

58

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
(ORIENTACION BIOQUIMICA CLINICA)

TESIS

"DETERMINACION DE LA EXPRESION DE CITOCINAS EN RATONES (BALB/c X C57Bl/6)F1 PARA IDENTIFICAR EL TIPO DE RESPUESTA Th1/Th2 DURANTE LA INFECCION PRIMARIA Y SECUNDARIA CON *Plasmodium chabaudi AS*"

ALUMNO:

ROBLES MEDINA TOMAS

NUMERO DE CUENTA:

9259270-6

FOLIO:

152083

AREA DEL PROYECTO: INMUNOLOGIA

AÑO EN QUE TERMINO LA CARRERA: 1997

LUGAR DONDE SE DESARROLLA EL TRABAJO:

UNAM: F.E.S "ZARAGOZA" LABORATORIO DE INMUNOLOGIA L-313, CAMPUS II

ASESOR: DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

1. Introducción	7
2. Fundamentación del tema	11
2.1 Citocinas	11
2.1.1 Propiedades generales de las citocinas	12
2.2 La respuesta inmune en malaria	15
2.2.1 Relación de los factores genéticos del huésped con la resistencia o susceptibilidad a la infección con <i>P. chabaudi</i>	15
2.2.2 La participación de las células T CD4+ durante la infección con <i>P. chabaudi</i> AS	16
2.2.3 La relación de los factores genéticos y las subpoblaciones Th1 y Th2 en malaria	17
2.2.4 La participación de los linfocitos B en la respuesta inmune contra <i>P. chabaudi</i>	18
3. Planteamiento del problema	22
4. Objetivos	24
4.1 Objetivo general	24
4.2 Objetivos específicos	24
5. Hipotesis de trabajo	25
6. Material y metodos	26
6.1 Material biológico	26
6.1.1 Ratones singénicos	26
6.1.2 Parásito	26
6.2 Reactivos de biología molecular	26
6.2.1 Oligonucleótidos iniciadores	26
6.2.2 Enzimas	26
6.2.3 Otros reactivos de biología molecular	26
6.3 Equipo	27

6.3.1 Material diverso	28
6 4 Métodos	28
6.4.1 Preparación del parásito	28
6.4.2 Infección de los ratones	28
6.4.3 Toma de muestra	29
6.4.3.1 Toma de sangre y preparación de frotis	29
6.4.3.2 Extracción del bazo	30
6.4.3.2.1 Maceración del bazo	30
6.4.4 Extracción de RNA	31
6.4.5 Cuantificación de RNA	32
6.4.6 Reacción de retrotranscripción	32
6.4.7 Amplificación por PCR de los genes que codifican para las citocinas	33
7 Resultados	37
7.1 Parasitemia	37
7.1.1 Infección primaria	37
7.1.1.1 Machos	37
7.1.1.2 Hembras	38
7.1.1.3 Comparación de las parasitemias en machos y hembras	39
7.1.2 Infección secundaria	40
7 1.2.1 Machos inmunes	40
7.1 2.2 Hembras inmunes	41
7.1.2.3 Comparación de las parasitemias en machos y hebras inmunes	42
7 2 Expresión de los genes que codifican para las citocinas	43
7.2.1 Expresión de citocinas en el grupo de ratones machos infectados por primera vez con <i>P. chabaudi</i>	44
7.2.2 Expresión de citocinas en el grupo de ratones machos inmunes infectados por segunda vez con <i>P. chabaudi</i>	45
7.2.3 Expresión de citocinas en el grupo de ratones hembras infectados por primera vez con <i>P. chabaudi</i>	46

6.3.1 Material diverso	28
6.4 Métodos	28
6.4.1 Preparación del parásito	28
6.4.2 Infección de los ratones	28
6.4.3 Toma de muestra	29
6.4.3.1 Toma de sangre y preparación de frotos	29
6.4.3.2 Extracción del bazo	30
6.4.3 2.1 Maceración del bazo	30
6.4.4 Extracción de RNA	31
6.4.5 Cuantificación de RNA	32
6.4.6 Reacción de retrotranscripción	32
6.4.7 Amplificación por PCR de los genes que codifican para las citocinas	33
7. Resultados	37
7.1 Parasitemia	37
7.1.1 Infección primaria	37
7.1.1.1 Machos	37
7.1.1.2 Hembras	38
7.1.1.3 Comparación de las parasitemias en machos y hembras	39
7.1.2 Infección secundaria	40
7.1.2.1 Machos inmunes	40
7.1.2.2 Hembras inmunes	41
7.1 2.3 Comparación de las parasitemias en machos y hebras inmunes	42
7.2 Expresión de los genes que codifican para las citocinas	43
7.2 1 Expresión de citocinas en el grupo de ratones machos infectados por primera vez con <i>P. chabaudi</i>	44
7.2 2 Expresión de citocinas en el grupo de ratones machos inmunes infectados por segunda vez con <i>P. chabaudi</i>	45
7.2 3 Expresión de citocinas en el grupo de ratones hembras infectados por primera vez con <i>P. chabaudi</i>	46

ABREVIATURAS

A:C = Antes de Cristo

CDC = Centers for Disease Control and Prevention

DEPC = Dietilpirocarbonato

IgG = Inmunoglobulina G

IgG1 = Inmunoglobulina G de subtipo 1

IgG2a = Inmunoglobulina G de subtipo 2a

IgM = Inmunoglobulina M

IL-2 = Interleucina 2

IL-4 = Interleucina 4

IL-10 = Interleucina 10

IFN- γ = Interferón γ

Kd = Constante de disociación

LPS = Lipopolisacáridos

M = Molar

MHC = Complejo mayor de histocompatibilidad

NIH = Cepa de ratones obtenidos del National Institute of Health

PBS = Solución amortiguadora de fosfatos

RNA_m = Acido ribonucleico mensajero

RT-PCR = Retrotranscripción-Reacción en cadena de la polimerasa

PBS = Solución amortiguadora de fosfatos

SCID = Inmunodeficiencia severa combinada

TBE = Solución de EDTA-Acido Bórico-Tris

Th0 = Respuesta inmune indiferenciada

Th1 = Respuesta inmune de tipo celular

Th2 = Respuesta inmune de tipo humoral

TNF- β = Factor de necrosis tumoral β

Determinación de la expresión de citocinas en ratones (BALB/c X C57Bl/6)F1 para identificar el tipo de respuesta Th1/Th2 durante la infección primaria y secundaria con *Plasmodium chabaudi* AS.

1. INTRODUCCIÓN

La palabra malaria, recibió ese nombre por la asociación entre el mal aire de los pantanos (donde se produce el mosquito anofeles) y las infecciones humanas por *Plasmodium spp.* La malaria ha afectado a la humanidad durante milenios y continúa haciéndolo hoy en día. (Mandell y Bennet, 1997).

En términos de registros históricos, las primeras referencias al paludismo fueron en China con descripciones de esplenomegalia con fiebre en el Nei Ching Canon of Medicine, de 1700 A.C. y de Egipto en el Ebers Papyrus, de 1570 A.C. Hipócrates reconoció el síndrome de paludismo y su relación con los pantanos. Aparecen referencias literarias al paludismo en la *Iliada* de Homero y en los trabajos de Chaucer y de Shakespeare. Los europeos que viajaban a la India, África subsahariana y Sudamérica fueron diezmados por la malaria del siglo XVI al XIX. En los Estados Unidos y Canadá, la malaria fue endémica durante los siglos XVIII y XIX. De hecho, en los Estados Unidos, hubo más de 500,000 casos de paludismo por año a comienzos del siglo XX, y los Centros para prevención y control de enfermedades (Centers for Disease Control and Prevention CDC) fueron fundados en realidad como la Oficina de Control del Paludismo. La malaria fue un factor importante en la Revolución Americana, la Guerra Civil, la Primera y Segunda Guerra Mundial, y las guerras de Corea y Vietnam. En Vietnam los soldados de Estados Unidos perdieron más días de combate por paludismo que por heridas de guerra. Hoy en día, el paludismo continúa siendo un problema abrumador en países tropicales en desarrollo (con 200-300 millones de casos y más de 2 millones de muertes por año), es además una complicación potencialmente fatal para los que viajan a los trópicos (Stites y Terr, 1997).

La malaria es una enfermedad infecciosa causada por protozoarios del género *Plasmodium*, la forma aguda de la enfermedad se caracteriza por los paroxismos de escalofrío, fiebre y sudación. La enfermedad puede presentarse en las etapas subaguda y recurrente. Los ataques agudos pueden reincidir después de periodos asintomáticos (Stites y Terr, 1997)

La malaria ha ocasionado un gran número de víctimas humanas, las epidemias han devastado grandes poblaciones con niños y lactantes. Aunque se ha erradicado de algunos países de zonas templadas, sigue siendo endémica en diversas regiones tropicales y subtropicales del mundo. La incidencia mundial por año de la enfermedad se estima en 250 millones de casos. En África se han informado un millón de muertes relacionadas con paludismo anualmente. En los países en vías de desarrollo se une a otros problemas de salud pública importante y forma una barrera significativa para el progreso económico (Stites y Terr, 1997).

Las cuatro especies de *Plasmodium* causantes de paludismo en humanos son *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*. La más peligrosa es *P. falciparum*, que da origen a la enfermedad terciana maligna. Los casos diagnosticados y que reciben terapia deben ser informados sin retraso cuando existe la posibilidad de que se trate de esta última especie. *P. vivax* causa paludismo terciano benigno y es el más común en humanos, pero da como resultado una enfermedad grave aunque no tiene una posibilidad elevada de muerte o de complicaciones graves que se relacionan con el tipo *falciparum*. En muchas partes del mundo aumentan las dificultades debido a la resistencia que presenta *P. falciparum* contra las 4-aminoquinolinas y otros medicamentos (Stites y Terr, 1997).

La malaria humana se transmite por mosquitos anofeles hembras, que ingieren las formas sexuales del parásito al picar a los enfermos. Los esporozoitos infectantes se desarrollan en el mosquito y se inyectan al huésped intermediario cuando el insecto los pica. En el humano, se desarrollan primero en forma extraeritrocitaria y se multiplican dentro de las células hepáticas sin inducir reacción inflamatoria. La progenie o merozoito invade los eritrocitos del huésped para iniciar el ciclo eritrocítico e iniciar la fase temprana de la malaria clínica. El gametocito es el estado sexual captado por el mosquito (Stites y Terr, 1997).

La malaria ha ocasionado un gran número de víctimas humanas, las epidemias han devastado grandes poblaciones con niños y lactantes. Aunque se ha erradicado de algunos países de zonas templadas, sigue siendo endémica en diversas regiones tropicales y subtropicales del mundo. La incidencia mundial por año de la enfermedad se estima en 250 millones de casos. En África se han informado un millón de muertes relacionadas con paludismo anualmente. En los países en vías de desarrollo se une a otros problemas de salud pública importante y forma una barrera significativa para el progreso económico (Stites y Terr, 1997)

Las cuatro especies de *Plasmodium* causantes de paludismo en humanos son *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*. La más peligrosa es *P. falciparum*, que da origen a la enfermedad terciana maligna. Los casos diagnosticados y que reciben terapia deben ser informados sin retraso cuando existe la posibilidad de que se trate de esta última especie. *P. vivax* causa paludismo terciano benigno y es el más común en humanos, pero da como resultado una enfermedad grave aunque no tiene una posibilidad elevada de muerte o de complicaciones graves que se relacionan con el tipo *falciparum*. En muchas partes del mundo aumentan las dificultades debido a la resistencia que presenta *P. falciparum* contra las 4-aminoquinolinas y otros medicamentos (Stites y Terr, 1997).

La malaria humana se transmite por mosquitos anofeles hembras, que ingieren las formas sexuales del parásito al picar a los enfermos. Los esporozoitos infectantes se desarrollan en el mosquito y se inyectan al huésped intermediario cuando el insecto los pica. En el humano, se desarrollan primero en forma extraeritrocitaria y se multiplican dentro de las células hepáticas sin inducir reacción inflamatoria. La progenie o merozoito invade los eritrocitos del huésped para iniciar el ciclo eritrocítico e iniciar la fase temprana de la malaria clínica. El gametocito es el estado sexual captado por el mosquito (Stites y Terr, 1997)

2. FUNDAMENTACION DEL TEMA

2.1 Citocinas

Todas las células del sistema inmune necesitan estar conectadas entre sí para elaborar de forma conjunta y ordenada una respuesta inmune que elimine al patógeno. Para ello, las células utilizan dos medios principales de comunicación: uno es el contacto directo mediante las distintas moléculas de membrana; otra forma, igualmente importante de relacionarse, es mediante la síntesis de pequeñas proteínas que reciben el nombre genérico de citocinas. Estas citocinas son producidas en los primeros instantes de la activación celular, alertando a las diferentes células que poseen receptores de citocinas en la membrana de que hay una respuesta inmune en marcha (Regueiro y López, 1996).

