

76



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

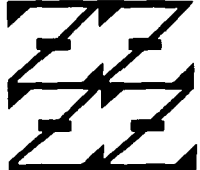
"DETERMINACION DE INMUNIDAD A MALARIA  
DURANTE LA REINFECCION CON UN  
PARASITO HETEROLOGO"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :  
MARIA LAURA VENTURA AYALA

U N A M  
F E S  
Z A R A G O Z A



LO HUMANO EJE  
DE NUESTRA REFLEXION

DIRECTORA: DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA

2002

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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.

# PAGINACION DISCONTINUA

## DEDICATORIA

*El presente trabajo lo dedico a mis papás: Roberto y Ventura, quienes en todo momento estuvieron conmigo y que gracias a su ejemplo de constancia, tenacidad y valor para enfrentar cualquier reto me han ayudado a forjar el camino en que ahora estoy.*

*A mis hermanas Sara, Ma. Félix y Gloria por brindarme su apoyo incondicional.*

*A la memoria de Gerardo, quien supo ser un gran amigo.*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Martha Legorreta Herrera, por haberme brindado la oportunidad de trabajar con ella.

Al CONACYT y la DGAPA por haber apoyado este trabajo con el número de proyecto: 34936-N y PAPIIT No. IN210100 respectivamente.

A la Sra. Elia y el Sr. Ricardo quienes con su valioso apoyo en el bioterio contribuyeron a la realización de este trabajo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# INDICE

Abreviaturas .....	iii
Resumen .....	V
1. Introducción .....	1
2. Generalidades de malaria	
2.1 Definición .....	2
2.2 Ciclo biológico .....	2
2.3 Incidencia de malaria en el mundo .....	5
2.4 Patogenia .....	6
2.5 Inmunidad a malaria .....	7
2.6 Inmunidad a estadios sanguíneos de malaria .....	8
2.7 Papel de las citocinas en malaria .....	9
3. Determinación de citocinas	
3.1 Análisis de citocinas .....	12
3.2 RT-PCR .....	12
4. Planteamiento del problema .....	15
5. Objetivos .....	17
6. Hipótesis .....	18
7. Material y métodos	
7.1 Material biológico .....	19
7.2 Material de laboratorio .....	19
7.3 Equipo .....	20
7.4 Reactivos .....	20
7.5 Metodología	
7.5.1 Inoculación de <i>P. chabaudi</i> AS (ratones inmunes) .....	23
7.5.2 Curva de parasitemia .....	23

7.5.3 Reinfeción con <i>Plasmodium</i> .....	24
7.5.4 Determinación de hemoglobina .....	24
7.5.5 Determinación de índice esplénico .....	24
7.5.6 Extracción de RNA .....	25
7.5.7 Reextracción de RNA .....	26
7.5.8 Lavado de RNA con etanol .....	26
7.5.9 Secado de RNA a temperatura ambiente .....	26
7.5.10 Hidratación y cuantificación de RNA.....	26
7.5.11 Retrotranscripción .....	27
7.5.12 Amplificación de los genes para citocinas por PCR .....	28
7.8.13 Electroforesis de los productos de PCR .....	30
8. Resultados .....	32
9. Discusión de resultados .....	46
10. Conclusiones .....	53
11. Anexos	
11.1 Soluciones .....	54
11.2 Glosario .....	58
12.Referencias .....	61

## Abreviaturas

Ag	Antígeno
APC	Célula presentadora de antígeno
APS	Persulfato de amonio
BFU-E	Unidad formadora de colonias en estallido
cDNA	DNA complementario
CFU-E	Unidad formadora de colonias eritroides
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Acido desoxirribonucleico
dNTP's	Desoxirribonucleótidos de trifosfato
dTT	Ditiotreitol
E	Eritrocitos
EP	Eritrocitos parasitados
Hb	Hemoglobina
IFN- $\gamma$	Interferon gama
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
iNOS	Oxido nítrico sintetasa inducible
i.v.	Intravenoso
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
M-MLVRT	Retrotranscriptasa del virus de leucemia murina Moloney
mRNA	RNA mensajero
NK	Natural killer
NO	Oxido nítrico
Oligo	Oligonucleótido
<i>P.</i>	<i>Plasmodium</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA	Acido ribonucleico
RPH	Royal Perth Hospital
RT-PCR	Retrotranscripción-PCR



SDS	Dodecilsulfato de sodio
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Amortiguador Tris-ácido bórico-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
Th	Células T cooperadoras
TNF	Factor de necrosis tumoral
TGF	Factor de crecimiento transformante

## RESUMEN.

La malaria sigue siendo una de las causas de morbilidad y mortalidad en el mundo, pues el desarrollo de una vacuna se ve impedido por la variabilidad antigénica que presentan los *Plasmodium* y la especificidad de la respuesta inmune para cada estadio (hepático y eritrocítico). Debido a ello, las últimas investigaciones se enfocan a estudiar la inmunidad celular más que humoral.

El presente trabajo fue enfocado en determinar la presencia de inmunidad cruzada a *Plasmodium yoelii* 17XL (letal), en ratones CBA/Ca inmunes a *Plasmodium chabaudi* AS (no letal), obteniéndose que si existe inmunidad cruzada puesto que los parámetros evaluados: anemia, pérdida de peso y parasitemias disminuyeron significativamente con respecto a una primera infección, además el incremento en el índice esplénico también confiere protección. La expresión de citocinas en el curso de la infección determinada por RT-PCR básicamente tiende hacia una respuesta proinflamatoria ya que IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e iNOS están incrementadas al principio de la infección y al mismo tiempo TGF- $\beta$  e -IL-4 quizá funcionen como inmunorregulatorias favoreciendo así el control de la infección e inflamación, conduciendo finalmente a la sobrevida de los ratones, por lo que la protección adquirida es de tipo inespecífica.

## 1. INTRODUCCION

La malaria es una enfermedad infecciosa transmitida por el mosquito *Anopheles* hembra y causada por diminutos parásitos protozoarios del género *Plasmodium* que infectan principalmente al hospedero humano y al insecto alternativamente. Se piensa que el hombre prehistórico debió haber sufrido de malaria, probablemente originada en Africa y acompañó las migraciones humanas a las orillas del Mediterráneo, a la India y al Asia Sur-Oriental. En la actualidad se calcula que aproximadamente 500 millones de personas adquieren malaria cada año, y se estiman dos y medio millones muertes, un millón de éstas en niños (Royal Perth Hospital, RPH Laboratory Medicine, 1998-2000: <http://www.rph.wa.gov.au/labs/haem/malaria/spain>).

La incidencia de malaria en el mundo va en aumento debido a la creciente resistencia por parte del mosquito a insecticidas (Legorreta y Sánchez, 1999) y el desarrollo de estrategias de resistencia por parte de los *Plasmodium* hacia los diferentes medicamentos empleados en el tratamiento (Hasting & D'Alessandro, 2000). Aunado a lo anterior la variación antigénica que presenta el parásito impide el desarrollo de una vacuna dirigida a un epítotope específico (Phillips *et al.* 1997; Ramasamy, 1998; Taylor-Robinson & Smith, 1999), por lo que básicamente las últimas investigaciones están encaminadas a estudiar la respuesta inmune celular, dejando a un lado la respuesta humoral, sin embargo tales investigaciones se realizan en infecciones primarias y en reinfecciones con un reto homólogo, aquí se presenta el análisis de una inmunidad cruzada utilizando un modelo murino inmune a un parásito no letal y reinfectado con un parásito letal, proponiendo que el tipo de respuesta es mediado por células más que por anticuerpos.

## 2. GENERALIDADES DE MALARIA

### 2.1 Definición.

La malaria, fiebre de los pantanos o paludismo es una parasitosis que se caracteriza por episodios febriles típicos de acuerdo a la especie de *Plasmodium* infectante, precedidos por escalofrío intenso terminando con diaforesis, además de existir hepatoesplenomegalia y anemia (Tay *et al.* 1995).

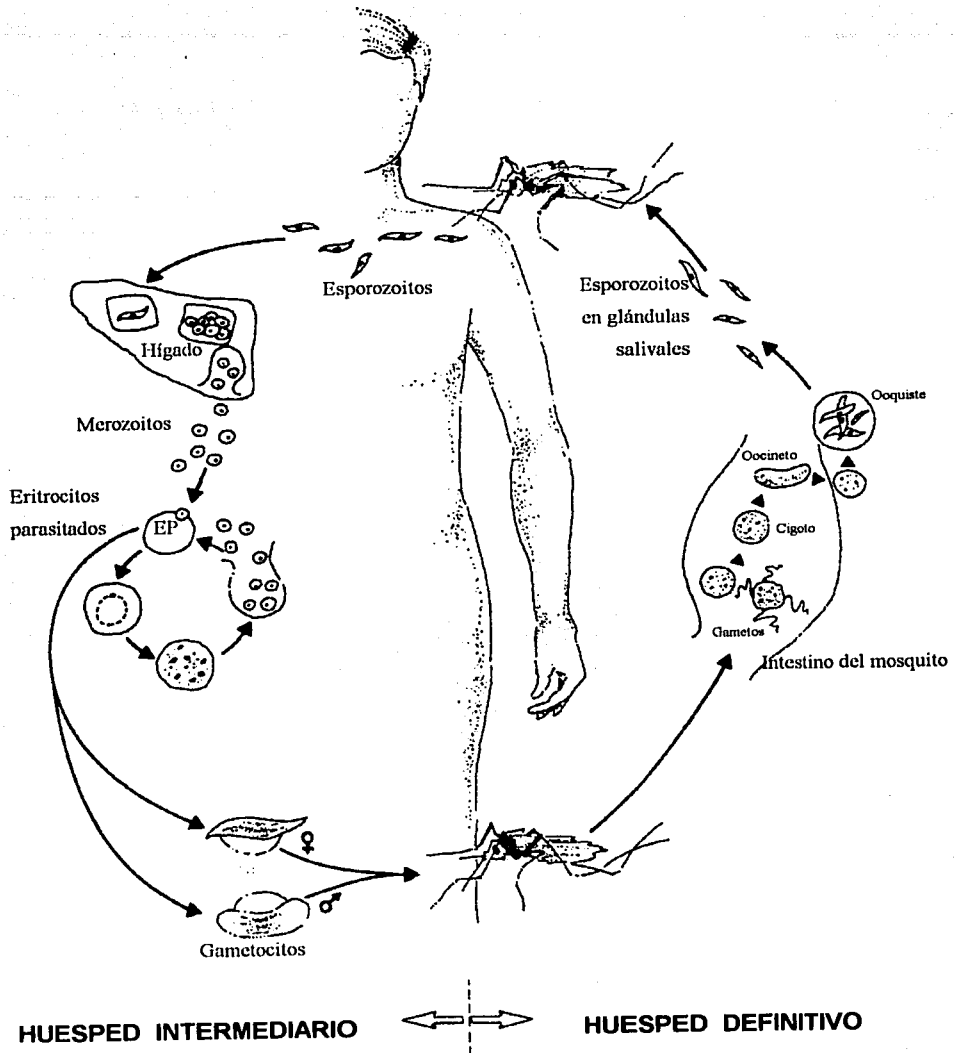
### 2.2 Ciclo biológico.

Existen cuatro especies de *Plasmodium* que infectan al hombre: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium ovale*, sin embargo no son las únicas en su género, ya que existen más especies que infectan a otros vertebrados (Greenwood, 1997).

La infección comienza a través de la picadura de mosquitos *Anopheles* hembras infectadas, las cuales inoculan las formas infectivas del parásito: esporozoitos, en el torrente sanguíneo del huésped y son liberados de la circulación dentro de 1 a 2 horas, invadiendo el parénquima hepático, en este momento se inicia el ciclo exoeritrocítico o preeritrocítico, donde las células hepáticas infectadas llegan a ser multinucleadas, generando así un esquizonte constituido por diversos merozoitos y después de 10 días sufren ruptura, descargando cada una 20,000 merozoitos exoeritrocíticos aproximadamente, los cuales invaden nuevamente células hepáticas o bien eritrocitos, dando lugar al ciclo eritrocítico (Cohen, 1984; Tay *et al.* 1995).

Al invadir el eritrocito, el merozoito crece, se redondea y le aparece una gran vacuola, por lo que el citoplasma y el gránulo de cromatina dan la apariencia de un anillo de sello o compromiso cuando se realiza una tinción de Giemsa, a este estadio se denomina trofozoito joven, el cual al sintetizar proteasas degrada la hemoglobina en aminoácidos para obtener nutrientes y desarrollarse a trofozoito maduro (en 15-18hrs) que se caracteriza por presentar un citoplasma voluminoso con pseudópodos grandes. El esquizonte es la fase posterior al trofozoito, donde

la cromatina se fragmenta generando los merozoitos eritrocíticos. Cuando el esquizonte madura el eritrocito se rompe y los merozoitos son liberados invadiendo eritrocitos no infectados, comenzando así un nuevo ciclo eritrocítico. Algunos merozoitos haploides se desarrollan en gametocitos (macrogametocitos ♀ ó microgametocitos ♂ ) dentro de los eritrocitos, los cuales sufren gametogénesis en el intestino del mosquito cuando son ingeridos, la fusión de gametos produce un cigoto diploide que sufre meiosis y se diferencia en un oocineto móvil. El oocineto se adelgaza y gracias a su movilidad atraviesa el epitelio del intestino llegando a la capa serosa y se convierte en ooquiste. En el ooquiste se forman miles de esporozoitos, los cuales al romperse la pared del mismo quedan libres y emigran hacia las glándulas salivales del mosquito para continuar el ciclo de la infección cuando son inoculados mientras se alimenta de sangre (Tay *et al.* 1995; Ramasamy, 1998; Good & Doolan, 1999), **Figura 1.**



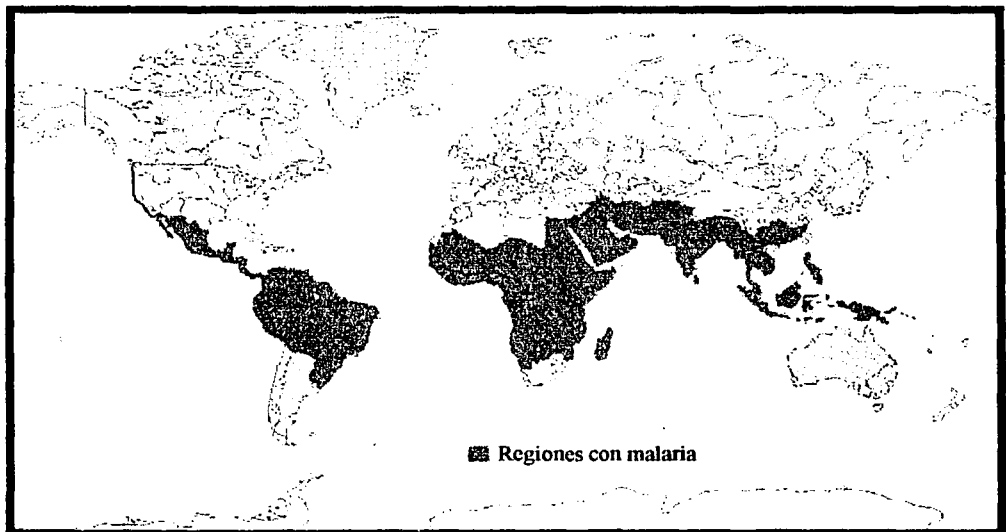
**Figura 1.** Ciclo biológico del parásito de malaria

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 2.3 Incidencia de malaria en el mundo.

La prevalencia de malaria en el mundo va en aumento debido a que las medidas tomadas en su control no han sido 100% efectivas por la resistencia que el vector presenta a los insecticidas utilizados, así como también a los mecanismos de resistencia que han desarrollado los *Plasmodium* a la quimioterapia utilizada. En la actualidad, se calcula que unos 500 millones de personas están expuestas a la malaria endémica en Africa, India, Asia Sur Oriental y América latina (**Figura 2**) y se estima que anualmente causa dos y medio millones de muertes, un millón de éstas en niños.

Otro factor que favorece la distribución de malaria es la llamada "malaria de aeropuerto", donde los mosquitos son transportados desde áreas endémicas o bien los viajeros adquieren malaria durante su estancia en tales sitios (RPH Laboratory Medicine, 1998-2000; <http://www.ncbi.nlm...>).



**Figura 2.** Distribución de malaria en el mundo

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 2.4 Patogenia.

La patología que caracteriza a la malaria es causada por el estadio eritrocítico. El paroxismo palúdico es desencadenado por la liberación de metabolitos contenidos en el eritrocito parasitado cuando ocurre su lisis. Estos metabolitos se han identificado como proteínas libres, termoestables y solubles denominadas toxinas de malaria las cuales estimulan la producción de TNF- $\alpha$ , por células T y macrófagos, las partes activas de estas toxinas se han caracterizado como moléculas tipo fosfatidilinositol-glicosiladas. TNF- $\alpha$ , a su vez induce la liberación de IL-1, pirógeno endógeno proveniente de macrófagos y fibroblastos (Tay *et al.* 1995; Rudin *et al.* 1997; Ramasamy, 1998).

