ciclo de vida asexual de <i>Plasmodium</i> (CELL 2006 COWMAN)..	8
Figura 2.- Organización del merozoito (L.H. BANNISTER 2000)	9
Figura 3.- Un modelo de mecanismo movilidad gliding. (L. David Sibley 1998)	10
Figura 4.- La motilidad y la invasión de los Apicomplexa (MORRISSETE 2002)	11
Figura 5.- Frotis del cultivo.	14
Figura 6._ Montaje Experimental (M. Casanova).	16
Figura 7._ Descripcion del programa	19
Figura 8.- Imagen utilizada para controlar el código.	20
Figura 9.- Secuencia de la rotación gliding de <i>P. falciparim</i>	29

Gráficos

Gráfico 1 ._Análisis figura que da dos vueltas horario $\Delta\theta = 1^\circ$	21
Gráfico 2.- ángulos generados θ_G y los ángulos analizados θ_A con $\Delta\theta = 1^\circ$	21
Gráfico 3.- Histograma normalizado 'delta' de θ_A con $\Delta\theta = 1^\circ$	22
Gráfico 4- Análisis figura que da dos vueltas horario con $\Delta\theta = 0,5^\circ$	22
Gráfico 5.- Histograma normalizado 'delta' de θ_A con $\Delta\theta = 0,5^\circ$	23
Gráfico 6.- Distribución utilizada para generar de los ángulos de rotación.	24

Gráfico 7.- Análisis con ángulos generados con una distribución normal.....	25
Gráfico 8- Análisis con ángulos generados con una distribución normal.....	25
Gráfico 9.- Superposición de los histogramas de los θ_G y θ_A	26
Gráfico 10 .- Análisis merozoito inmóvil de una película real.....	27
Gráfico 11.- Movimiento de traslación del merozoito y MSD de la trayectoria.....	30
Gráfico 12.- Merozoito normal de una película real.....	31
Gráfico 13.- Histograma normalizado 'delta'.	32

RESUMEN

En la presente tesis el tema central es el estudio del movimiento del parásito *Plasmodium falciparum* en estado de merozoito. El desarrollo de la investigación está orientado en tres ejes, el primero describe los procedimientos básicos de cultivo y su sincronización, permitiendo confinar al microorganismo en una etapa específica de su ciclo asexual, con el fin de llevar a cabo las observaciones necesarias para su estudio. El segundo eje presenta una primera aproximación de un código computacional para el análisis de dicho movimiento. Y por último, se detallan las experiencias donde fue posible individualizar fenómenos interesantes, realizados por el merozoito, tales como la *latencia* que corresponde al periodo que requiere éste para activarse y *'moonwalking'* que presenta la particularidad de realizar un giro alrededor de un punto fijo. También fue factible observar la acción sobre el cultivo de una droga (pendimetalina) que inhibe la polimerización de los microtúbulos, esto con el fin de entender la influencia de este proceso en el movimiento.

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN

La malaria o paludismo es una enfermedad que tiene una gran tasa de mortalidad y abarca extensas zonas con climas tropicales, según las cifras de la organización mundial de la salud mueren hasta 2,7 millones de personas cada año; afectando actualmente a un 36% de la población mundial en más de 90 países (UNESCO 2010).

Ronald Ross en 1897 observó que cierta especie de mosquito eran los responsables de transmitir la malaria por medio de una picadura, inyectando el parásito al torrente sanguíneo (THE NOBEL Foundation 1902). Ya dos décadas antes el médico militar francés Charles Louis Alphonse Laveran, había observado parásitos dentro de los glóbulos rojos de personas con malaria (THE NOBEL Foundation 1907). En este tiempo el parásito era denominado *Oscillaria* debido a las características de su movimiento. Un siglo después fue posible aislar exitosamente en vitro el parásito, lo que facilitó el estudio y entendimiento de los procesos invasivos e infecciosos. Es en este último proceso donde el movimiento del parásito en un estado denominado merozoito cobra una gran importancia ya que contribuye a la propagación de la infección. En contraste con muchos otros organismos patógenos, el parásito que causa malaria en humanos, *Plasmodium*, infecta eficientemente a su huésped por medio de

una rápida entrada a las células, al utilizar sus aparatos de invasión propia para identificar, penetrar y establecerse. La entrada a las células huésped representa un proceso obligatorio y específico del parásito, un 'talón de Aquiles' que puede ser explotado para el desarrollo de nuevos tratamientos. (COWMAN 2006). Los mecanismos de invasión utilizados están muy bien definidos para otros parásitos del mismo filum, pero aún son desconocidos varios aspectos del movimiento de *Plasmodium falciparum*, responsable del peor tipo de malaria en humanos.

En esta investigación, este movimiento es analizado en un sustrato de vidrio. El objetivo es obtener un acabado conocimiento del movimiento del merozoito de *Plasmodium falciparum* en una superficie simple ya que posteriormente se pretende entender el movimiento sobre superficies deformables como los glóbulos rojos.

Para llevar a cabo las experiencias es de vital importancia tener un cultivo sincronizado y con alta parasitemia, es decir, que la gran mayoría de los parásitos se encuentren en una misma etapa de su ciclo asexual y que el porcentaje de glóbulos rojos infectados sobre el total de la muestra supere el 5%. En este trabajo se describe detalladamente estos procesos, dado que la experticia necesaria en el cultivo y sus técnicas requirió de una parte importante del tiempo utilizado en esta tesis.

El análisis y procesamiento de imágenes también forman parte de este proyecto mostrando un primer acercamiento de un código capaz de medir la trayectoria y los ángulos descritos por el parásito. Se considero el ápice del *P. falciparum* como referente para describir con mayor precisión sus ángulos, ya que códigos anteriores sólo lo aproximaban a una elipse descuidando este detalle. Este código fue validado con una imagen simple rotada en ángulos conocidos para verificar su funcionamiento antes de analizar imágenes reales.

Posterior a la validación del código se presentan las experiencias llevadas a cabo con *Plasmodium falciparum* donde se estudia y se explican fenómenos particulares del movimiento del merozoito como son, la *latencia* que corresponde al periodo que

requiere éste para activar su movimiento después de salir de su estado maduro y '*moonwalking*', relacionado con su desplazamiento y con la particularidad de realizar un giro alrededor de un punto fijo.

Por último se detalla un experimento donde el movimiento del merozoito es afectado por la presencia de pendimetalina, droga que inhibe la polimerización de los microtubulos.

Debido que el trabajo guarda una importante relación con la biología el marco teórico se encuentra dotado de una variada terminología; para hacer más fácil su entendimiento este trabajo incluye un glosario con conceptos básicos relacionados con el tema.

Capítulo 2. ESTADO DE ARTE Y OBJETIVOS

El parasitismo es un proceso por el cual una especie amplía su capacidad de supervivencia utilizando a otras especies para que cubran sus necesidades básicas y vitales. Las especies explotadas normalmente no obtienen un beneficio por los servicios prestados, y se ven generalmente perjudicadas por la relación, viendo menoscabada su viabilidad. La especie que lleva a cabo el proceso se denomina parásito y la especie parasitada es llamada hospedador o huésped.

Existen diversos criterios de clasificaciones de los parásitos, según su localización con respecto al hospedador, son llamados endoparásitos si viven en el interior del huésped y ectoparásitos a aquellos que viven en el exterior. Otro criterio es según la necesidad de parásito, puede ser facultativa, es decir que no constituye una condición indispensable para la vida de éste u obligado en donde el parásito en un momento determinado de su ciclo vital o en todo él, necesita un huésped. Según su morfología en helmintos, artrópodos, protozoos (organismos microscópicos, unicelulares eucarísticos). También es posible clasificarlos según su taxonomía como por ejemplo el filum Apicomplexa.

El parásito de la malaria es el miembro más importante de los Apicomplexa. La proliferación de estos organismos se produce por la invasión de una célula huésped y es seguido por el crecimiento y la división celular hasta que la célula huésped es destruida por las replicas del parásito. Los parásitos liberados por la lisis de la célula huésped deben rápidamente invadir otras células del huésped para poder sobrevivir. Los ciclos reiterados de invasión celular, replicación del parásito, lisis de la célula huésped explica gran parte del tejido dañado asociado con las infecciones de los Apicomplexa. (MORRISSETE 2002). El filum Apicomplexa comparte una gran variedad de caracteres morfológicos e incluye parásitos de importancia humana y veterinaria como *Toxoplasma gondii*, *Theileria*, *Eimeria*, *Babesia*, y *Cryptosporidium*. Estos parásitos tienen ciclos de vida complejos, algunos, incluyendo *Toxoplasma*, *Eimeria*, y *Cryptosporidium* pasan directamente a los huéspedes vertebrados. Al contrario del ciclo de vida de otros, como *Plasmodium* que involucra a un vector artrópodo (en este caso un insecto), para transmitir el parásito a un anfitrión vertebrado durante su alimentación. Independiente de su huésped o modo de transmisión, todos los parásitos Apicomplexa comparten rasgos, incluyendo la presencia de un complejo apical especializado (a esto se debe el nombre del grupo), que es central en el desarrollo de la invasión (COWMAN 2006). Esta invasión a las células del huésped está basada en el proceso activo de la motilidad 'gliding' del parásito (FRÉNAL 2009).

2.1 Plasmodium falciparum

Plasmodium falciparum es el agente responsable de la malaria o paludismo, este microorganismo es un parásito protozoario intracelular obligatorio de filum Apicomplexa. Dentro de las diferentes especies del género *Plasmodium* que causan malaria en humanos, *P. falciparum* es la especie responsable de la forma más agresiva de la enfermedad con los índices más altos de complicaciones clínicas y de mortalidad. (WHO 2010)

Los huéspedes vertebrados de *Plasmodium falciparum*, adquieren la infección a través de la picadura de un mosquito *Anopheles* hembra portador del parásito. Estos mosquitos habitan en las zonas templadas, tropicales y subtropicales de Europa, África, Asia, América y Oceanía, lo cual representa una amplia distribución geográfica y explica la fuerte incidencia de la enfermedad en todo el mundo. El mosquito contiene en su saliva el estado parasitario llamado esporozoito, el cual es inyectado al torrente sanguíneo del huésped vertebrado durante la picadura. El esporozoito es una forma extracelular de migración rápida capaz de invadir activamente las células hepáticas o hepatocitos. Al interior del hepatocito el esporozoito sufre una diferenciación celular y entra en fase de división mitótica dando origen a miles de nuevas células llamadas merozoitos. Esta etapa corresponde al ciclo hepático de la infección. Una vez que los merozoitos son liberados de los hepatocitos, estas formas parasitarias invaden los glóbulos rojos o eritrocitos dando así origen al ciclo eritrocitario de la infección. (Ver Figura 1A). *Plasmodium falciparum* reside durante 48 horas en los eritrocitos pasando por tres diferentes estados parasitarios: anillo, trofozoito y esquizonte (J.LEE 2009). *Plasmodium* degrada la hemoglobina del eritrocito, la cual es utilizada para su nutrición dejando como producto residual el pigmento malárico o hemozoína. Al final de cada ciclo intraeritrocitario aproximadamente entre 16 y 32 merozoitos son liberados de cada esquizonte maduro o roseta (Ver Figura 1B). Cada merozoito liberado es capaz de invadir de nuevo otro glóbulo rojo propagando así la infección (MILLER 2002). La liberación de

los merozoitos y la lisis de los eritrocitos corresponden a la fase patológica de la malaria.

