



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

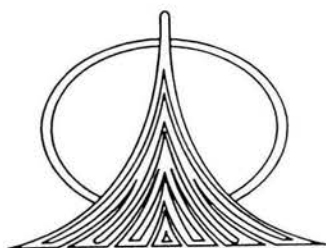
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

EXPRESION DE CITOCINAS EN RATONES CBA / Ca  
DURANTE LA REINFECCION CON UNA MEZCLA DE  
PLASMODIOS.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
**APOLINAR CERON RAMIREZ**

DIRECTORA: DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA



SEPTIEMBRE 2004



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.

---

---

## DEDICATORIA

‡ Le dedico este trabajo a los que me dieron la vida, a mis padres: **Idelfonso Cerón Ventura** y **Catalina Ramírez Hernández**. Gracias por su amor, confianza, caricias, dolor, sonrisas, regaños, por el ejemplo de la honradez y por que me enseñaron a cumplir todo lo que uno se proponga por muy difícil que sea. Gracias con todo mi corazón, por ser mis padres, los quiero mucho.

‡ A mi hermano **Eduardo**, mi mejor amigo, gracias por la confianza que siempre tienes en mí, tu apoyo me sirvió mucho para lograr esta meta, eres una persona muy valiosa para mí, gracias. A **Lucila**, mi cuñada, por pertenecer a la familia y permitir que todo siga igual. A mi sobrino **Eduardo**, que lo quiero mucho y que es un motivo más de superación.

‡ A **Maritza**, mi grandiosa hermana, mi mejor amiga, gracias por creer en mí, por que eres un motivo más de superación.

*La forma más fácil de crecer como persona es rodearme de gente capaz, y  
ustedes lo son.*

\*\*\**Gracias Familia*\*\*\*

---

---

---

---

## AGRADECIMIENTOS

- ❖ A la **Dra. Martha Legorreta Herrera** por haberme permitido trabajar en su laboratorio y por compartir sus conocimientos para la realización de este proyecto.
  
  - ❖ A los laboratoristas: **Elia Rincón Simbrón** y **Ricardo Gerardo Silvestre** por su gran ayuda y trabajo en el mantenimiento y cuidado de los animales.
  
  - ❖ Al **M. En C. Armando Cervantes Sandoval** por su valioso apoyo en el análisis estadístico de los datos obtenidos.
  
  - ❖ A los sinodales; **Q.F.B. Ma. De las Mercedes Zamudio Durán, Dra. Martha Legorreta Herrera, Dr. Alberto Monroy García, Q.FB. Oscar González Moreno** y a la **Dra. Ma. Isabel Soto Cruz**, gracias por su valiosa ayuda durante la revisión de este trabajo.
  
  - ❖ A **Bernardo Martínez Miguel** y **Francisco Gil Becerra**, por su grandiosa ayuda durante la parte experimental de este trabajo y, principalmente por la amistad que nos une.
- 
-

- 
- 
- ❖ A la **Q. Teresa Mendoza Mata** por su ayuda y asesoría proporcionada durante toda la carrera, gracias.
  
  - ❖ Al **Q.F.B. José Oscar González Moreno**, gracias por todo el apoyo proporcionado en toda la carrera y por tu amistad principalmente.
  
  - ❖ Al **Prof. Irineo Juárez García** por la excelente educación que me proporciono al inicio de mis estudios, gracias.
  
  - ❖ A todos los maestros que compartieron su conocimiento conmigo, muchas gracias.
  
  - ❖ A mis amigos con los cuales pase la mayor parte de la carrera: **Ibett, Jesica, Genaro, Otoniel, Alan, Christian, Uriel, Iván, Jonathan, Rene, Luis, Carlos** y a todos los que me faltaron mencionar, en especial a los del **grupo PB** de la generación **2000-2004**.
  
  - ❖ Gracias a la **Universidad Nacional Autónoma de México**, en especial a la **Facultad de Estudios Superiores Zaragoza** por haber permitido ser parte de esta institución.
  
  - ❖ Este trabajo recibió apoyo de los proyectos CONACyT: 39436 y DGAPA: 1N210100 y 1N221104.
- 
-

---

---

# INDICE

Abreviaturas.....	I
Lista de tablas.....	III
Lista de figuras.....	IV
Resumen.....	V
1. <b>Introducción</b> .....	1
2. <b>Marco teórico</b> .....	4
2.1 Ciclo biológico del <i>Plasmodium</i> .....	4
2.2 Inmunidad en malaria.....	7
2.3 Evasión del sistema inmune.....	9
2.4 Citocinas.....	10
2.4.1 Características de las citocinas.....	10
2.4.2 Citocinas asociadas a paludismo.....	11
2.4.3 Interferón $\gamma$ .....	12
2.4.4 Factor de necrosis tumoral $\alpha$ .....	12
2.4.5 Interleucina 4.....	13
2.4.6 Interleucina 10.....	13
2.4.7 Factor transformador de crecimiento $\beta$ .....	14
2.5 Óxido nítrico.....	15
2.5.1 Producción.....	15
2.5.2 Isoformas de NOS.....	16
2.5.3 Óxido nítrico sintetasa inducible.....	17
2.6 Reacción en cadena de la polimerasa.....	18
3. <b>Planteamiento del problema</b> .....	22
4. <b>Objetivo general</b> .....	23
4.1 Objetivos particulares.....	23
5. <b>Hipótesis</b> .....	24

---

---

---

---

<b>6. Diseño experimental</b> .....	25
6.1 Población: material biológico.....	25
6.2 Criterios de inclusión.....	25
6.3 Criterios de exclusión.....	25
6.4 Variables.....	25
6.5 Material.....	26
6.6 Equipo.....	26
6.7 Reactivos.....	27
<b>7. Método</b> .....	29
7.1 Diagrama de flujo.....	29
7.2 Determinación de la concentración de Hb.....	30
7.3 Índice esplénico.....	30
7.4 Medición de la parasitemia.....	30
7.5 Extracción de RNA.....	31
7.6 Retrotranscripción.....	31
7.7 Amplificación por PCR.....	32
7.8 Electroforesis en geles de acrilamida.....	34
<b>8. Resultados</b> .....	35
<b>9. Análisis de resultados</b> .....	49
<b>10. Conclusiones</b> .....	58
<b>11. Anexo</b> .....	59
<b>12. Bibliografía</b> .....	62

---

---

---

## ABREVIATURAS

---

### Abreviatura

---

APS	Persulfato de amonio
ATP	Trifosfato de adenosina
CDNA	DNA complementario
CPA	Célula presentadora de antígeno
CRO	Compuestos reactivos de oxígeno
Da	Daltones
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP's	Desoxirribonucleótidos de trifosfato
DT	desoxitimidina
ENOS	Óxido nítrico endotelial
EP	Eritrocitos parasitados
GMPc	Monofosfato de guanosina cíclico
Hb	Hemoglobina
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL-10	Interleucina 10
IL-4	Interleucina 4
INOS	Óxido nítrico sintetasa inducible
LPS	Lipopolisacarido
LT	Linfotoxina
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato
NED	N-1-naftilendiamina
NK	Asesinas naturales
NNOS	Óxido nítrico sintetasa neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetasa
ONOO <sup>-</sup>	Peróxinitrito
OPS	Organización Panamericana de Salud
<i>P.</i>	<i>Plasmodium</i>
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	RNA mensajero
RNI	Intermediarios reactivos de nitrógeno

---



---

---

Rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Retrotranscriptasa-PCR
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Amortiguador Tris-Ácido Bórico-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
TGF- $\beta$	Factor transformador de crecimiento beta
Tm	Temperatura de anelación
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
UV	Ultravioleta
WHO	Organización Mundial de Salud

---

---

## LISTA DE TABLAS

TABLA	Pág.
1.- Producción de merozoítos de acuerdo a la especie de <i>Plasmodium</i> .....	4
2.- Periodo del ciclo sexual de <i>Plasmodium</i> .....	5
3.- Familias de variantes antigénicas en diferentes especies de <i>Plasmodium</i> .....	9
4.- Isoenzimas de la óxido nítrico sintetasa.....	16

---

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Pág.
1.-Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> .....	6
2.- Células presentadoras de antígenos (CPA) que establecen comunicación con las dos subpoblaciones células T (TH), las células TH1 y las TH2.....	11
3.- Producción de óxido nítrico.....	15
4.- Representación de la reacción en cadena de la polimerasa.....	20
5.- Imagen de un gel de PCR revelado en UV.....	21
6.- Tinción de Giemsa de eritrocitos parasitados con <i>Plasmodium</i> .....	36
7.- Bandas correspondientes a la expresión de las citocinas determinadas por RT-PCR.....	41

---

---

## Resumen

La malaria es una enfermedad parasitaria de gran prevalencia en el mundo. Es la parasitosis humana de mayor importancia desde el punto de vista médico por su alta morbimortalidad y, socio-económico por su impacto sobre los países en desarrollo. Se localiza en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo.

La variabilidad antigénica de *Plasmodium* y su capacidad para evadir el sistema inmune han impedido el desarrollo de una vacuna efectiva. Para cada uno de los estados del ciclo de vida se cuenta con varios modelos pero ninguna con una eficiencia confiable.

En investigaciones anteriores se ha comprobado que durante la infección con *P. chabaudi* AS, se desarrolla una respuesta celular TH1 durante la fase aguda, donde se presenta un incremento en la concentración de óxido nítrico y de citocinas proinflamatorias como el IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$ , posteriormente ocurre un cambio a una respuesta tipo TH2 con incremento en la expresión de citocinas como IL-4 e IL-10. Las infecciones repetidas con plasmodios, ocurren con frecuencia en las zonas endémicas de malaria, sin embargo, se desconoce como se modifica la respuesta inmune cuando los individuos se infectan con mezclas de parásitos en una primera o segunda infección. En este trabajo se investigó como se afecta la respuesta inmune en infecciones a ratones CBA/Ca con mezcla de plasmodios, *P. chabaudi* AS (no letal) y *P. yoelii* 17 XL (letal), durante una primera infección y a ratones que se curaron de una infección solamente con el parásito no letal y que después se infectaron con la mezcla de plasmodios, en particular, se estudió como se modifica la expresión de los genes correspondientes a las citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  e iNOS en ambos grupos de ratones, además se cuantificaron los niveles de NO sérico por la técnica de Griess. La severidad de la anemia y el índice esplénico alto en el día 14 postinfección se asoció a la sobrevida mientras que la expresión de TGF- $\beta$  ejerció una regulación sobre la expresión de las citocinas pro y anti-inflamatorias. El óxido nítrico no se asoció con la sobrevida en los ratones.

---

## INTRODUCCIÓN

El paludismo o malaria, es la enfermedad asociada con la infección, por diversas especies de protozoarios pertenecientes al género *Plasmodium* y se transmite por el mosquito *Anopheles* hembra; estos protozoarios infectan principalmente al hospedero humano y al insecto alternativamente. La malaria es una de las enfermedades con mayor impacto a nivel mundial existiendo en más de 100 países, sobre todo en los subdesarrollados, especialmente en el continente africano (WHO, 2001). En la actualidad, aproximadamente 500 millones de personas están expuestas a la malaria endémica, de las cuales más de un millón mueren, en África, India, Asia Sur-Oriental, América del sur y regiones de Centroamérica (Gershon, 2002).

Existen 4 especies de *Plasmodium* que infectan al hombre: *P. falciparum* que se encuentra por toda la zona tropical de África, Asia y América Latina; *P. vivax* se localiza por todo el mundo especialmente en zonas tropicales y zonas templadas; *P. ovale* principalmente en el oeste tropical de África y *P. malariae* con una distribución irregular en todo el mundo. El vector es la hembra de los mosquitos que pertenecen al género *Anopheles*, en donde se lleva a cabo el ciclo sexual del parásito, lo que da origen a los esporozoitos que infectan al hombre.

En 1999, la población de América que vivía en zonas de condiciones ecológicas propicias para la transmisión de la malaria, ascendía a 299 millones, un total del 36.5% de la población, incluyendo a las zonas de México (OPS, 2001).

En México, la zona malárica comprende cerca del 58% del territorio nacional. De acuerdo al tipo de *Plasmodium*, el que infecta con mayor predominio es el *P. vivax* (todo el país) con un 95%; la malaria por *P. falciparum* (sureste de México) comprende del 1 al 3%; y *P. malariae* es causante de menos del 1%, pero a México se le considera una zona de baja endemia para la malaria, es decir, hipoendemia, con presentación de brotes epidémicos. Los transmisores que predominan en México son

---

---

*A. albimanus* y *A. pseudopunctipennis* presentes en las costas del pacífico y del Golfo de México, este último es el más importante para la transmisión de malaria en nuestro país, tomando en cuenta los diferentes requerimientos particulares de las diferentes especies para su desarrollo (Tay, 2003).

La principal función fisiológica del sistema inmunológico es proteger al hospedero contra microbios patógenos. Se ha observado que la inmunidad contra paludismo involucra respuestas tanto celulares como humorales. Tradicionalmente se ha dividido en inmunidad innata e inmunidad adquirida. Las principales diferencias entre ambas respuestas son los mecanismos y los tipos de receptores usados para el reconocimiento antigénico. En la inmunidad innata intervienen las barreras físicas y químicas, tales como: el epitelio y las sustancias antimicrobianas, las proteínas plasmáticas, las cuales incluyen miembros del sistema de complemento, proteínas de fase aguda y otros mediadores de inflamación. Los fagocitos son los principales productores de las citocinas IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, y TNF- $\alpha$  y además liberan otras moléculas como: la enzima activadora de plasminógeno y fosfolipasa, radicales libres del oxígeno, peróxido, factor activador de plaquetas, óxido nítrico y mediadores lipídicos de inflamación, tales como prostaglandinas y leucotrienos (Hernández y Alvarado, 2001).

El resurgimiento de la malaria en todo el mundo, incluyendo a México, se debe principalmente a tres factores:

- Disminución a la intensidad de las campañas contra la malaria.
- Aparición de vectores resistentes a insecticidas (DDT).
- Aparición de cepas de *Plasmodium* resistentes a fármacos antimaláricos.

además que la inmunidad protectora en la malaria es específica de cada especie y principalmente específica de cada estadio de desarrollo del parásito, de modo que todos los fármacos o vacunas antimaláricos confieren protección sólo contra una fase o varias etapas de desarrollo y no contra todas las fases del ciclo biológico (Kumate et. al., 2003).

---

En experimentos anteriores se ha estudiado la expresión de citocinas en ratones infectados con la mezcla de plasmodios por primera vez o infectados solamente con el *P. chabaudi AS* (Ventura-Ayala, 2001). En este trabajo se estudió la expresión de los genes que codifican para algunas citocinas involucradas en la regulación de la respuesta inmune, durante una segunda infección con la mezcla de *Plasmodium* (*P. chabaudi AS*, no letal, y *P. yoelli 17 XL*, letal para el ratón) después de 8 semanas de haberse infectado con *P. chabaudi AS* solamente, así como la determinación de óxido nítrico sérico durante la infección, se realizó la misma evaluación en ratones infectados por primera vez con la mezcla.

---

---

## MARCO TEÓRICO

### CICLO BIOLÓGICO DEL *Plasmodium* sp.

La fase preeritrocitaria asintomática se inicia cuando el mosquito hembra infectado del género *Anopheles* inyecta esporozoitos al torrente sanguíneo del hombre. Los esporozoitos presentes en la saliva de éste, pasan a la sangre, donde circulan hasta 30 minutos mientras parasitan a las células parenquimatosas del hígado, en donde se realiza la primera parte del ciclo asexual, y maduran durante aproximadamente dos semanas para convertirse en esquizontes tisulares (periodo de esquizogonia exoeritrocítica). En esta fase, el parásito crece y su núcleo se divide varias veces, lo que origina la formación de merozoítos tisulares. El número de merozoítos formados a partir de cada esporozoíto varía según la especie (de 5 a 17 días aproximadamente).

<i>Plasmodium</i>	# de merozoítos	Periodo
<i>P. vivax</i>	10,000 –15,000	8 a 13 días
<i>P. falciparum</i>	30,000-40,000	5 a 7 días
<i>P. malariae</i>	2,000	13 a 17 días

**Tabla 1. Producción de merozoítos de acuerdo a la especie de *Plasmodium*.**

Una vez formados, los merozoítos, que son infectantes para los glóbulos rojos, rompen a los hepatocitos y penetran a la circulación. La mayoría de ellos son destruidos con rapidez, sin embargo, una cantidad considerable se fija a las terminales glucosídicas de las glicoforinas A, B y C de los eritrocitos, por lo cual los merozoítos circulan por la sangre durante unos pocos minutos antes de entrar en los hematíes para continuar la fase sanguínea asexual y eritrocítica. Una vez en los hematíes, los merozoítos maduran para dar lugar a la forma anular, el trofozoíto, que consume hemoglobina y cuando su cromatina se divide produce un esquizonte.