El sistema reticuloendotelial, encargado de la eliminación por perlas de filtración reticular (Weiss, 1990) se activa por la ruptura de los eritrocitos infectados y la liberación intravascular de los parásitos, pigmento palúdico (hemozoina) y desechos celulares. El hígado y el bazo llevan la peor parte de la eliminación, ya que para deshacerse de estas partículas presentan hiperplasia de las células de Küpffer y macrófagos. Los macrófagos fijos de hígado y bazo fagocitan eritrocitos infectados e inclusive normales y muestran el pigmento palúdico ingerido. En infecciones crónicas o repetidas, especialmente el hígado y el bazo pero también otros órganos, adquieren un color grisáceo o negro debido a la acumulación de hemozoina (producto de la degradación de la hemoglobina) (Brow y Neva, 1985). Un estudio realizado en un modelo murino revela que la hemozoina en bazo persiste aún después de la eliminación del parásito, debiéndose quizá a que la hemozoina de otros tejidos e hígado pudiera migrar hasta este órgano aunado a que los ratones pudieran mantener parasitemias bajas y que más tarde estos parásitos contribuyan a la concentración de hemozoina encontrada (Levesque *et al.* 1999).

Sin duda, el mecanismo patogénico más importante en la malaria por *Plasmodium falciparum*, que a veces suele observarse con *Plasmodium vivax* y *Plasmodium malariae* es la gran adhesividad que muestran entre sí y con el endotelio vascular los eritrocitos parasitados (EP), esta complicación es característica en malaria



cerebral, donde se observa obstrucción de venas y capilares cerebrales con trofozoitos y esquizontes. Entre las moléculas de superficie del endotelio que regulan esta citoadherencia están: la trombospondinglicoproteína derivada de plaquetas, la molécula de adhesión intercelular 1 o ICAM-1, CD36, la selectina E, molécula de adhesión de célula vascular 1 o VCAM-1 y la condroitin sulfato A. Y, los ligandos correspondientes sobre la superficie de GRP son una familia de proteínas del parásito de 200-300Kda llamadas proteínas de membrana del eritrocito infectado con *Plasmodium falciparum* ó PfEMP-1. De acuerdo a esta citoadherencia se ha encontrado mayor número de EP secuestrados en diferentes órganos bajo el siguiente orden: cerebro > corazón > hígado > pulmón y riñones (Ramasamy, 1998). La citoadherencia es considerada como un mecanismo desarrollado por el parásito para evitar la circulación de trofozoitos y esquizontes a través de las perlas de circulación reticular del bazo, donde pueden ser atrapados y destruidos por acción combinada de citocinas de células T y fagocitos.

La anemia en malaria es multifactorial, involucra la destrucción y la producción disminuida de eritrocitos. La destrucción de eritrocitos (E) se ve favorecida por: la multiplicación intraeritrocítica de merozoitos que conduce a la ruptura de E, fagocitosis de EP, fagocitosis de E no parasitados debido a la unión de componentes del parásito en su superficie, la esplenomegalia también contribuye a la destrucción de E a través de su mecanismo de filtración de EP. La producción de E se ve afectada por la supresión de la síntesis de eritropoyetina, desbalance de citocinas (IL-10 disminuida) favoreciendo las citocinas inflamatorias y deseritropoyesis causada por TNF- $\alpha$  que inhibe la diferenciación de células progenitoras eritroides: BFU-E y CFU-E (Rudin *et al.* 1997; Menendez *et al.* 2000).

## **2.5 Inmunidad a malaria.**

La respuesta inmune a malaria es altamente compleja debido a los diferentes estadios del parásito, ya que para cada estadio existen antígenos específicos no compartidos, así la inmunidad comprende: a) respuesta humoral contra antígenos (Ag) de superficie del esporozoito para reducir la infección de hepatocitos infectados, b) respuesta celular contra estadios hepáticos para matar hepatocitos

infectados y reducir la subsecuente infección de eritrocitos, c) respuesta humoral contra Ags del estadio eritrocítico, d) respuesta celular para eliminar EP, éstos dos últimos tipos de respuesta generados para eliminar infecciones residuales y los síntomas de la enfermedad. Y, e) respuesta humoral contra Ags de gametocitos para reducir la transmisión (Leitner *et al.* 1997; Hommel & Barnish, 1998; Good & Doolan, 1999).

Aunado a las variantes de inmunidad descritas, está la variabilidad antigénica por la diversidad de especies, así como también la generación de nuevas variantes en las recrudescencias (Playfair *et al.* 1990; Phillips *et al.* 1997), lo cual impide tener un conocimiento detallado de la inmunidad y por consiguiente obstaculiza el desarrollo de una vacuna, ya que la protección no se lograría en un 100% debido a que no se cubre la gama de antígenos que presentan los *Plasmodios*.

## **2.6 Inmunidad a estadios sanguíneos de malaria.**

Dado que los estadios eritrocíticos de la infección están asociados con la patogenia de malaria, se hará énfasis en la respuesta inmune de esta fase. En respuesta a malaria durante la invasión de eritrocitos, el organismo desarrolla mecanismos humorales y mediados por células, donde las células T son esenciales en la inducción y regulación de esta inmunidad.

Así, la adquisición y mantenimiento de inmunidad protectora a malaria es dependiente de células T (Troyle-Blomberg, 1994), básicamente a través de células T CD4<sup>+</sup> o cooperadoras, Th (del inglés T helper), aunque se ha visto que las células T CD8<sup>+</sup> o citotóxicas también participan pero en menor grado (Podoba & Stevenson, 1991).

Las células T CD4<sup>+</sup> actúan durante la fase temprana o aguda de la infección regulando la rápida disminución en el pico de parasitemia a niveles bajos o crónicos subpatentes, vía mecanismos mediados por células e independientes de inmunoglobulinas; mientras que en la fase tardía actúan como cooperadoras en la producción de inmunoglobulinas IgG1 e IgE logrando resolver la infección crónica. De acuerdo a lo anterior y en base al tipo de citocinas producidas, las células TCD4<sup>+</sup> están constituidas por los subtipos Th1 o de tipo inflamatorio que producen

interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), factor de necrosis tumoral beta (TNF- $\beta$ ) e interleucina 2 (IL-2), predominando durante la fase temprana o aguda de la infección. Seguidas por la activación de células Th2, productoras de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 y aparecen en la fase tardía o crónica (Langhorne *et al.* 1989; Stevenson & Tam, 1993; Taylor & Phillips, 1993; Yap *et al.* 1994; Romagnani, 1997).

Las células Th1 y Th2 no derivan de líneas distintas, más bien se desarrollan del mismo precursor: las células Th0. Son el medio ambiente y factores genéticos los que influyen en la diferenciación Th1/Th2, quizá la predominancia de alguna citocina que estimula la respuesta Th. Así, la presencia temprana de IL-12 producida por células dendríticas e IFN- $\gamma$  de células NK (natural killer) favorecen el desarrollo de Th1; en tanto que IL-4 producida por células CD4<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> e IL-6 derivada de células presentadoras de antígeno APC (antigen presenting cell) estimulan la diferenciación a Th2 (Romagnani, 1997)

Diversos estudios establecen la importancia de la respuesta Th1 y Th2 en la resolución de malaria (Taylor-Robinson *et al.* 1993; Amante & Good, 1997; Winkler *et al.* 1998, 1999) ya que al activarse la células Th1 se producen una serie de citocinas en cascada, regulándose entre sí para disminuir el daño en el paciente e incrementar la eliminación del parásito. En la respuesta mediada por células no sólo actúan las linfocinas producidas por las células T, sino que también los macrófagos, las células dendríticas y las células NK por lo que existe una gamma de citocinas que caracterizan este tipo de respuesta.

## **2.7 Papel de las citocinas en malaria.**

Las citocinas son proteínas secretadas por células linfoides y no linfoides que ejercen efectos específicos en células diana (Meager, 1991). Inmunológicamente podemos definir las citocinas como proteínas secretadas por células de inmunidad innata y adquirida que regulan muchas de las funciones de estas células. Las citocinas son producidas en respuesta a microorganismos y otros antígenos y estimulan diversas respuestas de células involucradas en la inmunidad e inflamación. Entre las propiedades que tienen las citocinas tenemos que: su secreción es un evento corto y redundante, intervienen en la síntesis y actividad de otras citocinas, su

acción puede ser local y sistémica, se unen a receptores específicos de membrana en sus células diana, la expresión de sus receptores es regulada por señales externas y, la respuesta de las células diana consiste de cambios en la expresión de genes resultando en la expresión de nuevas funciones y algunas veces en la proliferación de las células diana (Abbas *et al.* 2000).

El curso de la infección por malaria es caracterizado por una interacción compleja de la respuesta inmune del huésped y estrategias de sobrevivencia del parásito. La fase temprana de la respuesta inflamatoria a malaria es iniciada por células  $T\gamma\delta$ , células NK y células  $CD14^+$  que producen  $IFN-\gamma$  y  $TNF-\alpha$  en respuesta a EP (Morris *et al.* 1996; Hensmann & Kwiatkowski, 2001) promoviendo una activación temprana de macrófagos. La subsecuente producción de IL-12, producida por monocitos-macrófagos tiene efectos pleiotrópicos como molécula inmunorregulatoria, induce la diferenciación de células  $TCD4^+$  en células Th1 y promueve la producción de  $IFN-\gamma$  y  $TNF-\alpha$  por éstas células y por NK (Stevenson *et al.* 1995, 2001). Las células Th1 producen IL-2,  $IFN-\gamma$  y  $TNF-\beta$ , también conocido como linfotóxina  $\alpha$  (LT- $\alpha$ , linfoxin alpha) a través de los cuales se activan macrófagos con actividad microbicida y regulan ciertos tipos de inmunoglobulinas: IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgM (Favre *et al.* 1997; Taylor & Smith, 1999).

$IFN-\gamma$  es considerado un importante regulador en la defensa del huésped en la respuesta mediada por células ya que activa macrófagos, conduciendo al control y eliminación de parásitos intraeritrocíticos (Stevenson *et al.* 1990). Los macrófagos activados incrementan su actividad fagocítica, la producción de intermediarios reactivos de oxígeno ( $H_2O_2$ , radicales superóxido), óxido nítrico (NO) a partir de L-arginina mediante la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) generándose especies reactivas de nitrógeno (iones nitrito, nitrato y radicales peroxinitrito y nitrito), también producen  $TNF-\alpha$  que regula la fagocitosis por monocitos y neutrófilos mediante la opsonización de EP, considerado un pirógeno endógeno con papel protector capaz de reducir la densidad de parásitos e induce la producción de intermediarios reactivos de nitrógeno. (Long, 1993; Kumaratilake & Ferrante, 1994; Fell & Smith, 1998; Riley, 1999; Muniz-Junqueira *et al.* 2001).

A pesar de que TNF- $\alpha$  y NO tienen un papel importante en la protección contra los *Plamodios* deben ser altamente regulados debido a que en altas concentraciones contribuyen a la gravedad de la enfermedad. Así, el NO produce deseritropoyesis generando por consecuencia anemia. TNF- $\alpha$  ha sido asociado con anemia y pérdida de peso debido a que es considerado un inductor de caquexia, también favorece la expresión de moléculas de adhesión endotelial en el cerebro durante la malaria cerebral (Roquett *et al.* 1994; Cross & Langhorne, 1998; Riley, 1999).

La respuesta inflamatoria generada al inicio de la infección, alcanza su máxima expresión en el pico de la parasitemia y después es regulada por IL-4, IL-10 y TGF- $\beta$ , esto es, cuando existe un cambio hacia el tipo celular Th2. Al activarse las células Th2 producen IL-4 que induce la maduración de células B a células plasmáticas productoras de anticuerpos del tipo IgG1 e IgE y favorece el crecimiento de células Th2 (Langhorne, 1994; Troyle-Blomberg, 1994; Fell & Smith, 1998). IL-10 es sintetizada por las células B Ly1<sup>+</sup>, las células cebadas y bajo ciertas condiciones por macrófagos, suprime la producción de citocinas por células Th1, inhibe la actividad microbicida de macrófagos activados por IFN- $\gamma$  suprimiendo la vía dependiente de arginina mediante la cual se produce NO, inhibe la producción de IFN- $\gamma$  por células NK, bloquea la producción de TNF- $\alpha$ , estimula la proliferación de células progenitoras de eritrocitos evitando con ello el desarrollo de anemia severa (Ostwal *et al.* 1992; Kurtzhals *et al.* 1998). Finalmente, TGF- $\beta$  (transforming growth factor beta) es una citocina inmunorregulatoria producida por una diversidad de células, incluyendo macrófagos, células T, células NK y células B; en concentraciones bajas actúa como citocina inflamatoria, teniendo la capacidad de reclutar monocitos, células T y neutrófilos al sitio de inflamación temprano; en concentraciones altas funciona como antiinflamatoria suprimiendo la producción de TNF- $\alpha$  y NO de macrófagos, inhibe la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  de las células NK y antagoniza la regulación de los antígenos de MHC clase II estimulada por IFN- $\gamma$ . IL-10, IL-4 y TGF- $\beta$  sinergizan para inhibir la activación de macrófagos (Taylor-Robinson & Smith, 1999; Omer *et al.* 2000).

### 3. DETERMINACION DE CITOCINAS

#### 3.1 Análisis de citocinas.

El análisis de citocinas en laboratorio puede realizarse mediante bioanálisis, inmunoanálisis o RT-PCR, éste último utilizado para el desarrollo de este trabajo.

El bioanálisis proporciona una medida de la citocina biológicamente activa, para ello utiliza animales vivos o bien líneas celulares en los cuales se mide la respuesta inducida por una citocina en particular, las desventajas que presenta son: la mayor inversión de tiempo, el alto costo por las técnicas de cultivo celular empleadas, riesgo de contaminación y, la variabilidad en la actividad de las citocinas en diferentes sistemas (Thorpe *et al.* 1993).

El inmunoanálisis evalúa la citocina biológicamente activa e inactiva, es más fácil y rápida de realizar que el bioanálisis. Los inmunoanálisis más realizados son radioinmunoanálisis (RIA) y análisis inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), la desventaja que presenta es que no detecta: citocinas en presencia de receptores solubles y citocinas unidas a proteínas (Mire-Sluis *et al.* 1995).

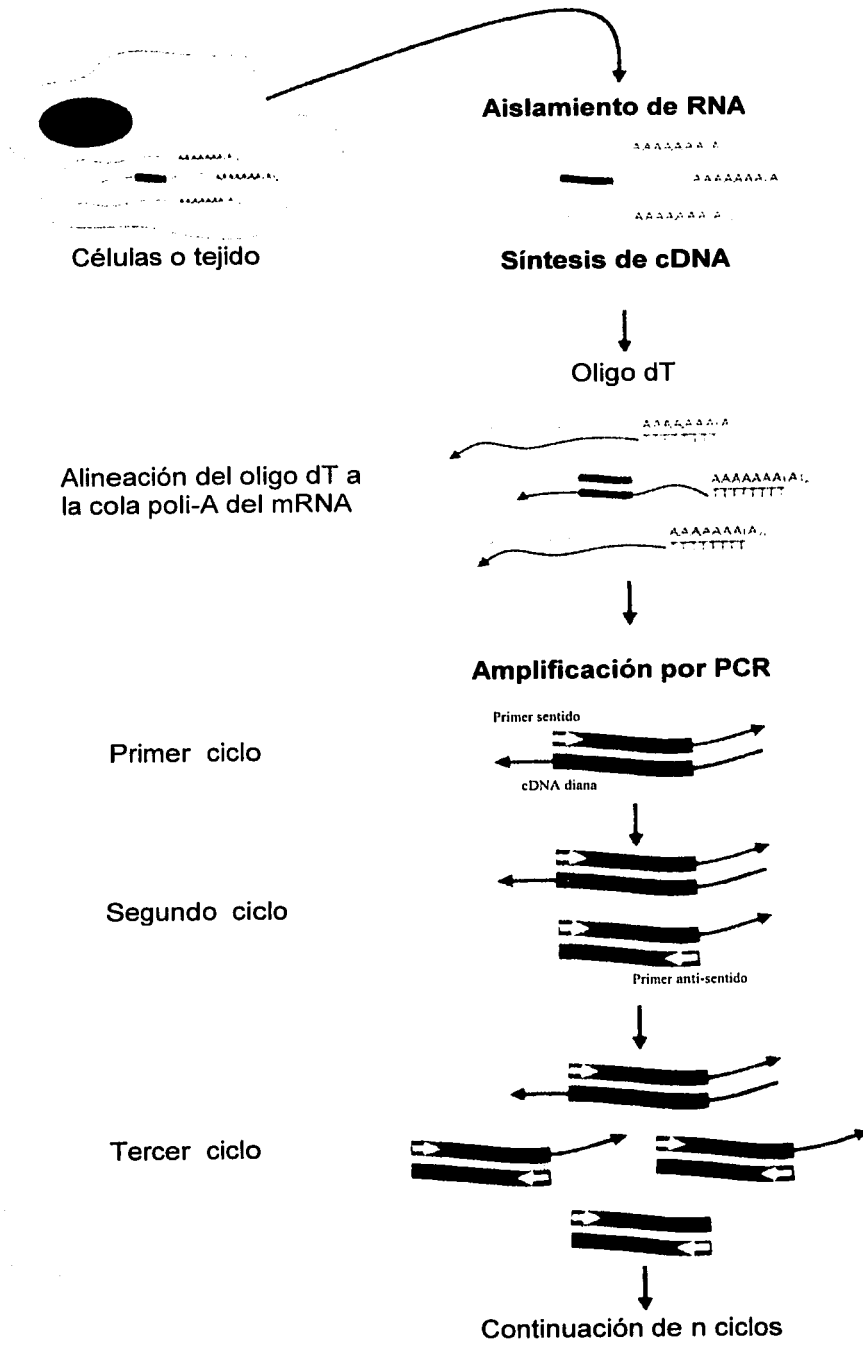
En RT-PCR se analiza la expresión de citocinas a partir de mRNA. Es altamente sensible, ya que identifica pequeños cambios en la expresión de genes que serían indetectables por los métodos anteriores. El único inconveniente que presenta es el cuidado extremo en la manipulación del RNA para evitar su degradación por RNAsas (Gause & Adamovicz, 1995).