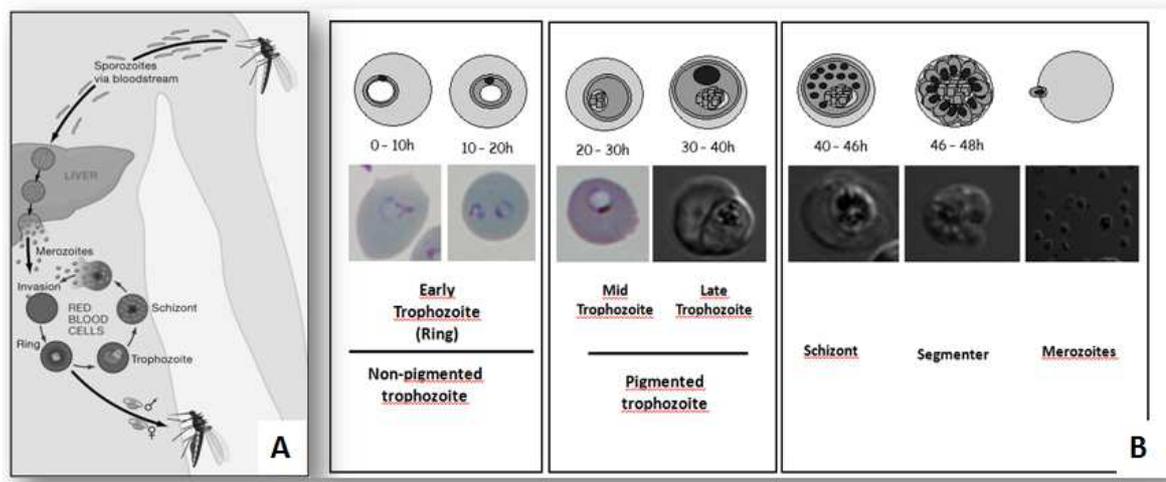


Figura 1.- 1A) Ciclo de vida asexual de *Plasmodium* (COWMAN 2006). 1B) Detalle de los diferentes estados del parásito en el ciclo de vida Asexual de *Plasmodium falciparum*, las tres primeras imágenes son obtenidas con la técnica de campo claro. Las cuatro siguientes son obtenidas con contraste de fase.

2.2 Estado de merozoito

El merozoito es el parásito que posee la capacidad de invadir los glóbulos rojos. Presenta forma oval y mide 1.5 μm de longitud por 1 μm de diámetro. El potencial invasivo del merozoito está dado por un complejo de organelos localizados en una de las extremidades de la célula, llamado el complejo apical (BOTERO 1998). Este complejo está conformado por tres diferentes organelos únicos en el filum de los Apicomplexa: los micronemas, las roptrias y los gránulos densos; el complejo apical también está conformado por una red de estructuras submembranales del citoesqueleto del parásito. La membrana parasitaria está constituida por dos capas. Por dentro de la capa interna o película, se encuentra una red de filamentos (A. KEELEY 2004) y los microtúbulos los cuales le dan forma y rigidez a la célula. Estos

microtúbulos se originan en los anillos polares apicales, los cuales también hacen parte de este complejo (L.H. BANNISTER 2000). (Véase Figura 2).

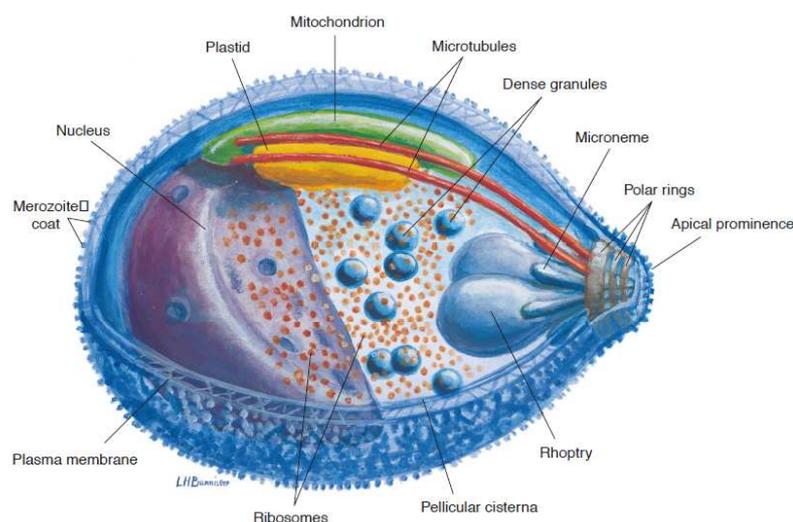


Figura 2.- Organización del merozoito de *Plasmodium Falciparum*. (L.H. BANNISTER 2000)

A diferencia de los merozoitos de otras apicomplexas como *Toxoplasma* y *Eimeria* donde los microtúbulos subpelliculares están espaciados uniformemente por debajo de la periferia de la película, los microtúbulos de *Plasmodium* ocupan dos tercios de la circunferencia de la célula con un microtúbulo en el tercio restante. Estos poseen cuatro copias únicas de genes de tubulina (α -I, α -II, β , γ) (J.C. PINDER 2000). La estructura de microtúbulos en el merozoito de *P. falciparum* es llamada f-MAST (falciparum merozoite assemblage of sub-pellicular microtubules) (R. E. FOWLER 1998). Cabe destacar que otras etapas del ciclo de vida de *P. falciparum* (esporozoitos y ookinetes) también presentan microtúbulos subpelliculares (MORRISSETE 2002).

2.3 Movimiento del merozoito

El merozoito al estar en contacto con el sustrato (vidrio), presenta un movimiento conocido como 'gliding' que utiliza para migrar a través de las barreras biológicas, tanto en la entrada como en salida de las células huésped.

Esta forma de movilidad es considerada inusual, debido a que no requiere de ninguna estructura convencional del movimiento celular tales como los cilios o flagelos. Sino que, en los apicomplexas, depende de un complejo macromolecular llamada glideosoma que está compuesto de proteínas de adhesión que son liberadas por la prominencia apical y posteriormente son trasladadas al polo del parásito por la acción del sistema actina-miosina anclado en el complejo de la membrana interna de este. (Ver Figura 3) (A. KEELEY 2004) .

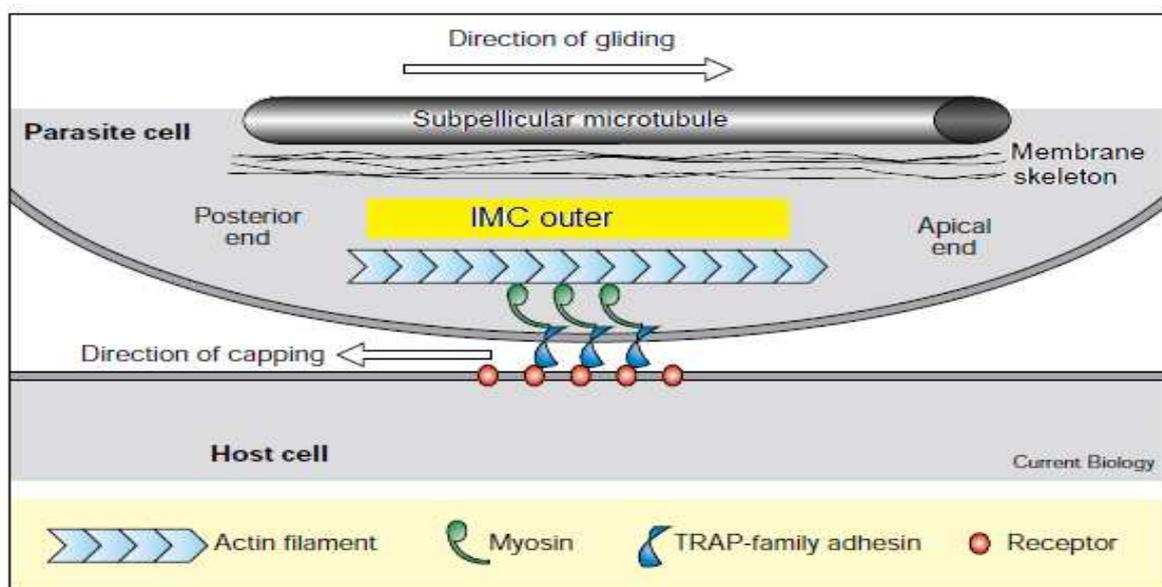


Figura 3.-Un modelo de mecanismo molecular que conduce la movilidad en parásitos Apicomplexa. Estudios morfológicos de *Toxoplasma* indican la presencia de actina y miosina subcortical, estas pueden proporcionar la armazón y el motor molecular necesarios para impulsar la movilidad del parásito. La familia de adhesins TRAP son un posible candidato como la proteína que proporciona el enlace entre la superficie celular y el motor actina- miosina del parásito. Así los complejos de adhesins, posterior nivelación del receptor a través del movimiento de la miosina a lo largo de los filamentos de actina darían lugar a un movimiento de avance del parásito a través del sustrato de la superficie celular (L. David Sibley 1998).

Los mecanismos de movimiento siguen siendo poco entendidos en *Plasmodium falciparum*, pero han sido analizados en *Toxoplasma gondii* y se sabe que consta de tres comportamientos: rotación de desplazamiento, en posición vertical, y helicoidal de deslizamiento. El deslizamiento helicoidal es el único comportamiento asociado con la movilidad que lo le permite desplazarse sobre un sustrato. Durante este comportamiento bifásico, el parásito avanza una distancia igual a su propia longitud. Este se desplaza hacia delante en una trayectoria helicoidal movido por la zona de contacto de su ápice. Por su forma de media luna, se mueve en espiral a modo de 'sacacorchos' (Figura 4. 1-5). La forma de media luna le impide la continuación del avance, ya que el parásito no puede comunicarse con el sustrato. Para corregir esta situación, el parásito gira 180 ° sin avanzar (Figura 4. 6-7) antes de iniciar otro ciclo de movimiento (MORRISSETE 2002).

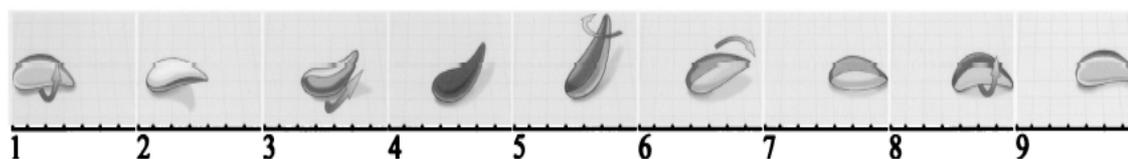


Figura 4.- La motilidad y la invasión de los Apicomplexa Esta secuencia muestra un ciclo completo para avanzar con motilidad gliding por un *Toxoplasma* en estado de tachyzoite, este estado es el equivalente al estado de merozoito de *P.falciparum*. (MORRISSETE 2002)

Para *Plasmodium falciparum* el movimiento descrito anteriormente presenta una particularidad, adicionando un giro alrededor de un punto fijo. Esta motilidad 'gliding' característico del merozoito es conocido con el nombre de 'moonwalking' y puede ser explicado por las diferencias ya mencionadas en los citoesqueletos de ambas apicomplexas.

2.4 Objetivos de la investigación

En un experimento donde el agente en estudio es de naturaleza biológica e infecciosa, se deben tener consideraciones elementales para conservarlo y protegerse del riesgo de ser infectado. En particular para realizar las experiencias, el cultivo de *Plasmodium falciparum* se debe caracterizar por estar sincronizado y tener una alta parasitemia, debido a esto se hace imprescindible dedicar gran parte de la investigación en adquirir la pericia necesaria en la manipulación del cultivo parasitario, ya que cualquier descuido en el manejo del procedimiento, aumenta el riesgo de perder las muestras y peor aun contraer la enfermedad.

Otros objetivos que se enmarcan dentro del curso investigación es el análisis del movimiento del merozoito a través de un código computacional cuantificando la evolución de su movimiento; tanto su traslación como su rotación.

También se busca entender los agentes responsables de este movimiento, específicamente entender la importancia de los microtúbulos en el proceso invasivo. Para esto se utiliza una droga (pendimetalina) que inhiben su polimerización.