Las citocinas con frecuencia presentan un efecto local en el espacio de reconocimiento antigénico, aunque también pueden actuar sobre células diana que se encuentran más alejadas, sus funciones son: regular la duración y la amplitud de la respuesta inmune tanto innata como específica, reclutar células a la zona en conflicto e inducir la generación de nuevas células a partir de los precursores hematopoyéticos. Cuando una célula se activa en respuesta a cualquier estímulo, inicia la síntesis de citocinas para advertir de lo que está sucediendo al resto de las células del sistema inmune. La unión de la citocina a su receptor en la célula diana genera, en algunos casos ayudado por otras proteínas de membrana, una señal intracelular en la que intervienen un gran número de proteínas, generalmente fosfatasa y cinasas. Como consecuencia de esta cascada de reacciones bioquímicas, se induce la expresión de ciertos genes, originando dos efectos principales. En primer lugar, hay un efecto autócrino: la propia célula productora es a la vez diana, induciéndose su proliferación y su diferenciación. En segundo lugar, hay un efecto parácrino: la célula productora induce la expresión de receptores en la membrana de las diferentes células diana, y activa o inhibe su función celular (Regueiro y López, 1996)

Si un patógeno consigue atravesar las barreras físicas y químicas de un organismo y alcanzar un determinado tejido, se encontrará con los macrófagos que se localizan en este tejido. La unión de la bacteria al macrófago provoca el inicio de la síntesis de diversas citocinas. Los linfocitos T CD4+ activados comienzan a secretar un gran número de citocinas que regulan y dirigen la respuesta inmune; atendiendo a las citocinas que producen; así pues, las células Th1 cuya formación se induce mediante IFN- γ e IL-2, regulan la respuesta inmune de tipo celular con base en la síntesis de IL-2, IFN- γ y TNF- β ; mientras que los linfocitos Th2 se encargan de coordinar la respuesta de tipo humoral mediante la síntesis de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, produciendo en ambos casos la proliferación y la diferenciación de linfocitos T y B respectivamente. Una característica de las citocinas es que la regulación de un tipo de respuesta inmune produce además la inhibición de los componentes que actúan en el otro tipo de respuesta (Regueiro y López, 1996).

2.1.1 propiedades generales de las citocinas

Las citocinas son un grupo diverso de proteínas que comparten varias propiedades:

1. *Las citocinas se producen durante las fases efectoras de la inmunidad natural y específica, y sirven para mediar y regular las respuestas inmunitarias e inflamatorias* En la inmunidad natural, los productos microbicidas, como el lipopolisacárido (LPS), estimulan directamente a los fagocitos mononucleares a secretar sus citocinas. Por el contrario, las citocinas derivadas de la célula T se producen en respuesta sobre todo al reconocimiento específico de antígenos extraños. Sin embargo, estas distinciones no son absolutas porque las citocinas producidas por un tipo celular suelen regular las síntesis de citocinas por otras células.

2. *La secreción de citocinas es breve, auto-limitada.* En general, las citocinas no se almacenan como moléculas pre-formadas, y su síntesis se inicia por una

nueva transcripción genética. Esta activación suele ser transitoria, y los RNAm que codifican para las citocinas suelen ser inestables. La combinación de un período corto de transcripción con un RNAm de vida corta, asegura que la síntesis de citocinas sea transitoria. Algunas citocinas pueden controlarse además por mecanismos post-traduccionales, como la liberación proteolítica de un producto activo a partir de un precursor inactivo. Una vez sintetizadas, las citocinas suelen secretarse con rapidez, lo que da lugar a un pico de liberación de citocinas cuando se necesitan.

3. *Muchas citocinas son producidas por muchos tipos celulares.* Para subrayar que la fuente celular de estas moléculas no suele ser una característica que las distinga, los investigadores se están adaptando cada vez más a la convención de denominar a estas moléculas citocinas en lugar de linfocinas o monocinas, sin importar el origen celular en un experimento particular.

4. *Las citocinas actúan sobre diferentes tipos celulares.* Esta propiedad se llama pleiotropismo. Al concepto anterior de que las citocinas son básicamente moléculas producidas por los leucocitos que actúan en particular sobre los leucocitos ("interleucinas"), se le considera demasiado restringido.

5. *Las citocinas tienen a menudo múltiples efectos diferentes sobre la misma célula diana.* Algunos efectos pueden ser simultáneos, mientras que otros ocurren en intervalos de tiempo diferentes (es decir, minutos, horas o días)

6. *Las acciones de las citocinas son a menudo redundantes.* Muchas funciones atribuidas originalmente a una citocina comparten propiedades de varias citocinas diferentes. Esta observación se ha reforzado con el estudio de los ratones "knockout" que carecen de los genes para una citocina en particular, y muestran sólo alteraciones sutiles en sus respuestas inmunitarias.

7. *Las citocinas a menudo influyen en la síntesis de otras citocinas.* Produciendo cascadas en las que una segunda y tercera citocina puede mediar los efectos biológicos de la primera. La capacidad de una citocina de aumentar o suprimir la producción de otras citocinas puede proporcionar importantes

mecanismos reguladores positivos y negativos para las respuestas inmunitarias e inflamatorias.

8. Las citocinas a menudo influyen en la acción de otras citocinas. Dos citocinas pueden interactuar para antagonizar sus acciones, producir efectos aditivos o, en algunos casos, producir efectos mayores de lo previsto e incluso distintos, un tipo de interacción que se llama sinérgica.

9. Las citocinas, a semejanza de las hormonas polipeptídicas, inician su acción uniéndose a receptores específicos en la superficie de la célula diana. La célula diana relevante puede ser la misma célula que secreta la citocina (acción autocrina), una célula cercana (acción parácrina) o, como las verdaderas hormonas, una célula distante que se estimula a través de las citocinas secretadas a la circulación (acción endocrina). Los receptores de las citocinas a menudo muestran elevada afinidad por sus ligandos, con constantes de disociación entre 10^{10} a 10^{11} M, y las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) a los péptidos con una Kd de sólo 10^6 M. En consecuencia, sólo necesitan producirse cantidades muy pequeñas de citocinas para desencadenar efectos biológicos.

10. La expresión de muchos receptores de citocinas está regulada por señales específicas. Esta señal puede ser otra citocina o incluso la misma citocina que se une al receptor, permitiendo la amplificación positiva o la retroalimentación negativa.

11. La mayor parte de las respuestas celulares a las citocinas precisan RNAm nuevo y la síntesis proteica. El mecanismo por el que la unión de la citocina a un receptor de superficie celular estimula la transcripción no se conoce todavía por completo. Algunos estudios recientes han identificado secuencias de nucleótidos en las regiones adyacentes 5' a los genes, cuya transcripción se activa por la acción de las citocinas. Se cree que las citocinas estimulan la producción o la unión de factores nucleares reguladores específicos a estas secuencias diana, y que tal unión produce la transcripción

12. Para muchas células diana, las citocinas actúan como reguladores de la división celular, es decir, como factores de proliferación. Las citocinas deberían clasificarse con los factores de proliferación celular epitelial y mesenquimal* en un grupo funcional mayor de moléculas reguladoras polipeptídicas. Sin embargo, se sigue haciendo distinción entre aquellas moléculas cuyas acciones básicas son la mediación de la defensa del huésped (es decir, las citocinas), de aquellas moléculas cuya función básica reside en la reparación de tejidos (es decir, de los factores de proliferación celular polipeptídicos epitelial y mesenquimal).

2.2. La respuesta inmune en malaria

2.2.1. Relación de los factores genéticos del huésped con la resistencia o susceptibilidad a la infección con *P. chabaudi*.

El curso de la infección con *P. chabaudi chabaudi* AS depende de la cepa del ratón y en algunos casos del sexo. Algunas cepas de ratones son más "susceptibles" que otras y sufren infecciones agudas frecuentemente fatales. Otras cepas son "resistentes" y curan de forma natural de infección aguda primaria. El sexo es un factor que puede influenciar el curso de la parasitemia, dado que las hembras son más resistentes que los machos. Los ratones que se curan de una infección son resistentes a un reto homólogo y la inmunidad declina lentamente después de un período de meses. Esta inmunidad la muestran cepas y especies específicas (Jarra et al, 1985; Brown 1990). En las cepas de ratones resistentes, la parasitemia aguda primaria se controla en un período de 7 a 14 días, no obstante puede aparecer recrudescencia a niveles bajos. El resurgimiento de la recrudescencia en *P. chabaudi* esta asociado con una declinación de la respuesta inmune así como también con la variación antigénica del parásito (Brown, 1990).

2.2.2. La participación de las células T CD4+ durante la infección con *Plasmodium chabaudi* AS.

En la inmunidad contra malaria están involucrados factores humorales y celulares. Los mecanismos que proporcionan mayor protección inmune para los estados sanguíneos de malaria aguda están mediados por los linfocitos T.

La importancia de las células T CD4+ en la resolución de la infección por estados sanguíneos de *Plasmodium chabaudi* AS se ha establecido con base en la incapacidad para eliminar y resolver la infección de los ratones desnudos, de los ratones SCID (inmunodeficiencia severa combinada) y de los ratones a los que se les destruyeron sus linfocitos T CD4+ con el empleo de anticuerpos monoclonales anti-CD4. Además, la transferencia adoptiva de células T inmunes o de clones de linfocitos T confiere protección contra diversos plasmodios murinos, incluyendo a *Plasmodium chabaudi*. (Mc Donald y Phillips 1978; Cavacini et al, 1986; Favila-Castillo et al, 1990).

Las células T CD4+ pueden dividirse en dos subpoblaciones mayores, Th1 y Th2, con base en el patrón de citocinas secretadas posterior a la estimulación; los distintos perfiles de citocinas que se expresan indican su función. Las células Th1 producen IL-2, IFN- γ y TNF- β , a través de estas moléculas se activan los macrófagos. Las células Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, lo que proporciona cooperación con las células B productoras de anticuerpo. Por lo tanto, las células Th1 y Th2 median cualitativamente distintas respuestas inmunes. Una de las características de la infección con *P. c. chabaudi* es que los ratones responden con células T CD4+ de ambos tipos Th1 y Th2. La contribución de estas dos subpoblaciones cambia durante el curso de la infección, las células Th1 predominan durante la fase aguda, y las células Th2 durante la fase tardía de la infección. (Langhorne et al, 1989; Taylor-Robinson y Phillips, 1994). El hallazgo de que las clones Th1 derivan del estadio temprano de la infección y que las clones Th2 derivan de exposiciones más prolongadas al parásito, está en acuerdo con la hipótesis de que la inmunidad a *P. chabaudi* es un proceso bifásico. El aislamiento de clones Th1 en el tiempo

cuando la inmunidad es independiente de anticuerpos esta relacionado con el predominio de mecanismos efectores no específicos al inicio de la infección (Langhorne et al, 1989; Taylor-Robinson y Phillips, 1994).

En el caso de malaria, no se conocen con precisión los factores que regulan la diferenciación de las células precursoras Th0 al fenotipo Th1 o al Th2 posterior a la activación, y por lo tanto el control secuencial que aparece durante la infección de *P. c. chabaudi* no esta comprendido claramente. Estos factores probablemente incluyen secreción de citocinas, la naturaleza de las células presentadoras de antígeno y el procesamiento del antígeno para la presentación a las células T (Taylor-Robinson y Phillips, 1994).

2.2.3. Relación de los factores genéticos y las subpoblaciones Th1 y Th2 en malaria.

El nivel de resistencia del huésped para *P. chabaudi* AS. difiere entre las cepas C57Bl/6 y la A/J, mientras que la primera es resistente, A/J es susceptible. El desarrollo de subpoblaciones de células Th es divergente en estas dos cepas de ratones. Después de la infección con el parásito *Leishmania mayor*, los ratones resistentes desarrollan una respuesta fuerte Th1 y espontáneamente sanan de la lesión local, mientras que los ratones susceptibles desarrollan una respuesta del tipo Th2 y la enfermedad se disemina a vísceras.

En el caso del plasmodio, se ha observado el desarrollo preferencial de un tipo de linfocitos T CD4+ como consecuencia de la infección de los estados sanguíneos de *P. chabaudi* AS. En las células de bazo de ratones C57Bl/6 se encontraron niveles elevados de IFN- γ durante la primera semana seguido por la producción de IL-4, IL-5 e IL-10 dos a cuatro semanas después de la infección. Por el contrario, los ratones A/J, murieron por la infección entre los días 10-12, y se observó la producción de niveles bajos de IFN- γ y niveles elevados de IL-4, IL-5 e IL 10 en la primera semana postinfección. Estos resultados indican que, al inicio de la infección con *P. chabaudi* AS, esta activada preferentemente la

respuesta Th1 en ratones C57Bl/6 y la respuesta Th2 en los ratones A/J (Yap, Jacobs y Stevenson, 1994).

2.2.4. La participación de los linfocitos B en la respuesta inmune contra *P. chabaudi*.

Los linfocitos B son las células que producen los anticuerpos. En el caso de la infección con *Plasmodium*, el papel protector de los anticuerpos se ha demostrado por experimentos de transferencia pasiva con suero inmune, proveniente de animales con un título alto de anticuerpos IgG. Este suero es específico de especie y cepa de plasmodio (Jarra, et al, 1985).