#### 3.2 RT-PCR (Retrotranscripción-Reacción en Cadena de la Polimerasa).

Es una técnica que utiliza PCR en conjunto con la transcripción reversa, es de gran utilidad para estudiar los cambios en la expresión de genes a nivel de mRNA. En este método, el RNA total se aísla de células o tejidos y el mRNA se transforma en un cDNA utilizando: dNTP's, oligo dT y una transcriptasa reversa. El cDNA se usa como molde para amplificar la secuencia de interés por PCR (Gause & Adamovicz, 1995), **Figura 3.**

PCR es un método enzimático para elaborar múltiples copias de un segmento preseleccionado de DNA, requiere un DNA molde, dNTP's, una DNA polimerasa y

dos oligonucleótidos sintéticos (Kocher & Wilson, 1994). El proceso de PCR incluye tres pasos en un ciclo: desnaturalización, alineación y polimerización o síntesis. Brevemente, en la desnaturalización existe una separación de las hebras de DNA a una temperatura aproximada de 94°C. En la alineación, realizada a una temperatura  $\approx 55^\circ\text{C}$  los oligonucleótidos, cebadores o primers se alinean en forma complementaria a la hebra molde de DNA comenzando por el extremo 3', en este paso los oligonucleótidos actúan como iniciadores para la *Taq* polimerasa. La polimerización realizada a una temperatura  $\approx 72^\circ\text{C}$  es el paso final del ciclo de PCR donde la temperatura de reacción se ajusta a la óptima para la actividad de la polimerasa, durante este paso la *Taq* polimerasa incorpora nucleótidos en la hebra de DNA naciente en la región especificada por el oligonucleótido alineado. La realización de n ciclos da una acumulación exponencial del gen especificado (Eeles & Stamps, 1994).



TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

**Figura 3.** Representación esquemática de RT-PCR.



#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Básicamente, el desarrollo de vacunas contra malaria ha sido enfocado a los diferentes antígenos que el parásito presenta tanto en el estadio hepático como en el estadio eritrocítico sin embargo, el problema actual de encontrar una vacuna es la variabilidad antigénica que el parásito presenta durante las recrudescencias (en el huésped) y recombinación genética (en el vector); por ello las últimas investigaciones han sido enfocadas en el estudio de los mecanismos celulares involucrados en la respuesta contra malaria, no obstante se realizan en infecciones primarias y reinfecciones con el parásito homólogo.

En el presente trabajo se planteó la posibilidad de inmunidad cruzada de tipo celular, utilizando un modelo murino con ratones CBA/Ca machos, inmunes a *Plasmodium chabaudi* AS (no letal) y re infectados con *Plasmodium yoelii* 17XL (letal), estos parásitos son específicos de ratones. Los resultados obtenidos contribuirán a posteriores investigaciones encaminadas a: a) el desarrollo de nuevas medidas terapéuticas enfocadas a incrementar la respuesta Th1/Th2, y b) el estudio de la modificación en la inmunidad cuando la infección es tratada con fármacos antipalúdicos.

Durante el curso de la infección se evaluaron diferentes parámetros de enfermedad: pérdida de peso, anemia, así como también las curvas de parasitemia, índice esplénico y la expresión de citocinas a nivel de mRNA utilizando la técnica RT-PCR, ésta técnica es más sensible que ELISA o el bioensayo, ya que las citocinas son lábiles y por tanto la concentración determinada en suero no es la que realmente se está produciendo. Las citocinas evaluadas fueron: tipo Th1 (IFN- $\gamma$ ), tipo Th2 (IL-4), además iNOS, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ .

Para poder demostrar si existía o no protección, los parámetros anteriores se evaluaron en diferentes grupos de ratones:

- a. Retados por primera vez, ya sea con *Plasmodium chabaudi* AS, *Plasmodium yoelii* 17XL o la Mezcla (*Plasmodium chabaudi* AS-*Plasmodium yoelii* 17XL).
- b. Ratones inmunes a *Plasmodium chabaudi* AS y reinfectados con *Plasmodium chabaudi* AS, *Plasmodium yoelii* 17XL o la Mezcla.

El haber introducido el grupo infectado con la mezcla en este trabajo, fue con la finalidad de analizar la respuesta inmune cuando existe más de una especie de parásito, considerando que en áreas endémicas las personas son infectadas por mas de una especie de *Plasmodium*.

## 5. OBJETIVOS.

### OBJETIVO GENERAL:



Analizar la inmunidad Th1/Th2 en ratones CBA/Ca inmunes a *P. chabaudi* AS y reinfectedos con *Plasmodium yoelii* 17XL.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS:



Realizar curvas de parasitemia de ratones CBA/Ca reinfectedos con: *P. chabaudi* AS, *P. yoelii* 17XL o la mezcla.



Elaborar gráficos de pérdida de peso corporal en los ratones reinfectedos.



Determinar el índice esplénico en los ratones reinfectedos.



Extraer el RNA total de bazo para realizar retrotranscripción.



Amplificar por PCR los genes que codifican para:  $\beta$ -actina, IFN- $\gamma$ , iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-4 y TGF- $\beta$ , a partir del cDNA.



Determinar el peso molecular de los productos de PCR por comparación del corrimiento electroforético con marcadores de peso molecular comerciales.

## **6. HIPOTESIS**

"Si la infección con *Plasmodium chabaudi* AS es resuelta en ratones CBA/Ca, entonces al sufrir una reinfección con el parásito heterólogo *Plasmodium yoelii* 17XL estarán protegidos a través de una inmunidad cruzada de tipo celular".

## 7. MATERIAL Y METODOS.

### 7.1 MATERIAL BIOLÓGICO.

1. 84 ratones CBA/Ca machos, de 6-8 semanas de edad.
2. Eritrocitos parasitados de ratón (EP) con *Plasmodium chabaudi* AS, criopreservados.
3. EP con *Plasmodium yoelii* 17XL criopreservados.
4. Suero normal de ratón CBA/Ca

### 7.2 MATERIAL DE LABORATORIO

1. Algodón
2. Cajas Petri de 10cm de diámetro, de plástico, nuevas y estériles.
3. Cubrebocas
4. Gorros y botas para trabajar en áreas limpias.
5. Gradillas para tubos eppendorf
6. Gradillas para tubos falcon
7. Guantes de hule latex.
8. Jeringas de insulina nuevas y estériles.
9. Malla de acero inoxidable nueva y estéril.
10. Pinzas de disección.
11. Pipetas Pasteur de vidrio.
12. Pipeta de Sahli.
13. Portaobjetos.
14. Puntas para micropipetas: 2.5 $\mu$ l, 10 $\mu$ l, 250 $\mu$ l, 1000 $\mu$ l, nuevas y estériles (libres de nucleasas).
15. Tijeras de disección.
16. Tubos eppendorf: 1.5ml, 650 $\mu$ l, 250 $\mu$ l, nuevos y estériles (libres de nucleasas).
17. Tubos falcon: 15ml, 50ml, nuevos y estériles.

### **7.3 EQUIPO.**

1. Agitador, Scientific Industries, INC.
2. Balanza analítica, Mettler H80.
3. Balanza granataria, Ohaus.
4. Cámara de electroforesis BIO-RAD, PROTEAN II xi Cell, 16cm.
5. Campana de flujo laminar, Veco.
6. Centrifuga clínica SOL-BAT.
7. Congelador, Nieto.
8. Equipo analizador de geles: Gel Doc 1000, BIO-RAD.
9. Espectrofotómetro UV, WPA.
10. Microcentrifuga, Eppendorf 5415C.
11. Micropipetas Eppendorf: 2.5 $\mu$ l, 10 $\mu$ l, 20 $\mu$ l, 100 $\mu$ l, 1000 $\mu$ l.
12. Micropipetas Gilson: p20, p200, p1000.
13. Microscopio óptico, Carl Zeiss estándar 25.
14. Refrigerador, MayTag.
15. Tanque de nitrógeno líquido, 34XT, Taylor-Wharton.
16. Termociclador, Eppendorf.
17. Termociclador, MJ Research.
18. Vortex Genie 2, Daigger.

### **7.4 REACTIVOS.**

1. Aceite mineral, Sigma
2. Acetato de sodio, Sigma
3. Acido bórico, Sigma
4. Acrilamida, USB/Amersham
5. Agua bidestilada, Hidropura
6. Albúmina sérica bovina, Sigma
7. Amortiguador para retrotranscripción 5X (5X first strand buffer), Gibco BRL.
8. Azul de bromofenol, Sigma
9. Bis acrilamida, Sigma
10. Bromuro de etidio, Sigma

11. Citrato de sodio, Sigma
  12. Cloroformo, Burdick-Jackson
  13. Cloruro de magnesio, Sigma
  14. Cloruro de potasio, USB/Amersham
  15. Cloruro de sodio, USB/Amersham
  16. Colorante de Giemsa, Sigma
  17. Dietilpirocarbonato, Sigma
  18. dNTP's (desoxirribonucleótidos de trifosfato), Pharmacia
  19. Ditiotreititol (dT) Gibco BRL
  20. EDTA, Sigma
  21. Etanol absoluto, Merck
  22. Eter, JT Backer
  23. Fenol ácido, Sigma
  24. Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), USB/Amersham
  25. Fosfato de sodio monobásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), USB/Amersham
  26. Gelatina, Sigma
  27. Glicol, Sigma
  28. Heparina de sodio, Sigma
  29. Inhibidor de RNA'sa, Gibco BRL
  30. Marcador de peso molecular 120pb, Gibco BRL
  31. M-MLV RT (retrotranscriptasa del virus de leucemia murina moloney),  
Gibco BRL
  32. 2-mercaptoetanol, Sigma
  33. Metanol, JT Backer
  34. Oligo (dT)<sub>12-18</sub>, Gibco BRL
  35. Persulfato de amonio, Sigma
  36. Primers u oligos para los genes:  $\beta$ -actina, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , iNOS, IL-4,  
Gibco BRL
- $\beta$ -actina
- 3' CTC TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC
- 5' GTG GGC CGC TCT AGG CAC CAA

IFN- $\gamma$

3' TGG ACC TGT GGG TTG TTG ACC TCA TTG GC

5' TGC ATC TTG GCT TTG CAG CTC TTC CTC ATG

TNF- $\alpha$

3' CCA AAG TAG ACC TGC CCG GAC TC

5' ATG AGC ACA GAA AGC ATG ATC CGC

TGF- $\beta$

3' GAC CGC AAC AAC GCC ATC TA

5' GGC GTA TCA GTG GGG GTC AG

iNOS

3' CAG GAT GCT CTG AAC GTA GAC CTT G

5' CAG CTC CAC AAG CTG GCT CG

IL-4

3' CAG TGA TGT GGA CTT GGA CTC ATT CAT GGT

5' CCA GCT AGT TGT CAT CCT GCT CTT CTT TCT

37. Sacarosa, Sigma

38. Sarcosil, Sigma

39. SDS (Dodecilsulfato de sodio), Sigma

40. Taq polimerasa (AmpliTaq DNA polimerase), Perkin Elmer

41. TEMED, Sigma

42. Tiocianato de guanidinio, Sigma

43. Tris base, Sigma

44. Xilencianol, Sigma



## 7.5 METODOLOGIA

### 7.5.1 INOCULACION DE *Plasmodium chabaudi* AS (RATONES INMUNES).

1. Se realizó la infección de 34 ratones CBA/Ca machos por inoculación intravenosa (i.v.) de  $5 \times 10^4$  eritrocitos parasitados (EP) de *Plasmodium chabaudi* AS, obtenidos de un ratón donador inoculado previamente con EP criopreservados (cuya parasitemia fue de 38%).
2. Se monitorearon las parasitemias de todos los ratones por examen microscópico, realizando frotis con sangre de la cola y tiñendo con el colorante de Giemsa.
3. La lectura de las parasitemias se realizó con un microscopio óptico, utilizando el objetivo 100X y de acuerdo a los siguientes criterios:
4. Cuando existían menos de 2 EP por campo, se leyeron 50 campos.
5. Cuando existían 2 o más EP por campo, se contaron 200 eritrocitos (incluyendo en este número los EP).
6. Cuando las lecturas de las parasitemias se tornaron negativas, los ratones se mantuvieron en reposo durante 2 meses, ello con la finalidad de que se recuperaran completamente de la infección.

**NOTA** Es importante mencionar que los ratones fueron mantenidos bajo condiciones libres de patógenos, es decir, en el bioterio y en un cuarto limpio, con agua, jaulas y aserrín estériles. Además de ser alimentados con Harlan TD9936, especial para ratones infectados con *Plasmodium*.

### 7.5.2 CURVA DE PARASITEMIA.

1. Se calculó el porcentaje de parasitemia en cada ratón.
2. Se obtuvo la media geométrica del % de parasitemia registrada.
3. Se realizó la curva de parasitemia en escala logarítmica.

### 7.5.3 REINFECCION CON *Plasmodium*.

1. Se distribuyeron los ratones inmunes en tres grupos, de tal forma que el primero estaba constituido por 8 ratones, es segundo por 18 y el tercero por 8.
2. Se etiquetaron las jaulas para identificar el tipo de infección en cada grupo.
3. Se inocularon i.v.  $5 \times 10^4$  EP de *Plasmodium chabaudi* AS en el primer grupo.
4. Se inocularon i.v.  $5 \times 10^4$  EP de *Plasmodium yoelii* 17XL en el segundo grupo.
5. Se inocularon i.v.  $10 \times 10^4$  EP de la Mezcla: *Plasmodium chabaudi* AS-*Plasmodium yoelii* 17XL.
6. Se anexaron otros tres grupos de ratones normales: el primero con 16, el segundo con 18 y el tercero con 16. Se etiquetó cada jaula para identificarlos.
7. Se repitieron los pasos 3-5 para estos últimos grupos de ratones.
8. Se monitorearon las parasitemias de todos los ratones y se registró su peso.
9. Se realizaron curvas de parasitemias y de pérdida de peso.

### 7.5.4 DETERMINACION DE HEMOGLOBINA.

1. Se tomó  $1 \mu\text{l}$  de sangre (de la cola) y se adicionó en  $250 \mu\text{l}$  de reactivo de Drabkin (dilución 1:251).
2. Se agitó vigorosamente para lograr una lisis completa.
3. Se leyó la absorbancia a  $540 \text{nm}$ .
4. Se registró la concentración de hemoglobina mostrada en el espectrofotómetro UV, WPA, determinada en base a la curva patrón previamente realizada.
5. Se realizaron las curvas de hemoglobina en el curso de la infección.

### 7.5.5 DETERMINACION DE INDICE ESPLENICO.

1. Se registró el peso del ratón al cual se le determinó el índice esplénico.
2. Se sacrificó el ratón en una cámara de éter.
3. Se humedeció la parte abdominal con etanol al 70% se extrajo el bazo y se pesó.
4. Se realizaron los cálculos correspondientes de la siguiente forma:

$$\text{Indice esplénico} = \frac{\text{Peso del bazo}}{\text{Peso del ratón}}$$

5. Se realizaron las curvas de índice esplénico durante el curso de la infección.

### **7.5.6 EXTRACCION DE RNA.**

1. Se sacrificó el ratón en una cámara de éter y posteriormente se obtuvo el RNA.
2. Se humedeció la parte abdominal con etanol al 70% (para evitar el desprendimiento de pelo), y se procedió a la extracción del bazo, procurando obtenerlo lo más íntegro y limpio posible (sin grasa y evitando el rompimiento de vasos sanguíneos).
3. Se maceró el bazo con el émbolo de una jeringa de insulina (nueva y estéril) pasándolo a través de una malla de acero inoxidable y enjuagando con PBS libre de calcio y magnesio, llevando a un volumen de 5ml.