---

---

Después de romper la pared del eritrocito parasitado por el esquizonte, los merozoitos quedan en libertad e invaden otros eritrocitos o inician la fase sexual y maduran dentro de los hematíes para formar gametocitos machos y hembras (se desconoce cuáles son las señales o eventos que desencadenan los procesos de diferenciación de un merozoíto-trofozoíto hacia esquizonte o gametocito), que pueden ingerirse por el mosquito *Anopheles* al alimentarse (Tay y col., 2002)

<i>Plasmodium</i>	Periodo
<i>P. vivax</i>	10 a 16 días
<i>P. malariae</i>	21 días
<i>P. falciparum</i>	10 a 16 días
<i>P. ovale</i>	10 a 16 días

**Tabla 2.-Periodo del ciclo sexual de *Plasmodium*.**

Cuando entran en el intestino del insecto, los gametocitos machos pierden los flagelos para formar microgametos que fertilizan al microgameto (hembra) y forman el cigoto, designado oocineto, que penetra en la pared del estómago, en donde pierden sus organelos de penetración y movilidad e inicia su crecimiento, maduración y diferenciación transformándose en un ooquiste. El ooquiste se desarrolla para producir miles de esporozoítos que invaden los tejidos del mosquito y especialmente emigran hasta las glándulas salivares del insecto, donde comienza otra vez el ciclo (Youmans, et. al., 1984; Kumate, et. al., 2001; Tay et. al., 2002).

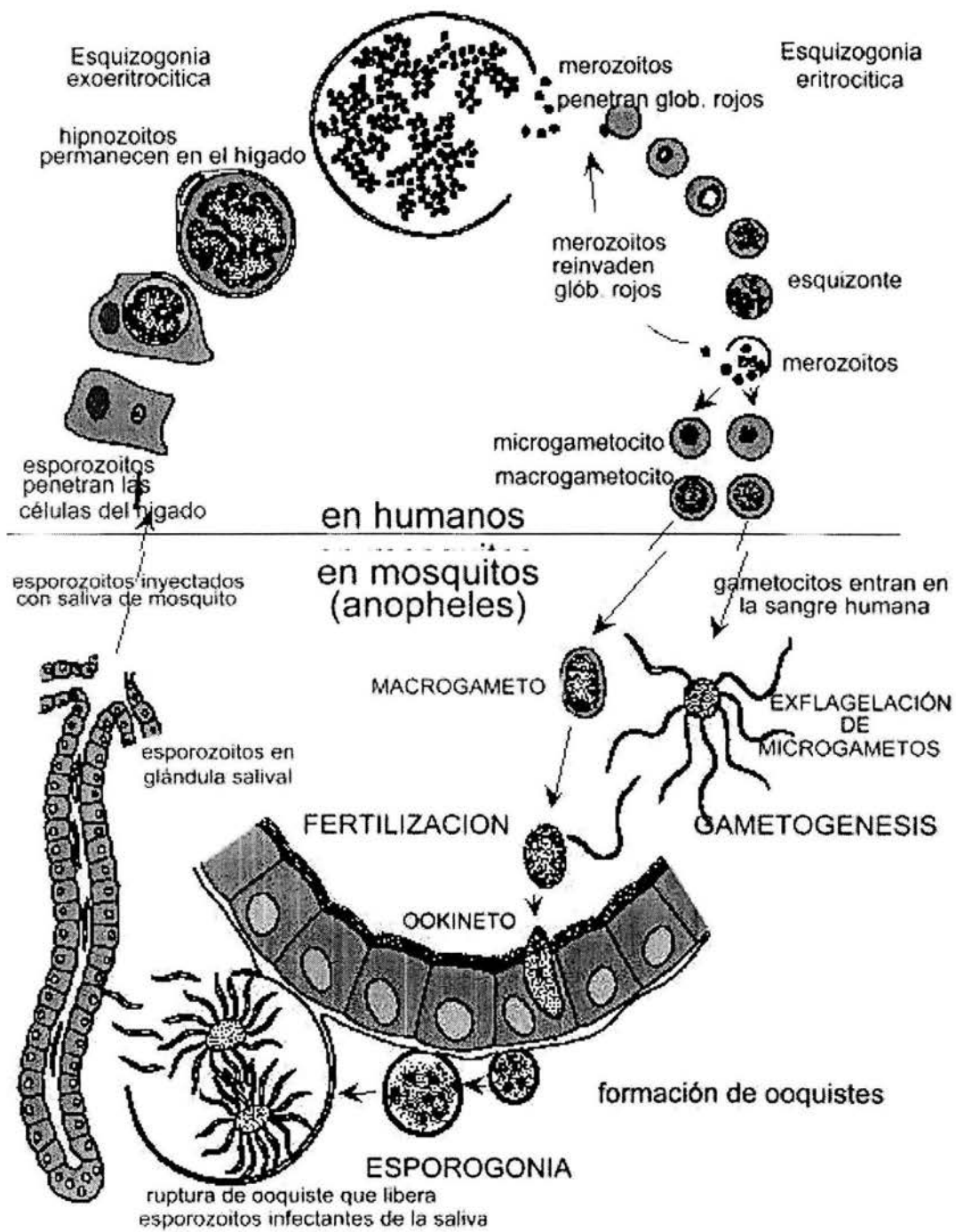


Figura 1.- Ciclo de vida de *Plasmodium*.

---

## INMUNIDAD EN MALARIA

El desarrollo de la inmunidad frente a malaria es muy complejo y todavía no se ha explicado de manera completa. La respuesta inmune del hombre ante la infección por plasmodios, se puede traducir en una tolerancia a la infección, fenómeno que determina un equilibrio entre el huésped y el parásito, existen también estados de resistencia natural e innata en algunas razas humanas contra especies definidas de plasmodios (Arredondo, 1995).

En varios estudios se ha sugerido que la inmunidad está mediada por anticuerpos frente a antígenos que se expresan en la membrana de los glóbulos rojos infectados. Los linfocitos T desempeñan una función primordial, indirectamente, en la producción de anticuerpos y en el establecimiento de una respuesta inmune celular contra el plasmodio (Fossati 1990). Los antígenos de superficie de los merozoítos, la forma que invade a los eritrocitos, también son un blanco importante de los anticuerpos producidos por el sistema inmune (Gershon, 2002).

La infección por *Plasmodium* es capaz de estimular tanto a las células T CD4<sup>+</sup> como las CD8<sup>+</sup>, éstas ejercen efectos protectores en diferentes fases de la infección por *Plasmodium*: las células T CD4<sup>+</sup> intervienen en la respuesta inmunitaria frente a la fase sanguínea de *P. yoelii*, mientras que en la fase hepática de la infección con *P. berghei* son las células T CD8<sup>+</sup> las que ejercen el efecto protector. Los hepatocitos expresan moléculas MHC (complejo principal de histocompatibilidad) de clase I, pero no de clase II, por lo que las células CD4<sup>+</sup> no los pueden reconocer y no son estimuladas para que produzcan IFN- $\gamma$ . De la misma forma, las células CD8<sup>+</sup> no afectan a los parásitos durante la fase sanguínea porque los eritrocitos no expresan moléculas MHC de clase I (White et. al., 1996).

Las células T CD4<sup>+</sup> se dividen en dos subpoblaciones principales TH1 y TH2. Las células TH1 producen IL-2, IFN- $\gamma$ , LT- $\alpha$  (TNF- $\beta$ ) que activan a macrófagos, son mediadores de la respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado y ejercen una sobrerregulación de los isotipos de inmunoglobulinas. Las células TH2 producen

---

---

IL4, IL-5, IL-6 e IL-10, además que ayudan a la maduración de células B a células plasmáticas, así como a la producción de anticuerpos y posición de otros isotipos. La inmunidad celular hacia los plasmodios está mediada fuertemente por macrófagos y neutrófilos, con o sin anticuerpos específicos, por citocinas como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  así como intermediarios reactivos de nitrógeno y oxígeno (Taylor-Robinson, 1995), además se ha demostrado que actúan durante la fase hepática del paludismo (Stevenson & Tam, 1993). Las células TH2 suelen colaborar con la producción de anticuerpos que aumentan la especificidad de la reacción inmunitaria, la eliminación de los parásitos palúdicos durante la fase eritrocítica se produce en el bazo por medio de células efectoras activadas y por medio de citotoxicidad dependiente de anticuerpos. Los anticuerpos inhiben la invasión del parásito a los eritrocitos, promueven la opsonización, de merozoítos y eritrocitos infectados y la separación de éstos últimos de las células endoteliales y capilares del cerebro (Taylor-Robinson, 1996).

El crecimiento esplénico exagerado, es la expresión clínica de una respuesta inmune humoral alterada por inmunoglobulinas M, específicas e inespecíficas, las cuales se producen en exceso y por un periodo anormalmente prolongado en el tiempo, ante un estímulo antigénico repetido en personas sin infección demostrable (Rodríguez y col., 2000).

La producción de óxido nítrico se ha asociado con la eliminación de la infección, las citocinas IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  estimulan su síntesis por medio de los macrófagos, las células endoteliales también pueden producir óxido nítrico. A este compuesto se le ha considerado como un mecanismo de resistencia al paludismo, así como importante para el control de la mayoría de las infecciones parasitarias (Rockett, et. al. 1996), sin embargo no se ha confirmado su participación directamente con la reducción de la parasitemia en individuos enfermos por malaria, pero se sigue investigando si existe una relación de los niveles de óxido nítrico con respecto al grado de la infección (Van der Heide, et. al., 2000).

## EVASIÓN DEL SISTEMA INMUNE

El parásito tiene la capacidad de evadir el sistema inmunológico por medio de variaciones genéticas. La representación molecular de los genes, se encuentra en los telómeros, las partes distales al centrómero de los cromosomas, donde las familias de genes con alta variabilidad se agrupan. En el caso de *P. falciparum* son 3, que se conocen como: *var*, *rif* y *stevor*, que codifican unas proteínas llamadas PfEMP1 (*falciparum* Eritrocyte Membrane Protein 1), rifinas y stevors, respectivamente. En *P. yoelii* cada merozoíto puede expresar diferentes números de proteínas al unirse con el eritrocito (Rasti, et. al., 2004) y por lo tanto ser inmunológicamente diferentes.

Especie de <i>Plasmodium</i>	Familias de genes variables	# de gen en el genoma	Variante antigénica	Función
<i>P. falciparum</i>	<i>var</i>	59	PfEMP1	Variación citoadherente
	<i>rif</i>	149	RIFIN	Variación antigénica
	<i>Stevor</i>	≈ 28	STEVOR	Variación antigénica
<i>P. vivax</i>	<i>vir</i>			Variación antigénica
<i>P. knowsei</i>	SICA gene		SICA	Variación antigénica
<i>P. yoelii</i>	<i>yir</i>			Variación antigénica
<i>P. chabaudi</i>	<i>cir</i>			Variación antigénica

**Tabla 3.-Familias de variantes antigénicas en diferentes especies de *Plasmodium*.**

Las proteínas PfEMP1 son blancos de los anticuerpos que genera el sistema inmune pero dada la alta variabilidad de la familia de genes *var*, no son reconocidos, por lo cual se llega a una infección crónica.

El factor inhibidor de la migración de los macrófagos es un inmunomodulador que promueve la supervivencia de los parásitos. Se encontró un análogo del inhibidor en *P. falciparum* (Greenwood, 2002).

---

---

## CITOCINAS

### CARACTERÍSTICAS DE LAS CITOCINAS

Las citocinas son proteínas solubles de bajo peso molecular (generalmente menos de 30kDa) secretadas por las células de la inmunidad innata y adquirida, que median muchas de las funciones de éstas. Son el principal medio de comunicación intracelular ante una invasión (Hernández y Alvarado, 2001). Las citocinas sirven para iniciar la respuesta inflamatoria, para definir la magnitud y naturaleza de la respuesta inmune específica (Oberholzer et. al., 2000).

Considerando las diversas citocinas, éstas pueden exhibir una o varias de las siguientes características:

- Pleitropía (múltiples efectos al actuar sobre diferentes células).
- Redundancia (varias citocinas pueden ejercer el mismo efecto).
- Sinergismo (dos o más citocinas ejercen un mismo efecto que se potencia mutuamente).
- Antagonismo (inhibición o bloqueo mutuo de sus efectos).
- La secreción de citocinas es un proceso breve y autolimitado.
- Las citocinas al igual que otras hormonas, inician sus acciones uniéndose a receptores de membrana específicos presentes en las células diana.

Las citocinas controlan al sistema inmune de varias maneras, que se puede agrupar de la siguiente forma:

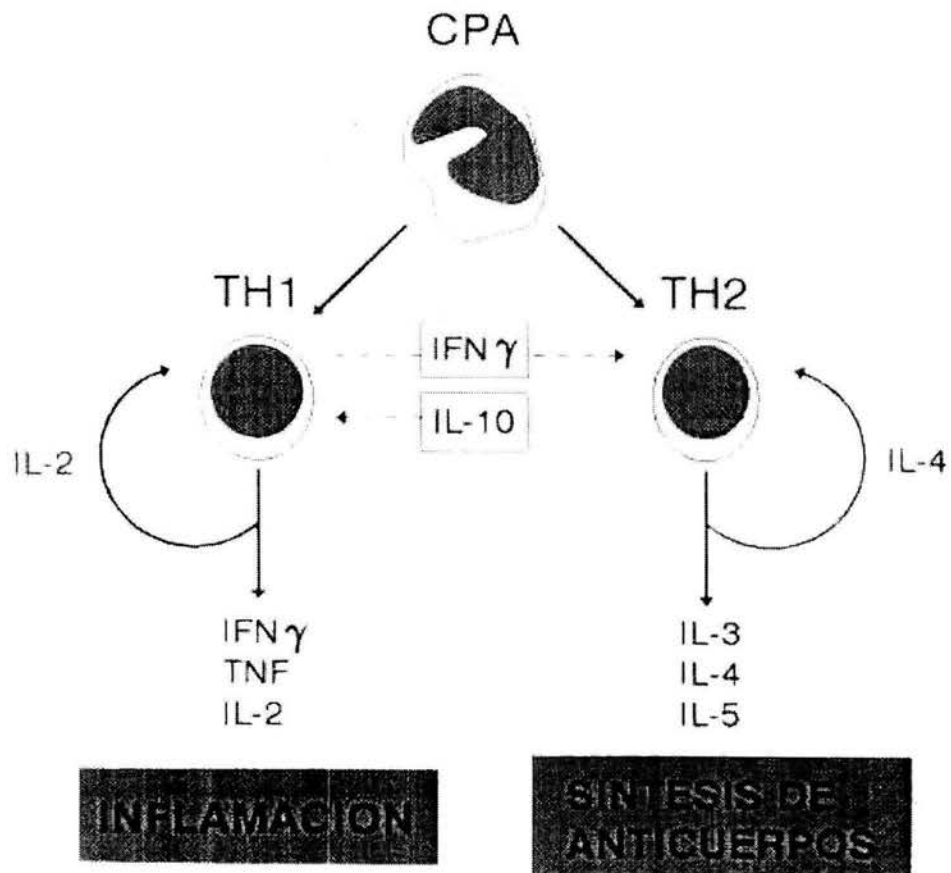
- Regulan la activación, proliferación y diferenciación de varios tipos de células.

Regulan la secreción de anticuerpos y de otras citocinas, tomando en cuenta que ejercen su función al unirse a receptores específicos para cada citocina en la superficie de la célula en la que ejerce su función (Duran et. al., 1998).

---

## Citocinas asociadas a paludismo

En la infección con *P. chabaudi* AS existe participación de células  $CD4^+$ , tanto TH1 y TH2. Las células TH1 predominan durante la fase aguda de la parasitemia, mientras que las células TH2 predominan después de la fase aguda de la infección. En la infección con *P. yoelii* 17 XL las células involucradas son las  $CD4^+$  TH2, en tanto que para una reinfección con *P. chabaudi* AS hay una respuesta más rápida que en la primera de las TH2. Las células TH1 producen IL-2, IFN- $\gamma$ , LT- $\alpha$  (TNF- $\beta$ ) y las células TH2 producen IL4, IL-5, IL-6 e IL-10, además que ayudan a la maduración de células B a células plasmáticas (Taylor-Robinson, 1996).



**Figura 2.-** Las células presentadoras de antígenos (CPA) establecen comunicación con las dos subpoblaciones de células T (TH), las células TH1 y las TH2.