Capítulo 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cultivo de Parásitos¹

La cepa de *Plasmodium falciparum* 3D7-GFP se cultiva en 20 mL de RPMI completo (Anexo. protocolo 4) más 2 mL de GR al 50%²(Anexo. protocolo 3). Al enfrentarse al cultivo lo primero que se debe determinar es la parasitemia ; para esto es necesario hacer un frotis, vale decir, generar sobre un portaobjetos una delgada película de glóbulos rojos infectados, dejarlo secar y teñirlo con tintes rojo y azul (tinción May-Grünwald-Giemsa). Luego el frotis se observa en un microscopio con un objetivo de 100x donde se cuentan las formas jóvenes y las maduras del parásito. (Ver Figura 5).

¹ véase en el Anexo. Recomendaciones para un buen cultivo

² Fracción volumétrica

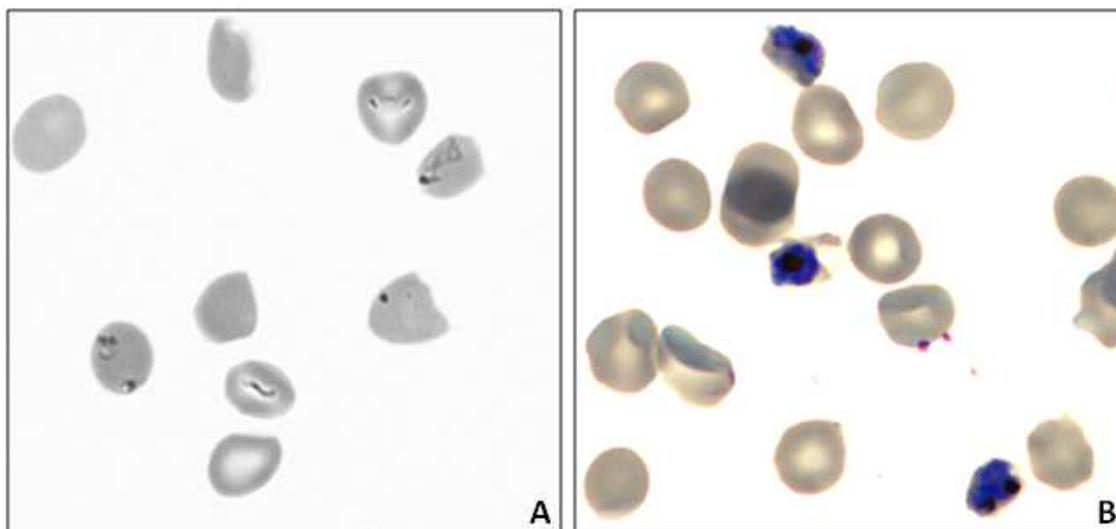


Figura 5.-Frotis del cultivo. A) Presenta formas jóvenes (ring).con pequeñas tinciones azules B) se observan formas maduras (esquizontes), en color azul.

Dependiendo de la etapa (jóvenes o maduros) en que se encuentren la gran mayoría de los parásitos y de la parasitemia el cultivo debe ser sincronizado, para esto hay dos opciones. Ambas aprovechan el mismo principio relacionado con la semipermeabilidad de la membrana del parásito en forma madura.

3.1.1 Sincronización de las formas jóvenes

Si el cultivo presenta en su mayoría formas jóvenes en un porcentaje entre el 3 y el 5 % sobre el total de glóbulos rojos de la muestra, se aplica el protocolo de Sorbitol (Anexo. protocolo 1). Debido a su baja osmolaridad provoca la ruptura de los parásitos maduros, conservando de esta manera solo las formas jóvenes que no son afectadas por este fenómeno (C. LAMBROS 2009).

3.1.2 Sincronización formas maduras

Si hay una mayoría de formas maduras en un porcentaje superior al 5 % se aplica el protocolo de gelofusina (Anexo. protocolo 2), que es una gelatina que ingresa en el parásito maduro disminuyendo su densidad haciéndolo flotar en el sobrenadante, en este caso las formas jóvenes no son afectadas y si el caso lo amerita

pueden ser rescatadas y puesta en cultivo. El sobrenadante denominado plasmión es el que se utiliza en el experimento, ya que los parásitos luego de alcanzar su máximo estadio, son liberados del glóbulo rojo en forma de merozoitos.

3.2 Cámara de Observación

Con el fin de obtener una cantidad óptima de parásitos para la observación, es decir, que exista una distancia entre un glóbulo y otro de tal manera que cuando los merozoitos sean liberados tengan espacio para distribuirse y desplazarse; los 4 mL de plasmión obtenidos para las experiencias deben ser diluidos en 10mL de medio. Luego sobre un cubre objeto circular de diámetro 22 o 24mm, el cual se encuentra adherido en la parte central a un cilindro de acero de 8mm altura y 105 mm de diámetro, se colocan 3 mL de plasmión (ver Anexo. protocolo 2). Arriba de esta base se sitúa una estructura de teflón la cual sirve para dar una altura de 1mm a la muestra. Finalmente se instala una estructura cilíndrica de acero que permite aislar el plasmión y observarlo bajo el microscopio. (Ver Figura 6A).

Como se muestra en la Figura 6 B, se conectan dos mangueras que permiten inyectar 5% de CO₂ y 95% de oxígeno a la muestra. Para conservarla a 37°C el objetivo del microscopio y el condensador están conectados a un controlador de temperatura (TC344B Dual automatic temperatura controler). (Ver Figura 6C)

El microscopio invertido Leica DMIRB, en modo de contraste de fase, se utiliza para la adquisición de datos con un objetivo de 100x. A este se le conecta una cámara (Phantom Camera 7464) con la cual se obtienen 30 cuadros por segundo durante una hora con una resolución de 256x256 y tiempo de exposición de 400μs.

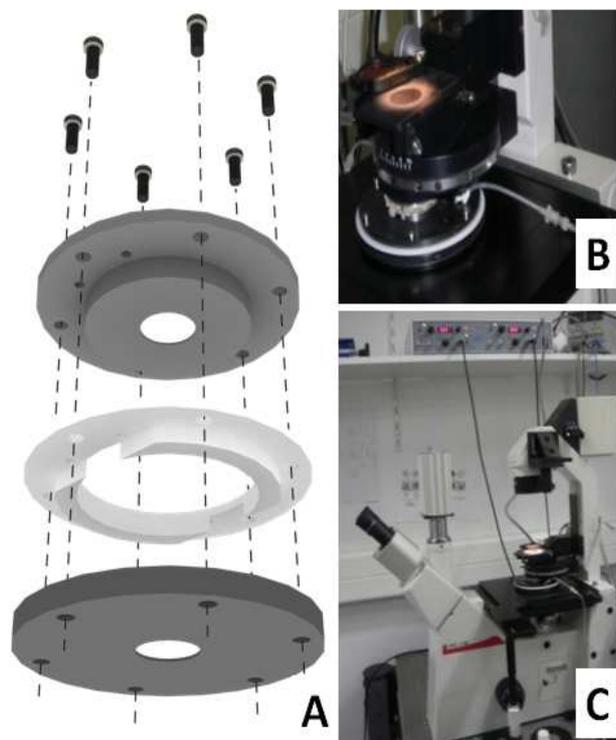


Figura 6. A) Ensamblado de las Estructuras en donde es observado el plasmion. B) Detalle del montaje en el microscopio. Se distinguen las mangueras por donde es inyectado CO₂ y oxígeno. C) Vista general del montaje experimental se puede apreciar el sistema que controla la temperatura del condensador y del objetivo.

En general para poder observar el movimiento del parasito, el cultivo debe encontrarse, en su gran mayoría, en etapa de esquizontes maduros, posteriormente se identifican los más maduros, los que son claramente distinguibles por su forma de roseta. Luego corresponde esperar que los merozoitos sean liberados. Cuando esto ocurre comienza la grabación, la primera parte corresponderá al tiempo que toma el merozoito para activarse sobre el sustrato, latencia, y la segunda a su '*moonwalking*'. (Anexo. protocolo 5)

Si el plasmión se encuentra en etapa de trofozoito debe dejarse madurar en la incubadora unas 6 horas más para alcanzar la forma madura requerida en la experiencia.

3.3 Drogas

Para observar de qué manera los microtubulos del merozoito influyen en su movimiento el plasmión se trata con pendimetalina. Para esto, primero se debe confirmar con anterioridad que el plasmión presente una elevada cantidad de esquizontes maduros. Luego, es necesario tomar los 4mL de plasmión diluido en 10 mL de medio y colocar 2 mL en un tubo para ser centrifugado. Consecutivamente se extrae el sobrenadante y es reemplazado por medio que contiene una concentración de 5µg/mL de pendimetalina. Rápidamente este nuevo plasmión se coloca en la cámara de observación, debido a que su tiempo de utilidad es solo de una hora. Después de este tiempo, es posible que el cultivo quede inactivo por los efecto de la misma droga. (Anexo. protocolo 6)

Capítulo 4. ANALISIS DEL MOVIMIENTO

4.1 Descripción Del Programa

El código escrito para analizar el movimiento de los merozoitos calcula el desplazamiento del centro de masa y sus ángulos de rotación, en este caso se consideran el ápice del merozoito para obtener una mayor precisión en la orientación de los ángulos.

Las imágenes utilizadas se obtienen siguiendo el procedimiento indicado en la sección 3.2. Luego, por medio del software Image J se selecciona el merozoito de interés y se guardada como una secuencia de imágenes.

Los primeros ángulos calculados son llamados '*ejes de inercia*' ya que corresponden a la inclinación del eje mayor de inercia con el eje x, de una elipse ajustada a la imagen del merozoito. Estos ángulos están comprendidos entre -90° y 90° . Posteriormente se distingue en que cuadrante se encuentra el extremo apical del merozoito, el problema se reduce a determinar, si las imágenes con ángulos entre 0° y 90° correspondían al primer o a tercer cuadrante y si las imágenes con ángulos 0 y -90° correspondían al segundo o cuarto cuadrante. Para resolver esto, la figura se rota

en el ángulo obtenido con 'ejes de inercia', luego la imagen del parasito es encerrada en un rectángulo, como muestra la Figura 7, con el fin de obtener el centro de masa de éste, para poder posteriormente compararlo con el centro de masa del merozoito. El signo de la diferencia entre ambos entrega el criterio de selección entre un cuadrante y otro, por ejemplo si el ángulo de ejes de inercia está entre 0 y -90° , no se sabe si la punta del merozoito está en el segundo o cuarto cuadrante. Al comparar los centros de masa si la diferencia es menor que un valor que llamaremos ' ϵ ', la punta del merozoito está en el segundo cuadrante (Figura 7A) en cambio si es mayor que ' ϵ ' el extremo apical esta en el cuarto cuadrante (ver Figura 7B). Si el valor de la diferencia se encuentra entre ' $-\epsilon$ y ϵ ' entonces el merozoito se encuentra en flip, es decir, su extremo apical esta adherido al sustrato y se encuentra en posición vertical respecto al plano de observación. En esta perspectiva su forma es circular por tanto los centros de masa del parasito y del rectángulo son muy cercanos (ver Figura 7C). Los ángulos obtenidos de esta manera son designados con el nombre de 'dirección'.