**NOTA.** Cuando se realizaba la extracción de RNA, se sacrificaba a más de un ratón, por lo que después de macerar el bazo, la suspensión se mantenía en hielo para inhibir la actividad de RNAsas.

4. Se centrifugó a 1000rpm durante 5min.
5. Se desechó el sobrenadante y el botón formado se desprendió agitando vigorosamente.
6. A la suspensión de tejido obtenida se adicionaron 500µl de amortiguador de lisis y se agitó vigorosamente.

**NOTA.** Las muestras pueden almacenarse a -20°C en este punto y continuar la extracción al día siguiente.

7. En un tubo eppendorf se colocaron 500µl del lisado y se adicionó:
  - a) 50µl de acetato de sodio 3M, se mezcló por 30seg.
  - b) 500µl de fenol ácido (saturado con agua), se mezcló por 30seg.
  - c) 100µl de cloroformo, se mezcló por 1min.
8. Se colocó en hielo durante 15min y se agitó cada 5min.
9. Se centrifugó a 14,000rpm por 15min.
10. Se pasó la fase acuosa a otro tubo (superior).
11. Como la fase acuosa estaba turbia se realizó una reextracción.

### **7.5.7 REEXTRACCIÓN DE RNA.**

1. A la fase acuosa obtenida se adicionó:
  - a) 500 $\mu$ l de fenol ácido, se mezcló por 30seg.
  - b) 100 $\mu$ l de cloroformo, se mezcló por 1min.
2. Se colocó en hielo durante 15min y se agitó cada 5min.
3. Se centrifugó a 14,000rpm por 15min.
4. Se pasó la fase acuosa a otro tubo (superior), **EVITANDO LA INTERFASE.**
5. Se adicionaron 500 $\mu$ l de isopropanol y se guardó en el congelador (-20°C) hasta su uso.

### **7.8.8 LAVADO DE RNA CON ETANOL.**

1. Se centrifugaron las muestras de RNA que contenían isopropanol a 14,000rpm durante 15min.
2. Se descartó el sobrenadante con una micropipeta, teniendo cuidado de no tocar el botón.
3. Se adicionaron 800 $\mu$ l de etanol al 80% en agua DEPC y se agitó suavemente.
4. Se guardó en el congelador (-20°C) durante 24 horas.

### **7.8.9 SECADO DE RNA A TEMPERATURA AMBIENTE.**

1. Se centrifugaron las muestras que contenían etanol al 80% a 14,000rpm durante 15 min.
2. Se descartó el sobrenadante con una micropipeta, teniendo cuidado de no tocar el botón.
3. Se destaparon los tubos y se cubrieron con parafilm, posteriormente se realizaron pequeños orificios con una aguja (limpia y estéril).
4. Se colocaron los tubos en un lugar limpio y a temperatura ambiente, permitiendo que se secan durante 24 horas.

### **7.8.10 HIDRATACION Y CUANTIFICACION DE RNA.**

1. Se hidrataron las muestras adicionando a cada tubo con RNA seco 20 $\mu$ l de agua DEPC al 0.1% estéril.

2. Se agitó durante 5min. Como la hidratación no era completa, se mantuvieron las muestras en refrigeración (4°C) de 1-2 horas, agitando en vortex cada 30min.
3. Se centrifugó a 14,000rpm durante 5seg.
4. Para determinar la concentración de la solución de RNA, se realizó una dilución 1:400, y se leyó la absorbancia a 260nm.

**NOTA.** La dilución 1:400 se realizó colocando 399µl de agua DEPC estéril + 1µl de la solución de RNA.

5. Se realizaron los cálculos correspondientes para determinar la concentración en µg/µl, considerando el factor de dilución (Sambrook&Firtsch, 1989).

$$[\text{RNA}] = \text{Abs}_{260\text{nm}} \times \frac{40\mu\text{g}}{1000\mu\text{l}} \times 400 = \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Donde:

$\text{Abs}_{260\text{nm}}$  = Absorbancia de la dilución a 260nm

$\frac{40\mu\text{g}}{1000\mu\text{l}}$  = Concentración de RNA cuando la absorbancia $_{260\text{nm}} = 1$

400 = Factor de dilución.

### 7.8.11 RETROTRANSCRIPCION.

1. De acuerdo a la concentración de RNA obtenida, se determinó el volumen de la solución de RNA necesario para tomar 1.5µg de RNA, requerido para la retrotranscripción.
2. Se determinó el volumen de agua DEPC requerido para la retrotranscripción, considerando que el volumen final es de 10µl:
 
$$\text{Vol RNA} + 1.5\mu\text{l oligo dT} + \text{Agua DEPC} = 10\mu\text{l}$$
3. En un tubo eppendorf se colocó: agua DEPC, el oligo dT y el RNA de acuerdo a los cálculos realizados.
4. Se incubó a 65°C por 10min, utilizando el termociclador.
5. Se colocó en hielo durante 5min y se centrifugó a 14,000rpm durante 5seg.

6. Se volvió a colocar en hielo y se adicionaron 10 $\mu$ l de la mezcla de retrotranscripción, **Tabla 1**.

**Tabla1.** Preparación de la mezcla de retrotranscripción

	1 Rx
Amortiguador de retrotranscripción 5X	4.0 $\mu$ l
0.1M dTT	2.0 $\mu$ l
5mM dNTP's	2.0 $\mu$ l
Enzima M-MLV RT	1.0 $\mu$ l
Inhibidor de RNAsa	0.1 $\mu$ l
Agua DEPC	1.0 $\mu$ l
Volumen final	10.1 $\mu$ l

7. Se incubó a 37°C por 1 hora, empleando el termociclador.
8. Se incubó a 95°C por 5min.
9. Se colocó en hielo durante 5min y se centrifugó a 14,000rpm durante 5seg.
10. Se adicionaron 70 $\mu$ l de agua DEPC y se guardó en el congelador (-20°C) hasta su uso. El producto obtenido se denomina cDNA (DNA complementario).

#### **7.8.12 AMPLIFICACION DE LOS GENES PARA CITOCINAS POR PCR.**

1. Se etiquetaron los tubos (fecha, número de tubo y tipo de citocina).
2. Se calcularon las cantidades de cada reactivo para el número de tubos utilizados.
3. Se preparó la mezcla de reacción como se muestra en la **Tabla 2**, considerando que el volumen final en un tubo de reacción debe ser de 20 $\mu$ l.  
**Todos los reactivos y la mezcla de reacción deben mantenerse en hielo.**

**Tabla 2.** Características y preparación de la mezcla para PCR en un tubo de reacción.

Stock	Reactivo	[ ]/Rx	μl/Rx
10X	Amortiguador de PCR	1X	2.0μl
5mM	dNTP's	0.2mM	0.8μl
20μM	Oligo β-actina	0.1μM	0.1μl
20μM	***Oligos	0.1μM	0.1μl
5 <sup>U</sup> /μl	Taq DNA pol	0.5U	0.1μl
	Agua para PCR		11.9μl
Volumen final			15.0μl

\*\*\*De acuerdo al gen amplificado se colocó el oligonucleotido correspondiente

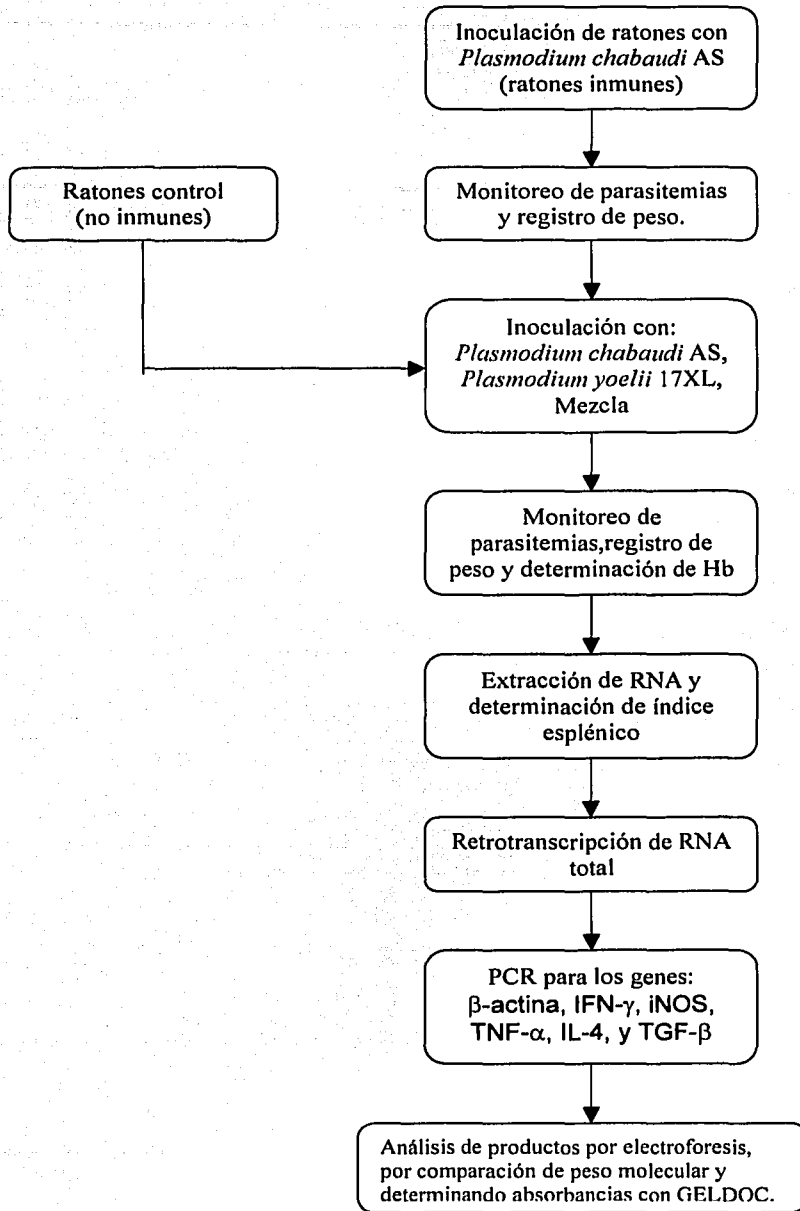
4. Se mezcló en vortex y se distribuyó en cada tubo 15μl de la mezcla de reacción.
5. Se adicionaron 50μl de aceite mineral en cada tubo con la mezcla de reacción.
6. Se depositaron 5μl de cDNA o retrotranscrito, atravesando la capa de aceite y sin agitar. **Para evitar la formación de aerosoles y por consecuencia la contaminación con cDNA. Hasta este paso deben mantenerse en hielo los tubos.**
7. Se colocaron los tubos en el termociclador cuando éste tenía 94°C y se corrió el siguiente programa:
  1. 94°C por 6 minutos
  2. 55°C por 2 minutos
  3. 72°C por 2 minutos
  4. 94°C por 45 segundos
  5. Se repitió 30 veces del paso 2-4
  6. 55°C por 2 minutos
  7. 72°C por 7 minutos
  8. 20°C 1hora
  9. Fin
8. Se guardaron los productos de PCR en refrigeración (4°C) hasta su uso.

### **7.8.13 ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS DE PCR.**

1. Se prepararon geles de acrilamida al 5% en TBE 1X.
2. Se adicionó a cada muestra 10 $\mu$ l de amortiguador de carga, se mezcló la fase acuosa, sin hacer emulsiones con el aceite.
3. Se depositaron 10 $\mu$ l de la muestra con amortiguador en cada pozo, utilizando un pozo por muestra.
4. Se colocó en un pozo de los extremos 10 $\mu$ l de marcador de peso molecular de 123 pares de bases.
5. Se corrió la electroforesis a 180volts por 1 hora y media, en TBE 1X.
6. Se procedió a teñir los geles con bromuro de etidio, utilizando 20 $\mu$ l de una solución 10mg/ml en 200ml de TBE 1X y se agitó suavemente durante 5 minutos.
7. Se destiñó en agua destilada durante 5 minutos.
8. Se colocó el gel en el equipo analizador de geles: Gel Doc para visualizar los resultados.
9. Se determinó la absorbancia de los productos de PCR y se realizaron gráficos para la expresión de cada citocina.

Resumiendo, la metodología realizada se representa en un diagrama de flujo **Figura 4.**





**Figura 4.** Representación esquemática de la metodología realizada.

## 8. RESULTADOS

### Curso de la infección.

Los ratones infectados por primera vez presentaron niveles de parasitemias más altos que los inmunes a *Plasmodium chabaudi* AS (**Gráficas 1 y 2**), observándose que el parásito no letal en un primer contacto con el huésped generó parasitemias cercanas al 42% y fueron eliminadas el día 22 postinfección, en tanto que en un segundo reto las parasitemias son menores al 0.1% y resueltas a partir del día 16. En cambio *P. yoelii* 17XL (letal) generó parasitemias cercanas al 50% y los ratones murieron alrededor del día 14, mientras que cuando existe inmunidad al parásito no letal la infección con *P. yoelii* 17XL produjo máximos de parasitemias del 13% y los ratones sobrevivieron eliminando el parásito en el día 22.

Durante el reto con la mezcla de ambos parásitos, los ratones infectados por primera vez registraron parasitemias cercanas al 40% a partir del día 8 postinfección y éste porcentaje casi se mantuvo constante hasta que los ratones perecieron en el día 12; en contraste, las parasitemias de ratones inmunes fueron cercanas al 14% en el día 8 postinfección y posteriormente disminuyeron, a pesar de que en el día 12 se haya generado una recrudescencia con el 12% de parasitemia, este grupo de ratones tendía a la eliminación de la infección.

### Anemia generada durante la infección.

En la determinación de hemoglobina, se observó mayor anemia durante los primeros retos, ya sea con *P. chabaudi* AS, la *Mezcla* o *P. yoelii* 17XL, generándose con éste último niveles menores de Hb (**Gráfica 3**). No así, en ratones inmunes quienes a pesar de presentar bajas concentraciones de hemoglobina logran reestablecerse a los niveles iniciales, excepto con el reto *P. yoelii* 17XL que es el que produce los niveles más bajos de Hb (**Gráfica 4**).

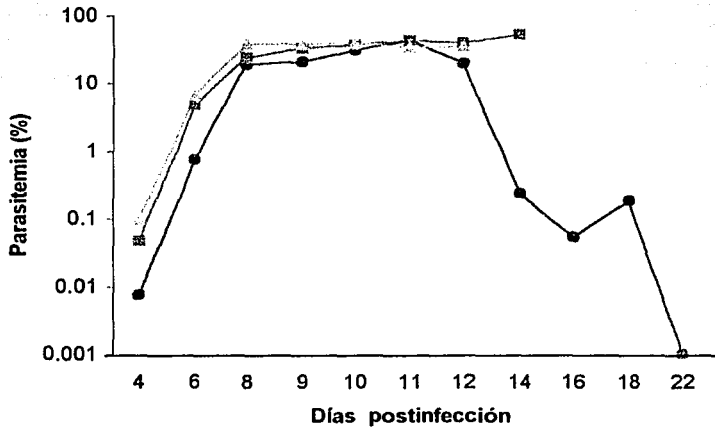
### **Pérdida de peso.**

Durante la primera infección, sólo los ratones infectados con *P. chabaudi* AS logran recuperar su peso inicial, en tanto que para *P. yoelii* 17XL y la *Mezcla*, los ratones tienden a perder mayor peso conforme transcurre el tiempo (**Gráfica 5**).

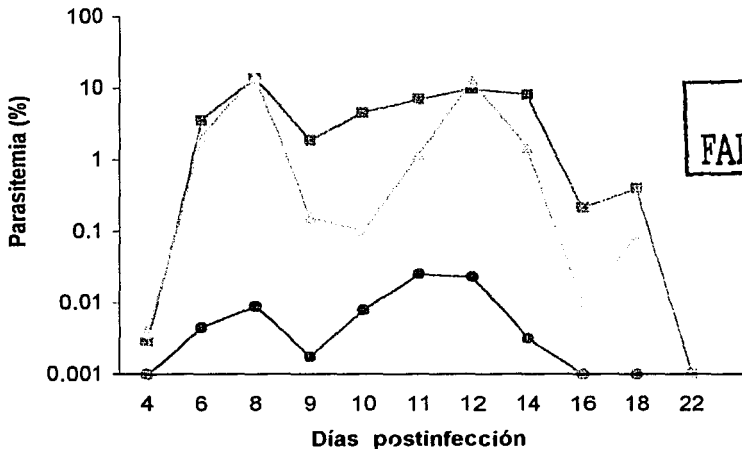
En ratones inmunes, hubo más pérdida de peso en el reto con la *Mezcla*, sin que ello signifique que pierdan el mismo porcentaje que en la primera infección, consiguiendo finalmente recuperar su peso inicial, al igual que en los retos con *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17XL (**Gráfica 6**). Ahora bien, observando las gráficas 5 y 6 se aprecia que los ratones inmunes y retados con *P. yoelii* 17XL casi no pierden peso comparados con aquellos retados por primera vez con el parásito letal, cuyo peso merma hasta en un 25%.