---

### **Interferón gamma (IFN- $\gamma$ )**

El IFN- $\gamma$  se produce por los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> en respuesta específica a antígenos, es la principal citocina de células TH1, activa macrófagos, aumenta la expresión de moléculas del MHC clase I y II, incrementa la fagocitosis, induce la producción del factor necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y metabolitos reactivos de oxígeno, es esencial para la inmunidad celular frente a microorganismos intracelulares. El principal blanco del IFN- $\gamma$  durante la malaria son los monocitos-macrófagos (Bate et. al., 1988) y los neutrófilos, ya que están asociados a la respuesta principal durante una primera infección por *Plasmodium* (Phillips et. al., 1995), además de inhibir el desarrollo de los parásitos en los hepatocitos. En modelos murinos se ha demostrado que para controlar la infección, se requiere tempranamente de IFN- $\gamma$  (Jasón, 2001). La regulación de la secreción de IFN- $\gamma$  en su mayor parte está bajo el control de la citocina IL-2.

### **Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )**

Los factores de necrosis tumorales (TNFs), son citocinas multifactoriales que poseen numerosas actividades biológicas, implican a la respuesta de la fase aguda durante una infección o daño, así como a la regulación del crecimiento y diferenciación celular, además son clave en la activación de los macrófagos (Castro y col., 2003).

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), se produce en la fase pre-eritrocítica, después del estímulo con antígenos parasitarios en el tiempo de la ruptura del esquizonte, y en la fase eritrocítica durante la liberación de los merozoitos de los glóbulos rojos infectados (Perlmann et. al., 1999). El TNF junto con las citocinas: IL-1, IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$  y RNI están involucrados en la disminución de la parasitemia en malaria, ya que son capaces de matar gametocitos intraeritrocíticos, así como actuar en los parásitos intraeritrocíticos indirectamente, induciendo la producción de intermediarios de nitrógeno (RNI). El TNF- $\alpha$  es una citocina



---

---

proinflamatoria producida por células NK (del inglés natural killer) y macrófagos activados por toxinas del parásito del estadio sanguíneo (Long, 1993).

En una infección primaria, los niveles de TNF- $\alpha$  se elevan tempranamente para eliminar la infección, en ese momento predominan las células CD4<sup>+</sup> TH1, pero después hay un cambio a un tipo de respuesta TH2 que lleva a la supresión de TNF- $\alpha$ , y por lo tanto disminuye su expresión (Taylor-Robinson, 1995). Luego de la infección con el *Plasmodium* se requiere regular la disminución de IFN- $\gamma$  que induce la activación de macrófagos, la regulación se lleva a cabo por citocinas del tipo TH2 (IL-4 e IL-10).

#### **Interleucina 4 (IL-4)**

La IL-4, secretada por células TH2 induce el crecimiento y la maduración de las células B a células plasmáticas productoras de anticuerpos. La IL-4 es el estímulo más importante para la producción de anticuerpos IgE y para el desarrollo de células TH2 a partir de CD4<sup>+</sup>, induce la expresión de moléculas MHC clase II; por lo cual IL-4 y las células TH2 son importantes en la respuesta de anticuerpos contra *Plasmodium* (Langhorne, 1994). La IL-4 inhibe a los monocitos que tienen actividad antiparasitaria, pero no ejerce ningún efecto sobre los neutrófilos que juegan un papel importante en la eliminación de la infección, especialmente en presencia de factores de opsonización, además que está asociada a la proliferación de células B, así como en la producción de anticuerpos, también es conocida por inducir el cambio hacia IgG4 e IgE (cuando no promueve a macrófagos y neutrófilos), y es probable que inhiban la producción de IgG1 a IgG3, los cuales producen la fagocitosis (Kumaratilake & Ferrante, 1995).

#### **Interleucina 10 (IL-10)**

Una anemia severa presente durante la malaria, se asocia con bajos niveles de IL-10 (Kathryn & Marsh, 2004), además de que inhibe la liberación de citocinas proinflamatorias, incluyendo TNF- $\alpha$  de monocitos y neutrófilos humanos e inhibe

---

---

la secreción de IFN- $\gamma$  producidos por TH1, pero inclina el equilibrio regulador a favor de las respuestas inmunitarias humorales. La IL-10 al desactivar a los macrófagos suprime la producción de intermediarios reactivos del oxígeno (IOR), óxido nítrico y proteínas de adhesión (Roitt, 2001). La IL-10 se produce durante el estado hepático de la infección por *P. falciparum* (en personas que sufren una reinfección) en respuesta al LSA-1 (Liver Stage Antigen 1), por lo que se asocia a la resistencia a la siguiente infección (Curtis et. al. 1999), tomando en cuenta que en una reinfección la respuesta inmune que predomina es la TH2.

### **Factor transformador de crecimiento $\beta$ (TGF- $\beta$ )**

El TGF-  $\beta$  es una proteína producida por diferentes tipos celulares como: macrófagos, linfocitos, plaquetas, osteocitos, etc. El TGF-  $\beta$  inhibe la proliferación y la diferenciación de las células T y la activación de macrófagos, estimula la producción de anticuerpos IgA en ratones (Abbas, 2002).

En modelos murinos se ha detectado que en concentraciones bajas de expresión la mortalidad es muy alta, y cuando se acompaña de niveles normales, la supervivencia predomina. El TGF- $\beta$  suprime la producción de TNF- $\alpha$  y óxido nítrico de macrófagos, además de suprimir la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  de células NK, pero cuando se expresa se acompaña por un incremento de IL-10 que conduce a un cambio del tipo de respuesta de TH1 a TH2 (Fakhereldin, 1998).

---

---

## ÓXIDO NÍTRICO

### PRODUCCIÓN

Biológicamente la producción de óxido nítrico (NO) se origina a partir del oxígeno y la L-arginina en una reacción catalizada por la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS), como consecuencia de la oxidación, al ceder 5 electrones, el nitrógeno guanidino de la L-arginina. La NOS presenta diferentes propiedades bioquímicas que dependen del tejido de donde se obtiene y su síntesis esta regulada particularmente por los niveles de expresión del gen (Titheradge, 1998).

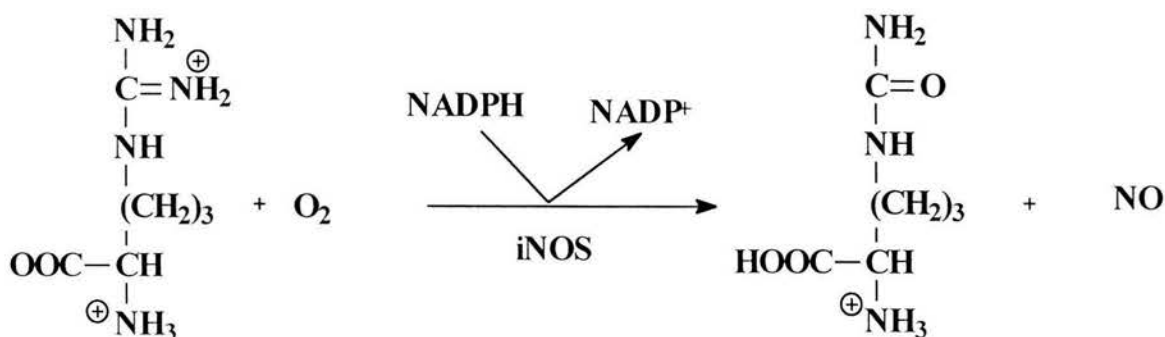


Figura 3.- Producción de óxido nítrico.

En relación con la inmunidad el NO tiene acciones inespecíficas que regulan la actividad de los macrófagos, pero también la de células no fagocíticas vasculares y epiteliales. Puede estimular o inhibir la proliferación de los linfocitos T y en ocasiones interviene en los estados de inmunodeficiencia en la infección severa (Vivian y col., 1999). El óxido nítrico y los intermediarios reactivos de nitrógeno se producen en la resistencia a la infección a malaria Y pueden ocasionar daño en las células. El óxido nítrico tiene actividad microbicida, *Plasmodium* es sensible al efecto de éste, así como a compuestos nitrogenados derivados del óxido nítrico (Hommel, 1996).

El óxido nítrico inhibe la producción de ATP y ADN, por lo que presenta una fuerte acción antimicrobiana contra parásitos intracelulares (*Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Tripanosoma*) (Roitt, et. al., 2000).

### ISOFORMAS DE NOS

Existen tres diferentes isoenzimas de la NOS, la neuronal (nNOS), la endotelial (eNOS), que son constitutivas dependientes de  $Ca^{2+}$  /calmodulina, y la inflamatoria o inducible (iNOS), que no depende de calcio, todas poseen diferentes propiedades (Titheradge, 1998).

La nNOS se produce principalmente en el cerebro, la iNOS se expresa en células del sistema inmune, principalmente macrófagos y neutrófilos y esta isoforma juega un papel mayor en la defensa antimicrobiana, y por último la eNOS se expresa en las células del endotelio vascular. Las primeras dos isoformas son las que contribuyen a la formación de óxido nítrico durante la infección a células sanguíneas por *Plasmodium* (Van der Heide, 2000).

Isoenzima de NOS	Peso molecular, Kda	Propiedades Distintivas	Tejidos o células de expresión
Neuronal (nNOS)	160	$Ca^{2+}$ dependiente Expresión constitutiva	Células neuronales y músculo esquelético
Endotelial (eNOS)	134	$Ca^{2+}$ dependiente Expresión constitutiva	Células endoteliales, epiteliales y cardiomiocitos
Inducible (iNOS)	130	$Ca^{2+}$ independiente Inducido por estímulos inflamatorios	Macrófagos, Hepatocitos, células del músculo liso, etc.

**Tabla 4.- Isoenzimas de la óxido nítrico sintetasa.**  
modificada de Hommel, 1996.

Una vez difundido el NO, activa a la enzima guanidil ciclasa y ésta provoca un aumento intracelular de GMPc, el cual es un mediador de los efectos fisiológicos. La actividad del óxido nítrico va a depender de la cantidad y del lugar donde se

---

---

produce, además del estado de óxido-reducción del medio en donde va a actuar, por lo tanto, es de suma importancia la concentración de radical libre de oxígeno ( $O_2^{\cdot}$ ) que exista, pues a partir de éste se llevará a cabo la formación de mayores o menores cantidades de peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ), un radical libre oxidante que tiene un papel fundamental en la lesión tisular (Rodella, et. al., 1999).

### **ÓXIDO NÍTRICO SINTETASA INDUCIBLE (iNOS)**

Su expresión regula la producción de óxido nítrico, se expresa en respuesta a la secreción de citocinas proinflamatorias durante la infección o exposición a antígenos específicos de parásitos. Las citocinas, inducidas por una infección parasitaria, como  $IFN-\gamma$ ,  $TNF-\alpha$ ,  $IL-1$  y algunos productos patógenos como glicosilfosfatidilinositol, pueden estimular la expresión de iNOS (Brunet, 2001), después de unas cuantas horas de exposición, este estímulo ejerce sus efectos a nivel transcripcional del RNA.

---

---

## REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Es una técnica usada para obtener un millón de copias de una secuencia de DNA *in vitro* en pocas horas a partir de una muestra muy pequeña. Fue descrita por Kary Mullis en el año de 1986.

Para llevar a cabo la reacción de PCR necesitamos conocer al menos una parte de la secuencia del gene que se quiere amplificar para emplear dos oligonucleótidos sintéticos de DNA, complementarios a dos fragmentos de la doble cadena, los cuales se colocan en una mezcla de reacción, en donde después se adiciona la fracción de DNA (Hoffe, 1998).

El PCR esta basado en 3 pasos que se requieren para la reacción de síntesis del DNA:

1) **La desnaturalización.**- Para que se inicie la reacción es necesario que el DNA molde se encuentre en forma de cadena sencilla. Esto se consigue aplicando temperaturas de 90 a 95°C que producen la rotura de los puentes de hidrógeno intercatenarios y por lo tanto la separación de ambas cadenas. Para conseguir la completa separación de las hebras de toda la muestra esta temperatura debe mantenerse unos minutos. Si el DNA solo se desnaturaliza parcialmente éste tenderá a renaturalizarse rápidamente, evitando así una eficiente hibridación de los *primers* y una posterior extensión.

2) **La hibridación.**- Esta fase se denomina también fase de “annealing” o de emparejamiento. Una vez que el DNA está desnaturalizado se disminuye la temperatura hasta un rango comprendido entre los 40 y los 60°C para que se pueda producir la unión de los *primers* a las secuencias flanqueantes del fragmento que se va a amplificar. La temperatura de fusión o annealing ( $T_m$ , “melting temperature”) depende de varios factores y es relativamente específica para cada *primer*. La longitud de los *primers* y la secuencia son críticas en la designación de los parámetros de una amplificación, una fórmula simple para calcular la  $T_m$  es la siguiente:

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T).$$

---

---

No obstante, cada *primer* exige una serie de estudios experimentales para determinar su temperatura de annealing específica ya que si la temperatura es muy baja, la unión se hará de forma inespecífica y si es muy alta no se producirá una unión completa.

### **3) Elongación de la nueva cadena de DNA definida por el *primer*.-**

Durante este paso la *Taq polimerasa* incorpora nucleótidos en el extremo 3' del primer utilizando como molde la cadena de DNA previamente desnaturalizada. La temperatura a la que se lleva a cabo este paso suele ser de 72°C ya que es la temperatura a la que la *Taq polimerasa* alcanza su máxima actividad. Normalmente una extensión de 20 segundos es suficiente para fragmentos menores de 500 pb, y 40 segundos para fragmentos mayores de 1.2Kb.

Para la PCR se utilizan dos oligonucleótidos sintéticos de unos 15-20 nucleótidos que son complementarios a las zonas flanqueantes de la región que se quiere amplificar. Estos oligonucleótidos (habitualmente conocidos por su nombre en inglés, "primers") actúan como cebadores para la síntesis *in vitro* de DNA la cual está habitualmente catalizada por una enzima llamada *Taq polimerasa* (White, 1993). Dicha enzima se aísla de una bacteria termófila, denominada *Thermus aquaticus*, que es capaz de crecer a temperaturas elevadas (79-85 ° C). A esta temperatura dicha enzima es capaz de mantener una media de extensión de más de 60 nucleótidos por segundo en regiones ricas en uniones G-C. La temperatura óptima a la que actúa la *Taq polimerasa* permite el uso de elevadas temperaturas para la unión de los *primers* y para la extensión, de esta manera se aumenta el nivel de exigencia de la reacción y se reduce la extensión de los *primers* unidos inespecíficamente al DNA.