La recuperación de la primer parasitemia aguda está acompañada por la producción de anticuerpos de tipo IgM e IgG2a, los cuales alcanzan los títulos máximos 1 ó 2 días después del pico de la parasitemia. (Phillips y Taylor-Robinson, 1994).

El tratamiento a los ratones con el anticuerpo anti- μ elimina totalmente a los linfocitos B. La eliminación de las células B de los ratones NIH permite que puedan reducir la primer parasitemia aguda, sin embargo desarrollan una parasitemia crónica, lo que sugiere que las células B no se necesitan en el control de la fase aguda de la infección pero son necesarias para la eliminación final del parásito (Langhorne et al, 1998).

Durante el aumento de la primer parasitemia, los ratones tratados con el anticuerpo anti- μ y los ratones control muestran una fuerte respuesta de tipo Th1, ejemplificada por la producción de IFN- γ e IL-2. Únicamente en el suero de los ratones control se detectaron niveles elevados de anticuerpos específicos IgM e IgG2a para *P. c. chabaudi*, este isotipo de IgG proviene de la regulación Th1. De allí en adelante, a través de un periodo de 50 días, los ratones tratados con anti- μ conservaron el tipo de respuesta Th1 con niveles altos de IFN γ e IL-2 y niveles bajos de IL-4 e IL-10. En contraste, en los ratones control después del día 20 de la infección, la respuesta ha pasado a fenotipo Th2,

tipificado por la producción de IL-4 e IL-10 y de anticuerpos IgG1. El paso de Th1 a Th2 no se presenta en los ratones sin linfocitos B, lo que sugiere que las células B son necesarias para el desarrollo de la respuesta T CD4+ bifásica durante la infección de *P. c. chabaudi*. (Taylor-Robinson y Phillips, 1994; Von der Weid y Langhorne, 1994; Von der Weid y Kitamura, 1994, Langhorne et al, 1998).

Las células B promueven el desarrollo de células Th2, cuando actúan como células presentadoras de antígeno, por el contrario, cuando los macrófagos funcionan como células presentadoras de antígeno estimulan la proliferación de clonas Th1 (Taylor-Robinson y Phillips, 1994), probablemente esto se deba a que las células B estimuladas son eficientes a concentraciones mucho menores de antígeno que las células presentadoras de antígeno convencionales, dado que procesan y dirigen al antígeno de forma tal que favorecen la interacción con las células T. No obstante, los mecanismos precisos, todavía no están bien dilucidados.

Las citocinas secretadas por diferentes subpoblaciones celulares que llevan a la activación de los linfocitos y macrófagos parecen determinar la mayor actividad inmunológica de las células T CD4+. Estas son, por lo tanto, buenos candidatos para guiar la inesperada retención de respuesta Th1 acompañado por la falta de diferenciación de la respuesta Th2 en ausencia de células B. Algunos linfocitos B activados y las células Th2 producen IL-10, esta molécula suprime la síntesis de citocinas de tipo Th1 indirectamente por la inhibición de la función de presentación de antígeno en macrófagos. Además, la IL-10 suprime la capacidad de los macrófagos murinos, para estimular la síntesis de IL-2 e IFN- γ por los linfocitos Th1. Esta función puede atribuirse, a la capacidad de IL-10 de disminuir la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II en monocitos. Como la IL-10 es una citocina que también se produce por los linfocitos B, que suprime la síntesis de citocinas de tipo Th1 indirectamente por inhibición de la función de presentación de antígenos en macrófagos; es posible que la persistencia de la respuesta Th1

para *P. chabaudi* en ratones sin células B se deba a la carencia de IL-10. Esto sugiere que la IL-10 producida por los linfocitos puede ser un requerimiento crítico para el balance de las respuestas tipo Th1 y Th2 durante la infección con *P. c. chabaudi* en los ratones normales.

La IL-4 esta involucrada en el desarrollo de las células Th2, la reducida producción de esta citocina en ausencia de células B muestra que puede ser la base de la carencia del desarrollo de una respuesta funcional mediada por Th2 para *P. c. chabaudi* incluyendo la secreción de IL-10, la inducción de la diferenciación de las células B, y el aumento de la secreción de Ig específica. La IL-12 producida por los macrófagos también esta involucrada en la diferenciación de los linfocitos B (Taylor-Robinson y Phillips, 1994).

Por lo descrito anteriormente se sugiere que la inmunidad protectora a los estadios eritrocíticos asexuales del *Plasmodio* involucra tanto anticuerpos protectores como inmunidad mediada por células. El papel protector de los anticuerpos se ha evidenciado en experimentos de protección pasiva. Los anticuerpos pueden actuar como una opsonina o anticuerpo citofílico promoviendo fagocitosis de eritrocitos infectados o liberando merozoitos y/o neutrófilos y en el caso de *P. falciparum*, pudieran impedir la citoadherencia de los eritrocitos infectados (Phillips y Taylor-Robinson, 1994).

La infección en ratones singénicos con *Plasmodium chabaudi chabaudi* se ha utilizado como modelo para examinar la inmunidad adquirida de estados asexuales eritrocíticos de *Plasmodio* porque es considerado, un equivalente de la infección con *P. falciparum*. La consecuencia de una infección con estados asexuales eritrocíticos con *P. chabaudi* en los ratones, depende de la compleja interacción de eventos inmunológicos y la contribución de la interacción huésped/parásito. (Legorreta et al, 1994; Phillips y Taylor-Robinson, 1994).

Las señales involucradas en la activación selectiva de las subpoblaciones Th pueden ser múltiples. Las células Th vírgenes adquieren una polarización de patrón de producción de citocinas con el primer encuentro con antígenos, probablemente después de la presentación del antígeno por las células

dendríticas, o cuando las células dendríticas bajo ciertas circunstancias pueden activar a las células Th produciendo IFN- γ o IL-4. Así mismo, es posible que en el balance Th1/Th2 sean muy importantes las células presentadoras de antígeno, como los macrófagos y los linfocitos B. (Von der Weid y Kitamura, 1994).

Para la respuesta inmune tipo Th1, la IL-12 producida por el macrófago es la clave, mientras que para la respuesta Th2 la citocina clave es la IL-4. Una infección con *P. chabaudi* AS dispara una respuesta secuencial Th1-Th2 contra el parásito. La polarización de las respuestas Th1 y Th2 puede inhibirse mutuamente, aunque es crucial el tipo de respuesta que se desarrolla en un inicio. Este balance podría modificarse por la presencia de citocinas como en el caso de IL-12 para Th1 y de IL-4 para Th2 y/o alteración de la población de células presentadoras de antígeno (Von der Weid y Kitamura, 1994).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La malaria es uno de los principales problemas de salud pública en el mundo, la organización mundial de salud estima de 250 a 500 millones de casos anualmente de los cuales fallecen alrededor del 1-1.5 % (Greenwood, 1997). Diferentes problemas han impedido el éxito en las campañas de erradicación entre los que están: la resistencia de los mosquitos a los insecticidas y del parásito a las drogas antimalaricas. Probablemente la estrategia más importante para el control del paludismo es el diseño de vacunas, sin embargo, para ello es necesario conocer y potenciar los mecanismos efectores de la respuesta inmune, con el propósito de intervenir inmunologicamente en la diferenciación y expansión del parásito en el huésped o en el vector (Good, 1992; Bruce-Chwatt, 1998).

La inmunidad a paludismo requiere de repetidas infecciones, toma años desarrollarla y no es absoluta ya que la parasitemia persiste en ausencia de enfermedad clínica (Legorreta-Herrera et al, 1994). la adquisición y mantenimiento de la inmunidad protectora contra malaria depende de los linfocitos T. Estos cooperan en la producción de anticuerpos y en el establecimiento de una respuesta inmune celular contra el plasmodio (Fossati, 1990).

La infección por el plasmodio es capaz de estimular a los linfocitos CD4+ y CD8+, células NK y macrófagos. La participación de los linfocitos T CD4+ es necesaria en el establecimiento de la inmunidad protectora contra el estadio eritrocítico asexual del parásito. los linfocitos T CD8+ son importantes en la fase hepática de la infección, mientras que los macrófagos y las células NK participan en el inicio de la infección (Fell y Smith, 1998).

Durante la infección primaria, se ha descrito activación secuencial Th1 y Th2, la primera se manifiesta al inicio de la enfermedad y la Th2 al final, esto se ha logrado establecer al diferenciar el patrón de citocinas que secretan dichas células (Taylor Robinson, 1994 y Langhorne et al, 1998). Sin embargo se

desconoce el papel que juegan los linfocitos T en un segundo reto con el parásito homólogo por lo que determinar los mecanismos de respuesta involucrados en los ratones que ya sufrieron una infección con *P. chabaudi* AS, es de singular importancia, para establecer el tipo de respuesta inmune que permite controlar al parásito en una segunda infección y de esta forma se podría favorecer la generación de estas respuestas en el diseño de vacunas efectivas contra el plasmodio.

Por lo descrito anteriormente, es importante conocer los mecanismos de respuesta que se desarrollan durante una infección primaria, sobre todo aquellos que llevan a la eliminación del parásito durante las subsiguientes infecciones. Una forma de realizar un análisis detallado de los eventos que se desarrollan durante una infección primaria y secundaria, es utilizar modelos murinos de malaria experimental, los cuales han permitido establecer la activación de las subpoblaciones de células T cooperadoras Th1 y Th2 de forma secuencial. Estos conocimientos son el resultado del análisis de patrón de expresión de citocinas en diferentes tiempos durante la primera infección.

No obstante debido a lo importante que resulta al análisis del curso de la infección secundaria, dado que es un fenómeno común en las zonas endémicas, se plantea realizar un estudio detallado del patrón de expresión de las citocinas que nos permitan hacer diferencias entre las subpoblaciones Th1 y Th2 que se activan a diferentes tiempos durante una infección secundaria. Es importante indicar que hasta el momento no existe información en la literatura de ningún estudio en relación a la expresión de citocinas realizado durante una segunda infección. Se eligieron las citocinas IL-2, IL-4, IFN- γ , TNF- β e IL-10 dado que con estas moléculas se puede determinar el tipo de subpoblación celular Th1 o Th2 que se esta activando preferentemente.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

- Determinar el tipo de respuesta Th1/Th2 que predomina durante la primera y segunda infección con *P. chabaudi*.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarización de la técnica de PCR para las citocinas: IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ , y TNF- β .
- Conocer la cinética de expresión de las citocinas involucradas en la respuesta inmune primaria a *Plasmodium chabaudi* AS, en ratones (BALB/cXC57BL/6)F1.
- Determinación de la expresión de citocinas en el bazo de ratones inmunes infectados por segunda vez con *Plasmodium chabaudi* AS, utilizando la técnica de RT-PCR.
- Determinar si el sexo del ratón es un factor que modifica la expresión de citocinas durante la infección con *P. chabaudi* AS

5. HIPÓTESIS

Los linfocitos Th2 participan en la eliminación del parásito homólogo en una infección secundaria.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Material Biológico:

6.1.1 Ratones singénicos. Se utilizaron ratones de 4 a 8 semanas de edad de la cepa (BALB/cXC57Bl/6)F1, criados en el bioterio de ratones de la FES Zaragoza..

6.1.2. Parásito.- Se utilizó el *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS, donado por el Dr. William Jarra, criopreservado en viales en un tanque de nitrógeno líquido.

6.2. Reactivos de biología molecular:

6.2.1. Oligonucleótidos iniciadores.- las secuencias son:

β -Actina oligo 5': GTG GGC CGC TCT AGG CAC CAA

oligo 3': CTC TTT GAC GTC ACG CAC GAT TTC

IL-2 oligo 5': ATG TAC AGC ATG CAG CTC GCA TC

oligo 3': GGC TTG TTG AGA TGA TTT GAC A

IL-4 oligo 5': CCA GCT AGT TGT CAT CCT GCT CTT CTT TCT CG

oligo 3': CAG TGA TGT GGA CTT GGA CTC ATT CAT GGT GC

IL-10 oligo 5': ATG CAG GAC TTT AAG GGT TAC TTG GGT T

oligo 3': ATT TCG GAG AGA GGT ACA AAC GAG GTT GTT T

TNF- β oligo 5': ATG AGC ACA GAA AGC ATG ATG ATC CGC

oligo 3': CCA AAG TAG ACC TGC CCG GAC TC

IFN- γ oligo 5': TGA ACG CTA CAC ACT GCA TCT TGG

oligo 3': CGA CTC CTT TTC CGC TTC CTG AG

6.2.2. Enzimas

Enzima Taq polimerasa Cetus, Perkin Elmer

Enzima MMLV-RT retrotranscriptasa del virus de la leucemia murina.