### **Índice esplénico.**

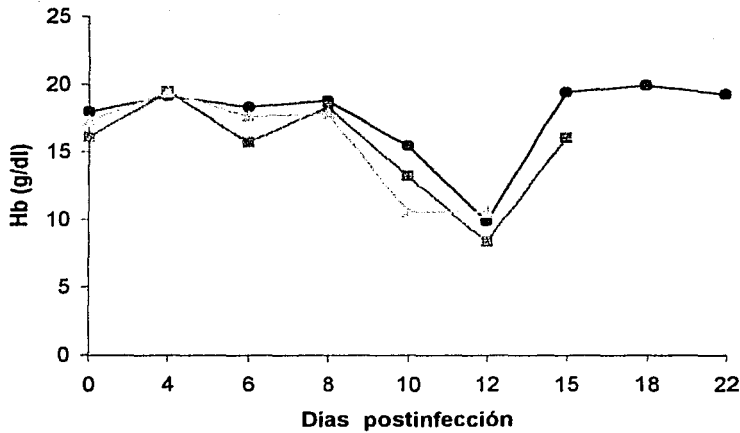
La esplenomegalia manifestada en ratones infectados por primera vez es similar para los retos con *P. chabaudi* AS, *P. yoelii* 17XL y la *Mezcla*, no obstante los únicos sobrevivientes fueron los retados con *P. chabaudi* AS y, al menos hasta el día 22 postinfección tendían a regenerar el tamaño del bazo (**Gráfica 7**). En contraste, de los ratones inmunes sólo los re infectados con *P. yoelii* 17XL y la *Mezcla* alcanzaron mayor esplenomegalia que con *P. chabaudi* AS, con una diferencia de casi el doble(**Gráfica 8**).



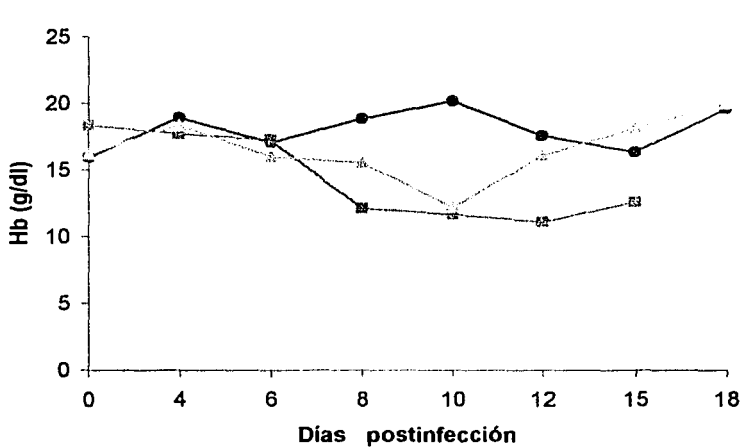
**Gráfica 1. CURSO DE LA PRIMERA INFECCION EN RATONES CBA/Ca.** Los ratones fueron inoculados i.v. con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi* AS (—●—), *P. yoelii* 17XL (···) o la Mezcla (---□---). Se realizaron frotis con sangre de la cola en los días señalados y se tiñeron con Giemsa, cada punto representa la parasitemia promedio de 16 ratones.



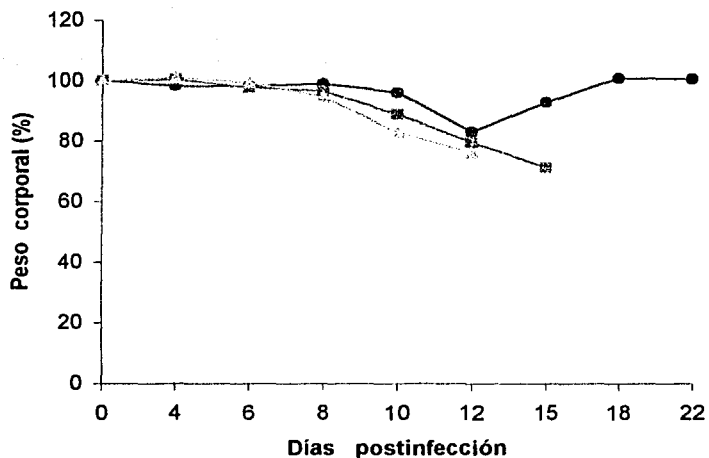
**Gráfica 2. CURSOS DE LA INFECCION SECUNDARIA EN RATONES INMUNES A *P. chabaudi* AS.** Un grupo de ratones CBA/Ca fueron inoculados i.v. con  $5 \times 10^3$  EP de *P. chabaudi* AS y se permitió que resolvieran la infección, posteriormente fueron re infectados con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi* AS (—●—), *P. yoelii* 17XL (···) o la Mezcla (---□---). Se realizaron frotis con sangre de la cola en los días señalados y se tiñeron con Giemsa, cada punto representa la parasitemia promedio de 7 ratones.



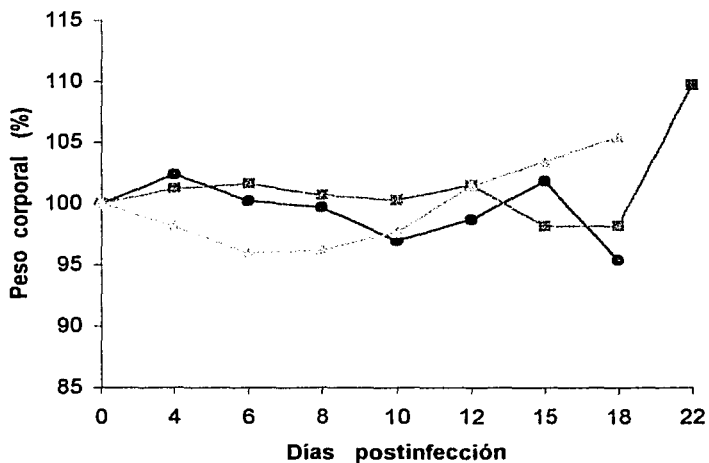
**Gráfica 3. DETERMINACION DE HEMOGLOBINA DURANTE LA PRIMERA INFECCION.** Ratones CBA/Ca inoculados i.v. con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi* AS (○), *P. yoelii* 17XL (●) o la Mezcla (□) fueron sangrados de la cola y se les determinó la concentración de Hb en los días señalados. Cada punto representa la Hb promedio en 5 ratones.



**Gráfica 4. DETERMINACION DE Hb EN RATONES INMUNES A *P. chabaudi* AS.** Ratones CBA/Ca inmunes a *P. chabaudi* AS fueron re infectados i.v. con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi* AS (○), *P. yoelii* 17XL (●) o la Mezcla (□). Se obtuvo sangre de la cola en los días señalados y se determinó la concentración de Hb. Cada punto representa la Hb promedio en 5 ratones.

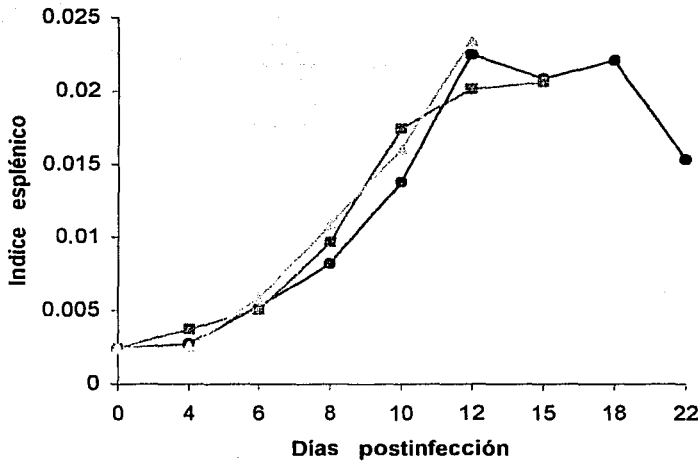


**Gráfica 5. PERDIDA DE PESO DURANTE LA PRIMERA INFECCION.** Ratones CBA/Ca inoculados i.v. con  $5 \times 10^3$  EP de *P. chabaudi* AS (●), *P. yoelii* 17XL (○) o la Mezcla (■) fueron pesados en los días señalados. Cada punto representa el peso promedio de 5 ratones.

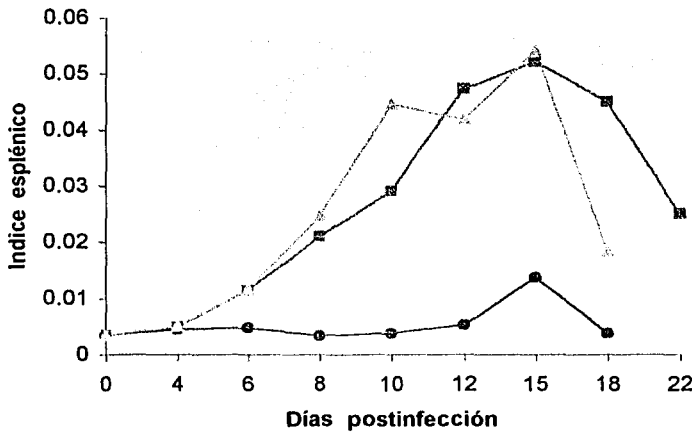


**Gráfica 6. PERDIDA DE PESO EN RATONES INMUNES A *P. chabaudi* AS.** Ratones CBA/Ca inmunes a *P. chabaudi* AS fueron reinfestados i.v. con  $5 \times 10^3$  EP de *P. chabaudi* AS (●), *P. yoelii* 17XL (○) o la Mezcla (■) y su peso fue registrado en los días señalados. Cada punto representa el peso promedio de 5 ratones.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



**Gráfica 7. INDICE ESPLÉNICO DURANTE LA PRIMERA INFECCION.** Ratones CBA/Ca fueron inoculados i.v. con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi* AS (---), *P. yoelii* 17XL (---) o la Mezcla (-). Los ratones fueron pesados en los días señalados y sacrificados para obtener el bazo y pesarlo. Cada punto representa el índice esplénico promedio de 2 ratones.



**Gráfica 8. INDICE ESPLÉNICO EN RATONES INMUNES A *P. chabaudi* AS.** Ratones CBA/Ca inmunes a *P. chabaudi* AS fueron re infectados i.v. con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi* AS (-), *P. yoelii* 17XL (-) o la Mezcla (-). En los días señalados los ratones fueron pesados y sacrificados para obtener el bazo y pesarlo. Cada punto representa el índice esplénico determinado en un ratón.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

### **Expresión de citocinas.**

Para analizar la expresión de citocinas se realizó la extracción de RNA y posteriormente se retrotranscribió obteniéndose así cDNA, a partir del cual se realizaron las amplificaciones de los genes que codifican para las citocinas determinadas. El análisis de los productos de PCR se realizó por electroforesis y con ayuda del equipo analizador de geles Gel Doc se determinaron las absorbancias de cada una de las bandas obtenidas. En la **Figura 5** se muestran las bandas obtenidas para diferentes citocinas durante el curso de la infección en los ratones inmunes y re infectados con *P. yoelii* 17XL.

**IFN- $\gamma$ .** En los ratones infectados con *P. chabaudi* AS existe mayor expresión de IFN- $\gamma$  durante el primer reto que en el segundo. De igual forma para *P. yoelii* 17XL y la *Mezcla*, sin embargo, la máxima expresión se observa los primeros días de la infección y declina a medida que transcurre la parasitemia. El único grupo que no sigue esta tendencia es el de ratones inmunes y re infectados con *P. chabaudi* AS, quienes en el curso de la infección disminuyen su expresión y después la regeneran (**Gráficas 9 y 10**).

**TNF- $\alpha$ .** La mayor expresión para TNF- $\alpha$  se observó en los ratones infectados por primera vez, con el reto *P. chabaudi* AS se alcanzó una mayor manifestación pero finalmente se recuperan los niveles iniciales, por el contrario, *P. yoelii* 17XL y la *Mezcla* inducen una menor expresión pero no logran regresar a los niveles iniciales y los ratones perecen (**Gráfica 11**). En los ratones inmunes, TNF- $\alpha$  se expresó en menor grado que en los no inmunes (aproximadamente la mitad) para *P. yoelii* 17X y la *Mezcla*, en cambio para *P. chabaudi* AS por ser un reto homólogo disminuye su expresión durante el desarrollo de la parasitemia (**Gráfica 12**).

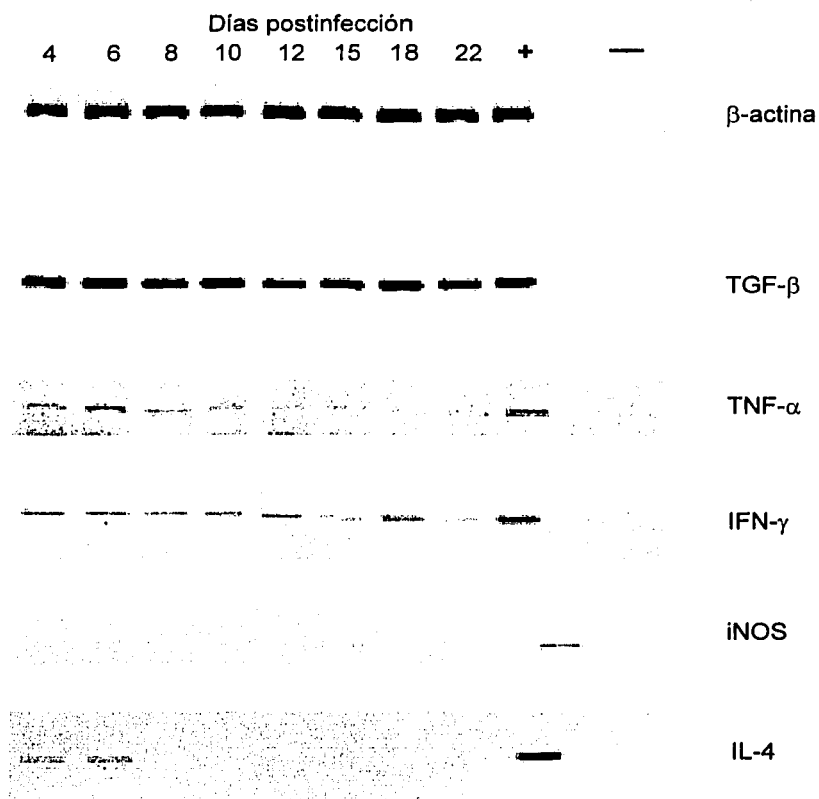
**iNOS.** En ratones no inmunes, *P. yoelii* 17XL y la *Mezcla* inducen una expresión similar, y mayor que *P. chabaudi* AS (**Gráfica 13**). Mientras que en ratones inmunes y retados con el parásito homólogo la expresión tiende a cero, y los



ratones retados con *P. yoelii* 17XL o con la *Mezcla* expresaron la iNOS casi constante (**Gráfica 14**).

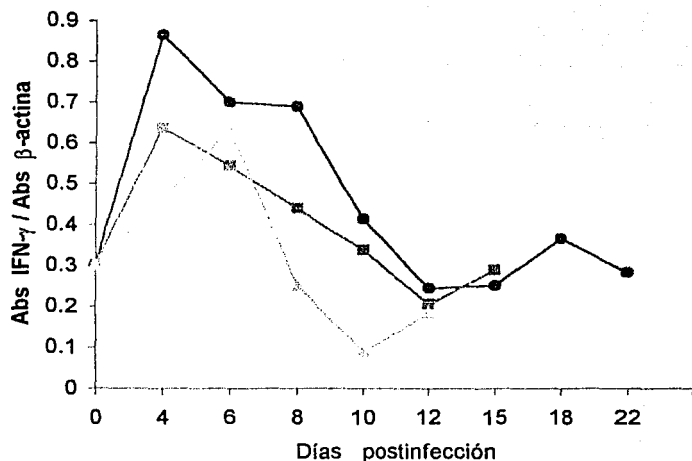
**TGF- $\beta$** . Esta citocina inmunorregulatoria se expresó de forma casi constante en los ratones no inmunes (**Gráfica 15**). En los ratones inmunes se alcanzó una mayor expresión de TGF- $\beta$  que los no inmunes, además de presentar fluctuaciones más intensas en el curso de la infección (**Gráfica 16**).

**IL-4**. En ratones inmunes como no inmunes la máxima expresión de IL-4 se apreció en los primeros días de la infección. Sin embargo, la máxima expresión se dio en un primer reto con el parásito no letal, y los ratones inmunes infectados con *P. yoelii* 17XL y la *Mezcla* incrementaron su expresión a diferencia de los no inmunes (**Gráficas 17 y 18**).