# Reacción en cadena de la polimerasa

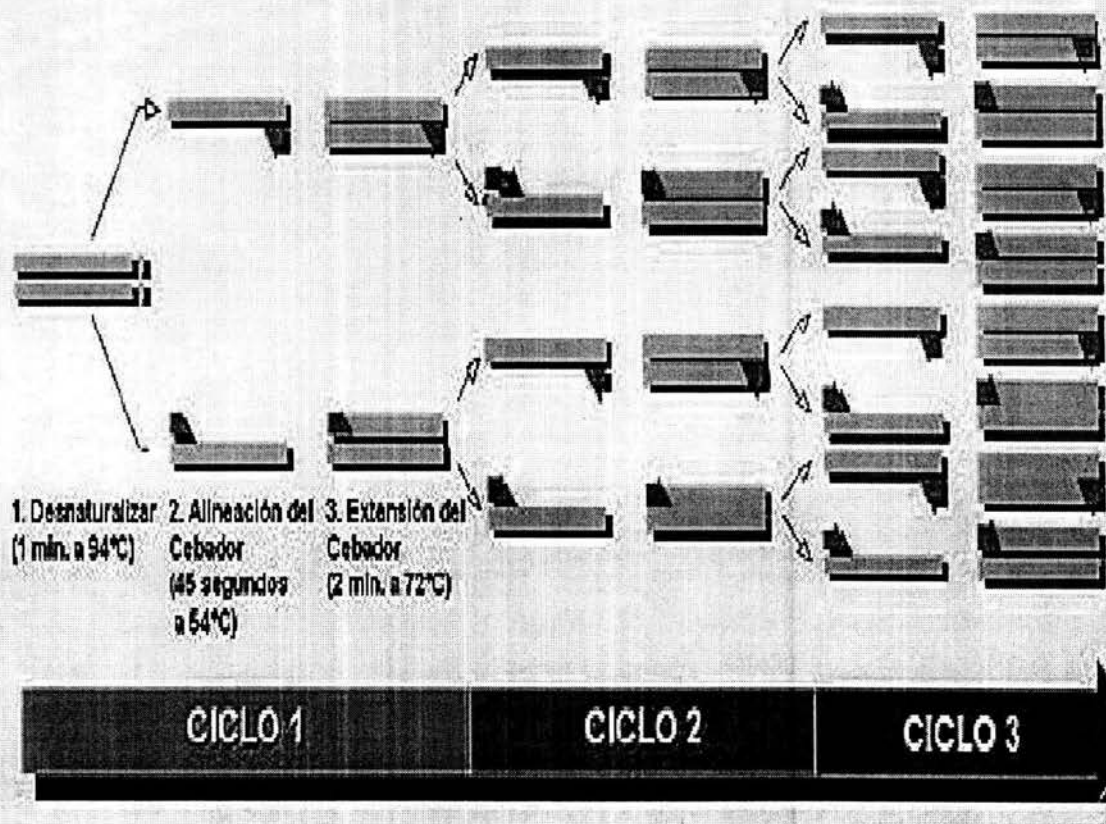
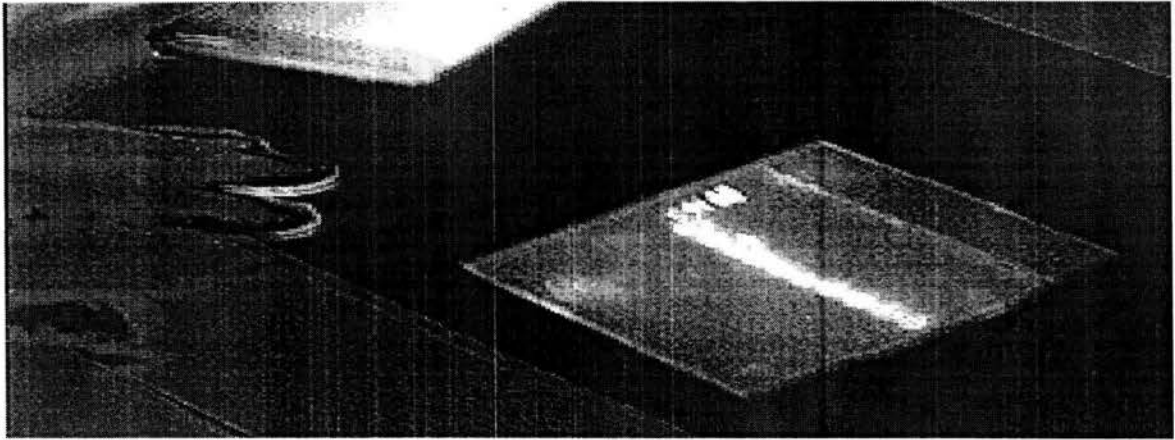


Figura 4.- Representación de la reacción en cadena de la polimerasa.



---

El ciclo se repite una y otra vez, dando como resultado el doble del número de moléculas de DNA por cada ciclo. Después de 30 ciclos, se producen alrededor de 1 billón de copias de DNA entre los dos *primers*. Esta cantidad de DNA es suficiente para detectarlo directamente por electroforesis de acrilamida, en donde se tiñe el gel con bromuro de etidio (Hoffee, 1998).



**Figura 5.- Imagen de un gel de PCR revelado en UV.**

---

---

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El paludismo es la enfermedad de mayor prevalencia transmitida por vectores; es endémica en 91 países, 40 % de toda la población mundial está en riesgo de contraerla cada año. En la actualidad, unos 500 millones de personas están expuestas a la malaria endémica en África, India, Asia Sur-Oriental, América del sur y regiones de Centroamérica, se reportan aproximadamente 2 millones de muertes anuales atribuidas al paludismo, la mitad de las cuales se presentan en la población de menores de 5 años (Rodríguez, 2002). Se han realizado varias vacunas (inmunización con esporozoitos irradiados, partículas proteínicas del esporozoito unido al antígeno de superficie de hepatitis B, etc.), las cuales sólo confieren una inmunidad no mayor de 2 meses (Gershon, 2002). Por lo cual es de suma importancia realizar experimentos que nos permitan conocer los mecanismos de la respuesta inmune que intervienen en esta infección para que en un futuro se pueda lograr el desarrollo de una vacuna para eliminar esta enfermedad.

En este proyecto se evaluó por la técnica de RT-PCR la expresión de los genes que codifican para IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10, iNOS y TGF- $\beta$ , además se cuantificaron los niveles de NO en suero y Hb en ratones que se infectaron con *P. chabaudi* AS y que fueron retados con *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17XL y en ratones que solamente se infectaron con la mezcla.

---

---

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el efecto sobre la expresión de citocinas tipo TH1 y TH2 durante una segunda infección con la mezcla de *Plasmodium chabaudi* AS y *P. yoelii* 17XL en ratones CBA/Ca que previamente sufrieron una infección primaria con *P. chabaudi* AS.

## **OBJETIVOS PARTICULARES:**

- Evaluar la parasitemia en los ratones infectados con la mezcla de plasmodios.
- Estudiar la expresión del RNA mensajero de las citocinas: IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 y TGF- $\beta$  los días 0, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 18 y 21 de la segunda infección con una mezcla de plasmodios.
- Determinar la concentración de hemoglobina y el índice esplénico de los ratones infectados con la mezcla durante la primera y segunda infección con la mezcla de plasmodios.
- Evaluar los niveles séricos de NO durante los días 0, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 18 y 21 de la segunda infección.

---

## HIPÓTESIS

Si durante la primera infección con *P. chabaudi* AS en ratones CBA/Ca se genera una respuesta inmune que induce un incremento en la expresión de los genes de las citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 y TGF- $\beta$  e induce células de memoria, entonces, si a estos ratones que curaron la infección con *P. chabaudi* AS se les reinfecta con una mezcla de *P. chabaudi* AS (no letal) y *P. yoelii* 17 XL (letal) se modificará la expresión de las citocinas en relación a la primera infección con la mezcla de los mismos plasmodios.

---

---

## **DISEÑO: Experimental**

### **POBLACIÓN : Material biológico**

- Ratones CBA/Ca hembras de 8 meses de edad, mantenidos en condiciones libres de patógenos específicos.
- Eritrocitos parasitados de ratón con la cepa *Plasmodium chabaudi chabaudi* y *Plasmodium yoelii17 XL* criopreservados en nitrógeno líquido.

### **Criterios de inclusión**

Ratones hembras

Edad: 8 meses.

Ratones singénicos de la cepa: CBA/Ca

### **Criterios de exclusión**

Ratones machos

Ratones de edad menor de 8 meses.

Ratones de diferentes cepas.

### **Variables:**

IFN  $-\gamma$ .

TNF- $\alpha$ .

INOS.

IL-4.

IL-10.

TGF- $\beta$ .

Concentración de óxido nítrico.

Concentración de hemoglobina.

Índice esplénico.

Peso del ratón.

---

## Material de laboratorio

- Portaobjetos .
- Tijeras de disección guantes de hule de látex.
- Pipetas Pasteur de vidrio.
- Gradilla para tubos Falcon.
- Gradillas para tubos eppendorf.
- Malla de acero inoxidable estéril.
- Gorros y botas para áreas estériles .
- Tubos Falcon: 15mL, 50mL, nuevos y estériles.
- Cajas petri de 10 cm de diámetro, de plástico, nuevas y estériles.
- Tubos Eppendorf: 1.5mL, 250mL, nuevas y estériles.
- Puntas para micropipetas: 1.5  $\mu$ L, 2.5 $\mu$ L, 10  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L, nuevas y estériles (libres de nucleasas).

## Equipo

- Balanza analítica , SCIENTECH.
- Cámara de electroforesis BIO-RAD, PROTEAN II xi Cell, 16cm.
- Campana de flujo laminar, Veco.
- Congelador Nieto.
- Espectrofotómetro UV, WPA.
- Equipo analizador de geles; Gel Doc 1000, BIO-RAD.
- Microcentrifuga, Eppendorf 5415C.
- Micropipetas Eppendorf: 2.5  $\mu$ L, 10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L.
- Micropipeta Eppendorf 8 x 200  $\mu$ L.
- Micropipetas Gilson: p20, p200, p1000.
- Microscopio óptico, Carl Zeiss Estándar 25.
- Refrigerador MayTag.
- Tanque de nitrógeno líquido, 34XT, Taylor-Wharton.
- Termociclador , Eppendorf.
- Vortex Genie 2, Daigger.
- Lector de ELISA, Stat fax-2100, Awareness Technology Inc.
- Impresora, Deskjet 680C, Hewlett Packard.
- Ultracongelador REVCO, Legaci Refrigeration System.
- Autoclave, Tuttnauer Brinkmann 2540M.

---

---

## Reactivos

- Aceite mineral, Sigma.
- Agua destilada, Hidropura.
- Acrilamida USB/Amersham.
- Albúmina sérica bovina, Sigma.
- Amortiguador para retrotranscripción 5X (5X first strand buffer), Gibco BRL.
- Azul de bromofenol, Sigma
- Bis acrilamida, Sigma.
- Bromuro de etidio, Sigma.
- Citrato de sodio.
- Cloroformo, Burdick-Jackson.
- Cloruro de magnesio, Sigma.
- Colorante de Giemsa, Sigma.
- Dietilpirocarbonato, Sigma.
- dNTP's (desoxirribonucleótidos de trifosfato), Pharmacia.
- Ditioeritritol (dTT), Gibco BRL.
- EDTA, Sigma.
- Etanol absoluto, Merck.
- Éter, JT Becker.
- Fenol +ácido, Sigma.
- Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), USB/Amersham.
- Fosfato de sodio monobásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), USB/Amersham.
- Gelatina Sigma.
- Glicerol, Sigma.
- Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), USB/Amersham.
- Fosfato de sodio monobásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), USB/Amersham.
- Heparina de sodio, Sigma.
- Inhibidor de RNA'sa, Gibco BRL.
- Lipopolisacárido, Sigma.
- Marcador de peso molecular 100 pb y de 50 pb, Gibco BRL.
- 2-mercaptoetanol, Sigma.
- metanol, JTBacker.
- NADPH (Tetrasodium SALT) 98%, Roche.
- NED (N-1-Naphthyle Thylenediamine Dihydrochloride), Backer Analyzed Reagent.
- Nitrate reductase 20 U, Roche.
- Oligo dT.
- Persulfato de amonio, Sigma.
- Retrotranscriptasa MMLV-RT.

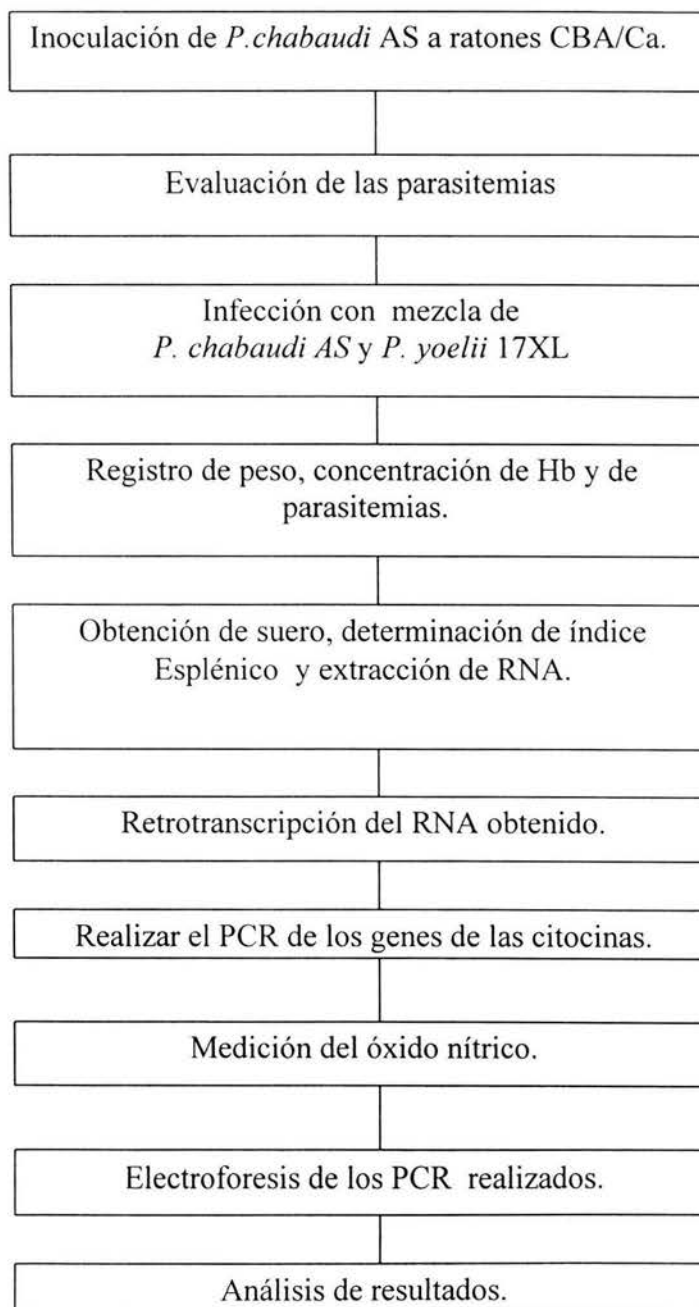
- 
- Sacarosa, Sigma.
  - Sarcosil, Sigma.
  - Sulfanilamida (p-aminobenzenesulfonamida) 99%, Sigma.
  - SDS (Dodecilsulfato de sodio), Sigma.
  - Taq polimerasa (AmpliTaq DNA polimerase), Perkin Elmer.
  - TEMED, Sigma.
  - Tiocianato de guanidinio, Sigma.
  - Tris base, Sigma.
  - Xilencianol Sigma.
  - *Primers* u oligos para los genes a codificar.



---

# MÉTODO

## Diagrama de flujo



---

## METODOLOGÍA

### ➤ DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE Hb

- En 250 $\mu$ L de solución Drabkin adicionar 1  $\mu$ L de sangre tomada de la cola.
- Agitar la mezcla (no exponerla a la luz).
- Leer la absorbancia a 540nm y realizar el cálculo comparado con una curva patrón de Hb.

### ➤ ÍNDICE ESPLÉNICO.

- Registrar el peso al ratón al cual se le va a realizar la determinación.
- Sacrificar al ratón en una cámara de éter.
- Humedecer al ratón con etanol al 70% y extraer el bazo, enseguida proceder a pesarlo.

Índice esplénico = peso del bazo / peso del ratón.

### ➤ MEDICIÓN DE PARASITEMIA

- Tomar una gota de sangre de la cola de los ratones para realizar un frotis.
- Fijar el frotis con metanol absoluto y teñir con colorante Giemsa por 30 minutos.
- Leer en el microscopio con el objetivo 100X.

---

---

➤ EXTRACCIÓN DE RNA.

- Del ratón a determinar el índice esplénico, macerar una porción del bazo con ayuda del émbolo de una jeringa y una rejilla de acero inoxidable.
- Enjuagar la malla con solución PBS y llevar a un volumen de 5mL.
- Centrifugar a 2500 rpm durante 5 minutos.
- Desechar el sobrenadante, y resuspender el botón.
- Adicionar 500µL de solución de Trizol y agitar vigorosamente.
- Agregar 200µL una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (49:1) y agitar 15 minutos en vortex.
- Centrifugar 15 minutos a 14000 rpm.
- Separar la fase acuosa y desechar la interfase y la fase orgánica.
- Agregar 500µL de alcohol isopropílico para precipitar el RNA.
- Centrifugar a 14000 rpm durante 15 minutos.
- Eliminar el sobrenadante.
- Secar el RNA a temperatura ambiente por 12 horas.
- Rehidratar el botón de RNA usando 50µL de agua tratada con DEPC.
- 

➤ RETROTRANSCRIPCIÓN

- De acuerdo a la concentración de RNA que se obtenga, determinar el volumen de la solución de RNA necesario para tomar 1.5 µg de RNA.

- Determinar el volumen de agua DEPC requerido para la retrotranscripción, considerando que el volumen final es de 10 $\mu$ L
- En un tubo Eppendorf colocar: Agua DEPC, oligo dT (0.75 $\mu$ L) y el RNA (volumen total de 10  $\mu$ L).
- Incubar a 65° C por 10 minutos, utilizando el termociclador.
- Colocar en hielo los tubos por 5 min.
- Centrifugar a 14000 rpm durante 5 segundos.
- Colocar en hielo y adicionar 10 $\mu$ L de la mezcla de retrotranscripción:

	<b>1 Rx</b>
<b>Amortiguador de retrotranscripción 5X</b>	4.0 $\mu$ L
<b>0.1MdTT</b>	2.0 $\mu$ L
<b>5 mM dNTP's</b>	2.0 $\mu$ L
<b>Enzima M-MLV RT</b>	1.0 $\mu$ L
<b>Inhibidor de RNAsa</b>	0.1 $\mu$ L
<b>Agua DEPC</b>	1.0 $\mu$ L
<b>Volumen final</b>	<b>10.1 <math>\mu</math>L</b>

- Incubar a 37° C por 1 hora, empleando el termociclador.
- Incubar a 95° C por 5 min.
- Colocar en hielo 5 min.
- Centrifugar a 14 000 rpm por 5 segundos.
- Adicionar 80  $\mu$ L de agua DEPC y guardar en el congelador (-70° C) hasta su uso. El producto se denomina cDNA (DNA complementario).