GIBCO

6.2.3. Otros reactivos de biología molecular

•Inhibidor de RNAsa. GIBCO

•dNTP 's solución de cada uno 100mM Pharmacia

- EDTA ultrapuro Sigma
- TRIS ultrapuro Sigma
- Gelatina porcina Sigma
- Agarosa Ultrapura Gibco
- Cloruro de magnesio 1M Sigma
- Fenol ultrapuro Amersham
- Etanol absoluto Merck
- Cloroformo ultrapuro Merck
- Isopropanol Sigma
- Isotiocianato de Guanidinio Sigma
- Acetato de sodio ultrapuro Sigma
- Cloruro de sodio ultrapuro Sigma
- Lauril sulfato de sodio Sigma
- Cloruro de potasio Sigma
- Ficoll Sigma
- Sacarosa Sigma
- Xilen-cynol Sigma
- Azul de bromofenol Sigma

6.3 Equipo:

- Termociclador PT-100 MJ Research
- Centrifuga 5415C Eppendorf
- Campana de flujo laminar Veco
- Micropipetas Gilson : P-2, P-20, P-200, P-1000
- Pipetor Eppendorf
- Vortex Genie
- Analizador de Geles Gel-Doc Bio-Rad
- Cámara de electroforesis Protean Xii Bio-Rad

6.4. Material diverso

- Microtubos eppendorf de 1.5 ml
- Tubos Falcon de 15 y 50 ml.
- Cajas Petri estériles de 12mm de diámetro Nunc
- Puntas de plástico desechables y libres de nucleasas para las diversas micropipetas
- Pipetas Pasteur
- Pipetas de polipropileno de 5 y 10 ml estériles Nunc
- Guantes de cirujano
- Jeringas de 1 ml estériles Plastipack
- Marcadores indelebles

6.4 Métodos:

6.4.1. Preparación del parásito.

Para obtener la suspensión de eritrocitos parasitados se descongeló un vial que contenía eritrocitos parasitados al 20% y se inoculó intraperitonealmente en un ratón singénico, cuando la parasitemia en este último ratón alcanzó alrededor de 20% se le extrajo sangre y se diluye en PBS, se contó en número de eritrocitos por microlitro en dicha suspensión en cámara Neubauer, además del número de eritrocitos parasitados en frotis teñidos con Giemsa, se realizó el cálculo para obtener una suspensión de 200 microlitros con 5×10^4 eritrocitos parasitados para cada ratón, en un volumen de 200 μ l

6.4.2. Infección de los ratones: Se utilizaron 20 ratones machos y 20 ratones hembras F1 a los cuales se les inocularon 5×10^4 eritrocitos parasitados con *Plasmodium chabaudi* AS, intraperitonealmente, en los grupos como se muestran en las siguientes tablas:

JAULA NUMERO	SEXO	NUMERO DE RATONES POR JAULA	RATONES MARCADOS CON LOS NÚMEROS
1	Machos	5	1, 2, 3, 4, y 5
2	Machos	5	6, 7, 8, 9, y 10
3	Machos	5	11, 12, 13, 14 y 15
4	Machos	5	16, 17, 18, 19 y 20

NOTA Los ratones se marcaron con una pequeña mancha de ácido pícrico en diferentes partes del cuerpo del animal.

Tabla 1.-Grupo de ratones machos F1 inoculados intraperitonealmente con *Plasmodium chabaudi* AS.

JAULA NUMERO	SEXO	NUMERO DE RATONES POR JAULA	RATONES MARCADOS CON LOS NÚMEROS
5	Hembras	5	1, 2, 3, Y 4
6	Hembras	5	5, 6, 7, Y 8
7	Hembras	5	9, 10, 11, Y 12
8	Hembras	5	13, 14, 15 Y 16

Tabla 2: Grupo de ratones hembras F1 inoculados intraperitonealmente con *Plasmodium chabaudi* AS

Se utilizaron otros 20 ratones machos y 20 ratones hembras F1 a los cuales se les inocularon igualmente 5×10^4 eritrocitos parasitados con *Plasmodium chabaudi* AS, intraperitonealmente, los cuales no se sacrificarían para que se inmunizaran y fuerón utilizados para un segundo reto con el parásito homólogo.

6.4.3. Toma de muestras.

6.4.3.1. Toma de sangre y preparación de frotos.- Diariamente se tomó muestra de sangre de la cola de los ratones para evaluar la parasitemia en frotos teñidos por Giemsa, se realizó la lectura en microscopio con el objetivo de 100X, se contaron un total de 200 eritrocitos cuando la parasitemia excedió

al 2% y cuando la parasitemia fue menor a 2% se contaron 50 campos. Con estos valores, se calculó la media geométrica para cada uno de los grupos diariamente y se construyeron las gráficas.

6.4.3.2. Extracción del bazo.- Se sacrificó por dislocación cervical a los ratones en los días señalados en la tabla 1.

La extracción del bazo se realizó en una zona estéril (cerca del mechero Fisher) trabajando con guantes nuevos, con material quirúrgico estéril, además de contar con una caja petri estéril desechable con 2 ml de PBS IX.

Se mojó al ratón con etanol al 70% en la zona donde se extrajo el bazo para evitar el desprendimiento de pelo; la piel se corto con pinzas y tijeras estériles, la piel se separo y con otro juego de tijeras y pinzas estériles se extrajo el bazo del ratón.

El bazo se coloco en la caja petri estéril que contenía PBS IX estéril; para transportarlo a la campana de flujo laminar, donde se realizó los siguientes pasos:

6.4.3.2.1. Maceración del bazo.- En un tubo falcon de plástico estéril (de 15 ml), se colocó una fina malla estéril donde se depositó el bazo y se adicionó 1 ml de PBS estéril, posteriormente se macero con la ayuda del émbolo de una jeringa estéril y se lavo el macerado con 3 ml de PBS IX depositando los lavados en el tubo de plástico.

El tubo se colocó inmediatamente en hielo y se centrifugó durante 5 minutos a 1000 rpm.

Se eliminó el sobrenadante, al botón de células se le adicionó 1 ml de solución de lisis y se agitó fuertemente, durante 1 minuto.

El lisado se conservó en congelación a -20°C para la posterior extracción de RNA y la retrotranscripción.

Días después de la infección	Número de los ratones MACHOS a los que se le extrae el bazo
0	
1	
2	1 y 2
3	
4	3 y 4
5	
6	5 y 6
7	
8	7 y 8
9	
10	9 y 10
11	
12	11 y 12
13	
14	
15	13 y 14
16	
17	
18	15 y 16
19	
20	
21	
22	17 y 18
23	
24	19 y 20

Días después de la infección	Número de los ratones HEMBRAS a los que se le extrae el bazo
0	
1	
2	1 y 2
3	
4	3 y 4
5	
6	5 y 6
7	
8	7 y 8
9	
10	9 y 10
11	
12	11 y 12
13	
14	
15	13 y 14
16	
17	
18	15 y 16
19	
20	
21	
22	17 y 18
23	
24	19 y 20

Tabla 3.- Calendario de infección y extracción del bazo de los ratones machos y hembras.

6.4.4. Extracción de RNA.

1. A cada 500 μ L de lisado de células de bazo se adicionaron:

- a) 50 μ l de acetato de sodio 3M y se mezcló por 30 segundos
- b) 500 μ l de fenol ácido (saturado con agua) y se agitó durante 30 segundos.
- c) 100 μ l de cloroformo y se mezcló por 1 minuto

2. Se colocó en hielo durante 15 minutos, se agitó vigorosamente con Vortex cada 5 min.
3. Se centrifugó por 15 minutos a 13000 rpm.
4. Se pasó la fase acuosa a otro tubo, se utilizaron pipetas de 200 μ l con volumen de 150 μ l
5. Se precipitó el RNA total con 2 volúmenes de etanol absoluto.
6. Se colocó a -20 °C durante toda la noche.
7. Se centrifugó por 15 minutos a 13000 rpm.
8. Se eliminó el sobrenadante.
9. Se adicionaron 800 μ L de etanol al 80% en agua con dietilpircarbonato (DEPC al 0.1%).
10. Se almacenó a -20°C durante toda la noche.
11. Se centrifugó por 15 minutos a 13000 rpm.
12. Se descartó el sobrenadante.
13. Se dejó secar a temperatura ambiente.
14. Se resuspendió el botón en 20 μ L de agua DEPC

6.4.5. Cuantificación del RNA.

Se colocó 1 μ l de RNA en 199 μ l de agua destilada y se midió la absorbancia a 260 y 280 nm. Para calcular la concentración de RNA se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de RNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260\text{nm}} \times 40 \times 200.$$

6.4.6 Reacción de Retrotranscripción

Se preparó la siguiente mezcla de retrotranscripción por reacción.

- 4.0 μ l de amortiguador 5X RT
- 0.8 μ l de desoxinucleótidos(dNTP's) 10 mM
- 0.3 μ l de albúmina bovina (2.91 mg/ μ L)
- 0.2 μ l de inhibidor de RNAsa

0.8 μl de M-MLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase)

3.9 μl de agua DEPC

10.0 μl de VOLUMEN TOTAL

1. Se colocaron .5 μg del RNA aislado en un tubo eppendorf de 200 microlitros de pared delgada.
2. Se adicionaron 2 μl de oligo (dT).
3. Se incubó a 65°C por 10 minutos, se utilizó la máquina de PCR
4. Se enfrió en hielo y se adicionaron 10 μL de la mezcla de retrotranscripción.
- 5 Se incubó a 37°C por 1 hora en la máquina de PCR.
6. Se incubó a 95°C por 5 minutos.
7. Se adicionaron 80 μL de agua DEPC.
8. Se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.4.7. Amplificación por PCR de los genes que codifican para: β -Actina, IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ y TNF- β .

- 1.- Se etiquetaron tubos eppendorf de 200 μl de pared delgada para PCR.
- 2.-.Se calcularon las cantidades de cada reactivo para el número de tubos que se van a utilizar.
3. Se preparó la mezcla de reacción de la siguiente forma:

concentración del reactivo	Nombre del reactivo	CONCENTRACIÓN FINAL EN LA REACCION.	(μ l)/Rx
	Amortiguador para PCR 10 X	1 X	2.0
n	dNTP 's	0.2 mM	0.8
M	Oligos de IL'	0.1 mM	0.1
ml	Taq polimerasa	0.5 U	0.1
	Agua PCR		16.0

NOTA. Se debe calibrar la amplificación para cada citocina, modificando la concentración de los reactivos del cuadro.

4. Se mezcló en el vortex y se colocaron las alicuotas en los tubos etiquetados previamente (19 μ l)
5. Se adicionaron 50 μ l de aceite mineral para PCR.
6. Sobre la capa de aceite se depositó 1 μ l del DNAc que correspondía al tubo etiquetado.
7. Se colocó en el termociclador y se siguió el programa para la β -actina y Good Start 55° C para las otras citocinas.

β -actina	Good Start 55° C
1- 94° C 4 min.	1- 94° C 6 min.
2- 55° C 2 min.	2- 55° C 2 min.
3- 72° C 2 min.	3- 72° C 2 min.
4- 94° C 1 min.	4- 94° C 45 seg.
5- repetir 30 veces del paso dos al 4,	5- repetir 29 veces del paso dos al 4,
6- 55° C 2 min.	6- 55° C 2 min.
7- 72° C 7 min.	7- 72° C 7 min.
8- 20° C por 1 hr.	8- 20° C 2 hrs.
9- Fin	9- Fin

8. Se preparó un gel de poliacrilamida al 5% en amortiguador de Tris-Acido Bórico-EDTA (TBE 1X).
9. Se adicionaron a cada muestra 10 μ l de amortiguador de carga, se mezcló completamente la fase acuosa sin hacer emulsión con el aceite.
10. Se depositaron 10 μ l en cada pozo y se colocó el marcador de peso molecular de 1Kb.
11. Se sometió a corrimiento electroforético a 180 Volts por 2 hrs. en TBE 1X.
12. El gel se tiñó con bromuro de etidio, para lo cual se depositaron 20 μ l de la solución de bromuro de etidio a una concentración de 10 mg/ml en 200 ml de TBE y se agitó suavemente durante 30 minutos.
13. El gel se lavó con TBE 1X durante 5 minutos.
14. Se visualizaron los resultados al colocar el gel en el aparato analizador de geles
15. Se determinó el peso molecular del producto de PCR por comparación con marcadores de peso molecular comerciales.

16. Las bandas en los geles se analizaron por densitometría en el equipo analizador de geles y los cálculos se realizaron en una hoja electrónica de un programa comercial de computadora.

7. RESULTADOS

El presente trabajo se realizó para:

- a) Identificar el tipo de respuesta inmune Th1/Th2 que predomina durante la infección primaria y secundaria con *Plasmodium chabaudi* en ratones de la cepa (BALB/cXC57Bl/6)F1
- b) Conocer si el sexo es un factor que modifica la expresión de citocinas durante la infección primaria y secundaria con *P. chabaudi*.

Para lograr estos objetivos se requirió la estandarización de las siguientes técnicas: extracción de RNA a partir de bazo de ratón; la reacción de retrotranscripción y las diferentes reacciones de PCR para amplificar los genes de β -actina, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10 y TNF- β .