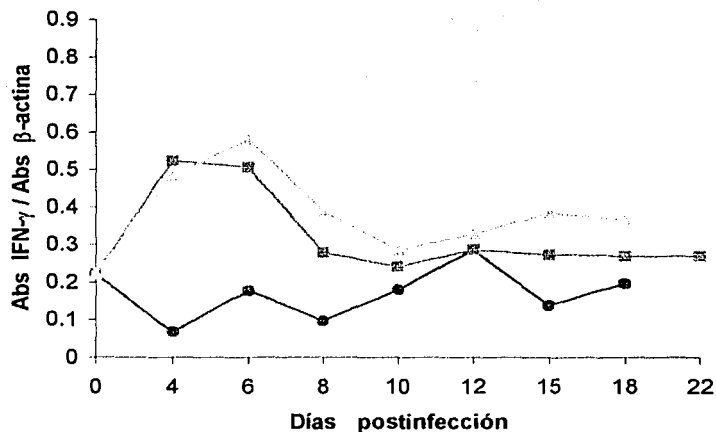


**Figura 5.** Expresión de citocinas en ratones inmunes a *P. chabaudi AS*. Ratones CBA/Ca fueron inoculados con *P. chabaudi AS* y se permitió que resolvieran la infección, posteriormente fueron re infectados con *P. yoelii* 17XL y en los días 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18 y 22 postinfección se realizó la extracción de RNA a partir del bazo. La expresión de citocinas se determinó por RT-PCR, utilizando geles de acrilamida al 5% para el corrimiento electroforético de los productos obtenidos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

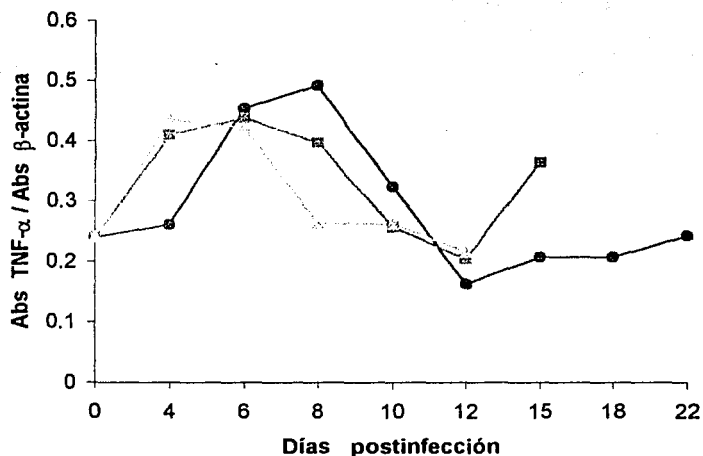


**Gráfica 9. EXPRESION DE IFN- $\gamma$  DURANTE LA PRIMERA INFECCION.** Ratones CBA/Ca fueron inoculados i.v. con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi* AS (●), *P. yoelii* 17XL (■) o la Mezcla (▲). En los días señalados se obtuvo el bazo para la extracción de RNA y se determinó la expresión de IFN- $\gamma$  por RT-PCR. Cada punto representa la expresión promedio de IFN- $\gamma$  en dos ratones.

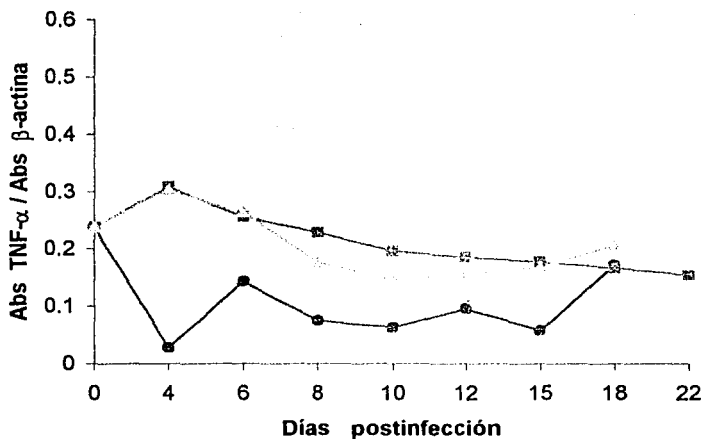


TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

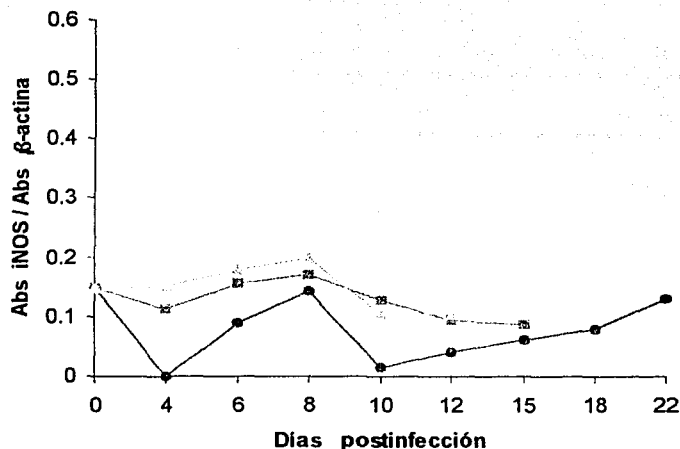
**Gráfica 10. EXPRESION DE IFN- $\gamma$  EN RATONES INMUNES A *P. chabaudi* AS.** Ratones CBA/Ca inmunes a *P. chabaudi* AS fueron re infectados i.v. con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi* AS (●), *P. yoelii* 17XL (■) o la Mezcla (▲). En los días señalados los ratones fueron sacrificados y se obtuvo el bazo para extraer RNA. La expresión de IFN- $\gamma$  se determinó por RT-PCR, cada punto representa la expresión de IFN- $\gamma$  en un ratón.



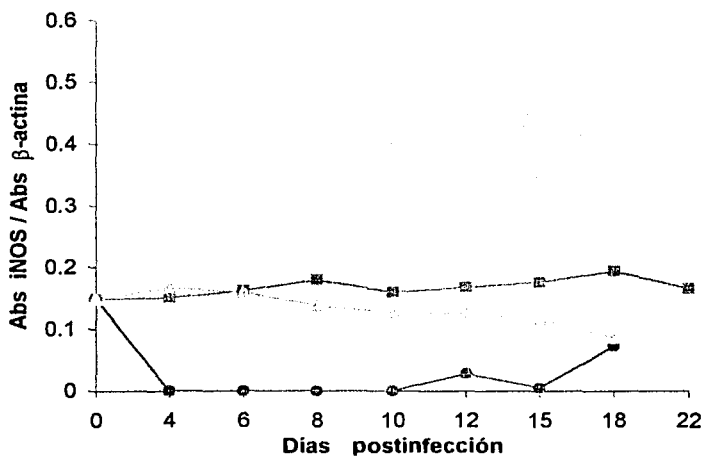
**Gráfica 11. EXPRESION DE TNF- $\alpha$  DURANTE LA PRIMERA INFECCION.** Ratones CBA/Ca fueron inoculados i.v. con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi* AS (●), *P. yoelii* 17XL (◻) o la Mezcla (◻). En los días señalados se obtuvo el bazo para la extracción de RNA y se determinó la expresión de TNF- $\alpha$  por RT-PCR. Cada punto representa la expresión promedio de TNF- $\alpha$  en dos ratones.



**Gráfica 12. EXPRESION DE TNF- $\alpha$  EN RATONES INMUNES A *P. chabaudi* AS.** Ratones CBA/Ca inmunes a *P. chabaudi* AS fueron re infectados i.v. con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi* AS (●), *P. yoelii* 17XL (◻) o la Mezcla (◻). En los días señalados los ratones fueron sacrificados y se obtuvo el bazo para extraer RNA. La expresión de TNF- $\alpha$  se determinó por RT-PCR, cada punto representa la expresión de TNF- $\alpha$  en un ratón.

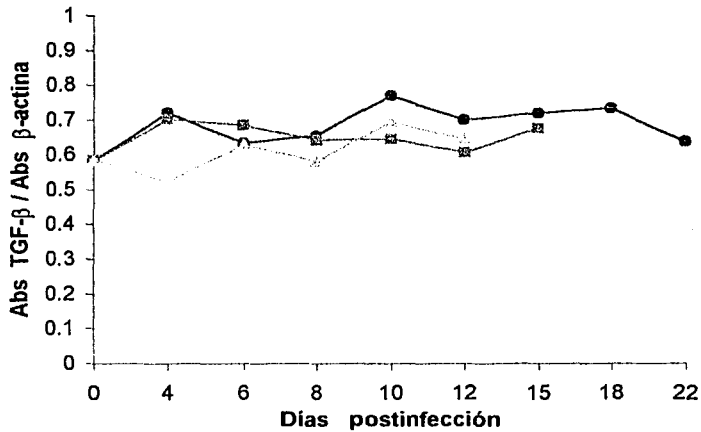


**Gráfica 13. EXPRESION DE iNOS DURANTE LA PRIMERA INFECCION.** Ratones CBA/Ca fueron inoculados i.v. con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi* AS (●), *P. yoelii* 17XL (◻) o la Mezcla (◻). En los días señalados se obtuvo el bazo para la extracción de RNA y se determinó la expresión de iNOS por RT-PCR. Cada punto representa la expresión promedio de iNOS en dos ratones.

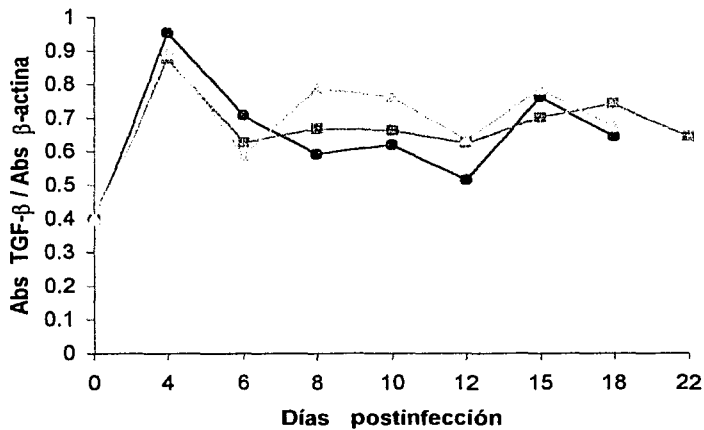


**Gráfica 14. EXPRESION DE iNOS EN RATONES INMUNES A *P. chabaudi* AS.** Ratones CBA/Ca inmunes a *P. chabaudi* AS fueron re infectados i.v. con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi* AS (●), *P. yoelii* 17XL (◻) o la Mezcla (◻). En los días señalados los ratones fueron sacrificados y se obtuvo el bazo para extraer RNA. La expresión de iNOS se determinó por RT-PCR, cada punto representa la expresión de iNOS en un ratón.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

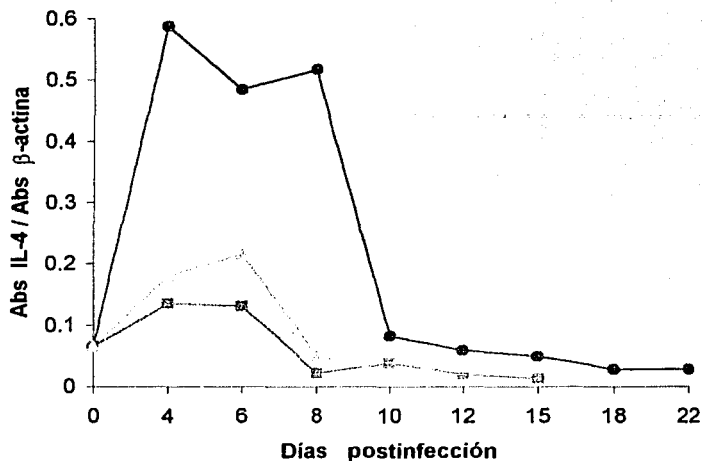


**Gráfica 15. EXPRESION DE TGF-β DURANTE LA PRIMERA INFECCION.** Ratones CBA/Ca fueron inoculados i.v. con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi* AS (●), *P. yoelii* 17XL (○) o la Mezcla (□). En los días señalados se obtuvo el bazo para la extracción de RNA y se determinó la expresión de TGF-β por RT-PCR. Cada punto representa la expresión promedio de TGF-β en dos ratones.

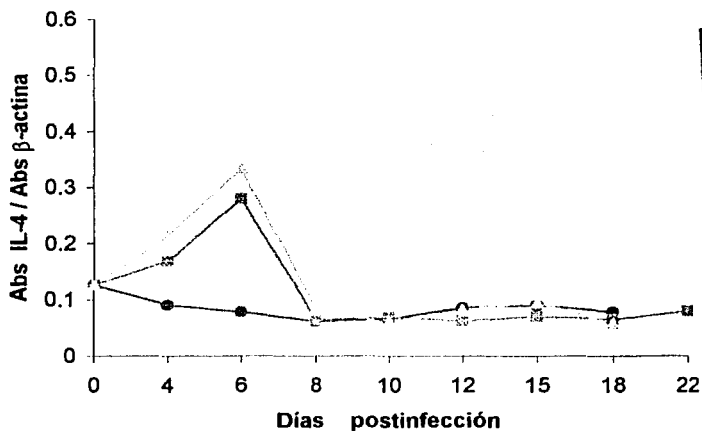


**Gráfica 16. EXPRESION DE TGF-β EN RATONES INMUNES A *P. chabaudi* AS.** Ratones CBA/Ca inmunes a *P. chabaudi* AS fueron re infectados i.v. con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi* AS (●), *P. yoelii* 17XL (○) o la Mezcla (□). En los días señalados los ratones fueron sacrificados y se obtuvo el bazo para extraer RNA. La expresión de TGF-β se determinó por RT-PCR, cada punto representa la expresión de TGF-β en un ratón.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Gráfica 17. EXPRESION DE IL-4 DURANTE LA PRIMERA INFECCION.** Ratones CBA/Ca fueron inoculados i.v. con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi* AS (●), *P. yoelii* 17XL (○) o la Mezcla (□). En los días señalados se obtuvo el bazo para la extracción de RNA y se determinó la expresión de IL-4 por RT-PCR. Cada punto representa la expresión promedio de IL-4 en dos ratones.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

**Gráfica 18. EXPRESION DE IL-4 EN RATONES INMUNES A *P. chabaudi* AS.** Ratones CBA/Ca inmunes a *P. chabaudi* AS fueron re infectados i.v. con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi* AS (●), *P. yoelii* 17XL (○) o la Mezcla (□). En los días señalados los ratones fueron sacrificados y se obtuvo el bazo para extraer RNA. La expresión de IL-4 se determinó por RT-PCR, cada punto representa la expresión de IL-4 en un ratón.

## 9. DISCUSION DE RESULTADOS

Se determinó el porcentaje de parasitemias para analizar las diferencias en el control de la infección entre los diferentes grupos. En los ratones infectados por primera vez, se confirma la letalidad del *P. yoelii* 17XL (Taylor-Robinson, 1995; Taylor-Robinson & Smith, 1999), además se observa que en un reto con la mezcla de parásitos letal y no letal existe una parasitemia mayor en los primeros días postinfección y se incrementa la virulencia, hecho no observado en ratones infectados con *P. chabaudi* AS, que logran eliminar la parasitemia (**Gráfica 1**). En ratones inmunes a *P. chabaudi* AS y reinfectados con el parásito homólogo se observó una muy buena protección, en tanto que los retos con *P. yoelii* 17XL o la mezcla, desarrollaron protección cruzada que se explica con la sobrevivencia de los ratones (**Gráfica 2**). Un suceso de gran relevancia es que el reto con la mezcla presentó una mayor protección que el de *P. yoelii* 17XL, probablemente se deba a que la reacción cruzada es más intensa cuando el reto involucra al parásito para el cual ya se desarrolló una respuesta.

Se analizó la anemia generada durante la infección para estudiar si la disminución de la concentración de Hb está asociada con la muerte que se presenta en la infección con la cepa letal. Evaluando este parámetro se observó que en un primer reto los ratones infectados con *P. chabaudi* AS desarrollaron menor anemia que los otros grupos (**Gráfica 3**). En general, todos los ratones muestran la misma tendencia de disminución en la concentración de Hb hasta el día 12, sin embargo el único grupo que recupera sus niveles de Hb fue el infectado con *P. chabaudi* AS. No se encontraron diferencias notorias que pudieran explicar la muerte de los ratones infectados con *P. yoelii* 17XL asociada a la disminución en la concentración de Hb.

Durante la infección secundaria, los ratones infectados con *P. chabaudi* AS no desarrollaron anemia (**Gráfica 4**). A diferencia de los anteriores, los ratones infectados con la mezcla desarrollaron anemia, pero en menor grado que los



retados únicamente con *P. yoelii* 17XL, ésto probablemente se deba a que los ratones ya habían desarrollado protección contra *P. chabaudi* AS y en el reto con la mezcla la protección cruzada es más intensa que en el reto heterólogo.

