

Separación columnar de esporozoitos de *Plasmodium berghei* ^{a,b}

S.R. Mack¹, J.P. Vanderberg¹ y R. Nawrot¹

La posibilidad de usar cargas superficiales para separar y concentrar esporozoitos de *Plasmodium* a partir de mosquitos, se sugirió en un trabajo previo donde se indicó que los esporozoitos de *P. berghei* tenían menos carga negativa que cualquier otro componente que se observaba después de homogeneizar mosquitos *Anopheles stephensi* infectados (Miller et al. 1973, *J Parasitol* 59: 925-927).

En este artículo se informa un procedimiento relativamente simple de una columna de celulosa-DEAE para separar esporozoitos de *P. berghei*, a partir de mosquitos infectados. Esta técnica permite preparar suspensiones de esporozoitos más limpias que las que habían sido obtenibles con cualquier método descrito antes.

El tampón usado contenía 8.8 g Tris (hidroximetil) aminometano (Trizma Base, Sigma), 5 g NaH₂PO₄.H₂O, 5 g NaCl y 18 g glucosa/litro H₂O con un pH de 8.2 ± 0.05 y una potencia iónica de 0.121 (calculada de acuerdo con Lanham & Godfrey 1970, *Exp Parasitol* 28: 521-534). Después de equilibrar la dietilaminoetil celulosa microgranular (DE 52, Whatman) con tampón, se prepararon las columnas usando jeringas plásticas desechables, de 12 ml (diámetro interior 16 mm). Con un taladro-corchos se cortó un disco de tul de nylon fino de 16 mm de

diámetro para adaptarlo al extremo de salida de la jeringa y dentro de ella se pipeteó una suspensión espesa de DE 52 equilibrada para formar una columna de 25 mm. Luego se lavó por lo menos con 100 ml de tampón desde un reservorio aproximadamente a 60 cm por encima de la columna, y se comprimió la celulosa DE 52 hasta una altura total de ~20 mm. Antes de aplicar la preparación de esporozoitos a la columna, se escurrió el tampón hasta que escasamente quedó cubierta la parte superior de la columna. Para cada experimento se preparó tampón fresco pues su efectividad decrecía después de almacenarlo por varios días a 4°C. Sin embargo, las columnas comprimidas con DE 52 equilibrada se prepararon con anticipación y se guardaron congeladas (-30°C) sin pérdida de eficacia. Las columnas se descartaron después de un solo empleo.

Los mosquitos *Anopheles stephensi* infectados con esporozoitos de *Plasmodium berghei* se obtuvieron según se describió antes (Vanderberg 1977, *Exp Parasitol* 42: 169-181). En casi todos los fraccionamientos de esporozoitos se usaron mosquitos infectados totales aunque se alcanzaron resultados similares con tórax aislados totales que se probaron a causa de la mayor infectividad y antigenicidad de los esporozoitos obtenidos a partir de esta región del cuerpo (Vanderberg 1975, *J. Parasitol* 61: 43-50; Vanderberg et al. 1972, *Proc. Helminthol Soc Wash* 39: 514-525). Para cada columna, ~75 mosquitos infectados o 150 tórax infectados se homogeneizaron con 6 ml de Medio 199 (M-199) en un homogeneizador de vidrio. Esta y las siguientes operaciones se efectuaron en frío. La suspensión resultante se centrifugó en una centrífuga refrigerada modelo PR-2 Internacional a ~100 rpm (3 a 4 g) por 30 segundos para sedimentar las partículas mayores de restos de los mosquitos y luego la suspensión sobrenadante se centrifugó a 25 g durante 5 min para sedimentar tejidos adicionales de mosquito. Con un hemocitómetro se determinó la concentración de esporozoitos en el resto de la suspensión sobrenadante. Después de centrifugar a 700 g durante 20 min el concentrado se resuspendió en 1 ml de 1:1 M-199-35% bovalbúmina

a. Trabajo financiado en parte por el Comando de Desarrollo e Investigación Médica del Ejército de Estados Unidos, bajo el contrato No. DADA 1773 C 3027; es la contribución No. 1471 del Programa de Investigación sobre Malaria del Ejército. También recibió ayuda financiera de la Organización Mundial de la Salud.

b. Este artículo fue publicado originalmente en *The Journal of Parasitology* (64: 166-168, 1978) por los mismos autores con el título "Column separation of *Plasmodium berghei* sporozoites". El editor de *The Journal of Parasitology*, Dr. Austin J. MacInnis, y los autores, amablemente dieron autorización al Dr. Pablo Barreto para traducirlo al castellano y publicarlo nuevamente en *Acta Médica del Valle*.

1. Division of Parasitology, Department of Microbiology, New York University Medical School, New York, N.Y. 10016, USA.

(Path-O-Cyte 4, Miles Labs). Esta preincubación de esporozoitos en albúmina mejoró sensiblemente la cosecha de parásitos. Se eligió una concentración final de 17.5% de albúmina porque las concentraciones por debajo de 15% dieron recuperaciones significativamente inferiores. La preparación de esporozoitos se dejó permanecer en frío durante 30 minutos, luego se llevó a temperatura de la habitación y se mezcló 1:1 con el tampón columnar también a temperatura ambiente. Luego se puso en la parte superior de la columna y se dejó penetrar por gravedad. Los esporozoitos se diluyeron a temperatura ambiente y la solución se colectó sobre hielo. Los esporozoitos se colectaron en los primeros 30 ml de solvente (tasa de flujo entre 5 y 7 ml/min). Después se compactaron por centrifugación a 700 g durante 20 minutos y luego se resuspendieron en M-199. La producción de esporozoitos se calculó por determinación del número de parásitos en el solvente con respecto al número que se colocó en la columna.