Se utilizaron cuatro grupos de ratones (BALB/cXC57Bl/6)F1, de los cuales dos fueron de ratones machos y los otros dos de ratones hembras. Dos grupos (uno de machos y otro de hembras) se sacrificaron a diferentes tiempos durante una primera infección con el parásito *P. chabaudi* AS y los otros dos grupos se infectaron dos veces con el mismo parásito, durante la segunda infección se sacrificaron a diferentes tiempos.

El parásito se inoculó vía intraperitoneal, diariamente se hizo el recuento de eritrocitos parasitados en frotis teñidos con Giemsa, los resultados se representaron en gráficas de porcentaje de parasitemia en relación al tiempo.

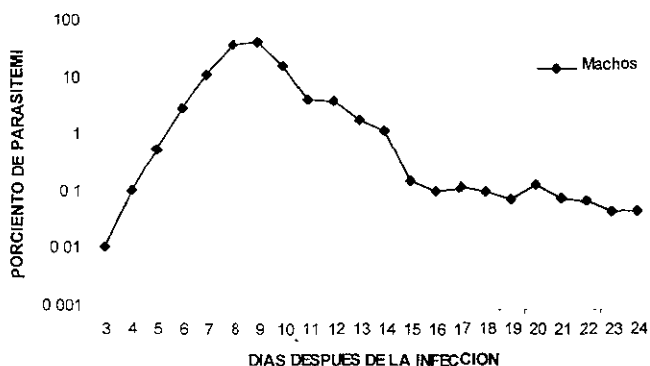
7.1. PARASITEMIAS

7.1.1. Infección primaria

7.1.1.1. Machos

Los ratones machos infectados por primera vez con el parásito *Plasmodium chabaudi* AS presentaron un ascenso en el porcentaje de la parasitemia a partir del día 3 de la infección, con un máximo aproximadamente al día 9, y posteriormente un descenso con valores cercanos al 0.1% en el día 16 y mantuvieron niveles menores al 0.1% hasta el día 24 (gráfica 1).

PARASITEMIA DE RATONES MACHO

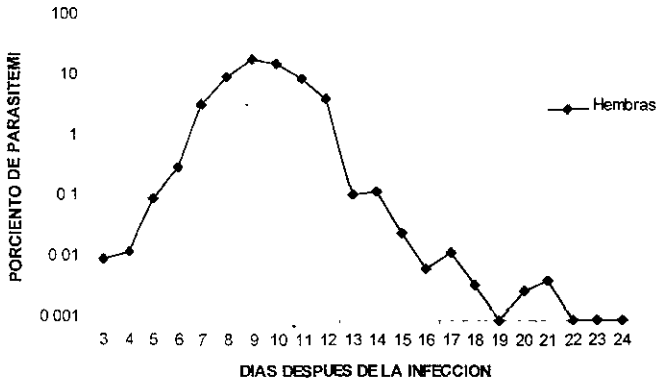


Gráfica 1. Curso de la infección con *P. chabaudi* AS en ratones machos infectados por primera vez. Los resultados se representan como el porcentaje de la parasitemia. Cada valor se calculó a partir de la media geométrica del número de eritrocitos parasitados de un total de 10 ratones en dos experimentos por separado

7.1.1.2. Hembras.

Las hembras infectadas por primera vez con *P. chabaudi* AS alcanzaron el pico máximo de parasitemia el día 9, la parasitemia bajo a niveles no detectados por la técnica el día 19, la parasitemia se incrementó ligeramente y se tornó negativa a partir del día 22 de la infección (gráfica 2).

PARASITEMIA DE RATONES HEMBRA

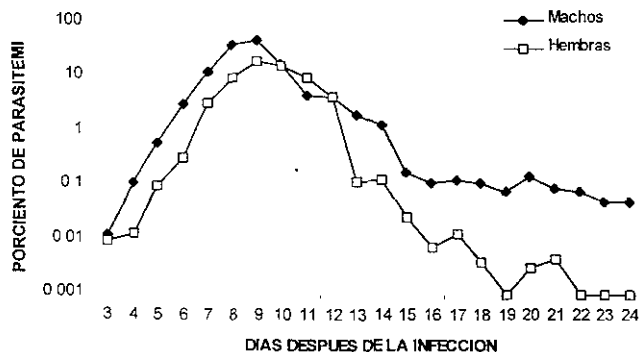


Gráfica 2.- Curso de la infección con *P. chabaudi* AS en ratones hembras infectados por primera vez. Los resultados se representan como el porcentaje de la parasitemia. Cada valor se calculó a partir de la media geométrica del número de eritrocitos parasitados de un total de 10 ratones en dos experimentos por separado.

7.1.1.3. Comparación de las parasitemias en machos y hembras.

Al comparar la parasitemia de machos y hembras durante la primera infección con *P. chabaudi* AS, se observó un comportamiento semejante antes del día 9 no obstante, las hembras desarrollaron parasitemias menores que curaron completamente al final del experimento a diferencia de los ratones machos quienes desarrollaron parasitemias crónicas a niveles muy bajos. Aunque este hallazgo debería corroborarse con un número mayor de ratones, la tendencia en las curvas de parasitemia durante la primera infección con *P. chabaudi* AS sugiere que los machos son más susceptibles que las hembras dado que manifiestan mayores parasitemias y nunca llegan a valores de 0.01%, mientras que en las hembras el día 22 presentan valores de 0.001% (gráfica 3).

PARASITEMIA DE RATONES MACHO COMPARADO CON RATONES HEMBRA



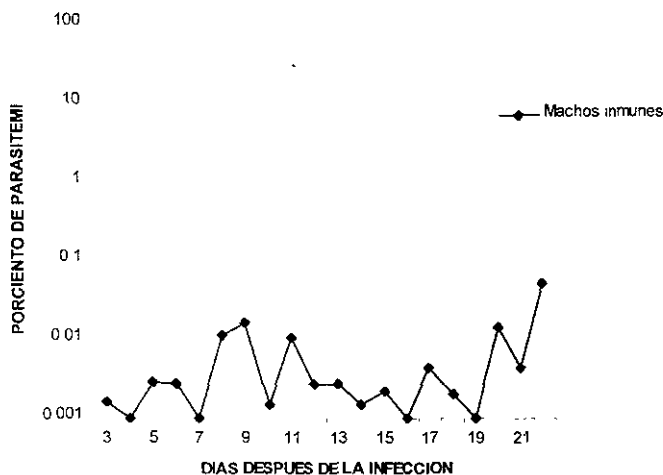
Gráfica 3 Curso de la infección con *P. chabaudi* AS en ratones machos y hembras infectados por primera vez. Los resultados se representan como el porcentaje de la parasitemia. Cada valor se calculó a partir de la media geométrica del número de eritrocitos parasitados de un total de 10 ratones en dos experimentos por separado.

7.1.2. Infección secundaria

7.1.2.1 machos inmunes

Los ratones machos durante la segunda infección con *P. chabaudi* AS desarrollaron niveles de parasitemia notoriamente menores a los que se presentaron en los machos durante la infección primaria, los valores no sobrepasaron al 0.1% , además se observaron múltiples picos, el máximo nivel de la parasitemia se alcanzó el día 9 y no se detectó parasitemia para el día 16 (gráfica 4).

PARASITEMIA DE RATONES MACHO INMUNES

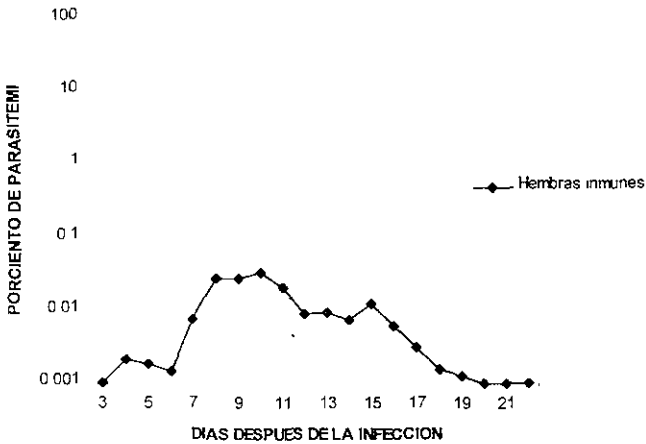


Gráfica 4.- Curso de la infección con *P. chabaudi* AS en ratones machos inmunes. Los resultados se representan como el porcentaje de la parasitemia. Cada valor se calculó a partir de la media geométrica del número de eritrocitos parasitados de un total de 10 ratones en dos experimentos por separado.

7.1.2.2. Hembras inmunes

Las hembras inmunes retadas por segunda vez con el mismo parásito desarrollaron parasitemias menores que las hembras infectadas por primera vez, los valores no sobrepasaron al 0.1%, además que las parasitemias disminuyeron a niveles menores de 0.001% el día 20 de la infección (gráfica 5).

PARASITEMIAS DE RATONES HEMBRA INMUNES

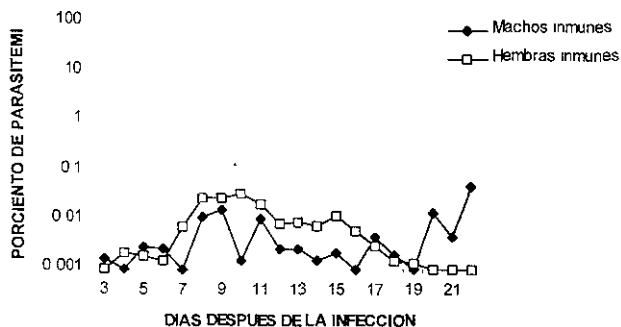


Gráfica 5.- Curso de la infección con *P. chabaudi* AS en ratonas hembras inmunes. Los resultados se representan como el porcentaje de la parasitemia. Cada valor se calculó a partir de la media geométrica del número de eritrocitos parasitados de un total de 10 ratones en dos experimentos por separado.

7.1.2.3. Comparación de las parasitemias en machos y hembras inmunes.

Se observó que en ambos grupos de ratones durante un segundo contacto con el parásito las parasitemias no alcanzaron valores del 0.1%. En el grupo de ratonas hembras inmunes se presentó una curva en la parasitemia con valores un poco mayores al de los ratones machos inmunes, la parasitemia se torna a valores de 0.001 el día 20, mientras que en los ratones machos inmunes se presentaron ascensos y descensos a niveles menores que en el grupo de hembras (gráfica 6).

**PARASITEMIA DE RATONES MACHO INMUNES COMPARADO CON
RATONES HEMBRA INMUNES**



Gráfica 6.- Curso de la infección con *P. chabaudi* AS en ratones hembras y machos inmunes. Los resultados se representan como el porcentaje de la parasitemia. Cada valor se calculó a partir de la media geométrica del número de eritrocitos parasitados de un total de 10 ratones en dos experimentos por separado.

7.2. Expresión de los genes que codifican para: β -actina, IFN- γ , IL-2, IL-4 y TNF- β .

Para analizar el tipo de citocinas que se producen tanto en una infección primaria como en una secundaria, los 4 grupos de ratones: machos y hembras de primera y segunda infección se sacrificaron por dislocación cervical, se les extrajo el bazo y de ese tejido se extrajo el RNAm, se utilizó la enzima MMLV-RT que es una retrotranscriptasa para generar a partir de ese RNAm un DNA complementario, el cual se empleó como molde para amplificar por PCR los genes que codifican para β -actina, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10 y TNF- β . Los productos de PCR (amplicones) así obtenidos, se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron en el analizador de geles Gel Doc. Los resultados para cada uno de los grupos de ratones analizados se muestran en las figuras 1-4.