Otro parámetro que se evaluó para correlacionarlo con la mortalidad de los ratones fue la pérdida de peso. Así, en la primera infección los tres grupos de ratones mostraron una pérdida de peso similar hasta el día 12 postinfección, sin embargo, el grupo que perdió menos peso y se recuperó fue el infectado con *P. chabaudi* AS (**Gráfica 5**). La mortalidad de los ratones no se puede explicar con base a la pérdida de peso, dado que los ratones que sobrevivieron presentaron pérdida de peso similar a los que perecieron.

Durante la segunda infección no se observaron cambios de peso importantes en los tres grupos de ratones, lo que correlacionó con la protección que desarrollaron estos ratones después de haberse recuperado de una infección primaria con *P. chabaudi* AS (**Gráfica 6**). Estos resultados corroboran los estudios realizados en áreas endémicas donde las personas que son reinfectadas varias veces disminuyen la sintomatología de paludismo, tendiendo a una recuperación más rápida (Hommel & Barnish, 1998). Los resultados en la pérdida de peso se podrían asociar a la mayor expresión de iNOS. Durante la infección secundaria los ratones que menos peso perdieron fueron los infectados con *P. chabaudi* AS y además no presentaron los niveles más altos de iNOS, estos resultados están de acuerdo con los descritos por Clark y Shofield, 2000, en donde describen asociación del incremento de la expresión de iNOS y la pérdida de peso.

El índice esplénico se determinó para analizar el grado de esplenomegalia y asociarlo con la recuperación de los ratones. Durante la primera infección no se observaron cambios importantes en el índice esplénico de los tres grupos de ratones, no obstante los únicos que tendían a recuperar el índice esplénico basal fueron los inoculados con *P. chabaudi* AS (**Gráfica 7**). Lo anterior sugiere que el incremento en el índice esplénico no explica la letalidad observada en los ratones

infectados con *P. yoelii* 17XL o con la *Mezcla*, por lo que se propone que deben existir otros mecanismos para que se logre la protección (Sam *et al.* 1999).

En la segunda infección, el índice esplénico en los ratones retados con *P. chabaudi* AS prácticamente no se modificó. Por el contrario, en los grupos retados con la *Mezcla* o con *P. yoelii* 17XL el índice esplénico se incrementó más de cinco veces del valor inicial (**Gráfica 8**). Los valores más altos de índice esplénico podrían explicarse con base en una reestimulación intensa del sistema inmune, en particular el bazo, que es el principal órgano de destrucción de EP y donde existe un incremento en la actividad fagocitaria y reactividad inmunológica, considerando también su contribución como órgano hematopoyético (Alves *et al.* 1996; Weiss, 1990; Sayles *et al.* 1991).

Se analizaron diferentes citocinas por RT-PCR para correlacionar su expresión con la protección a la infección.

**IFN- $\gamma$** , una linfocina pluripotente capaz de activar macrófagos con actividad microbicida, juega un papel importante al principio de la infección, controlando la multiplicación del parásito, pero no interviene en la eliminación completa durante la resolución de la infección (Stevenson *et al.* 1990; Favre *et al.* 1997).

Para la primera infección, se observó correlación entre la mayor producción de IFN- $\gamma$  y la recuperación y supervivencia de los ratones, se observó que los ratones infectados con *P. yoelii* 17XL o con la *Mezcla* desarrollaron niveles inferiores que los ratones infectados con *P. chabaudi* AS (**Gráfica 9**), corroborando así lo descrito por De Souza *et al.* 1997, por lo que se sugiere que quizá se requiera incrementar los niveles de IFN- $\gamma$  en los primeros días de un reto letal (Shear *et al.* 1989) para poder controlar la infección.

Durante la segunda infección, nuestros resultados indican que la protección está asociada con una disminución en la expresión de IFN- $\gamma$  para *P. chabaudi* AS. Los niveles elevados de IFN- $\gamma$  que se observaron en los ratones infectados con *P. yoelii* 17XL o con la *Mezcla* (**Gráfica 10**) pueden deberse a que es la primera vez que los ratones se enfrentan al parásito letal, correlacionando así la protección con el incremento de IFN- $\gamma$ . Retomando lo anterior, se aprecia que la expresión de

IFN- $\gamma$  en los ratones reinfectados con la mezcla es mayor que con *P. yoelii* 17XL siendo análogo con valores menores de la parasitemia (**Gráficas 10 y 2**).

**TNF- $\alpha$**  es una citocina que se ha asociado con la pérdida de peso en malaria (Long, 1993; Hirunpetcharat *et al.* 1999) por lo que en este trabajo se analizó su expresión durante la primera y segunda infección con diferentes cepas de *Plasmodium*.

En la primera infección, los ratones inoculados con *P. chabaudi* AS expresaron mayores niveles de TNF- $\alpha$  durante los primeros días, y se observó una marcada disminución el día 12 (**Gráfica 11**), que correlacionó con la disminución en la parasitemia y con la recuperación de los ratones de este grupo. Mientras que, en los grupos infectados con *P. yoelii* 17XL o la *Mezcla* los niveles se incrementaron en menor magnitud, a pesar de que estos dos grupos manifestaron tendencias similares, en el reto con *P. yoelii* 17XL se generó mayor expresión de TNF- $\alpha$  el último día de sobrevivencia, asociado con la máxima pérdida de peso. Con lo anteriormente descrito, se puede proponer que: el incremento de TNF- $\alpha$  en la fase temprana de la infección (al igual que IFN- $\gamma$ ) es crucial y por tanto contribuye a la sobrevivencia (Jacobs *et al.* 1996), a pesar de su contribución a las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

Durante la segunda infección con *P. chabaudi* AS los niveles de TNF- $\alpha$  fueron más bajos que en el primer reto (**Gráfica 12**) lo que correlacionó con la menor pérdida de peso y parasitemias bajas; mientras que en los ratones infectados con *P. yoelii* 17XL o la *Mezcla*, se incrementó un poco el día cuatro y después mostró una tendencia a disminuir (**Gráfica12**), éste fue un comportamiento análogo a la pérdida de peso. La expresión disminuida de TNF- $\alpha$  en una segunda infección está de acuerdo con el hallazgo de niveles plasmáticos bajos de TNF- $\alpha$  en individuos semiinmunes en áreas endémicas a *P. vivax* comparado con pacientes no inmunes, quienes presentan altos niveles de TNF- $\alpha$  (Mendis *et al.* 1990; Karunaweera *et al.* 1992), indicando con ello que los ratones inoculados con un parásito no letal adquirieron protección a un reto letal.

La enzima óxido nítrico sintetasa inducible, **iNOS** produce NO en macrófagos activados, confiriéndoles propiedades citotóxicas y citostáticas para estadios sanguíneos del parásito de malaria (Taylor & Smith, 1999), no obstante también tiene un efecto inmunosupresor (Rockett *et al.* 1994) por ello se consideró importante analizar su expresión.

Durante la primera infección, el reto con *P. chabaudi* AS presentó menor expresión de iNOS a diferencia de *P. yoelii* 17XL o la *Mezcla*, donde la expresión de iNOS fue mayor (**Gráfica 13**), sin embargo la máxima expresión de iNOS se obtiene el día 8 en los 3 grupos, simultáneamente IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  perciben una caída drástica en su expresión a partir de este punto que es justamente donde se forma una meseta en las curvas de parasitemia, indicando con ello que la protección básicamente está regulada por células Th1 hasta alcanzar los niveles máximos de parasitemia (Taylor-Robinson *et al.* 1993; Taylor-Robinson, 1995; Hirunpetcharat *et al.* 1999). También se observó que la máxima expresión de iNOS coincide con el inicio de una marcada anemia en los tres grupos de ratones, debiéndose quizá al efecto inmunosupresor del NO mediante la inhibición de la ribonucleótido reductasa de progenitores de eritrocitos en médula ósea (Rockett *et al.* 1994).

En la segunda infección la máxima expresión de iNOS se obtuvo para *P. yoelii* 17XL y la *Mezcla* (**Gráfica 14**). En tanto que para *P. chabaudi* AS la expresión fue nula, sugiriendo que la protección está regulada básicamente por inmunoglobulinas generadas en la primera infección y que la respuesta es desplazada hacia el tipo Th2 (Phillips *et al.* 1994). La mayor expresión de iNOS para *P. yoelii* 17XL correlacionó con la disminución en la concentración de Hb, debido tal vez a la propiedad inmunosupresora del NO, sin embargo tal efecto no tiene consecuencias letales como en el primer reto pues los ratones logran sobrevivir a pesar de manifestar una respuesta inflamatoria elevada, observándose así que la inmunización con un parásito no letal confiere protección inespecífica a un reto letal con lo que se logró controlar la parasitemia.

**TGF- $\beta$ .** Debido a la actividad binomial de TGF- $\beta$  que la define como la principal molécula inmunorregulatoria (Taylor-Robinson & Smith, 1999), se consideró importante su determinación tanto en la primera como en la segunda infección.

En general, los ratones infectados por primera vez con *P. chabaudi* AS expresaron niveles ligeramente más elevados de TGF- $\beta$  que los infectados con *P. yoelii* 17XL o la *Mezcla* (**Gráfica 15**), concordando así con bajos niveles séricos de TGF- $\beta$  reportados en infecciones letales, a diferencia de las infecciones resueltas con *P. chabaudi* AS, donde existe una significativa producción de esta citocina (Omer & Riley, 1998).

En todos los grupos de ratones reinfectados, los niveles de expresión de TGF- $\beta$  se incrementaron importantemente el día 4 postinfección, notándose una disminución después de este punto sólo para el reto homólogo (**Gráfica 16**). Para *P. yoelii* 17XL y la *Mezcla* quizá se favorezca una respuesta tipo Th1 al principio de la infección (Omer *et al.* 2000) puesto que el incremento de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  oscila por el día 4 y se expresan de forma análoga al primer reto con *P. chabaudi* AS, logrando finalmente la resolución de la parasitemia.

**IL-4** es una citocina inmunorregulatoria y favorece la respuesta Th2, coopera en la maduración de células B para la producción de IgG1 (Taylor-Robinson *et al.* 1993; Taylor-Robinson & Philips, 1994) cooperando así en la resolución de la infección. Durante la primera infección, la mayor producción de IL-4 al inicio de la parasitemia está asociada con la sobrevida de los ratones. El grupo infectado con *P. chabaudi* AS expresó niveles mayores de IL-4 a diferencia de los ratones infectados con *P. yoelii* 17XL o la *Mezcla* (**Gráfica 17**). Interesantemente, los niveles bajaron drásticamente el día diez, que coincide con la parasitemia más alta, lo que podría indicar que sus niveles están muy controlados por la respuesta inmune.

Con la segunda infección, en ratones retados con *P. chabaudi* AS sus niveles no se modificaron prácticamente durante el curso de la infección (**Gráfica 18**), lo que correlaciona con las parasitemias bajas en este grupo de ratones. Cuando los ratones se infectaron con *P. yoelii* 17XL o con la *Mezcla* se desarrolló mayor

expresión de IL-4 lo que correlaciona con la supervivencia de los ratones. Por lo tanto, la infección previa con *P. chabaudi* AS favorece la mayor expresión de IL-4 durante los primeros días de la segunda infección con un reto letal o la *Mezcla*.

La mayor expresión de IL-4 al principio de la infección, no correlaciona con lo descrito en la literatura (Taylor-Robinson & Phillips, 1994b; De Souza *et al.* 1997) pues se esperaría que IL-4 incrementara conforme transcurre la infección alcanzando su máxima expresión cuando se registra el pico de parasitemia y posteriormente tendería a disminuir. Sin embargo, si correlaciona con la resolución de la parasitemia, tanto en la primera como en la segunda infección, esta expresión de IL-4 quizá esté justificada por su actividad inmunorregulatoria, inhibiendo así la producción de citocinas proinflamatorias la cual debe ser suficiente para eliminar EP, pero no debe incrementarse tanto como para producir inflamación y empeorar las manifestaciones clínicas.

Resumiendo, los ratones previamente inoculados con *P. chabaudi* AS adquieren protección cruzada ante un reto con *P. yoelii* 17XL o con la *Mezcla*, ya que registraron parasitemias bajas, menor anemia y menor pérdida de peso, logrando finalmente sobrevivir, a diferencia de una primera infección con *P. yoelii* 17XL o la *Mezcla*, donde los ratones perecen. Para este tipo de protección el incremento en el índice esplénico si está correlacionado con la supervivencia, favoreciéndose quizá una mayor actividad de macrófagos, también se aprecia que la protección es inespecífica pues está altamente regulada por citocinas proinflamatorias lo que lleve quizá al incremento de las citocinas inmunorregulatorias TGF- $\beta$  e IL-4 al principio de la infección para contrarrestar el efecto inflamatorio y con ello disminuir las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

## 10. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que los ratones inoculados con *P. chabaudi* AS (no letal) son capaces de desarrollar una protección cruzada hacia *P. yoelii* 17XL (letal) o la *Mezcla*, ya que logran resolver la infección y los niveles de parasitemia son menores que en un primer reto, donde los ratones mueren con parasitemias altas.

Los parámetros de enfermedad: pérdida de peso y anemia se disminuyeron considerablemente durante la reinfección, deduciendo así que el previo reto con el parásito no letal genera protección.

El índice esplénico presentó un incremento no observado durante la primera infección, por lo que el previo reto con el parásito no letal favorece el incremento en el bazo ayudando así a la resolución de infecciones letales.

Proponemos que la respuesta celular probablemente es la responsable de la reacción cruzada que proporciona protección para el reto con el parásito letal, ya que las citocinas proinflamatorias IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  junto con iNOS presentan una marcada expresión al principio de la infección, la cual quizá es regulada por TGF- $\beta$  e IL-4.

## 11. ANEXOS

### 11.1 SOLUCIONES.

1. Acetato de sodio 3M, pH=6.

Acetato de sodio 24.61g

Agua DEPC cbp 100ml

NOTA. Ajustar el pH con ácido acético.

2. Acril-biscarilamida al 30%

Acrilamida 29.0g

Bisacrilamida 1.0g

Agua bidestilada cbp 100ml

NOTA. La acrilamida es neurotóxica, usar guantes y cubrebocas para su manipulación.

3. Agua DEPC 0.1%.

Dietilpirocarbonato 1g

Agua bidestilada cbp 1000ml

NOTA. Distribuir en frascos de 250ml, dejar actuar el DEPC durante 4-12 horas y remover el DEPC por esterilización.



#### 4. Amortiguador de carga 5X.

Reactivo	Concentración final
TRIS, pH=8	50mM
EDTA, pH=8	75mM
SDS	0.5% P/V
Sacarosa	30.0% P/V
Ficoll	10.0% P/V
Azul de bromofenol	0.12% P/V
Xilencianol	0.12% P/V

NOTA. Guardar a temperatura ambiente.

#### 5. Amortiguador de lisis.

Stock	Reactivo	Para preparar 5ml
4M	Tiocianato de guanidinio	5ml
1M	Citrato de sodio	125µl
0.1M	2-mercaptoetanol	39µl
10%	Sarcosil	250µl

NOTA. El amortiguador de lisis debe prepararse en el momento de realizar la extracción de RNA.

#### 6. Amortiguador de PCR 10X con Mg<sup>++</sup>

Stock	Reactivo	[Final] en el tubo de Rx = PCR 1X	10ml PCR 10X	[10X]
1M	MgCl <sub>2</sub>	2mM	0.2ml	20mM
2.5M	KCl	50mM	2.0ml	500mM
2.0M	Tris pH=8.3	10mM	0.5ml	100mM
20 <sup>mg</sup> /ml	Gelatina	0.1mg/ml	0.5ml	1 <sup>mg</sup> /ml
	Agua millipore		6.8ml	

NOTA. Distribuir el amortiguador de PCR 10X en tubos eppendorf de 650µl.

7. Citrato de sodio 1M.

Citrato de sodio	29.41g
Agua DEPC	cbp 100ml

8. Gel de acrilamida al 5%.

	100ml (2 geles 16X16)
Agua bidestilada	72.2ml
TBE 10X	10.0ml
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	16.8ml
APS 10%	950 $\mu$ l
TEMED	100 $\mu$ l

9. PBS (solucion amortiguadora de fosfatos) para extracción de RNA, libre de calcio y magnesio.

NaCl	8.0g
KCl	0.2g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24g
Agua millipore	cbp 1000ml

NOTA. Alicuotar en frascos de 250ml y esterilizar.

10. Persulfato de amonio (APS) al 10%.

Persulfato de amonio	10.0g
Agua bidestilada	cbp 100ml

NOTA. Preparar alícuotas de 500 $\mu$ l y guardar en el congelador.

11. Sarcosil al 10%

Sarcosil	10.0g
Agua DEPC	cbp 100ml

12. TBE (amortiguador Tris-Acido bórico-EDTA) 10X.

Tris 1M	121.10g
Acido bórico 1M	61.83g
EDTA 50mM	14.61g
Agua bidestilada	cbp 1000ml

**NOTA.** Calentar la solución para disolver más rápido los reactivos

**Exflagelación.** Proceso por el cual se forman microgametos a partir de un microgametocito.

**Gameto.** Estadio sexual del parásito, observado sólo en el intestino del mosquito donde existe la maduración de macrogametocitos y microgametocitos.