#### ➤ AMPLIFICACIÓN POR PCR.

- Etiquetar tubos (fecha, número de tubo y el tipo de citocina).

- Preparar la mezcla de reacción como se muestra a continuación, considerando que el volumen final debe ser de 20  $\mu\text{L}$ .

Stock	Reactivo	[ ] / Rx	$\mu\text{L}$ / Rx
10X	Amortiguador de PCR	1 X	2.0 $\mu\text{L}$
5mM	dNTP's	0.2mM	0.8 $\mu\text{L}$
20 $\mu\text{M}$	Oligo $\beta$ -actina	0.1 $\mu\text{M}$	0.1 $\mu\text{L}$
20 $\mu\text{M}$	Oligo TNF- $\alpha$	0.1 $\mu\text{M}$	0.1 $\mu\text{L}$
5U / $\mu\text{L}$	Taq DNA pol	0.5U	0.1 $\mu\text{L}$
	Agua para PCR		13.9 $\mu\text{L}$
	DNAC		2.0 $\mu\text{L}$
	<b>Volumen final</b>		<b>20.0 <math>\mu\text{L}</math></b>

- Mezclar en vortex y distribuir en el tubo 18 $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción.
- Adicionar 50  $\mu\text{L}$  de aceite mineral en el tubo con la mezcla de reacción.
- Depositar 3  $\mu\text{L}$  de cDNA, atravesando la capa de aceite y sin agitar, esto evita la formación de aerosoles y por ende la contaminación con cDNA. Mantener hasta este paso el tubo en hielo.
- Colocar el tubo en el termociclador cuando éste alcance la temperatura de 94° C y someterlo al siguiente programa:
  1. 94° C por 6 min.
  2. 55° C por 2 min.
  3. 72° C por 2 min.
  4. 94° C por 45 seg.
  5. Repetir 29 veces del paso 2 al 4.
  6. 55° C por 2 min.
  7. 72° C por 7 min.
  8. 20° C por 1 hr.
- Guardar los productos de PCR en el congelador (-20° C) hasta su uso.

---

---

➤ ELECTROFORESIS EN GELES DE ACRILAMIDA

- Preparar gel de acrilamida al 5% en TBE 1X.
- Adicionar al producto de PCR 10 $\mu$ L de amortiguador de carga, mezclar la fase acuosa, sin hacer emulsiones con el aceite.
- Depositar 10 $\mu$ L de la mezcla con amortiguador en cada pozo.
- Colocar en un pozo de los extremos 10  $\mu$ L de marcador de peso molecular de 100 pares de bases.
- Correr la electroforesis a 180 volts por 2 horas, en TBE 1X.
- Teñir el gel con bromuro de etidio, utilizando 20  $\mu$ L de una solución 10 mg/mL en 200 mL de TBE 1X, agitar suavemente durante 5 minutos.
- Lavar con agua destilada durante 5 minutos.
- Colocar el gel en el equipo analizador de geles: Gel Doc para visualizar los resultados.
- Utilizar el software del equipo para determinar la absorbancia de los productos de PCR y por densitometría realizar el gráfico para la expresión de la citocina en relación a la expresión del gen constitutivo  $\beta$ -actina.

---

---

## RESULTADOS

### Curso de la parasitemia.

La parasitemia se evaluó diariamente en todos los ratones, cada punto en las gráficas representa la media geométrica de la parasitemia de todos los ratones de cada jaula. Para la evaluación de la infección se contaron 200 eritrocitos y de estos por observación microscópica (figura 6), se calculó cuantos estaban infectados, cuando en un campo había menos de 3 eritrocitos infectados de 200, se contaron 50 campos.

Los ratones infectados con *P. chabaudi* AS (**gráfica 1**) presentaron un incremento en la parasitemia durante los primeros días hasta alcanzar el pico durante los días 11 y 12 postinfección, y disminuyó los siguientes días hasta que se eliminó el día 21. En los ratones infectados por primera vez con *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17XL la parasitemia ascendió notablemente los primeros días postinfección (**gráfica 2**) hasta que llegó al pico en el día 13, los ratones no lograron eliminarla y el día 14 postinfección los ratones murieron. Los ratones infectados con *P. chabaudi* AS y re infectados 8 semanas después con la mezcla de *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17XL presentaron un aumento paulatino en la parasitemia durante los primeros días postinfección; alcanzaron el pico de la parasitemia el día 14 y aunque los niveles de parásitos en sangre disminuyeron durante los siguientes días al pico, la parasitemia no se eliminó completamente aún en el día 21 cuando fue la última determinación (**gráfica 3**).

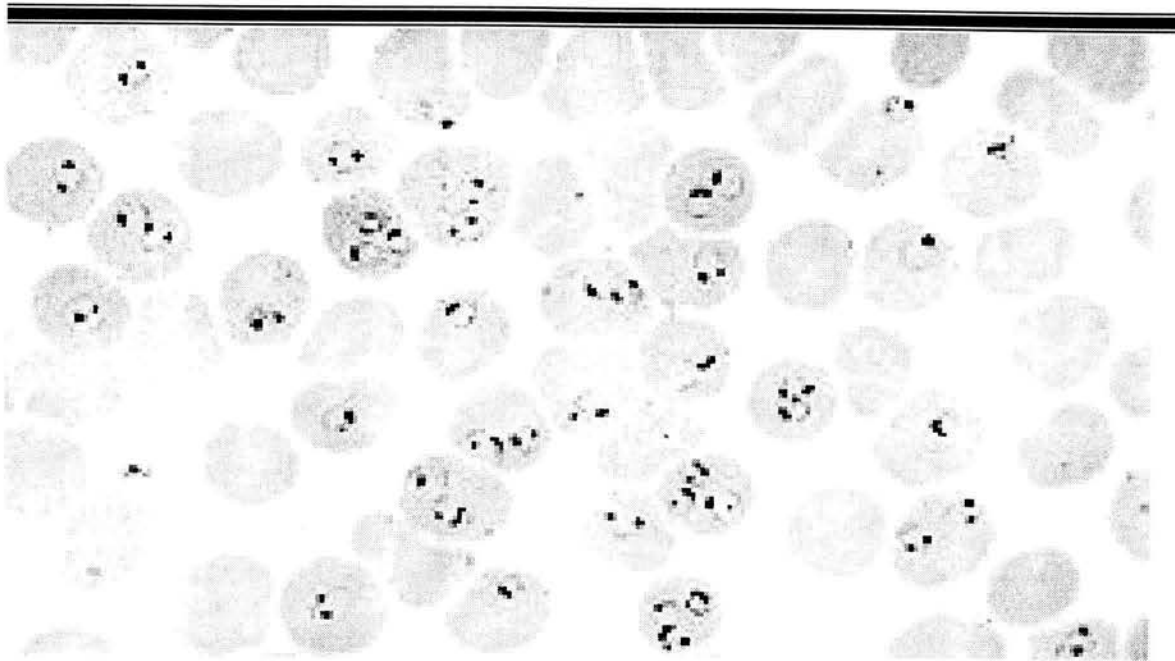
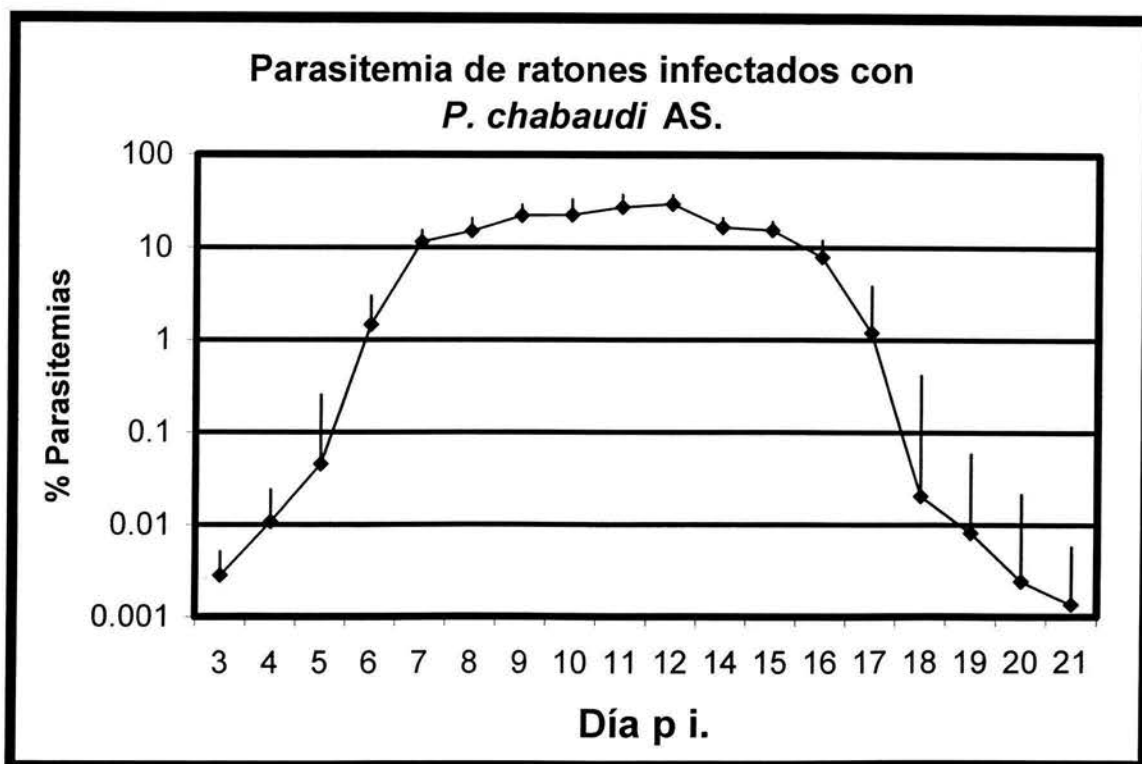


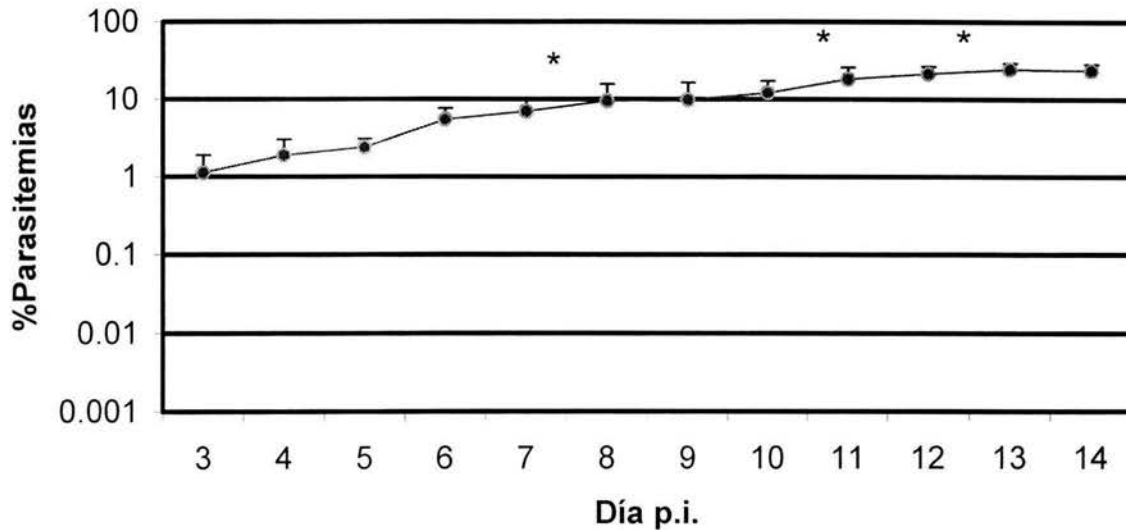
Figura 6.- Tinción de Giemsa de eritrocitos parasitados con *Plasmodium*.



Gráfica 1.- Curso de la parasitemia de ratones CBA/Ca que se infectaron con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi* AS durante la primera infección.

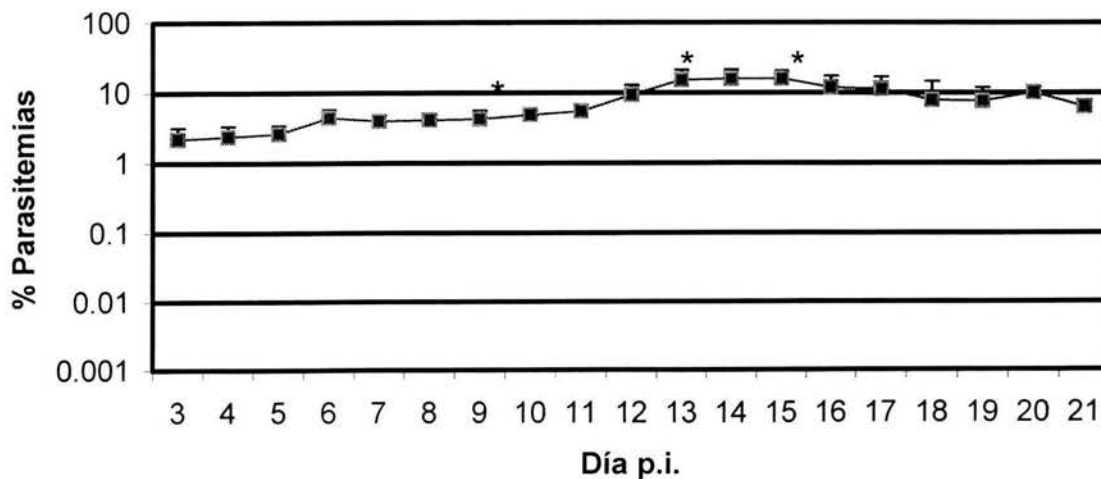


### Parasitemias de ratones infectados con la mezcla de plasmodios.



**Gráfica 2.-** Curso de la parasitemia de ratones CBA/Ca infectados por primera vez con  $5 \times 10^4$  EP de la mezcla de *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17XL. \* Diferencia significativa con respecto a los ratones inmunes a *P. chabaudi* AS.

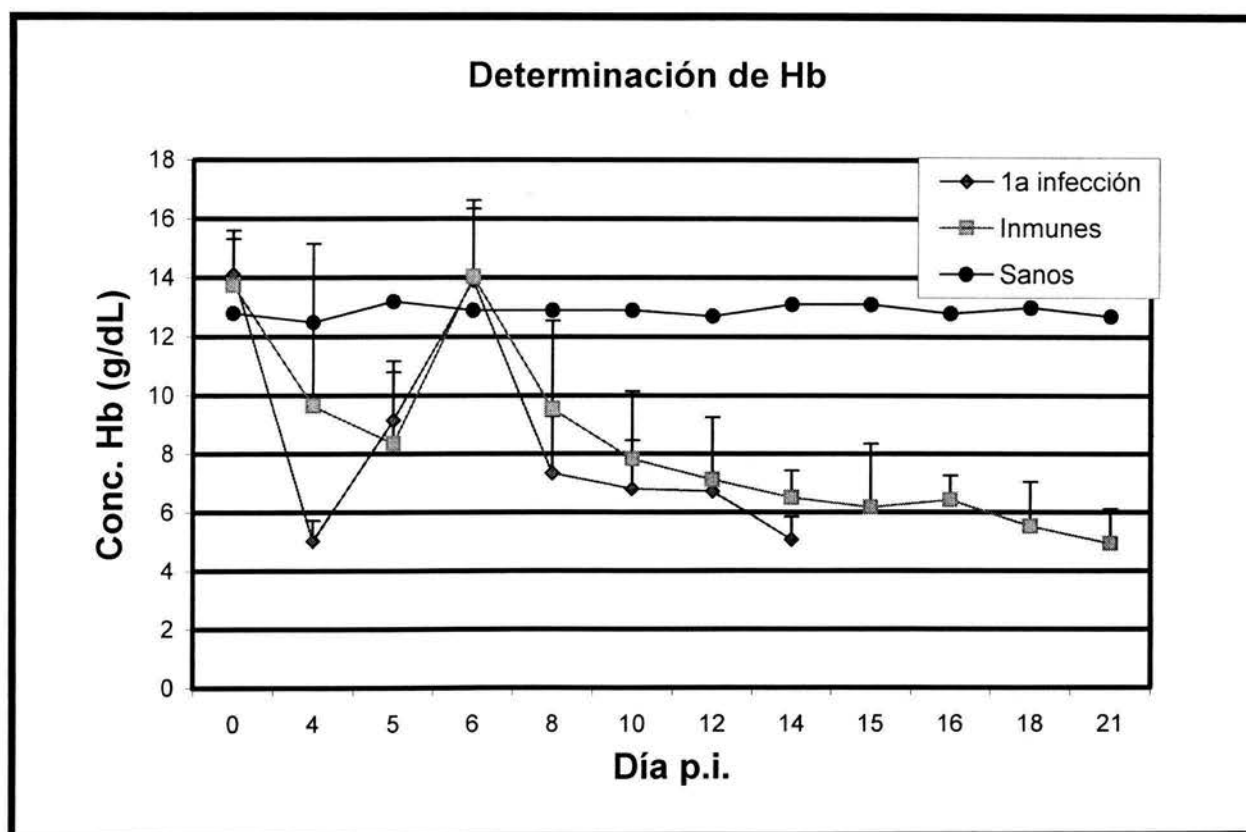
### Parasitemia de ratones inmunes infectados con la mezcla de plasmodios



**Gráfica 3.-** Curso de la parasitemia de ratones infectados con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi* AS y re infectados 8 semanas después con la mezcla de *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17XL. \*Diferencia significativa en relación a los ratones infectados por primera vez con la mezcla.