7.2.1. Expresión de citocinas en el grupo de ratones machos infectados por primera vez con *P. chabaudi* AS.

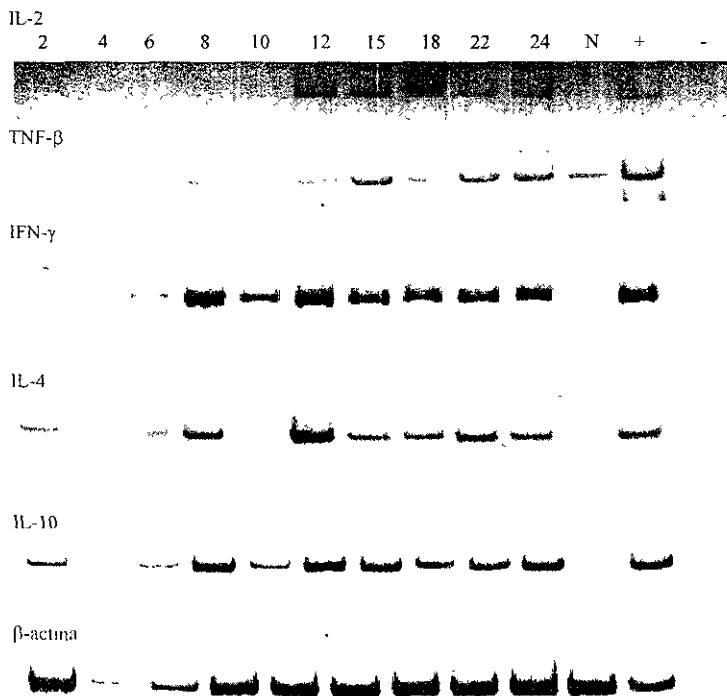


FIGURA 1. Corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida al 5% de los amplicones correspondientes a las citocinas (IL-2, TNF-β, IFN-γ, IL-4, IL-10), las muestras se tomaron de ratones machos a los días 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 22 y 24 durante una infección primaria con *P. chabaudi*. N: Ratón normal (sin infección); + Control positivo para el gen amplificado; - Control negativo

7.2.2. Expresión de citocinas en el grupo de ratones machos inmunes infectados por segunda vez con *P. chabaudi* AS.

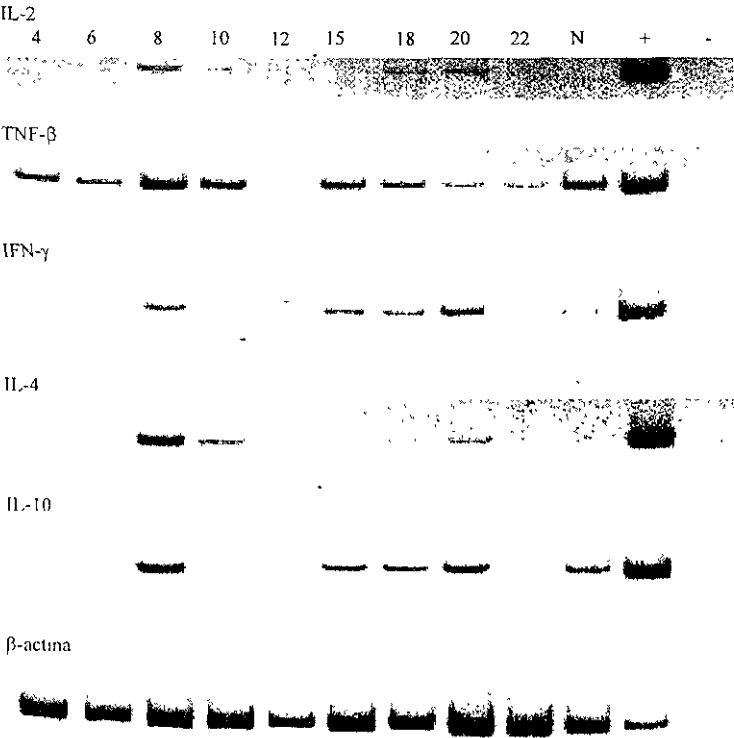


Figura 2.- Corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida al 5% de los amplicones correspondientes a las citocinas (IL-2, TNF-β, IFN-γ, IL-4, IL-10), las muestras se tomaron de ratones machos inmunes a los días: 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 20 y 22 durante una infección secundaria con *P. chabaudi*. N= Ratón inmune sin infección; + Control positivo para el gen amplificado, - Control negativo.

7.2.3. Expresión de citocinas en el grupo de ratones hembras infectados por primera vez con *P. chabaudi* AS.

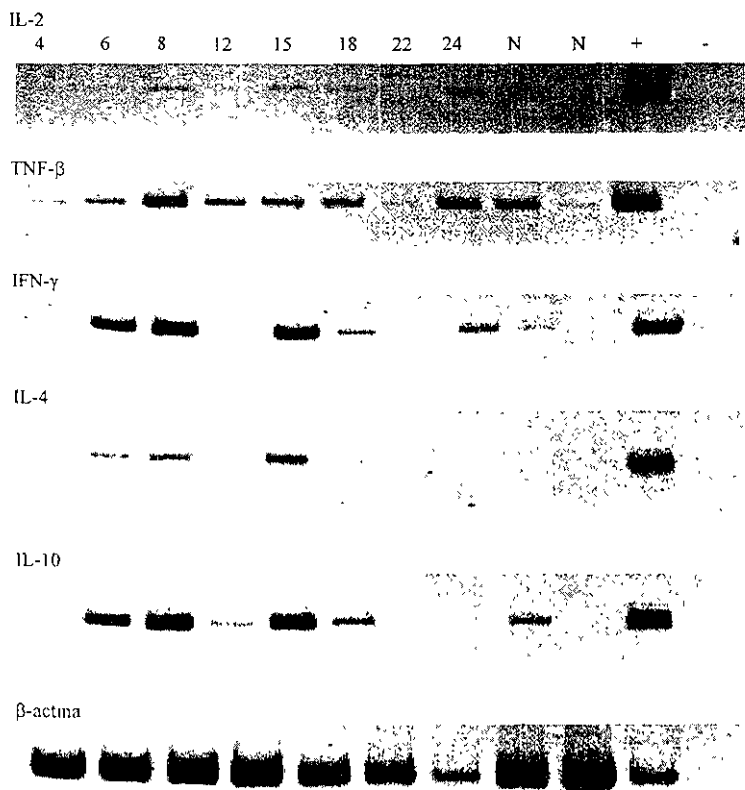


Figura 3.- Corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida al 5% de los amplicones correspondientes a las citocinas (IL-2, TNF-β, IFN-γ, IL-4, IL-10), las muestras se tomaron de ratones hembras a los días: 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 22 y 24 durante una infección primaria con *P. chabaudi*. N – Ratón normal (sin infección); + Control positivo para el gen amplificado; - Control negativo

7.2.4. Expresión de citocinas en el grupo de ratones hembras inmunes infectados por segunda vez con *P. chabaudi* AS.

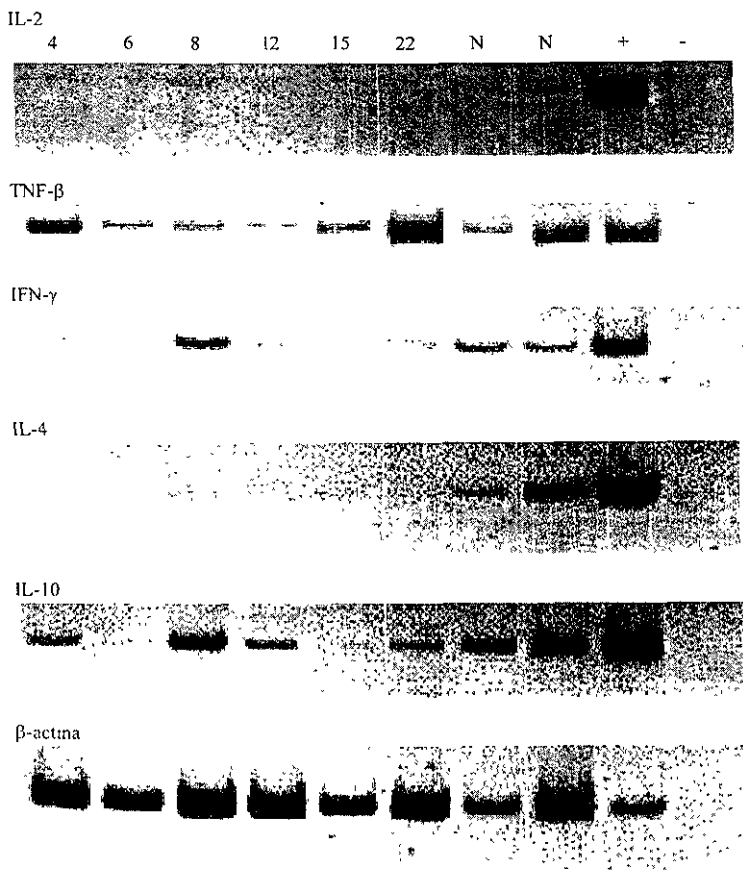


Figura 4.- Corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida al 5% de los amplicones correspondientes a las citocinas (IL-2, TNF- β , IFN- γ , IL-4, IL-10), las muestras se tomaron de ratones hembras inmunes a los días: 4, 6, 8, 12, 15 y 22 durante una infección primaria con *P. chabaudi*. N - Ratón inmune sin infección, + Control positivo para el gen amplificado; - Control negativo

7.3. Análisis de las citocinas en los diferentes grupos de ratones.

7.3.1 Expresión de IL-2

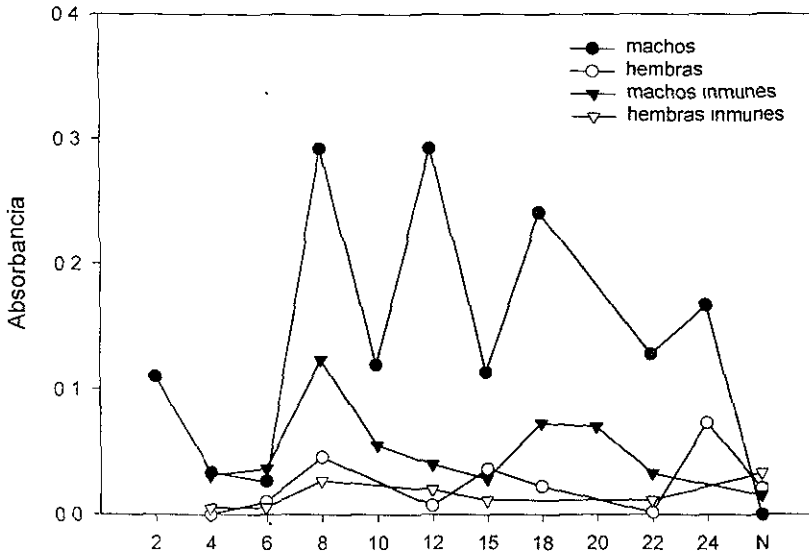
En el ratón macho normal que se utilizó como control de no infección, no se observó la expresión de IL-2. En los ratones machos infectados por primera vez, se detectó su expresión en la primer muestra del día 2 de la infección y durante todo el experimento. Los niveles mas altos de IL-2 se presentaron los días 8 y 12, fue evidente un aumento y disminución de la expresión de la citocina gráfica 7.

En el control sin infección en el grupo de las hembras, la IL-2 se expreso a niveles bajos, mientras que en el grupo de hembras con infección primaria se observaron niveles que se conservaron muy bajos durante todo el experimento (en el gel no se observo los días 4, 6 y 12; y se notan débilmente los días 8, 15 y 18), en general el grupo de ratones hembras presento niveles menores que el grupo de los ratones machos gráfica 7.

En el grupo de los ratones machos inmunes se detecto la expresión de IL-2 a niveles muy bajos antes de que se sometieran a la segunda infección con el *Plasmodium chabaudi*. En los ratones infectados por segunda vez se detecto durante todo el experimento en niveles muy bajos, se obtuvo la máxima expresión el día 8, con un posterior decremento de la expresión de esta citocina.

En el grupo de ratones hembras inmunes se exprezó en el ratón inmune sin infección (N) y prácticamente no se detecto durante el segundo reto (aunque en el gel pareciera que se expresa débilmente el día 8 de la infección) gráfica 7.

Expresión de IL-2



Gráfica 7.- Expresión de la citocina IL-2, en los ratones infectados por primera vez e inmunes con *P. chabaudi* AS. Cada banda en los geles de acrilamida se analizó por densitometría utilizando el analizador de geles Gel-Doc y una hoja de cálculo de microprocesador de computadora. Los valores de absorbancia se graficaron en relación al tiempo de infección en los días 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 20, 22 y 24.

7.3.2. Expresión de IFN- γ

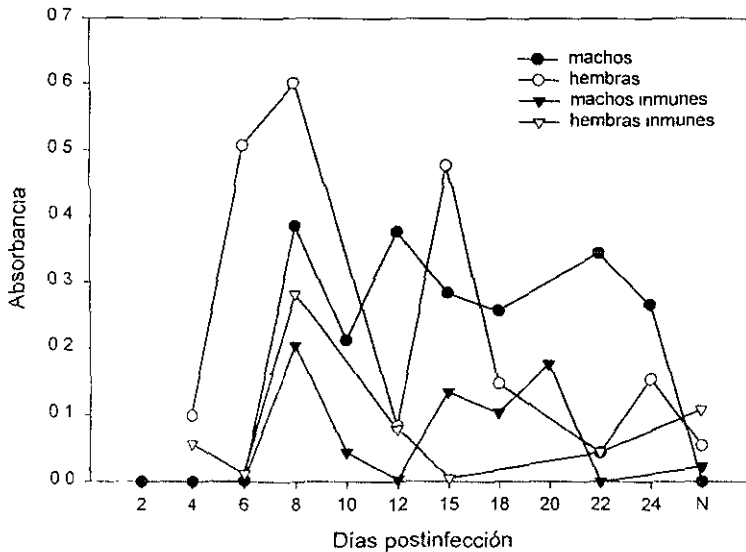
El IFN- γ no se expresó en el ratón macho sin infección utilizado como control. En el grupo de los machos infectados por primera vez, se detectó hasta el día 8 y este fue el pico máximo, que coincidió con el pico de la parasitemia. En el grupo de las ratones hembras con infección primaria el IFN- γ , se expresó en todas las muestras analizadas, incluyendo al ratón normal, el máximo del nivel de expresión se detectó al día 8 de la infección. La expresión de esta citocina al inicio de la infección fue mayor en las hembras que en los machos. No

obstante después del día 18 los niveles en la expresión se invirtieron y los machos mostraron valores más altos que las hembras gráfica 8.