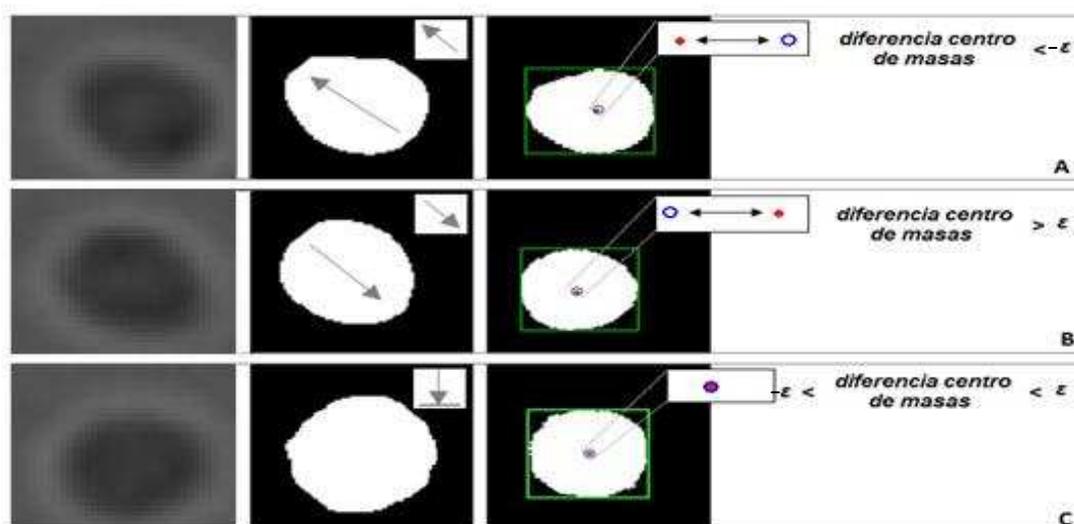


Figura 7. A) Imagen de merozoito en el segundo cuadrante, luego misma imagen rotada en ángulo obtenido a través de los ejes de inercia y rectángulo que lo encierra en su totalidad. Ampliación de los centros de masa. En rojo centro de masa del rectángulo en azul centros de masa del parasito. B) misma secuencia anterior pero el merozoito esta vez en el cuarto cuadrante. C) por ultimo secuencia del merozoito en flip.

Para poder comparar los ángulos son utilizados los gráficos denominados '*delta*' que corresponden a la diferencia de ángulos entre cuadros sucesivos.

4.2 Validación Del Programa

Para controlar como el código analiza los ángulos de rotación, se utiliza una figura simple que imita la forma del merozoito y se hace rotar tanto en sentido horario como antihorario.

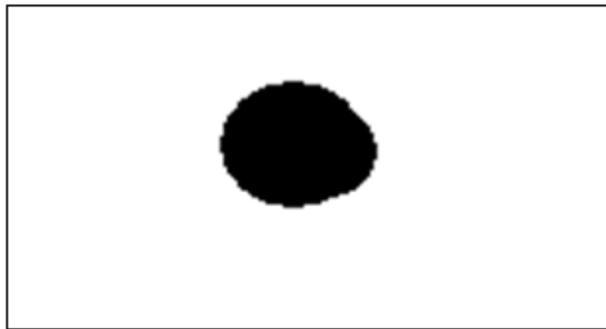


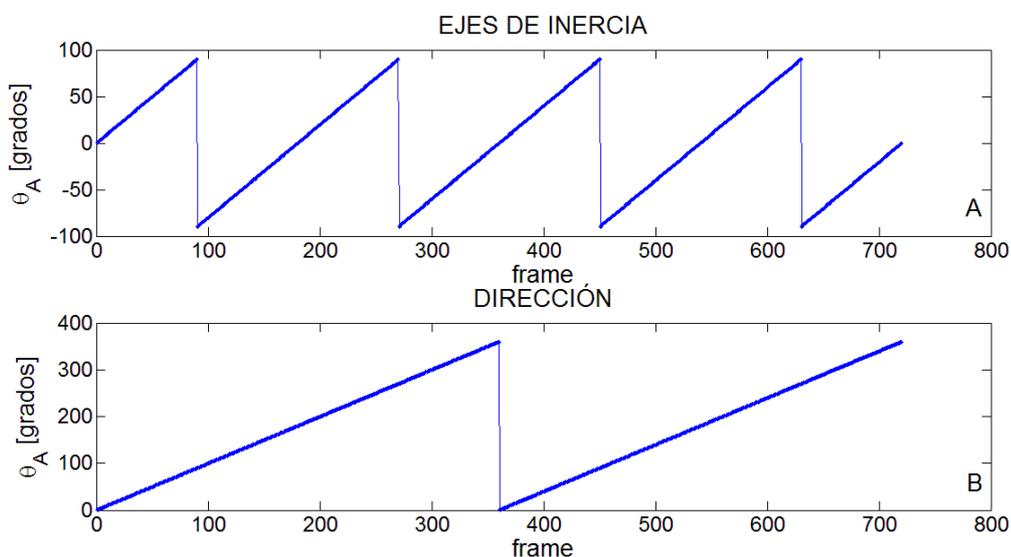
Figura 8.-Imagen utilizada para controlar el código.

4.2.1 Rotación continua en sentido horario

Los ángulos generados para hacer rotar a la figura cumplen con la condición, de que, la diferencia entre cuadros sucesivos es de 1 y de 0,5 grados. Expresado de otra manera, $\Delta\theta = 1^\circ$ y $\Delta\theta = 0,5^\circ$

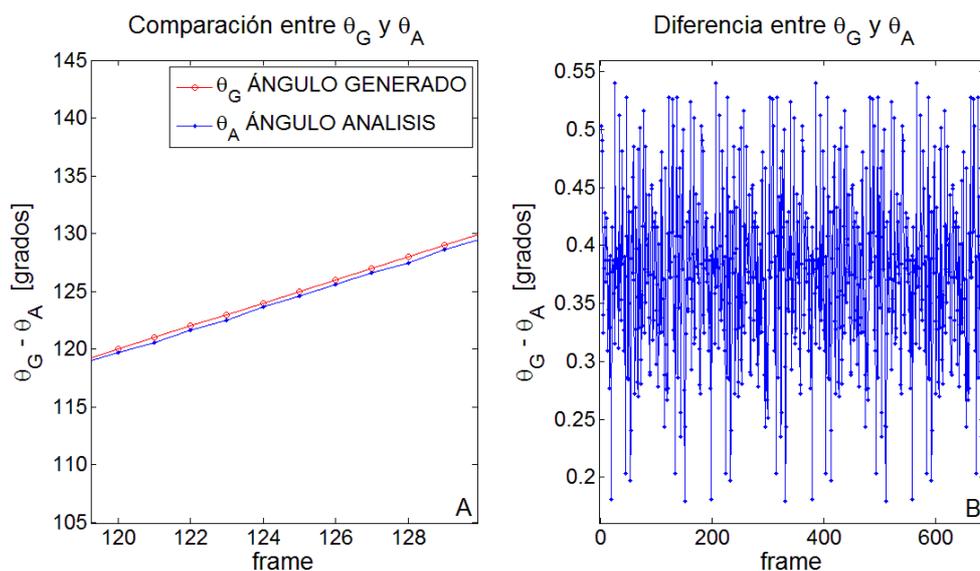
Para el caso de un incremento $\Delta\theta = 1^\circ$ el programa entrega gráficos de '*ejes de inercia*' y '*dirección*' (Véase Gráfico 1). Las dos vueltas en sentido horario están representadas por dos rectas en el grafico '*dirección*' que van entre 0° y 360° .

Gráfico 1 .Análisis figura que da dos vueltas horario A) Gráfico de 'ejes de inercia'. Los ángulos son obtenidos de la inclinación de los ejes de inercia. Están comprendidos entre 90° y -90° . B) Gráfico de 'dirección'. Los ángulos están comprendidos entre 0 y 360° .



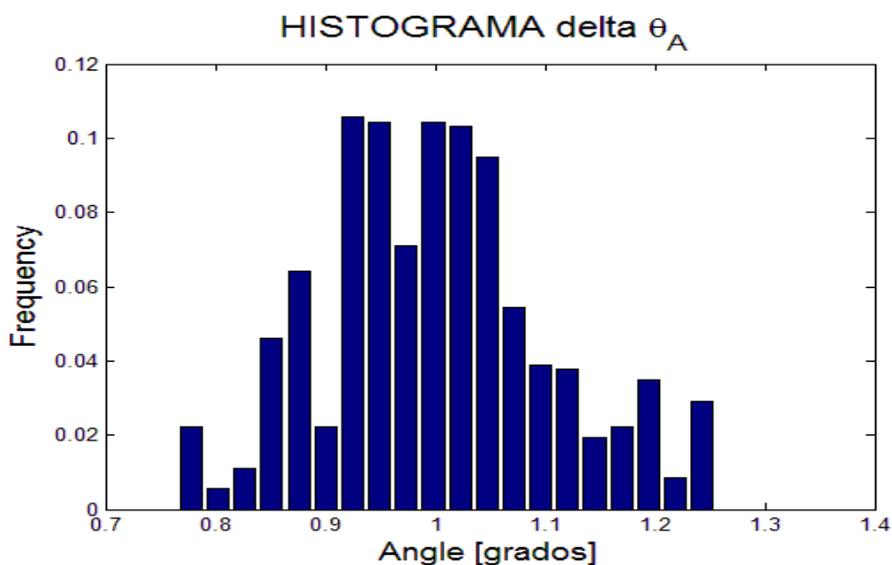
Las diferencias entre los ángulos generados θ_G y los ángulos analizados θ_A por el código son presentadas en el Gráfico 2. La desviación estándar es 0,07

Gráfico 2.- Análisis figura que da dos vueltas horario con $\Delta\theta = 1^\circ$. A) parte de las curvas los ángulos generados θ_G y los ángulos analizados θ_A . B) Diferencia entre ángulos generados θ_G y ángulos analizados θ_A .



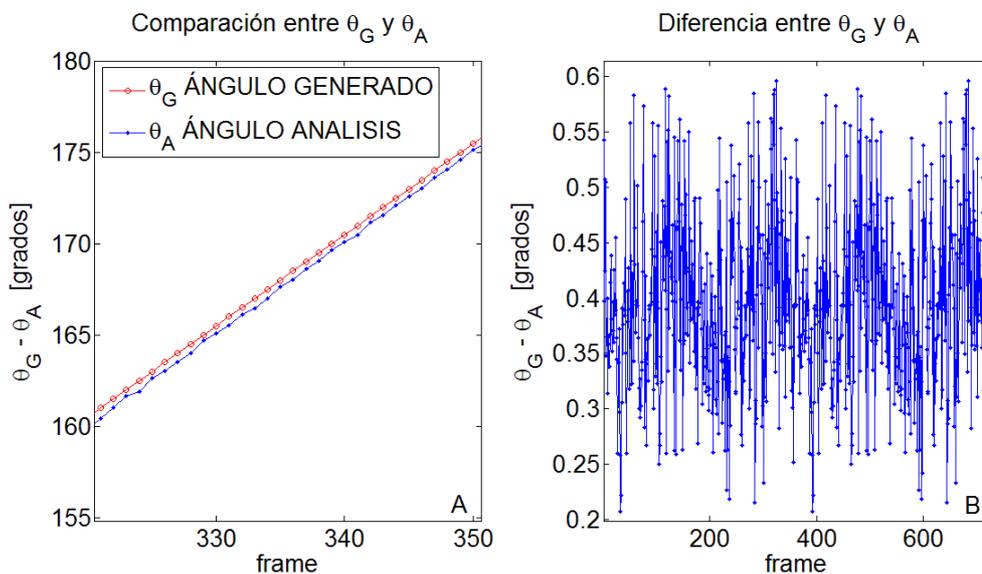
El histograma normalizado 'delta' del ángulo analizado se muestra a continuación (Gráfico 3). Su varianza es $\sigma = 0,10$ y su media $\mu = 1,00$.