### Evaluación de la anemia durante el curso de la infección.

En ambos grupos de ratones, los infectados por primera vez con *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17XL y los infectados con *P. chabaudi* AS y re infectados 8 semanas después con la mezcla de *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17XL, mantuvieron concentraciones bajas de Hb los días 4 y 5 postinfección; los infectados por primera vez presentaron una tendencia menor que los inmunes (gráfica 4), éstos últimos mantuvieron niveles bajos de Hb los días posteriores. Se observó anemia crónica en ambos grupos de ratones, sin embargo, los ratones infectados por primera vez con la mezcla desarrollaron anemia más severa.

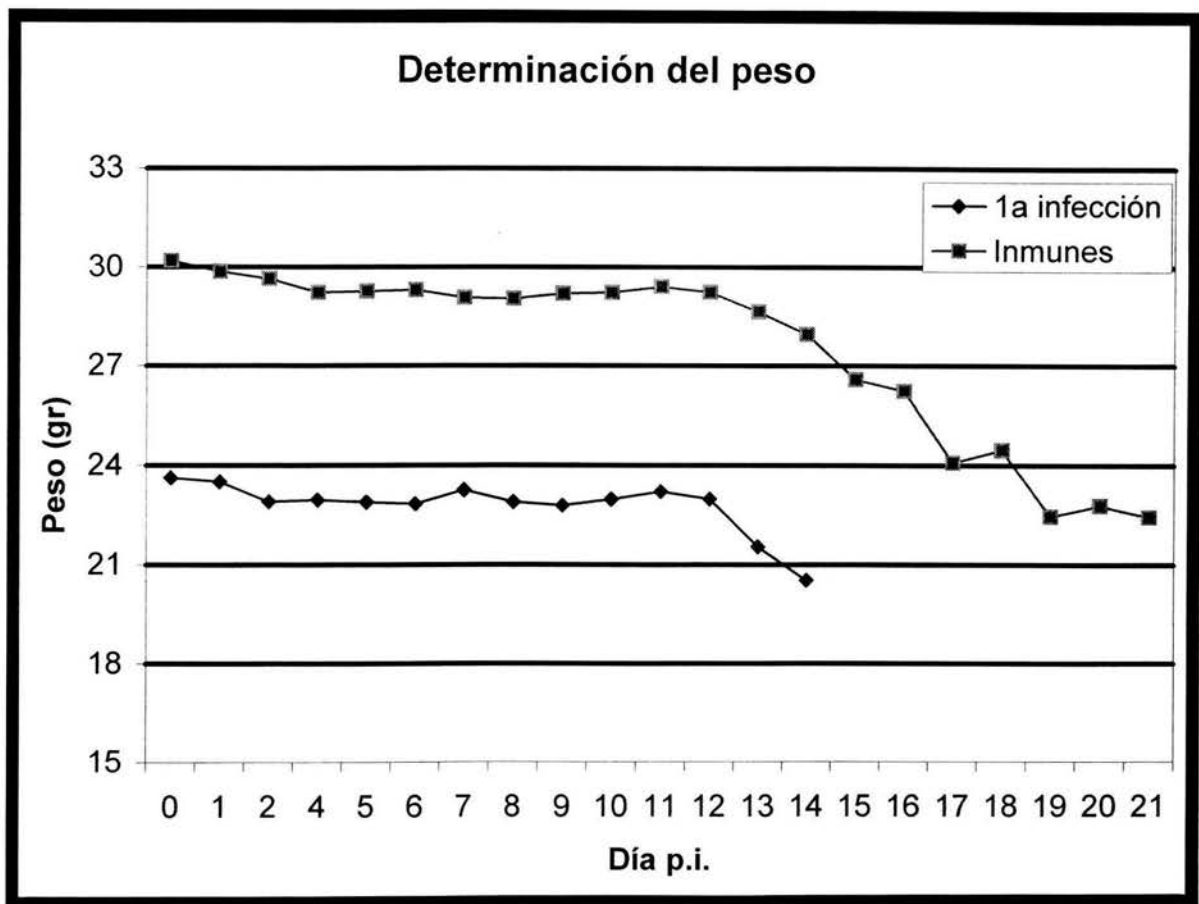


**Gráfica 4.-** Determinación de Hb de ratones infectados con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi* AS y re infectados 8 semanas después con la mezcla de *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17XL (---■---) y de ratones infectados por primera vez con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17XL (---◆---).

\*Diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.

## Determinación del peso

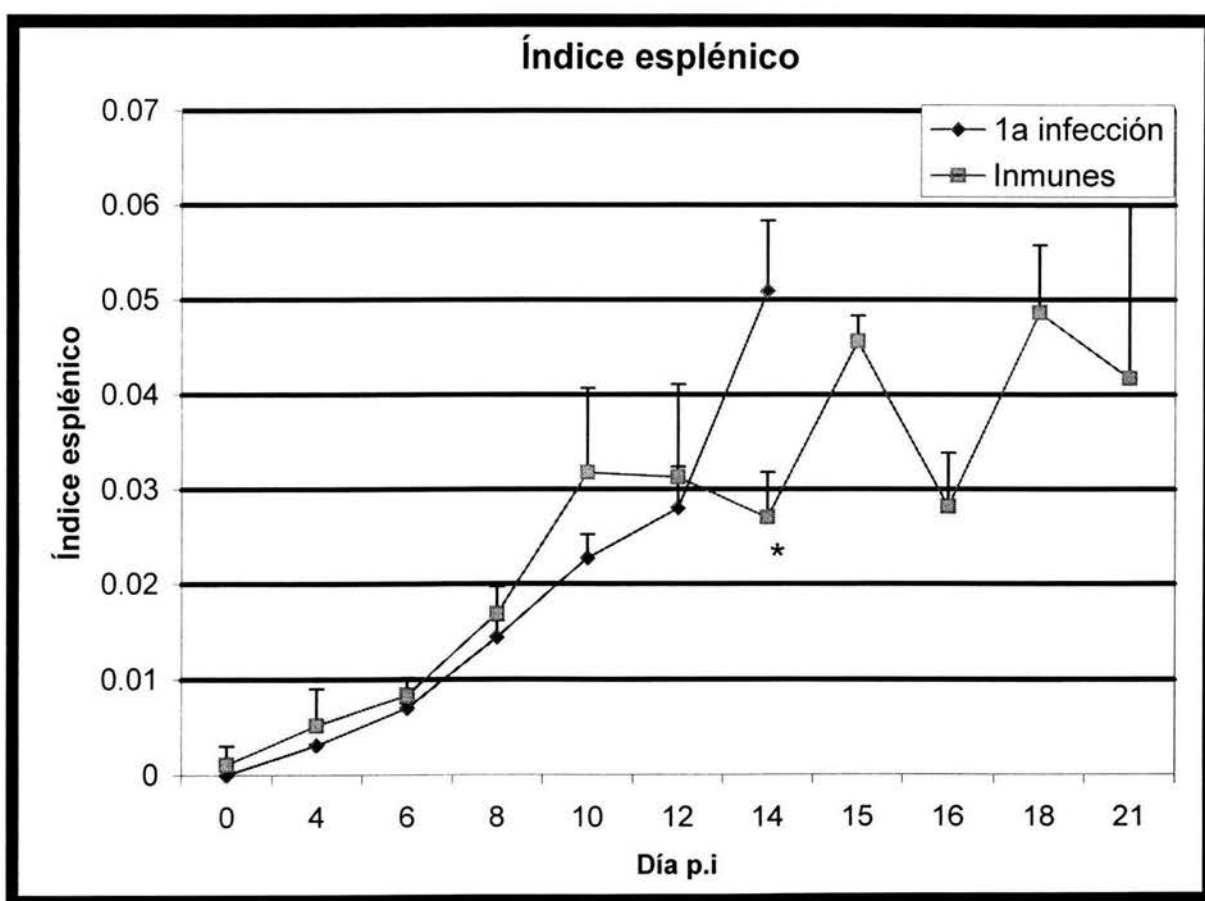
Los ratones infectados por primera vez con la mezcla, perdieron cerca del 15% de peso durante la infección. Los ratones infectados con *P. chabaudi* AS y re infectados 8 semanas después con la mezcla de *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17XL presentaron una pérdida de peso cerca del 30%.



**Gráfica 5.-** Determinación del peso de ratones infectados con 5 X 10<sup>4</sup> EP de *P. chabaudi* AS y re infectados 8 semanas después con la mezcla de *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17XL (---■---) y de ratones infectados por primera vez con 5 X 10<sup>4</sup> EP de *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17XL (---◆---).

## Evaluación del índice esplénico

El índice esplénico aumentó en gran proporción en ambos grupos de ratones, de hecho, los valores aumentaron hasta 5 veces que el determinado previo a la infección. El mayor aumento en el índice esplénico lo presentaron los ratones infectados por primera vez con *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17XL, especialmente el día 14 postinfección, donde se presentó una diferencia significativa con respecto a los ratones infectados con *P. chabaudi* AS y re infectados 8 semanas después con la mezcla de *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17 XL (gráfica 6).



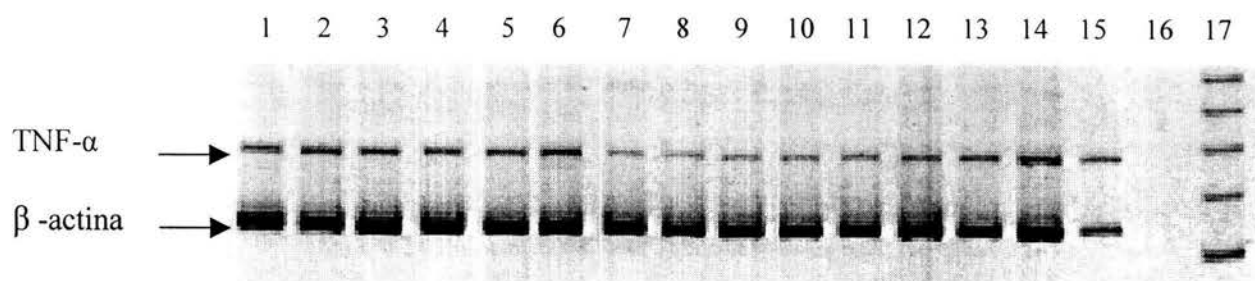
**Gráfica 6.-** Determinación del índice esplénico en ratones infectados con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi* AS y re infectados 8 semanas después con la mezcla de *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17XL (---■---) y de ratones infectados por primera vez con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17XL (---◆---). \*Diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos.

---

## Expresión de citocinas.

En los días 0, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 18 y 21 postinfección se sacrificaron de dos a 3 ratones por grupo; se disectó el bazo para extraer el RNA mensajero, el cual se retrotranscribió y el DNA complementario así obtenido se utilizó para amplificar por PCR simultáneamente el gene constitutivo  $\beta$ -actina y el de la citocina correspondiente.

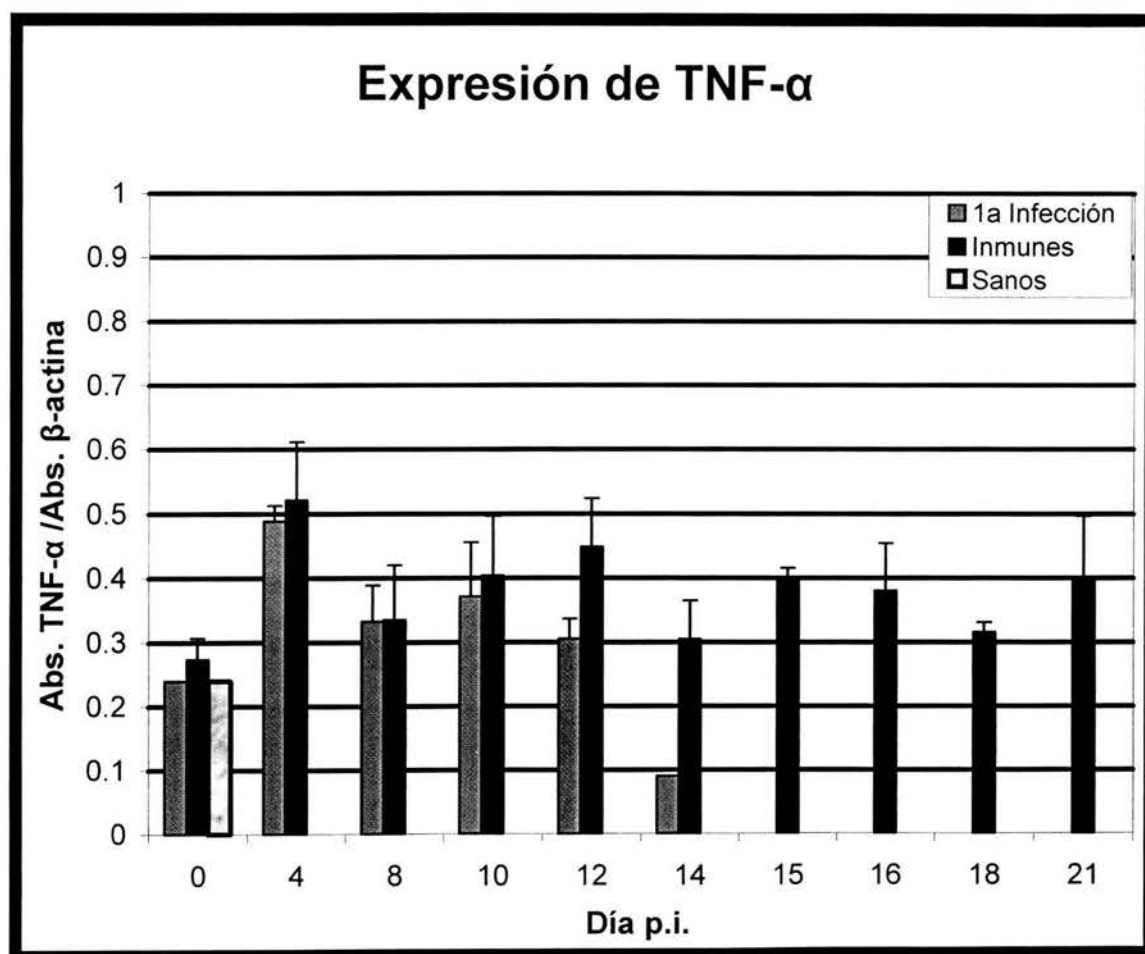
El análisis de los productos de PCR se realizó por electroforesis en acrilamida al 5%. El gel se tiñó con bromuro de etidio y las bandas se visualizaron con un transluminador de luz ultravioleta conectada a una cámara de video, la imagen se digitalizó y la absorbancia de cada banda se determinó con el software del analizador de geles Gel Doc. Con los valores de densitometría se elaboraron las gráficas y la expresión de la citocina se calculó en relación a la expresión del gen constitutivo. En la **figura 7** se ejemplifican las bandas obtenidas de la electroforesis de los productos de PCR a las cuales se les determino la absorbancia y la densitometría.