**Gametocito.** Estadio sanguíneo precursor de gametos.

**Haploide.** Célula que presenta sólo una dotación cromosómica (*n*).

**Hemozoina.** Producto de degradación de la hemoglobina por el parásito.

**Hepatoesplenomegalia.** Aumento del volumen del hígado y bazo.

**Hiperplasia.** Multiplicación anormal de los elementos hísticos.

**HLA.** Antígenos de histocompatibilidad. Antígenos en la superficie de cada una de las células de un individuo, son la expresión fenotípica de los genes del complejo mayor de histocompatibilidad.

**Índice esplénico.** Es la relación del peso corporal / peso del bazo y es la forma de expresar la esplenomegalia que manifiestan los modelos animales en el laboratorio.

**iNOS.** Enzima óxido nítrico sintetasa inducible, favorece la producción de óxido nítrico a partir de L-arginina produciéndose además citrulina.

**Interleucina.** Citocina producida por leucocitos, capaz de actuar sobre leucocitos.

**Linfocina.** Citocina producida por linfocitos.

**Linfotoxina.** Linfocina citolítica producida por linfocitos T citotóxicos.

**Macrogametocito.** Gametocito femenino que origina sólo un macrogameto.

**Merozoito.** Estadio asexual de los *Plasmodios*, desarrollado en el huésped intermediario, producto de la división en el esquizonte.

**MHC.** Complejo mayor de histocompatibilidad (major histocompatibility complex), conjunto de genes localizados en el brazo corto del cromosoma seis, determinan los antígenos de histocompatibilidad.

**Microgametocito.** Gametocito masculino que produce cierto número de microgametos.

**Nucleótido.** Es la unidad básica de los ácidos nucleicos, constituido por un azúcar, una base purínica, una base pirimidínica y fosfatos.

**Oligonucleótido.** Es la secuencia de más de dos nucleótidos.

**Oligo dT.** Oligonucleótido cuya base pirimidínica es la Timina, empleado en la retrotranscripción, se alinea a la cola poliA del mRNA.

**Oocineto.** Etapa móvil del cigoto que precede a la etapa de ooquiste.

**Ooquiste.** Cigoto después de la formación de la pared del quiste.

**Oponisación.** Capacidad de las opsoninas de intensificar la fagocitosis mediante su unión al antígeno. Los anticuerpos y el complemento son las opsoninas principales.

**Parasitemia.** Presencia de parásitos en la sangre.

**Paroxismos.** Brotes de fiebre causados por la liberación de merozoitos durante el estadio eritrocítico.

**Pirógeno.** Sustancia productora de fiebre.

**Pleiotropismo.** Capacidad de una citocina de actuar sobre diferentes tipos celulares.

**Primer cebador u oligo.** Es un oligonucleótido de secuencia específica, utilizado como iniciador en PCR.

**Recaída.** Reparición de parasitemias a partir de etapas exoeritrocíticas en el hígado.

**Recrudescencia.** Incremento de los parásitos que han persistido en bajas concentraciones en la sangre.

**Redundancia.** Propiedad de múltiples citocinas de tener el mismo efecto funcional.

**Reinfección.** Manifestación de infección renovada que no es consecuencia de la infección primitiva sino de una nueva infección.

**RT-PCR.** Es una técnica que utiliza PCR en conjunto con la retrotranscripción.

**Retrotranscripción.** Es la transcripción del RNA para obtener una hebra de cDNA

**Retrotranscriptasa** o transcriptasa reversa. Enzima que transcribe el RNA, resultando una hebra de DNA complementario. La lectura del RNA va del extremo 3' → 5'.

**Trofozoito.** Estadio asexual de los *Plasmodios*, con un núcleo indiviso observado en el eritrocito.

## 12. REFERENCIAS

1. Abbas AK, Lichtman AH & PoberJS. Cellular and molecular immunology. 4<sup>o</sup> ed. United States of America: W.B. Saunders Company, 2000: 235-369.
2. Alves HJ, Weidanz W, Weiss L. The spleen in murine *Plasmodium chabaudi adami* malaria: stromal cells, T lymphocytes and hematopoiesis. Am J Trop Med Hyg 1996; **55**: 370-378.
3. Amante FH & Good MF. Prolonged Th1-like response generated by a *Plasmodium yoelii*-specific T cell clone allows complete clearance of infection in reconstituted mice. Parasite Immunology 1997; **19**: 111-126.
4. Brown HD y Neva FA. Parasitología clínica. 5<sup>o</sup> ed. México: Ed Interamericana, 1985: 84-105.
5. Clark IA & Schofield L. Pathogenesis of malaria. Parasitol Today 2000; **16**: 451-454.
6. Cohen S. Immunology of malaria. En: Lachman and Peters. Clinical aspects of immunology. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1984: 1582-1604.
7. Cross CE & Langhorne J. *Plasmodium chabaudi chabaudi* (AS): inflammatory cytokines and pathology in an erythrocytic-stage infection in mice. Exp Parasitol 1998; **90**: 220-229.
8. De Souza JB, Williamson KH, Otani T & Playfair JHL. Early gamma interferon responses in lethal and nolethal murine blood-stage malaria. Infect immun 1997; **65**: 1593-1598.
9. Eeles RA & Stamps AC. Polymerase chain reaction (PCR) the technique and its applications. United States of America: Landes Company, 1994: 4-32.
10. Favre N, Ryffel B, Bordmann G & Rudin W. The course of *Plasmodium chabaudi chabaudi* infections in interferon-gamma receptor deficient mice. Parasite Immunology 1997; **19**: 375-383.
11. Fell AH & Smith NC. Immunity to asexual blood stages of *Plasmodium*: is resistance to acute malaria adaptive or innate? Parasitol Today 1998; **14**: 364-368.

12. Gause WC & Adamovicz. Use of PCR to quantitative relative differences in gene expression. En: Diefenbach CW & Dveksler GS. PCR primer: a laboratory manual. United States of America: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995: 293-311.
13. Good MF & Doolan DL. Immune effector mechanisms in malaria. *Curr Opin Immunol* 1999; **11**: 412-419.
14. Greenwood BM. The epidemiology of malaria. *Ann Trop Med* 1997; **91**: 763-769.
15. Hasting IM & D'Alessandro U. Modelling a predictable disaster: the rise and spread of drug-resistat malaria. *Parasitol Today* 2000; **16**: 340-346.
16. Hensmann M & Kwiatkowski D. Cellular basis of early cytokine response to *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* 2001; **69**: 2364-2371.
17. Hirunpetcharat Ch, Finkelman F, Clarck IA, Good M. Malaria parasite-specific Th1-like T cells simultaneously reduce parasitemia and promote disease. *Parasite Immunology* 1999; **21**: 319-329.
18. Hommel M & Barnish G. A broader view of malaria: from cell biology to health economics. *Parasitol Today* 1998; **14**: 337-340.
19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/80/Malaria/Epid/dnaworldview.html>
20. Jacobs P, Radzioch D & Stevenson MM. A Th1-associated increase in tumor necrosis factor alpha expression in the spleen correlates with resistance to blood-stage malaria in mice. *Infect Immun* 1996; **64**: 535-541.
21. Karunawera ND, Carter R, Grau GE, Kwiatkowski D, Del Giudice G & Mendis KN. Tumour necrosis factor-dependent parasite-killing effects during paroxysms in non-immune *Plasmodium vivax* malaria patients. *Clin Exp Immunol* 1992; **88**: 499-505.
22. Kocher TD & Wilson AC. DNA amplification by the polymerase chain reaction. En: Brown TA. Essential molecular byology: a practical approach. Great Britain: Oxford University Press 1994: vol. II: 185-207.
23. Kumaratilike LM & Ferrante A. T cell cytokines in malaria: their role in the regulation of neutrophil-and macrophage-mediated killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood forms. *Res Immunol* 1994; **145**: 423-429.

24. Kurtzhals JAL, Adabayeri V, Quarm GB *et al.* Low plasma concentrations of interleukin 10 in severe malarial anaemia compared with cerebral and uncomplicated malaria. *Lancet* 1998; **351**: 1768-1772.
25. Langhorne J. The response to the blood stages of *Plasmodium* in animals models. *Immunol Lett* 1994; **41**: 99-102.
26. Langhorne J, Gillard S, Simon B, Slade S & Eichmann K. Frequencies of CD4<sup>+</sup>T cells reactive with *Plasmodium chabaudi chabaudi*: distinct responses kinetics for cells with Th1 and Th2 characteristics during infection. *Int Immunol* 1989; **1**: 416-424.
27. Legorreta-Herrera M y Sánchez-Cruz P. La respuesta inmune celular contra el *Plasmodium*: agente etiológico de la malaria. *Vertientes* 1999; **2**: 3-8.
28. Leitner WW, Seguin MC, Ballou WR *et al.* Immune responses induced by intramuscular or gene gun injection of protective deoxyribonucleic acid vaccines that express the circumsporozoite protein from *Plasmodium berghei* malaria parasites. *J Immunol* 1997; **159**: 6112-6119.
29. Levesque MA, Sullivan AD & Meshnick SR. Splenic and hepatic hemozoin in mice after malaria parasite clearance. *J Parasitol* 1999; **85**: 570-573.
30. Long CA. Immunity to blood stages of malaria. *Curr Opin Immunol* 1993; **5**: 548-556.
31. Meager A. Cytokines. United States of America: Prentice Hall, 1991: 1-19.
32. Mendis KN, Naotunne TD, Karunaweera ND, Del Giudice G, Grau GE & Carter R. Anti-parasite effects of cytokines in malaria. *Immunol Lett* 1990; **25**: 217-220.
33. Menendez C, Fleming AF & Alonso PL. Malaria-related anaemia. *Parasitol Today* 2000; **16**: 469-476.
34. Mire-Sluis AR, Gaines-Das R & Thorpe R. Immunoassays for detecting cytokines: what are they really measuring? *J Immunol Methods* 1995; **186**: 157-160.
35. Morris JS, Goodier MR & Langhorne J. The response of  $\gamma\delta$ T cells to *Plasmodium falciparum* is dependent on activated CD4<sup>+</sup>T cells and the recognition of MHC class I molecules. *Immunology* 1996; **89**: 405-412.



36. Muniz-Junqueira MI, Dos Santos-Neto LL & Tosta CE. Influence of tumor necrosis factor- $\alpha$  on the ability of monocytes and lymphocytes to destroy intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* in vitro. *Cell Immunol* 2001; **208**: 73-79.
37. Omer FM, Kurtzhals JAL & Riley EM. Maintaining the immunological balance in parasitic infections: a role for TGF- $\beta$ ? *Parasitol Today* 2000; **16**: 18-23.
38. Omer FM & Riley EM. Transforming growth factor  $\beta$  production is inversely correlated with severity of murine malaria infection. *J Exp Med* 1998; **188**: 39-48.
39. Ostwal IP, Wynn TA, Sher A & James SL. Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor  $\alpha$  required as a constimulatory factor for interferon  $\gamma$ -induced activation. *Immunology* 1992; **89**: 8676-8680.
40. Phillips RS, Brannan LR, Balmer P & Neuville P. Antigenic variation during malaria infection-the contribution from the murine parasite *Plasmodium chabaudi*. *Parasite immunology* 1997; **19**: 427-434.
41. Phillips RS, Mathers KE & Taylor-Robinson AW. T cells in immunity to *Plasmodium chabaudi chabaudi*: operation and regulation of different pathway of protection. *Res Immunol* 1994; **145**: 406-411.
42. Playfair JHL, Taverne J, Bate CAW & De Souza B. The malaria vaccine: anti-parasite or anti-disease? *Immunol Today* 1990; **11**: 25-27.
43. Podoba JE & Stevenson MM. CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes both contribute to acquired immunity to blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS. *Infect Immun* 1991; **59**: 51-58.
44. Ramasamy R. Molecular basis for evasion of host immunity and pathogenesis in malaria. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1406**: 10-27.
45. Riley EM. Is T-cell priming required for initiation of pathology in malaria infections? *Inmunol Today* 1999; **20**: 228-233.
46. Rockett KA, Awburn MM, Rockett EJ, Cowden WB & Clark IA. Possible role of nitric oxide in malarial immunosuppression. *Parasite immunology* 1994; **16**: 243-249.
47. Romagnani S. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today* 1997; **18**: 263-266.

48. RPH Laboratory Medicine, 1998-2000.  
<http://www.rph.wa.gov.au/labs/haem/malaria/spain>
49. Rudin W, Quesniaux V, Favre N & Bordmann G. Malaria toxins from *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS and *P. berghei* ANKA cause dyserythropoiesis in C57BL/6 mice. *Parasitology* 1997; **115**: 467-474.
50. Sam H, Zhong-Su, Stevenson MM. Deficiency in tumor necrosis factor alpha activity does not impair early protective Th1 responses against blood-stage malaria. *Infect Immun* 1999; **67**: 2660-2664.
51. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> ed. United States of America: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989: 7.2-7.36.
52. Sayles PC, Cooley J & Wassom DL. A spleen is not necessary to resolve infections with *Plasmodium yoelii*. *Am J Trop Med Hyg* 1991; **44**: 42-48.
53. Shear HL, Srinivasan R, Nolan T & Chui-NG. Role of IFN- $\gamma$  in lethal and nonlethal malaria in susceptible and resistant murine hosts. *J Immunol* 1989; **143**: 2038-2044.
54. Stevenson MM, Su Z, Sam H & Mohan K. Modulation of host responses to blood-stage malaria by interleukin-12: from therapy to adjuvant activity. *Microbes Infect* 2001; **3**: 49-59.
55. Stevenson MM & Tam MF. Differential induction of helper T cell subsets during blood-stage *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS infection in resistant and susceptible mice. *Clin Exp Immunol* 1993; **92**: 77-83.
56. Stevenson MM, Tam MF, Belosevic M, Van der Meide PH & Podoba JE. Role of endogenous gamma interferon in host response to infection with blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS. *Infect Immunol* 1990; **58**: 3225-3232.
57. Stevenson MM, Tam MF, Wolf SF & Sher A. IL-12-induced protection against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS requires IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  and occurs via a nitric oxide-dependent mechanism. *J Immunol* 1995; **155**: 2545-2556.
58. Tay ZJ, Lara AR, Velasco CO y Gutiérrez QM. *Parasitología médica*. 5<sup>th</sup> ed. México: Editores Méndez, 1995: 157-170.

59. Taylor-Robinson A. Regulation of immunity to malaria: valuable lessons learned from murine models. *Parasitol Today* 1995; **11**: 335-341.
60. Taylor-Robinson AW & Phillips RS. Protective CD4<sup>+</sup> T-cell lines raised against *Plasmodium chabaudi* show characteristics of either Th1 or Th2 cells. *Parasite Immunology* 1993; **15**: 301-310.
61. Taylor-Robinson AW & Phillips RS. Th1 and Th2 CD4<sup>+</sup> cell clones specific for *Plasmodium chabaudi* but not for an unrelated antigen protect against blood stage *P. chabaudi* infection. *Eur J Immunol* 1994a; **24**: 158-164.
62. Taylor-Robinson AW & Phillips RS. B cells are required for the switch from Th1- to Th2-regulated immune responses to *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection. *Infect Immun* 1994b; **62**: 2490-2498.
63. Taylor-Robinson AW, Phillips RS, Severn A, Moncada S & Liew FY. The role of Th1 and Th2 cells in a rodent malaria infection. *Science* 1993; **260**: 1931-1934.
64. Taylor-Robinson AW & Smith EC. A dichotomous role for nitric oxide in protection against blood stage malaria infection. *Immunol Lett* 1999; **15**: 1-9.
65. Taylor-Robinson & Smith EC. A role cytokine in potentiation of malaria vaccines through immunological modulation of blood stage infection. *Immunol Rev* 1999; **171**: 105-124.
66. Thorpe R, Wadhwa M, Bird CR & Mire-Sluis AR. Detection and measured of cytokines. *Blood Rev* 1993; **15**: 133-148.
67. Troyle-Blomberg M. Human T-cell responses to blood stage antigens in *Plasmodium falciparum* malaria. *Immunol Lett* 1994; **41**: 103-107.
68. Weiss L. The spleen in malaria: the role of barrier cells. *Immunol Lett* 1990; **25**: 165-172.
69. Winkler S, Willheim M, Baier K *et al.* Reciprocal regulation of Th1- and Th2-cytokine-producing T cells during clearance of parasitemia in *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun* 1998; **66**: 6040-6044.
70. Winkler S, Willheim M, Baier K *et al.* Frequency of cytokine-producing T cells in patients of different age groups with *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 1999; **179**: 206-216.

71. Yap GS, Jacobs P & Stevenson MM. Th cell regulation of host resistance to blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS. Res Immunol 1994; **145**: 419-422.