Gráfico 3.- Histograma normalizado 'delta' del ángulo analizado θ_A con $\Delta\theta = 1^\circ$



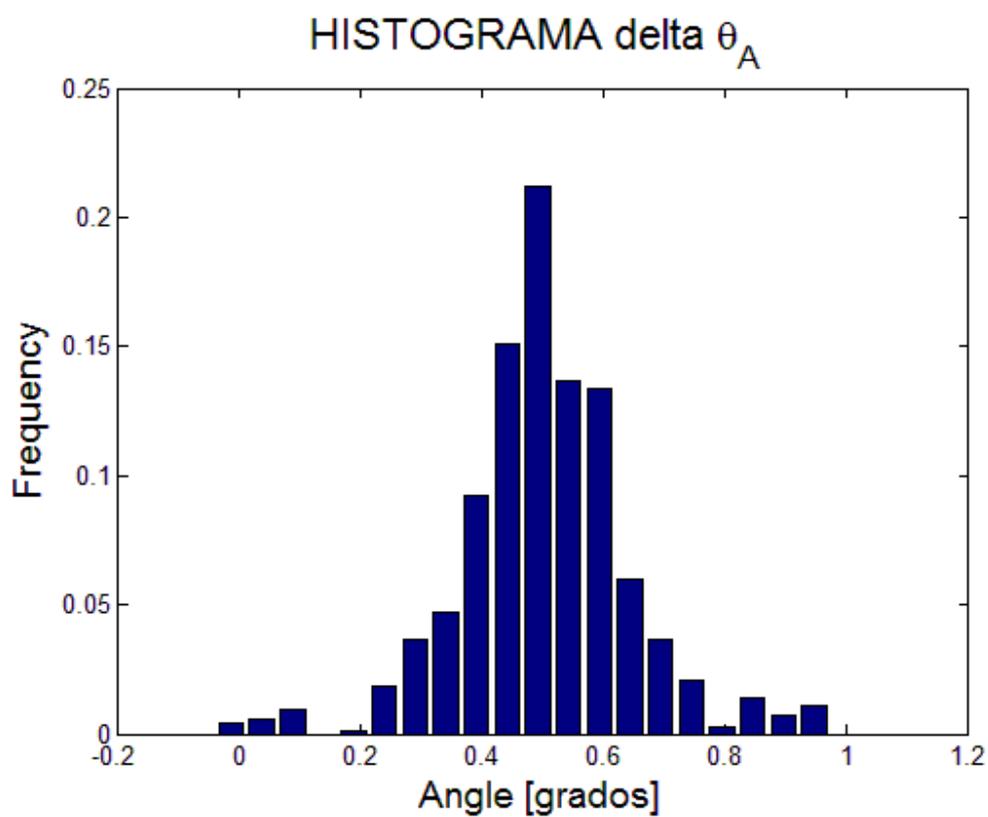
Para un la segunda condición $\Delta\theta = 0,5^\circ$ en sentido horario .La diferencia entre los ángulos generados θ_G y los ángulos analizados θ_A son presentadas en Gráfico 4. La desviación estándar es 0,08.

Gráfico 4- Análisis figura que da dos vueltas horario con $\Delta\theta = 0,5^\circ$. A) parte de las curvas los ángulos generados θ_G y los ángulos analizados θ_A . La ampliación se hizo en el lugar donde la diferencia es mayor en 176° . B) Diferencia entre ángulos generados θ_G y ángulos analizados θ_A .



Los valores para los parámetros del histograma normalizado 'delta' del ángulo analizado (Gráfico 5) en este caso son varianza $\sigma = 0,14$ y media es de $\mu = 0,50$.

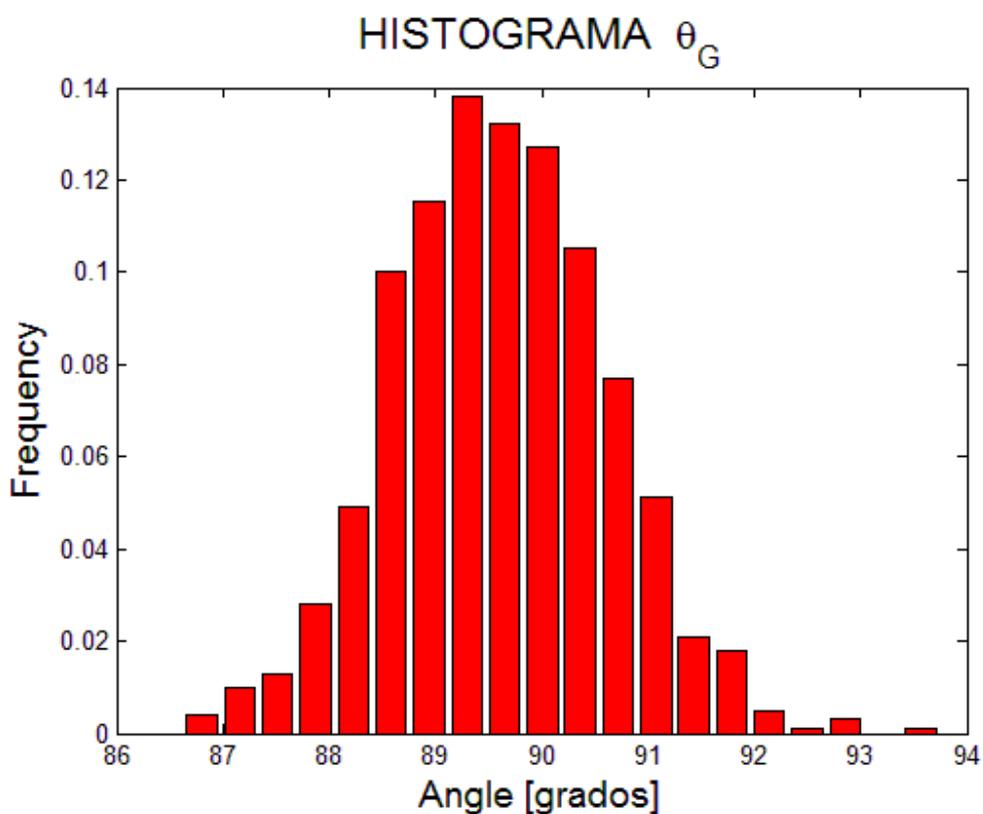
Gráfico 5.- Histograma normalizado 'delta' del ángulo analizado θ_A con $\Delta\theta = 0,5^\circ$



4.2.2 Rotación aleatoria

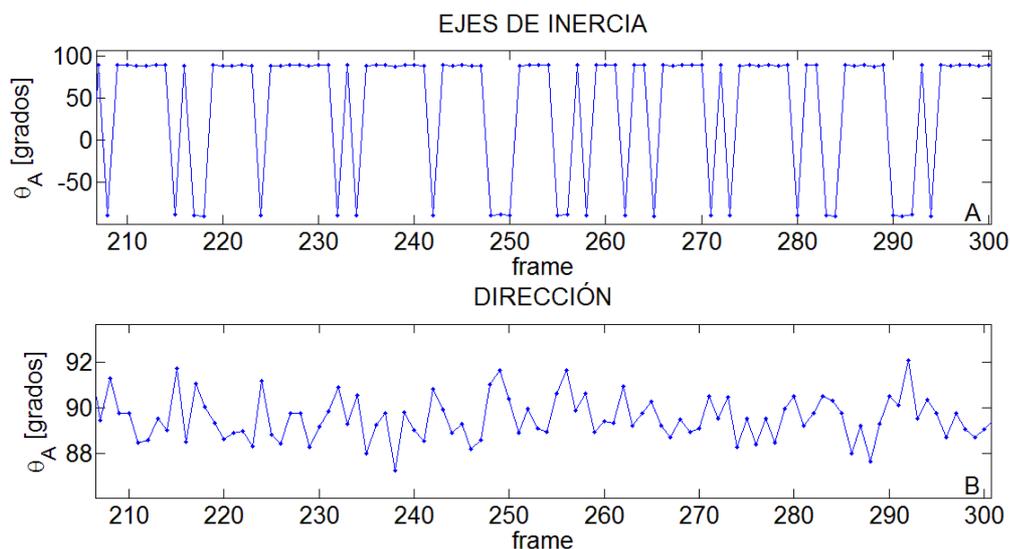
Se requiere observar la respuesta del código para una distribución diferente, para esto mil ángulos son generados con una distribución normal que cumple las siguientes características, desviación estándar $\sigma = 1,00$ y media $\mu = 89,57$. (Véase Gráfico 6)

Gráfico 6.- Distribución utilizada para generar de los ángulos con los cuales será rotada la figura.



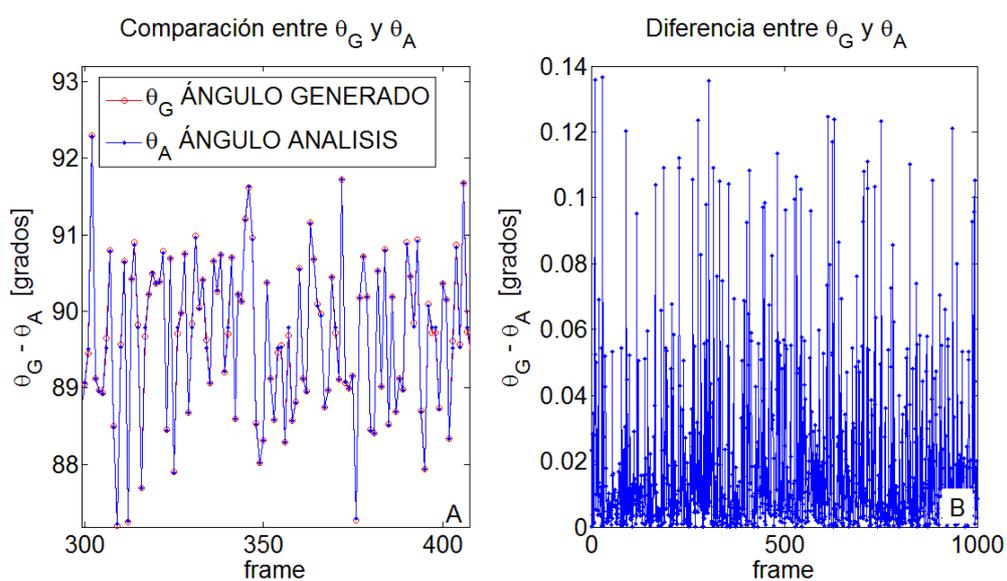
Los gráficos de '*ejes de inercia*' y '*dirección*' son presentados en Gráfico 7. En el gráfico '*dirección*' se puede apreciar que los ángulos varían entre 86° y 94° .

Gráfico 7.- Análisis figura que da rota con ángulos generados con una distribución normal. A) Gráfico de 'ejes de inercia'. B) Gráfico de 'dirección'.



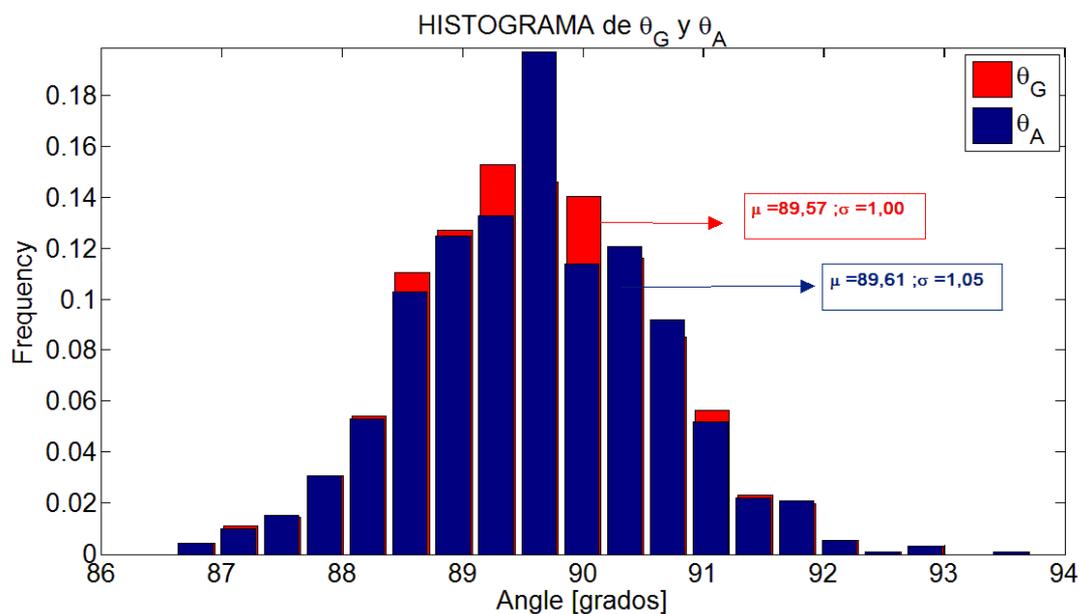
La diferencia entre los ángulos generados θ_G y los ángulos analizados θ_A son presentadas en Gráfico 8. La desviación estándar es 0,08

Gráfico 8- Para una figura cuyos ángulos de rotación fueron generados con una distribución normal . A) Curvas de los ángulos generados θ_G y los ángulos analizados θ_A . B) Diferencia entre ángulos generados θ_G y ángulos analizados θ_A .