**Figura 7.**— Bandas correspondientes a la expresión del gene TNF- $\alpha$  en muestras de ratones re infectados con *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17XL, determinadas por RT-PCR. Se utilizaron geles de acrilamida al 5% para el corrimiento electroforético de los productos obtenidos. Carriles 1, 2 y 3 corresponden al día 15 postinfección, carriles 4, 5 y 6 corresponden al día 16, carriles 7, 8 y 9 corresponden al día 18, carriles 10 a 14 corresponden al día 21, carril 15 es el control positivo, carril 16 corresponde al control negativo y carril 17 corresponde al marcador de peso molecular de 100 pb.

### Expresión de TNF- $\alpha$

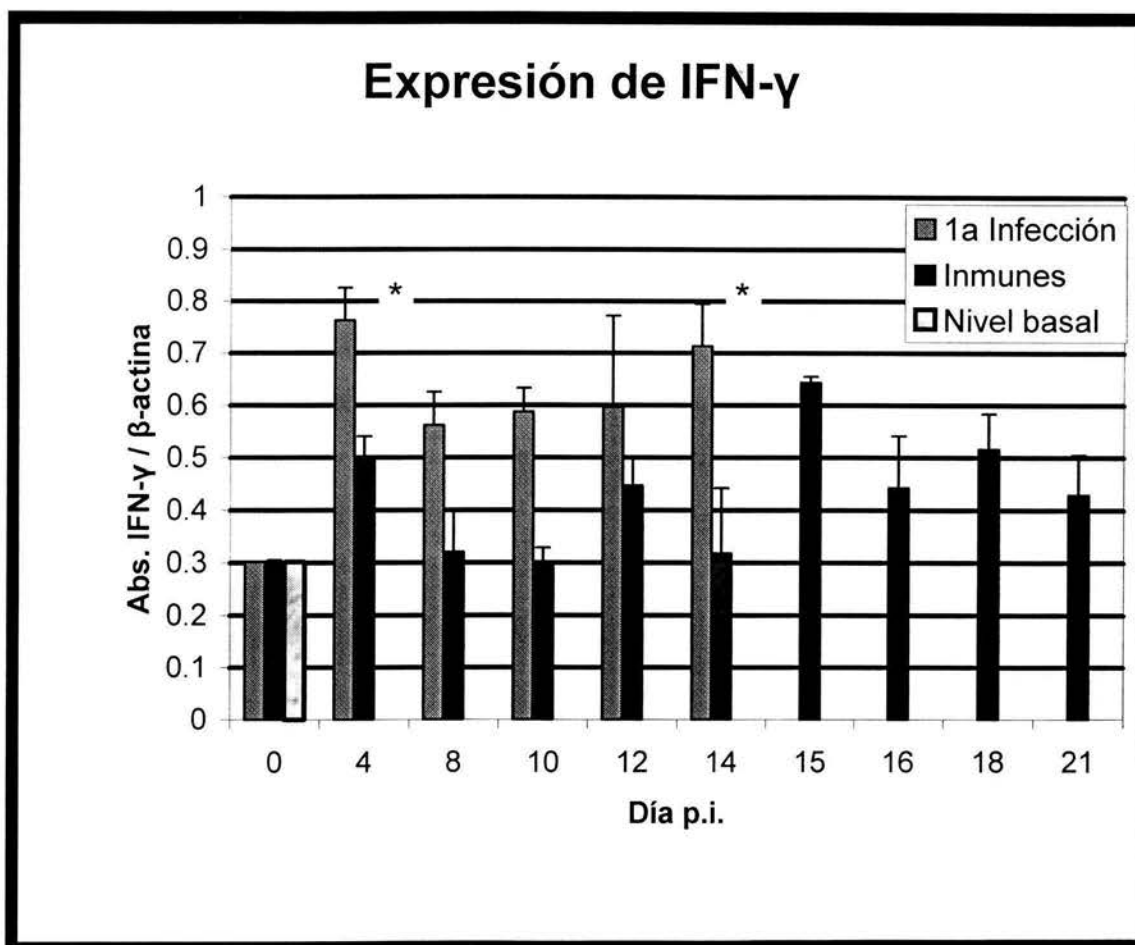
Los ratones infectados por primera vez con la mezcla de *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17XL presentaron al inicio una expresión alta, que durante el transcurso de la infección disminuyó paulatinamente, mientras que los ratones inmunes y re infectados con la mezcla los niveles de expresión de TNF- $\alpha$  fueron constantes aunque en niveles menores al día 4 (gráfica 7).



**Gráfica 7.-** Expresión de TNF- $\alpha$  en ratones CBA/Ca que fueron infectados por primera vez con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17 XL (■), y de ratones infectados con *P. chabaudi* AS y re infectados 8 semanas después con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17 X (■).

## Expresión de IFN- $\gamma$

La expresión de IFN- $\gamma$  fue mayor en los ratones infectados por primera vez con la mezcla de *P. chabaudi AS* y *P. yoelii 17XL*, especialmente los días 4 y 14 postinfección, en donde presentaron una diferencia estadísticamente significativa en relación a los ratones re infectados, los cuales desarrollaron niveles menores de expresión de IFN- $\gamma$  en los primeros días postinfección, alcanzaron el pico el día 15 pero los niveles volvieron a disminuir en los días posteriores de la infección (gráfica 8).

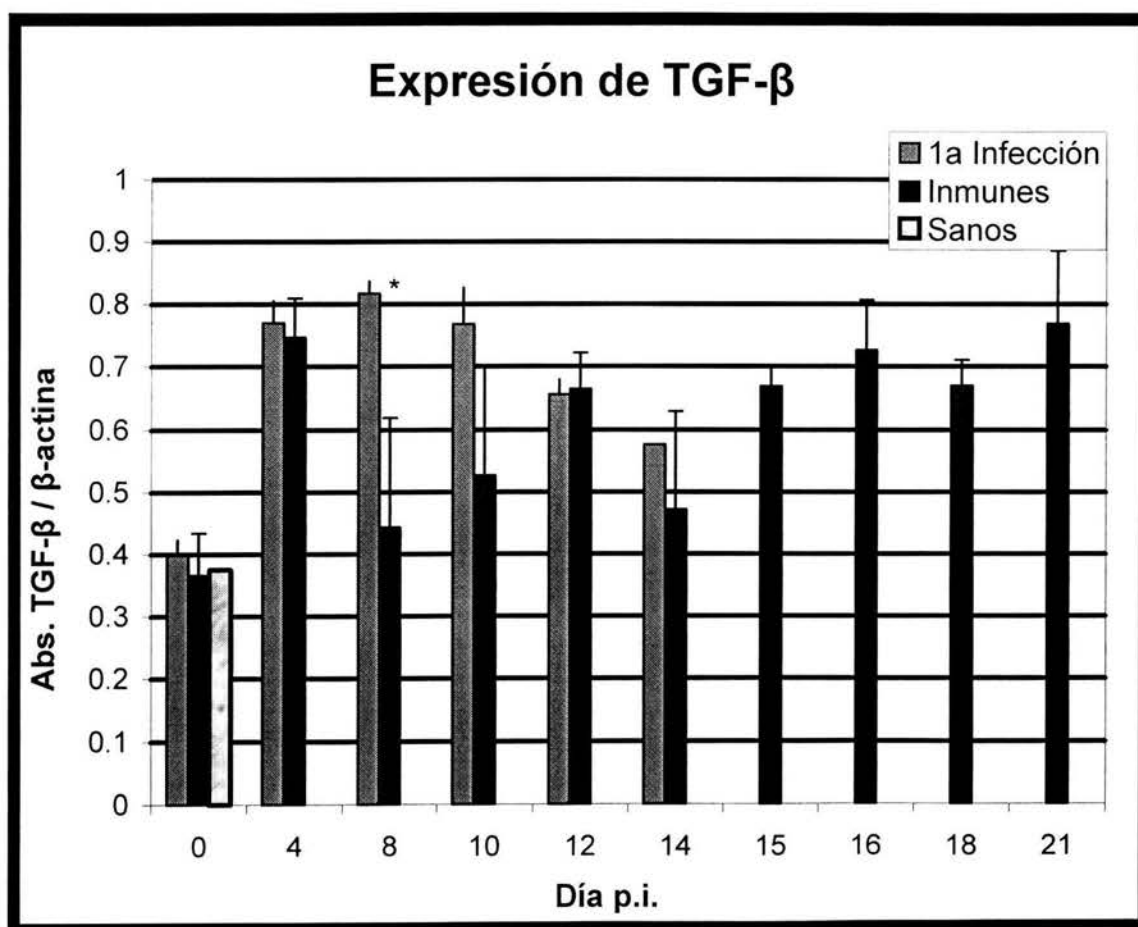


**Gráfica 8.-** Expresión de IFN- $\gamma$  en ratones CBA/Ca que fueron infectados por primera vez con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi AS* y *P. yoelii 17 XL* (■), y de ratones infectados con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi AS* y re infectados 8 semanas después con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi AS* y *P. yoelii 17XL* (■).

\*Diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos.

### Expresión de TGF- $\beta$

El TGF- $\beta$  fue la citocina que presentó los niveles de expresión más elevados durante toda la infección. En el grupo de ratones infectados por primera vez con la mezcla de *P. chabaudi AS* y *P. yoelii 17XL*, los niveles de TGF- $\beta$  disminuyeron ligeramente hasta el día en que perecieron los ratones, mientras que en los ratones inmunes los niveles de expresión se mantuvieron elevados y fueron menores que en los ratones infectados por primera vez (**gráfica 9**), sin embargo, únicamente se detectó diferencia significativa entre los dos grupos el día 8 postinfección.



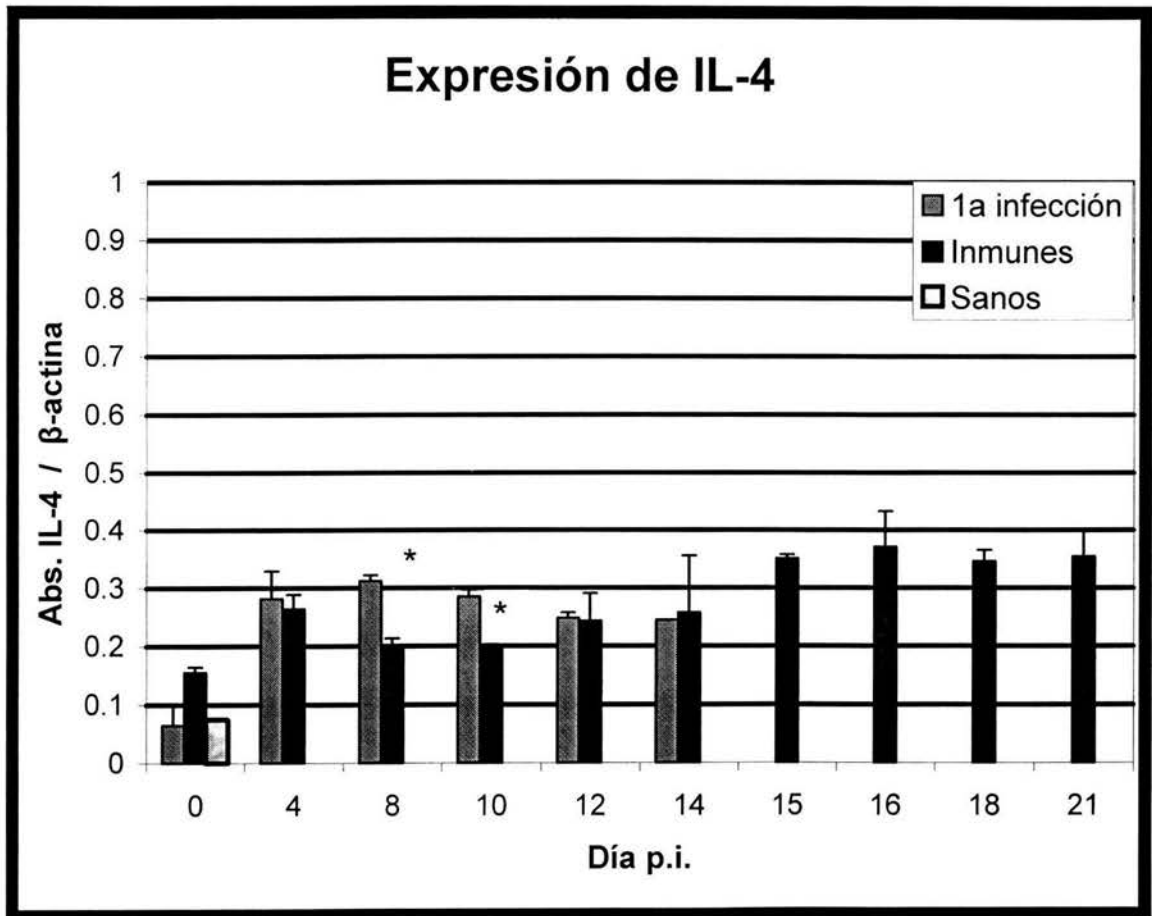
**Gráfica 9.-** Expresión de TGF- $\beta$  en ratones CBA/Ca que fueron infectados por primera vez con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi AS* y *P. yoelii 17 XL* (■), y de ratones infectados con *P. chabaudi AS* y re infectados 8 semanas después con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi AS* y *P. yoelii 17 X* (■).

\*Diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.



### Expresión de IL-4

En los ratones infectados por primera vez con la mezcla, la expresión de IL-4 se incrementó los primeros días postinfección y después disminuyó ligeramente, mientras que en los ratones re infectados, la expresión aumentó conforme transcurrió la infección. En los días 8 y 10 detectamos diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (gráfica 10).

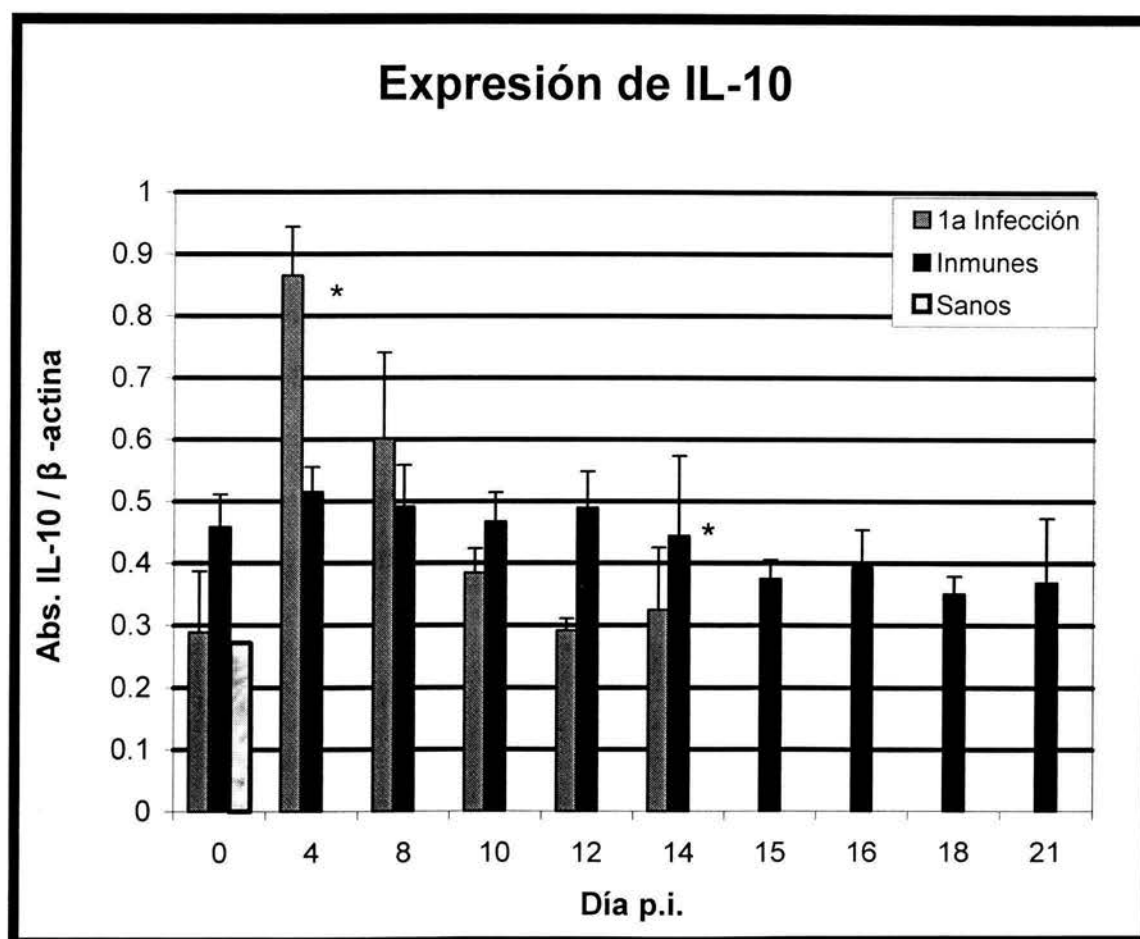


**Gráfica 10.-** Expresión de IL-4 en ratones CBA/Ca que fueron infectados por primera vez con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17 XL (■), y de ratones infectados con *P. chabaudi* AS y re infectados 8 semanas después con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17 XL (■).