La contaminación bacteriana se determinó por procedimientos bacteriológicos convencionales al inocular diluciones seriadas de las muestras en placas de petri con nutriente de agar. De manera similar se buscó la contaminación micótica mediante la siembra en placas de petri con medio Youssef para hongos y levaduras (Mycogel Labs, Brooklyn, N.Y.).

Los resultados de 30 experimentos bajo estas condiciones estandarizadas dieron una tasa promedio de recuperación de 42.6% de los esporozoitos colocados en la columna (desviación estándar $\pm 13\%$). Los parásitos que se recuperaron de la columna eran indistinguibles de los esporozoitos de la preparación original en su infectividad (Vanderberg, 1975, loc. cit.); en su motilidad (Vanderberg 1974, *J Protozool* 21: 527-537); o en su antigenicidad, según se determinó por su reactividad CSP (Vanderberg et al., 1969, *Mil Med* 134: 1183-1190) y en su habilidad para producir inmunidad protectora (Nussenzweig et al, 1972, *Am J Trop Med Hyg* 21: 712-728). La contaminación bacteriana de los esporozoitos dio un promedio de 44 colonias por parásito en la preparación original y 3.3 colonias por esporozoito en la preparación colectada en la columna, una reducción de más de 90%. La contaminación por hongos se eliminó completamente con el paso a través de la columna.

Se obtuvo una cosecha de esporozoitos significativamente aumentada ($p < 0.05$ en la prueba t de Student) incrementando la potencia iónica del tampón a 0.220 pero con el mismo pH y la misma osmolaridad del tampón 0.121 estándar (Figura 1). Sin embargo, los esporozoitos que se obtuvieron con este buffer de poder iónico alto estaban tan contaminados con bacterias como los de la preparación original. El descenso de la potencia iónica del tampón a 0.066 dio como resultado la retención de prácticamente todos los esporozoitos en la columna (Figura 1).

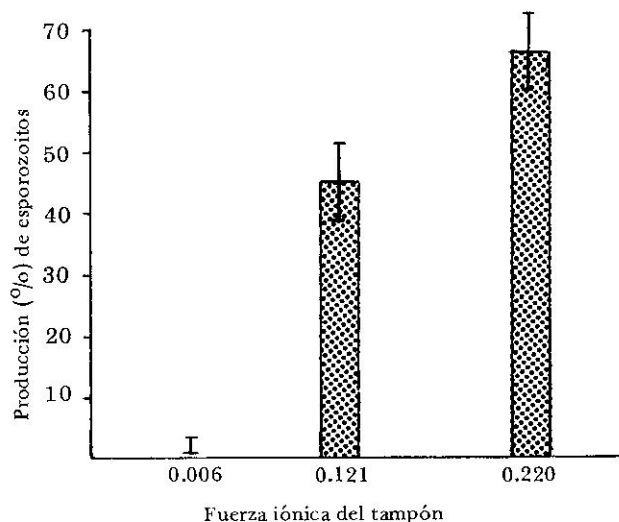


Figura 1. Efectos de la fuerza iónica del tampón sobre el porcentaje de recuperación de los esporozoitos de *P. berghei* colectados con el método de la columna de celulosa -DEAE (promedio de 4 experimentos \pm error estándar). Todos los tampones se prepararon como sigue, para dar la misma osmolaridad y el mismo pH: tampón 0.066 preparado con 8.6 g Tris, 5 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.4 g NaCl, 36 g glucosa/litro; tampón 0.121 preparado como en el texto; tampón 0.220 preparado con 9 g Tris, 4.8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10.8 g NaCl, 9 g glucosa/litro.

Cuando se usó el tampón estándar de potencia iónica 0.121, los valores de pH entre 7.8 y 8.4 dieron cosechas de esporozoitos de 10% o más, con una producción óptima en promedio por encima de 40% con pH 8.2. También se ensayó un tampón glucosa-salina-fosfato diseñado originalmente para diluir tripanosomas a partir de columnas (Lanham, 1968, *Nature* 218: 1273-1274). La producción de esporozoitos fue inferior a la obtenida con el buffer que contiene Tris en todos los pH ensayados. Además la capacidad estabilizadora limitada del tampón de Lanham a $\text{pH} > 8.0$ lo hizo ineficiente en la separación de los esporozoitos de *P. berghei*.

La técnica de columna descrita es útil en la obtención de grandes números de esporozoitos relativamente limpios con propósitos experimentales. Se pueden procurar cifras mayores de mosquitos con un aumento proporcional en el área de la superficie de la columna. Para casi todos los propósitos, las columnas preparadas con el tampón estándar de poder iónico 0.121, son suficientes para dar una producción satisfactoria de esporozoitos mientras al mismo tiempo se retiraron virtualmente todos los restos de los mosquitos y, sino todos, la mayoría de los microorganismos contaminantes.