La comparación entre histogramas de ángulo generado θ_G , ángulos analizados θ_A se muestra en Gráfico 9. Donde para ángulo analizado su desviación estándar es $\sigma = 1,05$ y una media de $\mu = 89,61$.

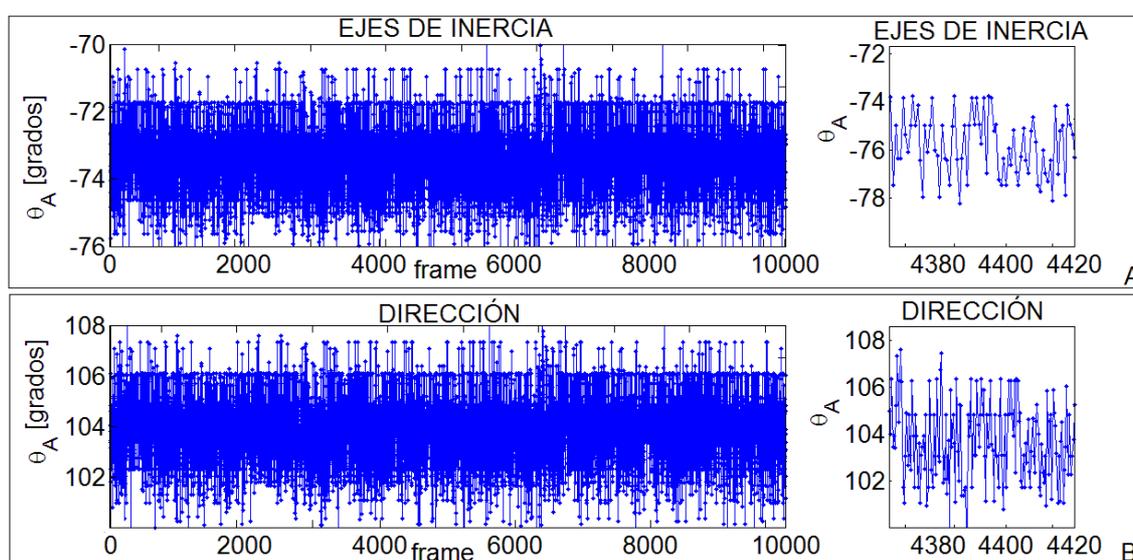
Gráfico 9.- Superposición de los histogramas de los ángulos generados y analizados



4.2.3 Merozoito inmóvil

Para determinar el ruido de las muestras, se analiza un merozoito inmóvil de una película real. Los gráficos de 'ejes de inercia' y 'dirección' son presentados en Gráfico 10. En el grafico 'dirección' se aprecia que los ángulos fluctúan entre los 100° y 110° .

Gráfico 10 .Análisis de un merozoito inmóvil de una película real. A) Gráfico de 'ejes de inercia'. B) Gráfico de 'dirección'.



Para calcular el error se toma una parte de la curva y se ajusta una recta obteniendo una desviación estándar de $1,70^\circ$.

Capítulo 5. EXPERIENCIAS

5.1 Control

Se observa que después de que los merozoitos son liberados del esquizonte maduro existe un desfase entre la adhesión del merozoito y el comienzo de su movimiento ('moonwalking'). El merozoito permanece inmóvil aproximadamente entre 4-15 minutos sobre el sustrato antes de comenzar su movimiento. Este periodo que requiere el merozoito para activarse es denominado latencia.

La Latencia es observada solo en superficies artificiales no estando presente cuando el merozoito entra en contacto con la membrana de un glóbulo rojo, en este caso, 'moonwalking' comienza casi inmediatamente.

Después de este tiempo el merozoito comienza a realizar su movimiento alrededor de un punto de adhesión. Éste puede descomponerse en varios movimientos: traslación a través de un punto fijo, rotaciones sobre el eje de observación y sobre el eje de revolución orientados a la punta al sustrato.

A continuación en la Figura 9 se muestra una secuencia de movimiento del parásito.

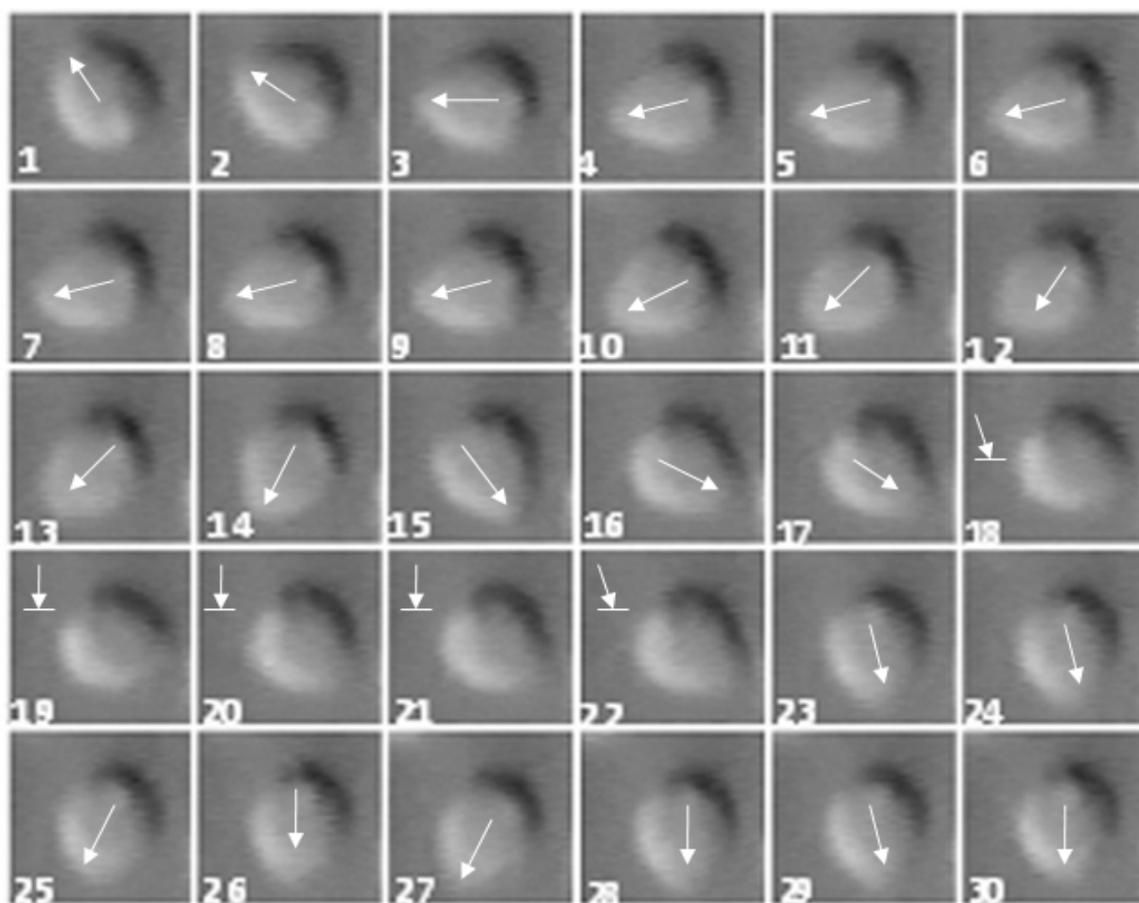
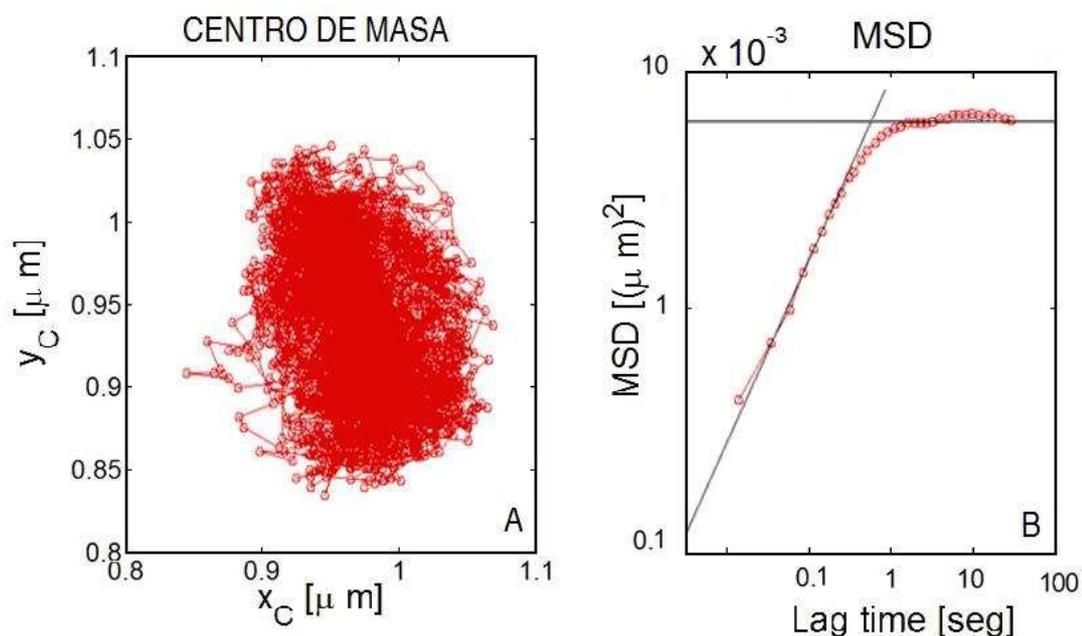


Figura 9.-Secuencia de la rotación gliding en el sustrato (el tiempo entre cada frame es de 0.125s). El merozoito está rotando en sentido horario (frame 1-17). En flip, orientando su complejo apical al sustrato (frame 18-21). Volviendo al plano de rotación (frame 22-30).

Para analizar el movimiento de traslación del merozoito (Gráfico 11A) se calcula la distancia cuadrática media, MSD, una medida de dispersión que muestra una relación entre todas las distancias, en diferentes intervalos de comparación. Este parámetro está relacionado con los coeficientes de difusión los cuales a su vez entregan información del movimiento.