En los machos inmunes no se detectó la expresión de esta citocina los días 4, 6, 12 y 22. los niveles se modificaron durante la segunda infección y se alcanzo el máximo el día 18 . Los niveles disminuyeron notoriamente al final del experimento, mientras que en los días 4, 6, 12 y 22 el resultado fue negativo gráfica 8.

En el grupo de hembras inmunes el nivel más alto de IFN- γ coincidió con el pico de la parasitemia del día 8. A medida que se controló la parasitemia los niveles de IFN- γ también disminuyeron gráfica 8.

Expresión de IFN- γ



Gráfica 8.- Expresión de la citocina IFN- γ , en los ratones infectados por primera vez e inmunes con *P. chabaudi* AS. Cada banda en los geles de acrilamida se analizó por densitometría utilizando el analizador de geles Gel-Doc y una hoja de cálculo de microprocesador de computadora. Los valores de absorbancia se graficaron en relación al tiempo de infección en los días 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 20, 22 y 24.

7.3.3 Expresión de TNF- β

En los ratones machos, infectados por primera vez con *P. chabaudi*, el TNF- β , no se detecto en los primeros días de la infección, su presencia se observó hasta al día 6 con un pico máximo el día 15 con posterior descenso hasta valor cercano a cero para el día 24.

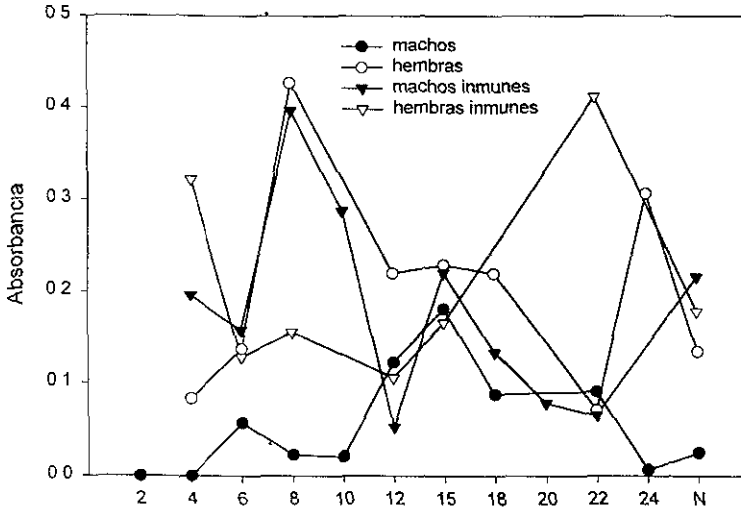
En las hembras de primera infección, la expresión de TNF- β es diferente que en los machos ya que en todas las muestras analizadas se obtuvieron niveles mas altos que en los machos, con un pico máximo al día 8 y posterior descenso y el día 24 se observaron nuevamente niveles elevados. En general se expreso esta citocina con mayor intensidad en el grupo de ratones hembras.

La expresión de TNF- β en los ratones machos inmunes es mayor en general comparado con el grupo de ratones machos durante la infección primaria, incluso en el ratón inmune sin infección la expresión es mayor en relación al ratón normal. El nivel mas alto se alcanzo el día 8 con descenso para el día 12 de la infección gráfica 9.

Las hembras inmunes expresaron esta citocina todos los días analizados, se detecto el pico máximo el día 22. Los niveles de expresión en general son menores al grupo de ratones hembras no inmunes.

Los niveles mas altos de esta citocina se detectaron el día 8 de la infección, el cual coincide con el pico mas alto de la parasitemia en todos los grupos de ratones.

Expresión de TNF- β



Gráfica 9. Expresión de la citocina TNF- β , en los ratones infectados por primera vez e inmunes con *P. chabaudi* AS. Cada banda en los geles de acrilamida se analizó por densitometría utilizando el analizador de geles Gel-Doc y una hoja de cálculo de microprocesador de computadora. Los valores de absorbancia se graficaron en relación al tiempo de infección en los días 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 20, 22 y 24.

7.3.4 Expresión de IL-4

En los machos infectados por primera vez, se detectó la expresión de IL-4 en todos los días analizados. Se detectaron dos picos, el primero el día 8 que coincide con la parasitemia más alta y después el pico más alto en el día 12 de la infección cuando la parasitemia ya está en descenso. No se detectó la expresión de IL-4 en los ratones normales utilizados como control. En las hembras con la infección primaria se detectó la expresión de IL-4 a partir del día 6 de la infección. El nivel máximo se detectó el día 15.

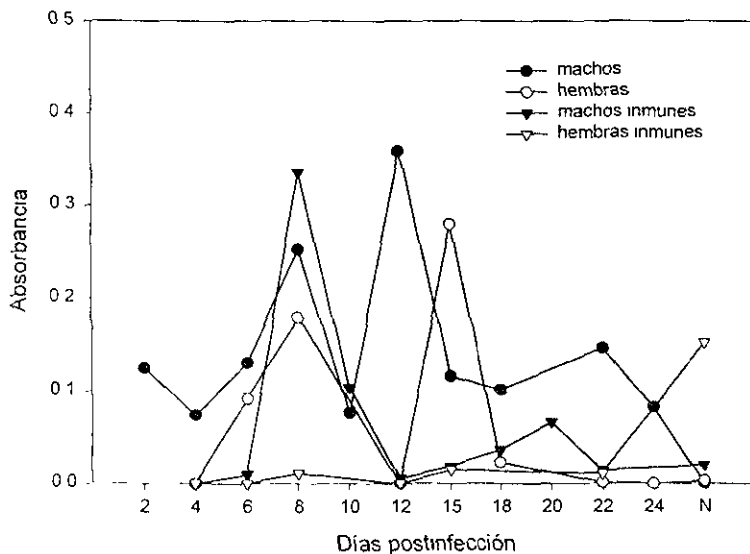
Los machos presentaron niveles más altos de IL-4 que las hembras. Los ratones machos infectados por segunda vez expresaron muy débilmente IL-4 el

día 6 y el máximo nivel se detectó al día 8, posteriormente los niveles disminuyen a valores cercanos a cero.

La hembra inmune sin infección utilizada como control expreso niveles mas altos de esta citocina que los ratones infectados. En general los niveles de expresión de IL-4 durante una infección secundaria son menores a los que se presentan durante una primera infección.

Los niveles mas altos coincidieron con el día 8 en que se alcanzo la mayor parasitemia en todos los grupos de ratones, interesantemente los ratones machos inmunes mostraron niveles mas altos que su contraparte no inmune, y en general las hembras mostraron niveles menores que los machos.

Expresión de IL-4



GRÁFICA 10 Expresión de la citocina IL-4, en los ratones infectados por primera vez e inmunes con *P. chabaudi* AS. Cada banda en los geles de acrilamida se analizó por densitometría utilizando el analizador de geles Gel-Doc y una hoja de cálculo de microprocesador de computadora. Los valores de absorbancia se graficaron en relación al tiempo de infección en los días 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 20, 22 y 24

7.3.5 Expresión de IL-10

En los ratones machos infectados por primera vez, la IL-10 se expresó prácticamente durante toda la infección, los niveles más altos se alcanzaron los días 8 y 12 con posterior descenso sin dejar de expresarse. El nivel más alto de esta citocina coincidió con el nivel mayor en la parasitemia.

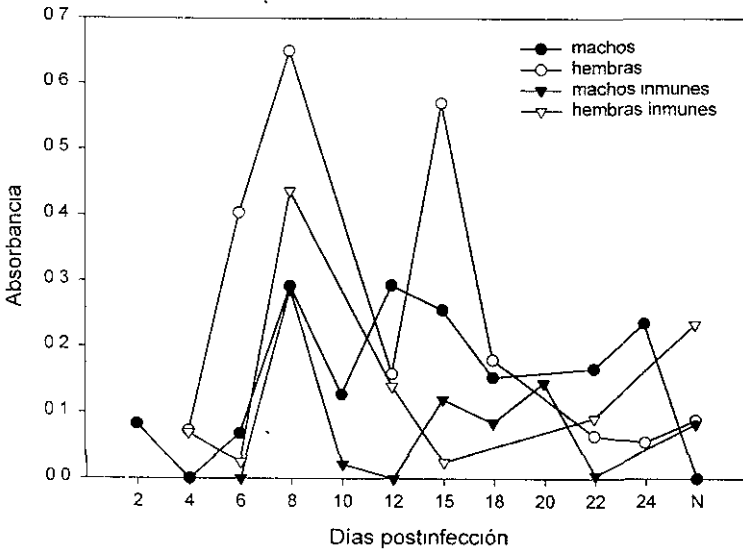
En las hembras infectadas por primera vez se detectó la expresión de IL-10 en todos los días analizados, el nivel más alto se alcanzó el día 8 que coincide con el pico en la parasitemia, posteriormente, los niveles disminuyeron.

En los ratones machos inmunes infectados, se detectó el nivel máximo de IL-10 el día 8 que coincidió con el pico de la parasitemia, con posterior descenso llegando a valores de cero para el día 22. El ratón inmune sin infección desarrollo niveles bajos de IL-10.

En las hembras inmunes se detectó la expresión de el día citocina en todas las muestras analizadas.

Los niveles mas altos corresponden al día en que se alcanzo la mayor parasitemia. Las hembras desarrollaron niveles mas elevados de esta citocina que los machos.

Expresión de IL-10



GRÁFICA 11. Expresión de la citocina IL-10, en los ratones infectados por primera vez e inmunes con *P. chabaudi* AS. Cada banda en los geles de acrilamida se analizó por densitometría utilizando el analizador de geles Gel-Doc y una hoja de cálculo de microprocesador de computadora. Los valores de absorbancia se graficaron en relación al tiempo de infección en los días 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 20, 22 y 24.

8. DISCUSION DE RESULTADOS

8.1. Parasitemias.

Los machos desarrollaron mayores parasitemias que las hembras durante la infección primaria. Por el contrario, durante la infección secundaria las parasitemias se invirtieron y fueron mayores en las hembras que en los machos. Una probable explicación a estos resultados, es que los machos desarrollaron parasitemias más altas durante la primera infección porque son mas susceptibles que las hembras, probablemente las hormonas juegan un papel muy importante en la regulación de la respuesta inmune en malaria. Este resultado concuerda con el observado por Jarra et al, 1985 quien describe mayor susceptibilidad en los ratones machos de la cepa CBA/Ca. Al desarrollar mayor parasitemia, la carga antigénica fue mayor y por lo tanto la estimulación del sistema inmune permitió desarrollar mayor protección que en las hembras. Lo anterior se refleja en un mejor control de la parasitemia durante la infección secundaria en los ratones machos. Los protección que desarrollaron los ratones de ambos sexos durante la primera infección originó que cuando se infectaron por segunda ocasión con el mismo parásito presentaron parasitemias tan bajas que no sobrepasan al 0.1% comparado con los ratones infectados por primera vez, además de controlar la infección en un menor tiempo, por lo tanto esta cepa de ratones singénicos generaron protección para un segundo reto con el mismo parásito. Además de desarrollar niveles menores en la parasitemia, se observo que ambos grupos eliminaron al parásito de 3 a 4 días antes que en la primera infección.

8.2. Expresión de las citocinas.

Para poder determinar la cinética en la expresión de citocinas en ratones C57Bl/6XBALB/c)F1 infectados con *P. chabaudi*, se sacrificaron ratones machos y hembras en diferentes días durante una infección primaria y secundaria con el *Plasmodium*. Se realizo la extracción del bazo de ratones infectados con el parásito en diferentes días durante el experimento, dicha

extracción se realizó, utilizando material nuevo, estéril y libre de nucleasas, lo que permitió obtener el RNA libre de contaminantes, para su posterior retrotranscripción. Como resultado se obtuvo DNAc que sirvió para amplificar las diferentes citocinas por PCR utilizando oligonucleótidos específicos para cada citocina.

8.2.1. Expresión de IL-2

En concordancia con los niveles de parasitemia, La IL-2 se detectó con niveles mayores en los machos que en las hembras, lo que indica que a mayor cantidad de estimulación antigénica, se presenta mayor arreglo del gene que codifica para IL-2 durante la infección primaria.

Los ratones machos inmunes durante el segundo contacto con el parásito desarrollaron niveles mas altos de esta citocina que las hembras inmunes.

Los resultados sugieren que los ratones machos desarrollaron mayor protección dado que controlaron mejor la segunda infección, expresaron IL-2 en niveles más altos que el grupo de hembras inmunes.

8.2.2. Expresión de IFN- γ

Los niveles de expresión de esta citocina mas altos se detectaron durante la primera infección tanto en las hembras como en los machos, esto correlacionó con el mayor número de parásitos en sangre lo que indica que cuando existe mayor estimulación antigénica, se induce la mayor síntesis de IFN- γ . Los resultados sugieren que la producción de IFN- γ esta regulada por la presencia del parásito, ya que a medida que disminuye la parasitemia disminuye la producción de IFN- γ .