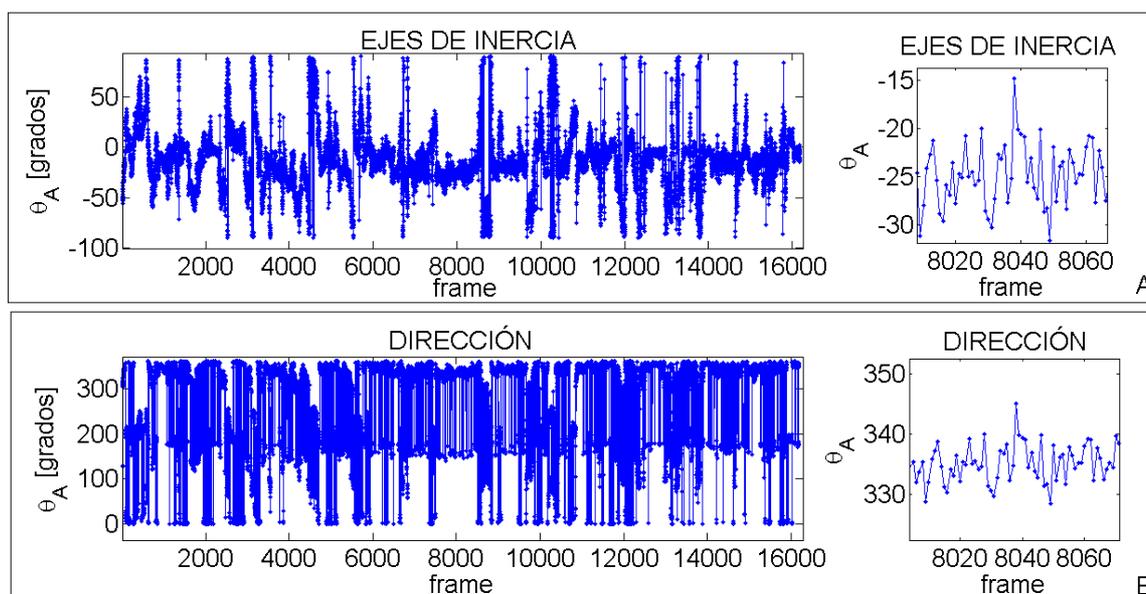
En un gráfico MSD versus intervalos de tiempo de comparación (Lag time), para un merozoito, se obtienen dos comportamientos de movimiento el primero es browniano y está representado por la pendiente de la recta con mayor inclinación donde el coeficiente de difusión es $10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$. (Gráfico 11B). El segundo es un movimiento confinado y está representado por el plateau.

Gráfico 11.- Movimiento de traslación del merozoito A) Detalle de trayectoria. B) Gráfico MSD de la trayectoria



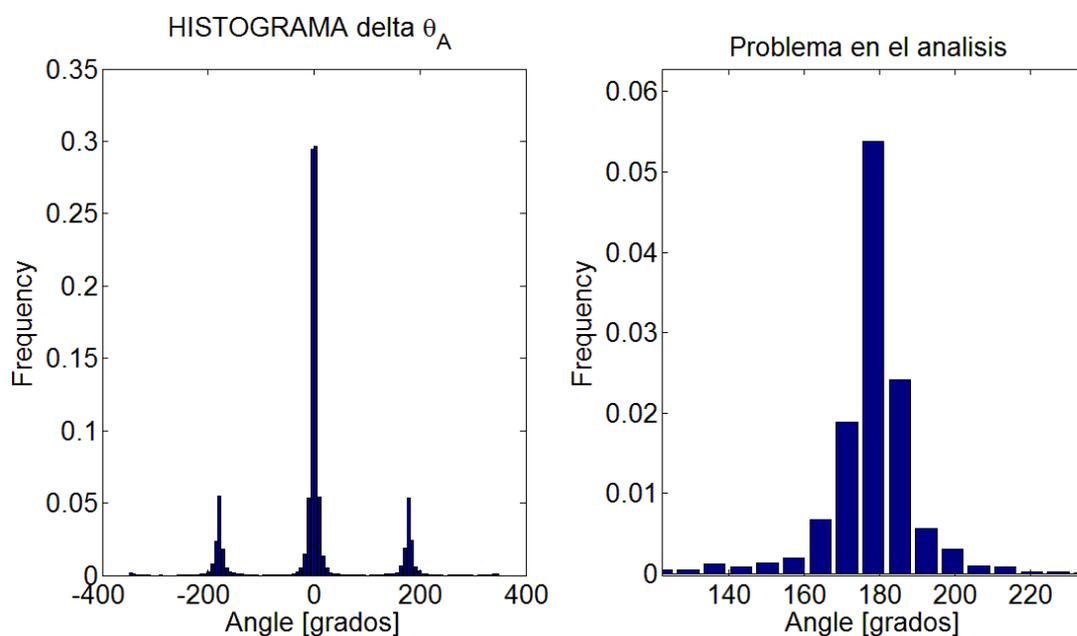
Los gráficos 'ejes de inercia' y 'dirección' para una película real se muestran en Gráfico 12.

Gráfico 12.- Es analizado un merozoito normal de una película real. A) Gráfico de 'ejes de inercia'. B) Gráfico de 'dirección'.



El análisis de las diferencias entre ángulos sucesivos en histograma 'delta' muestra tres peaks (véase Gráfico 13A). De estos destacan peaks en 180° que al observar las imágenes y compararlas con los resultados la aparición de estos se explican cuando la figura se vuelve simétrica y la diferencia entre los centros de masa es mayor que el rango considerado para este caso (entre $-\varepsilon$ y ε), donde por su forma equivaldría a un flip. El programa entrega ángulos del cuadrante opuesto al que está midiendo, generando estas diferencias de 180° .

Gráfico 13.- Histograma normalizado 'delta'. A) Histograma completo. B) Aumento en Peak de 180°.



5.2 Pendimetalina

Se observa que al tratar el cultivo con citocalisina B, una droga que inhibe la polimerización de la actina, los merozoitos se adhieren al vidrio pero permanecen inmóviles o realizaban movimientos de menor intensidad comparado con los merozoitos no tratados, se concluye que 'moonwalking' requiere de una red de actina polimerizada y que la miosina es el motor molecular asociado. Dichos resultados sugieren ahondar en el estudio de estructuras específicas del citoesqueleto tales como los microtubulos, para se utiliza pendimetalina, una droga que afecta la despolimerización de los microtúbulos del merozoito (R. E. FOWLER 1998).

Con una concentración de 5µg/mL se observó después de pasado el tiempo de latencia, una gran mayoría de merozoitos inmóviles. Los que presentaban rotaciones lo hacían más débilmente comparados con el control. Aun no se ha verificado si esta concentración produce el 100% de inhibición en ensayos de invasión. Si el porcentaje de invasión fuera inferior, el movimiento de algunos merozoitos se explicaría por no encontrarse afectadas por la droga.

Capítulo 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Se han conseguido los conocimientos básicos de cultivo lo que permite tomar decisiones con respecto a problemas que se presenten en este. Estas habilidades adquiridas otorgan la posibilidad de contar permanentemente con el plasmión necesario para el estudio del movimiento del parásito *Plasmodium falciparum* en estado de merozoito.

Con respecto al código generado, la validación del programa muestra resultados esperados conforme a las condiciones iniciales proporcionadas. Para $\Delta\theta = 1$ la media obtenida en el histograma de delta θ_A (variación entre ángulos analizados sucesivos) fue $\mu = 1$ y $\sigma = 0,1$ y para $\Delta\theta = 0,5$ la media obtenida fue $\mu = 0,5$ y $\sigma = 0,1$. En relación con los ángulos generados con una distribución normal los histogramas entregaron la siguiente información para ángulos generados $\mu = 89,57$ y $\sigma = 1,00$ y para ángulo analizado $\mu = 89,61$ y $\sigma = 1,05$ con un error 0,04%. En el merozoito inmóvil el error es de $\pm 3^\circ$ entregado por el intervalo de confianza de la media.

Si bien en la validación, los resultados entregados fueron satisfactorios estos todavía no lo son para el análisis de las imágenes de los experimentos. El error

presentado en el histograma de la variación de ángulos sucesivos para un merozoito (Gráfico 13), se debió a que en el código solo fue considerado un flip vertical y no se pensó en la situación que el merozoito adquiriera una inclinación distinta a 90° con respecto al sustrato; aquí se apreciaría en la imagen una forma simétrica, pero la diferencia de centros de masa estaría en intervalos distintos a los fijados. Exactamente, los peaks en 180° se presentan cuando el merozoito toma una forma muy circular y la diferencia de centros de masa no se encuentra en el rango determinado como flip, luego el programa seleccionó a la imagen del merozoito en el cuadrante opuesto. Desde luego esto será incluido en el código, donde se espera además determinar la inclinación del eje central del merozoito en flip con respecto al sustrato.

Es importante tener presente que las dimensiones del parásito son comparables con la resolución del microscopio, lo que proporciona una imagen no muy bien definida. Para solucionar esta limitante en el futuro se utilizarán técnicas de fluorescencia marcando la membrana de los parásitos con FM4-64 (Svetlana Glushakova 2005), con el propósito de definir mejor el contorno.

Debido a que los análisis de trayectoria consideran al merozoito como un punto, los resultados obtenidos son concluyentes. El coeficiente de difusión obtenido a través de la recta indica que el merozoito presenta un movimiento browniano. Y el plateau de la curva de este mismo gráfico (Gráfico 1B) da cuenta de un movimiento estacionario confinado que se explica por la adhesión del merozoito al sustrato.

Bajo el marco de una tesis doctoral en la universidad de Montpellier 2, Francia. Se continuará con este estudio. Ya han sido planteados futuras experiencias que se realizarán para un mayor entendimiento del movimiento de este microorganismo en superficies no deformables. Profundizando también en las que ya han sido

observadas como la latencia, 'moonwalking' y en la influencia de los microtúbulos donde se han obtenido resultados preliminares.

Las experiencias que se llevaran a cabo serán descritas a continuación. Para adherir el merozoito a un sustrato la superficie en tratada con un polímero llamado PEG (glymo/xylene). Debido a que el merozoito queda adherido a ella se espera que no esté presente el movimiento de traslación y solo se observen rotaciones y flip. Luego de comprobar su efectividad se realizara un experimento de confinamiento que consiste en poner una pequeña cantidad de parásitos entre dos vidrios donde uno de ellos estará tratado con PEG de tal manera que el parasito queda adherido a este vidrio y sea limitado por estas dos placas. Aquí se espera observar solo la rotación de este.

Para descubrir la importancia del microtúbulos en el movimiento se ahondaran las experiencias con pendimetalina para encontrar la concentración que permita un 100% de inhibición, es decir saber con certeza qué cantidad de droga asegurara que todos los parásitos se vean afectados por esta. Más adelante se pretende marcar filamentos y microtúbulos para observar con microscopia confocal que les ocurre al entrar en contacto con esta droga. El uso de la microscopia confocal permitiría también obtener un modelo tridimensional del movimiento.

Todas estas experiencias tienen como finalidad llegar a entender este movimiento en superficies deformable como son los glóbulos rojos, pero para llegar a esta etapa es necesario analizar el movimiento en situaciones más simples que serán conseguidas con las experiencias descritas anteriormente

Capítulo 7. GLOSARIO

ACTINA: Pertenece a una familia de proteínas globulares que forman los microfilamentos, uno de los tres componentes fundamentales del citoesqueleto de las células de los organismos eucariontes. Puede encontrarse como monómero en forma libre, denominada actina G, o como parte de polímeros lineales denominados microfilamentos o actina F, que son esenciales para funciones celulares como son la movilidad y la contracción de la célula durante la división celular (ZUKAMONT 2009).

APICOMPLEXA: Es un extenso grupo de protistas caracterizado por la presencia de un organelo denominado complejo apical. Este organelo incluye roptrias, micronemas, anillos polares apicales. Los roptrias y los micronemas son organelos secretores que contienen productos requeridos para la movilidad y adhesión de la célula huésped (MORRISSETE 2002).

CICLO ASEJUAL: Es ciclo de vida del parásito de la malaria en el huésped desde la invasión del glóbulo rojo por merozoito hasta la ruptura del esquizonte (merozoitos→estado de anillo→trofozoito→esquizonte→merozoitos). Duración aproximada de 48h es *Plasmodium falciparum* (WHO 2010).

CITOESQUELETO: Es un entramado tridimensional de proteínas que provee el soporte interno para las células, ancla las estructuras internas de la misma e interviene en los fenómenos de movimiento celular y en su división. En las células eucariotas, el citoesqueleto se divide en tres grupos, basados en el tipo de proteína que forma la base del polímero. Estos incluyen: (1) redes de actina-base, (2) elementos basados en la tubulina, que se organizan en los microtúbulos,(3) las estructuras de filamentos intermedios que son basada en una o más proteínas del tipo de filamentos intermedios. En la actualidad se estableció que tanto la actina y la tubulina basada en elementos del citoesqueleto son estructuras muy dinámicas (ROTHFIELD 2009).

FILUM: En la clasificación de los seres vivos, categoría taxonómica (vida→dominio→reino→filum→clase→orden→familia→genero→especie) posterior al reino. Cada filum se divide en clases (Larousse 2009).

FLIP: Entiéndase por la orientación casi vertical sobre el sustrato que realiza el merozoito.

INTRACELULAR OBLIGADO: Microorganismo que no puede vivir fuera de la célula.

LATENCIA: O tiempo de activación que requiere el merozoito después de salir del glóbulo rojo y adherirse al sustrato.

LISIS: Rotura de la membrana celular.

MEROZOITOS: Los parásitos liberados en el torrente sanguíneo cuando se rompe una esquizonte hepática o eritrocítica. Estos después pueden invadir los glóbulos rojos (WHO 2010).

MICROTÚBULOS: Los microtúbulos son estructuras tubulares de 25 nm de diámetro exterior y unos 12 nm de diámetro interior, con longitudes que varían entre unos pocos nanómetros a micrómetros, que se originan en los centros organizadores de microtúbulos y que se extienden a lo largo de todo el citoplasma.

MIOSINA: Es una proteína motora, tienen tres regiones estructurales: la cabeza y el cuello, que son totalmente conservadas, y la cola que le confiere funciones específicas originando diversas clases de la miosina. En la actualidad se conocen 15 clases acorde a la estructura de del dominio de la cola. Miosinas convencionales (pertenecen a la categoría II), son de dos cabezas filamentosas que forman las proteínas mientras que todas las otras clases, las no convencionales, pueden tener más de dos o sólo una cabeza (J.C. PINDER 2000).

MOONWALKING: Se define como el movimiento *gliding* del merozoito de *P. falciparum*, se caracteriza por su particularidad de rotar en torno a un punto fijo.

ORGANELOS: Diferentes estructuras suspendidas en el citoplasma

PASMODIUM FALCIPARUM: Es un protozoo parásito, una de las especies del género Plasmodium que causa malaria en humanos. (TRAGER 1976)

PLASMODIUM: Es un género de protistas del filum Apicomplexa. El parásito siempre tiene dos huéspedes en su ciclo vital: un mosquito que actúa como vector y un huésped vertebrado. Al menos diez especies infectan al hombre. Para humanos hay cuatro especies de Plasmodium que provocan la malaria o paludismo: *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. vivax*, de las cuales la primera es la más virulenta y la que produce la mayor mortalidad (TRAGER 1976).

SISTEMAS ACTINA-MIOSINA: Actúan como motores moleculares que permiten el transporte de vesículas y organelos a lo largo del citoplasma. La miosina camina a lo largo de filamentos de actina hacia el final de las puntas usando energía derivada de la hidrólisis del ATP (J.C. PINDER 2000).

TAXONOMIA: Clasificación jerarquizada de características y funciones que también permiten establecer un esquema de parentesco, similitudes y relaciones sistémicas entre los diferentes organismos.

Capítulo 8. REFERENCIAS

A. KEELEY, Dominique Soldati. «The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa.» *TRENDS in Cell Biology*, 2004.

A. STURM, Rogerio Amino, Claudia van de Sand, Tommy Regen, Silke Retzlaff, Annika Rennenberg, Andreas Krueger, Jörg-Matthias Pollok Robert Menard, Volker T. Heussler. «Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria Parasite for Delivery into Liver Sinusoids.» *SCIENCE*, 2006.

Akihiro Kusumi, Yasushi Sako, and Mutsuya Yamamoto. «Confined Lateral Diffusion of Membrane Receptors as Studied by Single Particle Tracking (Nano-Video Microscopy). Effects of Calcium-induced Differentiation in Cultured Epithelial Cells.» *Biophysical Journal*, 1993.

BOTERO. *Parasitos Humanos*. 1998.

C. LAMBROS, JEROME P.VANDERBERG. «Synchronization of Plasmodium Falciparum Erythrocytic Stages in Culture.» *the american society of parasitologists*, 2009.

COWMAN, Brendan S. Crabb. «Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites.» *Cell*, 2006.

FRÉNAL, SOLDATI -FAVRE. «Role of the Parasite and Host Cytoskeleton in Apicomplexa Parasitism.» *Cell Host & Microbe*, 2009.

J. M. SANTOS, Maryse Lebrun , Wassim Daher , Dominique Soldati , Jean-Francois Dubremetz. «Apicomplexan cytoskeleton and motors: Key regulators in morphogenesis, cell division, transport and motility.» *Parasiyology*, 2009.

J.C. PINDER, R.E. Fowler, L.H. Bannister, A.R. Dluzewski and G.H. Mitchell. «Motile Systems in Malaria Merozoites: How is the Red Blood Cell Invaded?» *Parasitology Today*, 2000.

J.LEE. «Rapport M2.» 2009.

KÖHLER, Charles F. Delwiche, Paul W. Denny, Lewis G. Tilney, Paul Webster, R. J. M. Wilson Jeffrey D. Palmer, David S. Roos§. «A Plastid of Probable Green Algal Origin in Apicomplexan Parasites.» *SCIENCE*, 1997.

L. David Sibley, Sebastian Håkansson and Vern B. Carruthers. «Gliding motility: An efficient mechanism for cell penetration.» *Current Biology*, 1998.

L.H. BANNISTER, J.M. Hopkins, R.E. Fowler, S. Krishna and G.H. Mitchell. «A Brief Illustrated Guide to the Ultrastructure of Plasmodium falciparum Asexual Blood Stages.» *Parasitology Today*, 2000.

Larousse. *Diccionario Enciclopedico*. S.L., 2009.

MILLER, Dror I. Baruch, Kevin Marsh, Ogobara K. Doumbo. «The pathogenic basis of malaria.» *Nature*, 2002.

MORRISSETE, Sibley. «Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites.» *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, 2002.

Patricio Mans, Horacio Salinas. *Vuelvo*.

R. E. FOWLER, R. E. FOOKES, F. LAVIN, L. H. BANNISTER. «Microtubules in Plasmodium falciparum merozoites and their importance for invasion of erythrocytes.» *Parasitology*, 1998.

ROTHFIELD, Purva Vats ,Ji Yu , Lawrence. «The dynamic nature of the bacterial cytoskeleton.» *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2009.

Svetlana Glushakova, Dan Yin, Tao Li, and Joshua Zimmerberg. «Membrane Transformation during Malaria Parasite Release from Human Red Blood Cells.» *Current Biology*, 2005.

THE NOBEL Foundation.

http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1902/ross-bio.html. 1902.

http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1907/laveran-bio.html. 1907.

TRAGER, Jensen. «Human malaria parasites in continuous culture.» *Science*, 1976.

UNESCO.or. http://portal.unesco.org/education/es/ev.php-URL_ID=30616&URL_DO=DO_TOPIC&URL_SECTION=201.html. 2010.

WHO. *Guidelines for the treatment of malaria Second edition*. 2010.

ZUKAMONT. <http://www.buenastareas.com/ensayos/Actina-Y-Miosina/47108.html>. 2009.

ANEXOS

A. Protocolos de preparación y cultivo

A.1 Protocolo 1. Sorbitol (GIBC0)

Tomar el cultivo en un tubo; centrifugar 5 min a 1500rpm.

Eliminar el sobrenadante

Agregar sobre el sedimento 5mL de sorbitol homogeneizando delicadamente.

Dejar 5 minutos a temperatura ambiente en la campana.

Centrifugar 5 minutos. Quita el sobrenadante.

Lavar con 10mL de medio completo. Centrifugar nuevamente

Botar el plasma, agregar 10mL de medio completo y llevar a la botella de cultivo.

A.2 Protocolo2. Gelofusina (Braun Medicals)

Tomar el cultivo en un tubo; centrifugar 5 min a 1500rpm

Eliminar el sobrenadante

Agregar 1,5mL de medio y homogeneizar suavemente

Agregar 2,5 mL de gelofusina y homogeneizar suavemente

Dejar el tubo a 37C durante 30 minutos

Extraer el plasmión en un nuevo tubo.

Lavarlo con 10mL de medio .Centrifugar 5 minutos. Conservar el sedimento

Agregar 10 mL de medio homogeneizar y poner 6mL en cultivo a 37C en una botella con 20 mL de medio y 2 mL de sangre con un 5% de CO₂. El resto es utilizado para experimento

A.3 Protocolo 3. Lavado de Sangre (EFS³)

Quitar plasma

Colocar RPMI base y homogenizar suavemente en volúmenes grandes.

Centrifugar a 3000 rpm durante 6 minutos

Sacar el plasma y los glóbulos blancos que se posan sobre el sedimento

Poner nuevamente RPMI base homogenizar y centrifugar.

Quitar medio restante. Poner el mismo volumen que el sedimento de RPMI completo para obtener glóbulos rojos al 50%.

³ Etablissement Français *du sang*

A.4 Protocolo 4. Medio de cultivo

500mL de RPMI 1640 (52400058, GIBCO).

25mL suero albumax 20x (EFS)

300µl gentamicina 10gr/mL. (15710049, GIBCO)

Se conserva refrigerado

A.5 Protocolo 5. Identificación de la roseta

Observar la etapa en que se encuentra el plasmión

Si este se encuentra en etapa de trofozoito dejar incubar 6 horas más

Si este se encuentra en etapa de esquizonte identificar una roseta(esquizonte maduro)

Comenzar a grabar

Esperar que los merozoitos sean liberados

Esperar que los merozoitos se activen sobre el merozoito.

Tomar una película de 30 minutos.

A.6 Protocolo 6. Pendimetalina (SIGMA)

Disolver en medio de cultivo la pendimetalina (36191, SIGMA) en una concentración de 5µg/mL.

Centrifugar 2 mL de plasmión diluido en 10mL de medio.

Extraer el sobrenadante y remplazarlo por medio con pendimetalina.

Poner en cámara de observación.

B. Recomendaciones

B.1 Recomendaciones para un buen cultivo

A continuación serán mencionadas medidas significativas para mejorar la manipulación y por consiguiente obtener mejores resultados en el cultivo.

Una consideración importante al hacer el frotis es evitar el riesgo de herirse las manos con el material infectado. Para esto es recomendable apoyar un portaobjetos sobre la superficie de trabajo y solo sostener el vidrio que repartirá la delgada película de glóbulos rojos. Para el paso siguiente, la tinción, se recomienda dejar solo 4 segundos en el tinte rojo y 10 segundos en el tinte morado.

Una correcta medida de la parasitemia del cultivo es otro punto importante de destacar, ya que la exactitud de esta, permite tomar correctas decisiones acerca de los tratamientos que se realizaran a los parásitos. En un comienzo es conveniente contar un total de 500 parásitos o más. Después de adquirida la destreza se deben contar solo 300 parásitos. El área del frotis en donde se realiza el conteo debe ser elegida de forma aleatoria cuidando de no observar a través del microscopio cuando se realiza este escogimiento, ya que la tendencia es buscar áreas contaminadas.

Para realizar las experiencias se requiere constantemente de parasitemias altas es por esto que fue necesario hacer algunas modificaciones en los protocolos. La primera modificación se efectuó en la preparación de medio de cultivo en donde la cantidad de antibiótico se disminuyó de 1 mL a 300ul. La segunda modificación se llevo a cabo en el protocolo de la gelofusina, en donde parte de los parásitos son utilizados para las experiencias, es recomendable que después de lavado el plasmión se disuelva el sedimento en 10 mL de medio, donde 4 mL pueden ser utilizados para la experiencia y el resto debe ser puesto en la botellas de cultivo. Con esta medida se conseguirá una parasitemia igual a superior al 4 % al día siguiente. Si no es así, y el cultivo evoluciona muy lentamente es preferible agregar 1 mL de suero a la botella.

Si el cultivo presenta una alta parasitemia es imperativo que la cantidad de medio sea igual o superior a 25 mL y que el CO₂ este en un 5%. Si estas condiciones no se cumplen los parásitos mueren en 1 o 2 días dependiendo de cuan alta sea la parasitemia.