La mayor expresión de esta citocina se observó durante la infección primaria, lo que corrobora de alguna forma los resultados descritos por Taylor-Robinson, 1994 y Langhorne, 1988. Sin embargo aunque a niveles menores se detectó su expresión durante la infección secundaria con el parásito homólogo. Una probable explicación de este resultado, es que debido a la variación antigénica

del plasmodium se estimulan nuevas clonas de linfocitos T que producen esta citocina como lo harían las células durante una primera infección, no obstante como la mayoría de las células se estimuló durante la primoinfección los niveles que alcanzaran son notoriamente menores. Otra probable explicación es que únicamente en niveles altos de parasitemia, la carga antigénica es tal que puede estimularse la producción de IFN- γ

8.2.3. Expresión de TNF- β

El nivel más alto de expresión de esta citocina se detecto justo cuando la parasitemia viene en descenso, lo que sugiere que su producción esta relacionada con la eliminación del parásito.

Los resultados sugieren que los niveles de expresión de TNF- β guardan una relación directa con la protección, puesto que los ratones que desarrollan menor parasitemia fueron los que tuvieron los niveles mayores de esta citocina. Los resultados indican que los niveles de TNF- β correlacionan con la mayor protección. Durante la infección primaria se observaron niveles más altos en las hembras que en los machos, lo que correlacionó con un mejor manejo de la parasitemia en las hembras. En concordancia con este resultado la menor parasitemia durante la segunda infección la desarrollaron los machos quienes alcanzaron los niveles mas elevados de TNF- β .

8.2.4. Expresión de IL-4

Los resultados indican que la carga antigénica esta relacionada con la producción de IL-4, en particular durante la infección primaria ya que los niveles mayores de IL-4 detectados por esta técnica correlacionaron con los niveles mas altos de parasitemia. Mientras que en una infección secundaria los niveles son notoriamente menores en particular en las hembras. Los incrementos súbitos en los niveles de esta interleucina junto con la disminución tan marcada podría indicar que su síntesis esta estrictamente regulada.

8.2.5. Expresión de IL-10

En general la IL-10 se expresa mas intensamente en el grupo de hembras que en los machos. La interleucina 10 al igual que las demas citocinas, se detecto a niveles más altos durante la infección primaria que en la infección secundaria.

Los resultados sugieren que existe una mayor expresión de IL-10 en las hembras que en los machos, tanto en la infección primaria como en la infección secundaria.

8.3. Análisis global de los resultados.

Se ha generalizado que una respuesta secundaria para el mismo antígeno es mas intensa que durante una infección primaria, una característica importante es que se elimina al antígeno con mayor velocidad.

En nuestro modelo experimental de malaria es evidente que los grupos de ratones hembras y machos desarrollaron protección después de curar de una infección primaria, lo que se manifesto como una parasitemia notablemente menor durante la infección secundaria. No obstante, la eliminación del parásito no se puede asociar con una mayor producción de citocinas durante la infección secundaria, puesto que los niveles de todas las citocinas analizadas fueron notoriament menores que durante la primera infección, lo que indica que la producción de estas moléculas esta regulada estrictamente y que uno de esos mecanismos pudiera estar asociado con la carga antigénica.

Como controles para la expresión de citocinas en los ratones inmunes con una infección secundaria, se utilizarón ratones que curaron de una infección primaria pero que no fueron nuevamente infectados, es decir sin infección secundaria. Esto fue con el objetivo de establecer si es realmente la segunda infección la que modifica la expresión de las citocinas durante ese periodo. No obstante es importante indicar que se ha descrito que este parásito presenta recrudescencias, lo que explicaría el que se mantenga activado al sistema inmune como se demuestra por la producción de algunas citocinas en los controles sin segunda infección

ESTA TESIS NO SALI
DE LA BIBLIOTECA

Investigadores como Taylor-Robinson y Langhorne han descrito resultados que sugieren una respuesta bifásica y secuencial para *P. chabaudi* AS, es importante indicar que en ambos grupos de investigación se han utilizado líneas clonadas de linfocitos T y que en el presente trabajo se analizó la población completa de bazo, en donde se pueden encontrar otras estirpes celulares como los son: los linfocitos T citotóxicos, macrófagos, células NK, etc. y que inevitablemente todas estas poblaciones celulares contribuyen a los resultados que describimos, de tal forma que analizando a la población total de bazo no encontramos la marcada respuesta Th1 que hace un cambio a Th2, sin embargo, si se observo que los niveles disminuyen de tal forma que en general concuerdan con lo descrito por dichos autores en otras cepas de ratones. Por otro lado la metodología empleada en este estudio (RT-PCR) posee mayor sensibilidad que el ensayo de ELISA que utiliza Langhorne para cuantificar citocinas en los sobrenadantes de cultivos de líneas celulares, razón por la cual consideramos que en el presente trabajo estamos detectando niveles de citocinas no detectados por los autores antes citados.

Una aportación importante del presente trabajo es el hallazgo de que la eliminación del parásito de forma tan eficaz durante la infección secundaria no correlaciona con una respuesta mas intensa que se reflejara en niveles elevados de las citocinas. Por el contrario, los niveles fueron notoriamente menores en una segunda infección que en la infección primaria. Adicionalmente, las hembras que de acuerdo a lo descrito muestran mayor resistencia a la infección primaria, durante la infección secundaria desarrollan parasitemias ligeramente mayores que los machos. Lo que es perfectamente explicable desde los términos de a mayor estimulación antigénica durante la primera infección se genera una mejor protección para un segundo reto con el mismo plasmodio

9. CONCLUSIONES

- Los machos son más susceptibles a la infección primaria con *P. chabaudi*, por lo que desarrollan parasitemias más altas, la mayor carga antigénica les permite desarrollar una mejor protección que a las hembras, lo que se evidencia durante una segunda infección donde las hembras desarrollan parasitemias mayores.
- En el bazo de los ratones machos F1(BALB/cXC57Bl/6) durante una primera infección se expresaron a diferentes niveles las citocinas de tipo Th1 y Th2.
- En general los niveles de citocinas más elevados correlacionaron con las parasitemias más altas. Durante la infección secundaria los niveles de expresión de citocinas son menores que durante una infección primaria lo que correlaciona con la parasitemia.
- Las diferentes poblaciones celulares en el bazo pueden estar contribuyendo a los niveles de citocinas observados.
- Se determinó que el sexo sí modifica la expresión de citocinas ya que un ratón hembra antes del primer contacto con el parásito expresó casi todas las citocinas excepto la IL-4, y un ratón macho tan solo expresó el TNF- β lo que tal vez podría explicar las parasitemias en ratones hembras un poco inferiores comparado con los ratones machos durante un primer encuentro con el parásito.
- Los ratones hembra inmunes expresan todas las citocinas antes del segundo contacto con el parásito, lo que no ocurrió en un ratón macho inmune ya que solo expresó TNF- β , IFN- γ e IL-10.

- Al analizar por RT-PCR la expresión de las citocinas IL-2, IFN- γ , TNF- β , IL-4 e IL-10 no se conoció el tiempo en el cual durante una infección primaria se lleva el paso de una respuesta Th1/Th2 ya que se observó una respuesta mutua desde los primeros días de la infección tanto en ratones no inmunes como en aquellos inmunes.
- Se detectaron a diferentes niveles las citocinas proinflamatorias (IFN- γ , TNF- β) y las antiinflamatorias como IL-10, en un órgano como el bazo, es evidente que las diferentes poblaciones celulares que se albergan en el órgano están contribuyendo a los resultados finales, y además la producción de estos mensajeros está muy regulada lo que se manifestó en los niveles de las citocinas.

10. APENDICE

PREPARACIÓN DE REACTIVOS.

CUADRO 6: Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

REACTIVO	CONCENTRACIÓN PBS 10X	CONCENTRACIÓN PBS 1X
NaCl	0.67 M	0.067 M
KH ₂ PO ₄	0.029 M	2.9 X 10 ⁻⁴
Na ₂ HPO ₄	0.253 M	0.025
H ₂ O	cbp 1 000 ml	cbp 1000 ml

CUADRO 7: Preparación de la solución de TBE10X

REACTIVO	CONCENTRACIÓN TBE 10X	CONCENTRACIÓN TBE 1X
Tris	1 M	0.1 M
EDTA	0.049 M	4.8 X 10 ⁻⁴
Ácido Bórico	1 M	0.1 M
Agua destilada	cbp 1 000 ml	cbp 1 000 ml

CUADRO 8: Solución de lisis.

REACTIVO	VOLUMEN PARA 5.5 ml	VOLUMEN PARA 4.5 ml	VOLUMEN PARA 2.5 ml
Tiocianato de guanidinio 4M	5 ml	4.151 ml	2.30 ml
Citrato de sodio 1M	125 ml	108 ml	57 ml
2-β-mercaptoetanol	45 ml	37 ml	20 ml
Sarcosil al 10%	250 ml	207 ml	115 ml
VOLUMEN TOTAL	5.420 ml	4.5 ml	2.5 ml

11. REFERENCIAS

- Abbas AK, Litchman AH, Pober JS. *Inmunología celular y molecular*. 2a. ed. México: Mac Geaw Hill, 1995:
- Brown KN. The parasitology of malaria and the study of protective immunity. *Immunol. Lett* 1990; **25**:97-99.
- Bruce-Chwatt LJ. History of malaria from prehistory to eradication. In *Wernsdorfen WH, MC Gregor I. Eds, Malaria: Principles and practice of Malariology*, vol I. New York: Churchill Livingstone, 1998; 1-60.
- Cavacini LA; Long CA; Weidanz WP. T-cell immunity in murine malaria: Adoptive transfer of resistance to *Plasmodium chabaudi adami* in nude mice with splenic T cell. *Infect. immun.* 1986; **52**: 637-643.
- C. Van der Heyde, B. Pepper, J. Batchelder, F. Cigel, W. P. Weidanz. The time course of selected malaria infections tokine-deficient mice. *Exp. parasitol.* 1997; **85**: 206-213.
- Favila-Castillo L; Jarra W; Brown RM. The adoptive transfer of T-cell dependent immunity to *Plasmodium chabaudi* and *P. berghei* in CBA/Ca mice is achieved only after superinfection of immune spleen cells donors. *Parasitol immunol*, 1990; **12**: 297-307.
- Good MF. A malaria vaccine strategy based on the induction of cellular immunity. *Immunol Today*. 1992; **13**:126-129.
- Greenwood BM. The epidemiology of malaria. *Ann Trop Med*, 1997; **91**(7): 763-769

- G.S Yap, P. Jacobs, M.M. Stevenson. Th cell regulation of host resistance to blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS. Res Immunol 1994; **145**: 419-423.
- Fell AH and Smith NC. Immunity to asexual blood stages of Plasmodium: is resistance to acute malaria adaptive or innate? Parasitol Today, 1998; **14**:364-369.
- Fossati L., Merino J, Izuis. CD4+ T cells play a major role for IgM and IgG anti-DNA production in mice infected with *Plasmodium yoelii*. Clin Exp Immunol, 1990; **79**: 291-296.
- Jarra W; Brown KM. Protective immunity to malaria: Studies with cloned lines of *Plasmodium chabaudi* and *P. berghei* in CBA/Ca mice. I. The effectiveness and inter and intra-species specificity of immunity induced by infection. Parasite immunol. 1985; **7**: 595-606.
- Langhorne, C. Cross. A role for B cells in the development of T cell helper function in a malaria infection in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. 1998; **95**: 1730-1734.
- Langhorne JM; Meding SJ; Eichman K; Gillard SS. The response of CD4+ T cells to *Plasmodium chabaudi chabaudi*. Immun. Rev. 1989; **112**: 71-94.
- Legorreta Herrera M; Jarra W; Snounou G; Bourne T; Brown KN. Specificity in protective immunity to malaria. Adv. Mod. Biotech. 1994; **2**: 11.
- Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Enfermedades infecciosas. 4a. ed. México Medica Panamericana, 1997: Vol. 2: 2710-2723.

11. PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES.

Una de las condiciones más importantes en este modelo experimental, es la higiene que se debe tener con estos ratones, ya que de otro modo si se llegan a infectar con cualquier otro microorganismo diferente de *Plasmodium chabaudi* AS, de igual modo se activará un tipo de respuesta que no necesariamente es la misma que se activaría con el plasmodio utilizado y por lo tanto, se determinaría un tipo de respuesta y cinética totalmente diferente, además cabe mencionar que las técnicas desde el momento de extracción del bazo, la extracción del RNA, la retrotranscripción, y la amplificación por PCR se deben trabajar en condiciones de esterilidad, ya que son técnicas muy sensibles pero también con un alto riesgo de contaminación por ribonucleasas presentes en las bacterias y por lo tanto se debe trabajar con material nuevo, libre de nucleasas, en campana de flujo laminar, con reactivos exclusivos para PCR, y con guantes.