\*Diferencia estadísticamente significativa significativa entre los grupos.

## Expresión de IL-10

En los ratones infectados por primera vez con la mezcla de *Plasmodium*, los niveles de expresión de IL-10 fueron más elevados (principalmente el día 4) al inicio de la infección y después, los niveles disminuyeron conforme pasó la infección. En los ratones reinfectedos los niveles de expresión de IL-10 se mantuvieron elevados los primeros días postinfección y posteriormente disminuyeron ligeramente (**gráfica 11**). Se observó diferencia significativa en los días 4 y 12 postinfección.

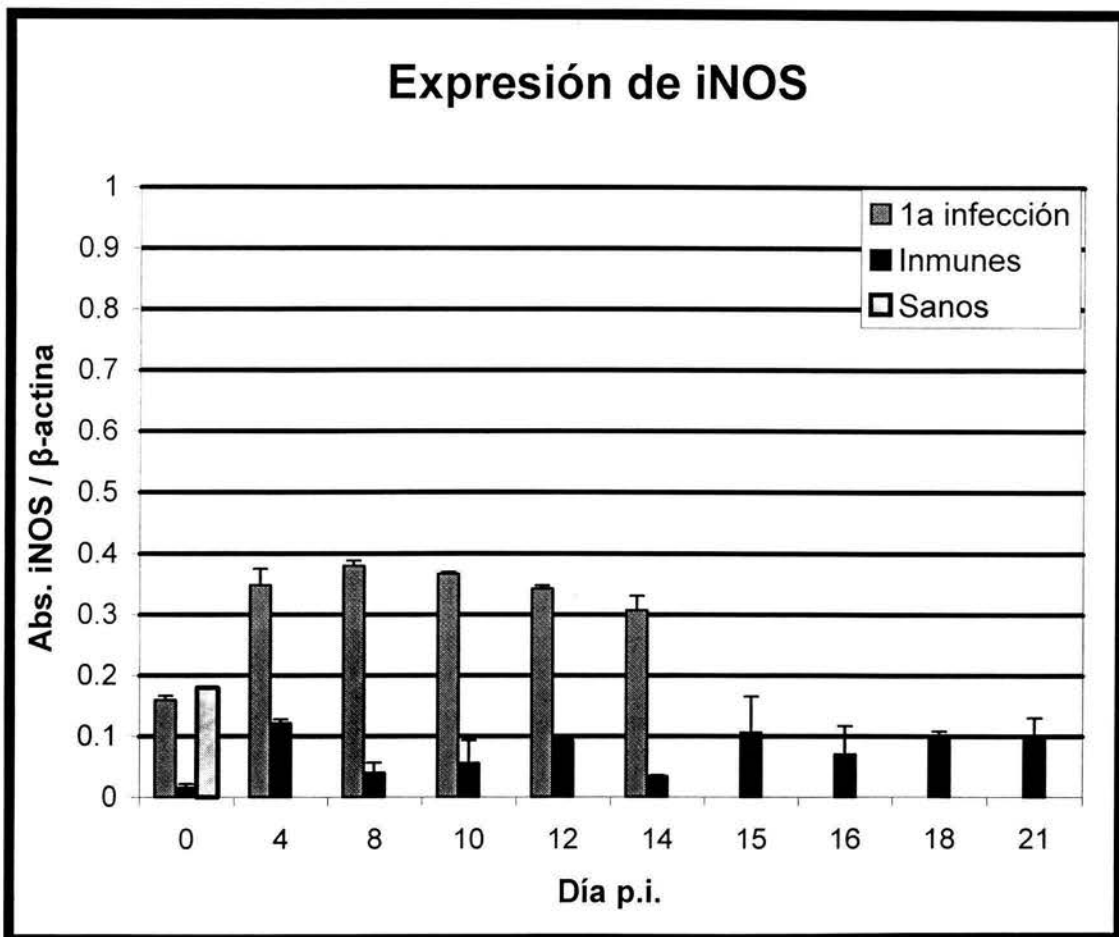


**Gráfica 11.-** Expresión de IL-10 en ratones CBA/Ca que fueron infectados por primera vez con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17 XL (■), y de ratones infectados con *P. chabaudi* AS y reinfectedos 8 semanas después con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17 XL (■).

\*Diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

## Expresión de iNOS

En los ratones infectados por primera vez con la mezcla de *P.chabaudi AS* y *P. yoelii 17XL* se observó una mayor expresión de iNOS, la cual se mantuvo hasta el día 14 postinfección en el que mueren los ratones, mientras que en los ratones re infectados la expresión de iNOS se mantuvo en niveles bajos durante el transcurso de la infección, todos los días, los valores mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de ratones (**gráfica 12**).

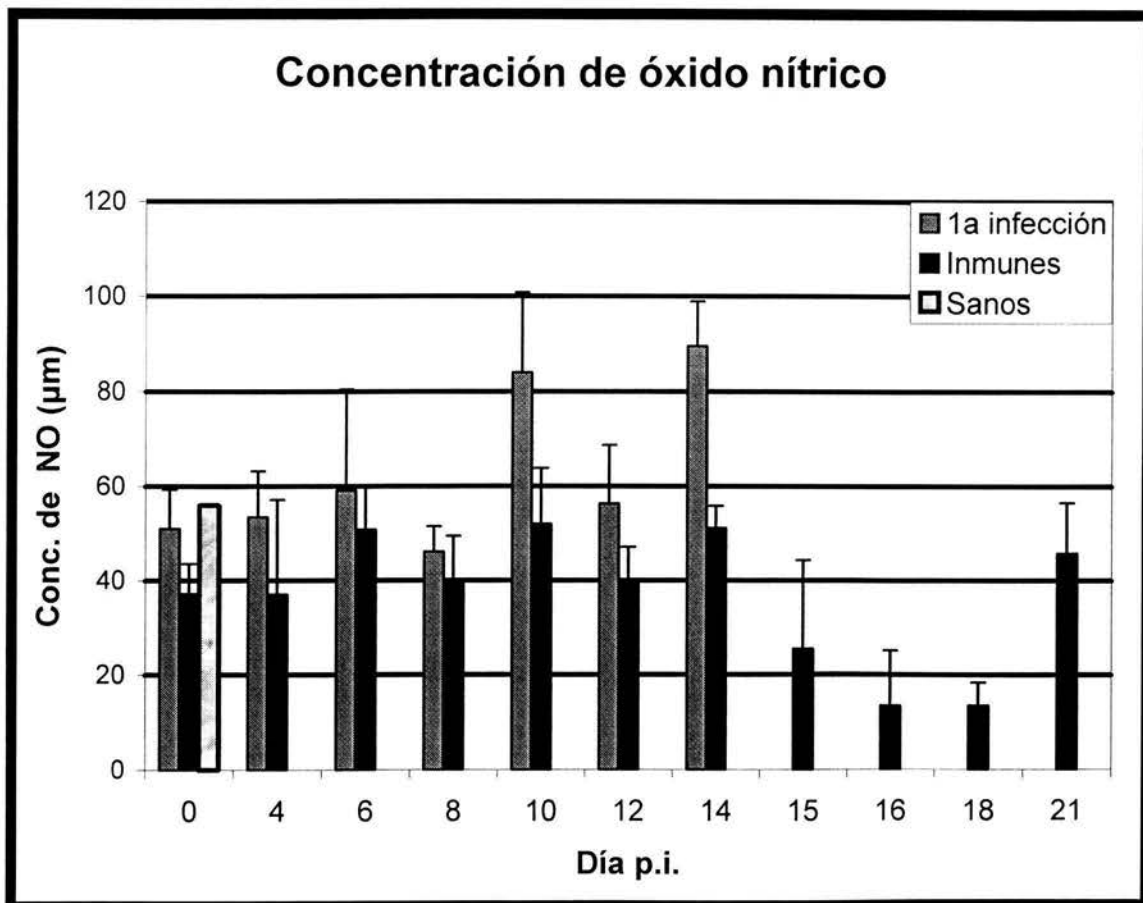


**Gráfica 12.-** Expresión de iNOS en ratones CBA/Ca que fueron infectados por primera vez con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi AS* y *P. yoelii 17 XL* (■), y de ratones infectados con *P. chabaudi AS* y re infectados 8 semanas después con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi AS* y *P. yoelii 17 XL* (■).

## Determinación de óxido nítrico sérico

La concentración de óxido nítrico se determinó mediante la técnica de Griess, se utilizó el suero de los ratones que fueron sacrificados en los días postinfección indicados.

En los ratones infectados por primera vez con la mezcla la concentración de óxido nítrico fue mayor, hasta llegar al pico el día 14 de la infección, mientras que en los ratones re infectados la concentración de óxido nítrico se mantuvo en niveles similares a los basales, salvo en los días 15, 16 y 18 en donde los niveles disminuyeron aun más.



**Gráfica 13.-** Concentración de óxido nítrico en ratones CBA/Ca infectados por primera vez con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17 XL (■), y de ratones infectados con *P. chabaudi* AS y re infectados 8 semanas después con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17 X (■).

---

---

## ANÁLISIS DE RESULTADOS

La infección con *P. chabaudi* AS en los ratones CBA/Ca no es letal, mientras que en la infección con *P. yoelii* 17XL si lo es. Las infecciones repetidas ocurren con frecuencia en las zonas endémicas de malaria, sin embargo, se desconoce como se modifica la respuesta inmune cuando los individuos se infectan con mezclas de parásitos en una primera infección, también se desconoce que ocurre cuando la infección con la mezcla sucede después de haber sufrido una infección con un parásito no letal, por esta razón en este trabajo se investigó como se afecta la respuesta inmune en infecciones con una mezcla de plasmodios durante una primera infección y, en particular, estudiamos como se modifica la expresión de los genes correspondientes a las citocinas: TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  e iNOS en ratones que se infectaron por primera vez con la mezcla de ambos parásitos y que sucede con la expresión de estos genes en los ratones que sufrieron una primera infección con *P. chabaudi* AS y que se retaron con una mezcla de *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17 XL 8 semanas después de haber sanado de la primera infección.

Los ratones infectados por primera vez con *P. chabaudi* AS lograron eliminar la infección alrededor del día 21 postinfección (gráfica 1), lo que comprueba que este parásito no es letal para el ratón y que estos resultados están de acuerdo a lo descrito en la literatura (Taylor-Robinson, 1993).

Los ratones infectados por primera vez con la mezcla de *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17 XL, no lograron abatir la parasitemia y sobrevivieron hasta el día 14 postinfección, (gráfica 2), esto se debió a la presencia del parásito letal que es *P. yoelii* 17XL. En el grupo de ratones inmunes a *P. chabaudi* AS y que se retaron con la mezcla de *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17 XL lograron sobrevivir hasta el día 21 postinfección (gráfica 3), tiempo en el cual los ratones presentaban signos de debilidad y decaimiento, aunque la parasitemia no era elevada (aproximadamente un 9%), este resultado sugiere que la primera infección con *P. chabaudi* AS les

---

---

proporcionó cierto grado de inmunidad, pero no la suficiente para lograr controlar completamente la infección con un parásito letal.

Ambos grupos de ratones presentaron una severa anemia, ligeramente menor en los ratones inmunes, fueron estadísticamente diferentes el día 14 postinfección, ya que la concentración de hemoglobina fue decayendo paulatinamente durante el transcurso de la infección (gráfica 4) y no lograron recuperarse totalmente, esto se podría explicar por que la parasitemia nunca logró eliminarse completamente. La sobrevida podría estar asociada directamente con la anemia debido a que, una gran cantidad de eritrocitos son destruidos por los mismos parásitos y otros por el sistema inmune. Tomando en cuenta que la anemia aguda es provocada por la hemólisis durante la ruptura del eritrocito por el esquizonte y por autoanticuerpos que se sintetizan en respuesta a estímulos inducidos por antígenos maláricos expresados en la superficie eritrocítica (Rodríguez y col., 2000), todo esto aunado a la pérdida de peso que presentaron ambos grupos de ratones (gráfica 5), especialmente a partir del día 11 postinfección y, se observó una relación con el aumento considerable de la parasitemia y de anemia en ambos grupos de ratones. Por lo que es probable que el índice esplénico se asocie con la recuperación de los ratones, en este caso, los ratones infectados con la mezcla de *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17 XL así como los ratones inmunes a *P. chabaudi* AS y retados con la mezcla, presentaron un aumento secuencial del tamaño del bazo durante el transcurso de la infección. En los últimos días de la infección los dos grupos de ratones presentaron una esplenomegalia significativamente diferente el día 14 postinfección (gráfica 6), la cual se asoció directamente con la severidad de la anemia que presentaron los ratones y que a estos días de la infección no lograron disminuir la parasitemia. Esto podría deberse a que en el bazo se lleva a cabo la mayor destrucción de eritrocitos parasitados y a la gran actividad inmunológica que presenta el bazo, por lo tanto se tiende a aumentar el tamaño del órgano.

---

---

Se analizó la expresión del RNA mensajero de diferentes citocinas, para determinar la posible participación durante el transcurso de la infección con la mezcla de *Plasmodium* en ratones inmunes e infectados por primera vez.

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) es una citocina proinflamatoria que juega un papel importante en las infecciones intracelulares (Duran et. al., 1998), se ha descrito en la literatura que durante el inicio de la infección de *P. chabaudi* AS la expresión de TNF- $\alpha$  está asociada a una respuesta inflamatoria, después de la fase aguda predomina una respuesta de tipo TH2, donde la expresión de esta citocina disminuye (Taylor-Robinson, 1995). En relación a los niveles de expresión de TNF- $\alpha$  de la primera infección con la mezcla de *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17 XL que obtuvimos en nuestros experimentos, observamos que primero se incrementa (gráfica 7) y después disminuye paulatinamente, esto podría estar asociado a la influencia de una infección con los dos tipos de parásitos, puesto que con la infección únicamente con *P. chabaudi* AS se observa una disminución muy marcada (Ventura-Ayala, 2002) o bien a que, el sistema inmunológico en este grupo de ratones intenta regular la respuesta inflamatoria reprimiendo la expresión de este gene y este control lo podría ejercer la IL-4 ó IL-10 (Abbas, 2002; Rojas, 2001), esta última citocina en nuestros experimentos presentó niveles de expresión superiores al de TNF- $\alpha$  durante el transcurso de la infección.

Nuestros resultados mostraron que los ratones que sufrieron una infección previa con *P. chabaudi* AS y que se retaron con la mezcla de *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17 XL mantuvieron niveles de expresión de TNF- $\alpha$  mayores que aquellos ratones infectados por primera vez con la mezcla, en especial el día 14 postinfección donde la diferencia de expresión de TNF- $\alpha$  fue estadísticamente significativa. Este hallazgo podría estar asociado inversamente con la sobrevivencia, dado que los niveles bajos de expresión de TNF- $\alpha$ , correlacionan con la muerte de este grupo de ratones, mientras que los ratones que sobrevivieron expresaron mayores niveles de TNF- $\alpha$ , sin embargo es importante indicar que en la literatura el papel de TNF- $\alpha$  es

---

---

controvertido, dado que las altas concentraciones contribuyen a la patología de la malaria cerebral y a niveles moderados podrían ejercer un papel tóxico para el parásito (Odeh, 2001).

El interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) es una citocina inflamatoria que presenta una considerable actividad *in vitro* e *in vivo* sobre *Plasmodium sp.* especialmente al infectar a los hepatocitos (Sedegah et. al., 1994) además de ser una molécula esencial para la resolución de la parasitemia ( Winkler et. al., 1998).

La infección primaria con la mezcla de plasmodios indujo un incremento en los niveles de expresión de IFN- $\gamma$  que disminuyó ligeramente, sin embargo el día 14 se presentó nuevamente un incremento en esta citocina. Lo anterior podría deberse a que los ratones están sufriendo una infección mixta, de un *Plasmodium* letal y uno no letal, misma que no pueden controlar y eso se refleja con la muerte el día 15. Cuando la infección se lleva a cabo únicamente con *P. chabaudi* AS la infección se controla y los niveles de IFN- $\gamma$  disminuyen (Croos & Langhane, 1998). Si estos niveles no bajan se mantiene una respuesta TH1 y el cambio a TH2 no se presenta, evento que se asocia con susceptibilidad o letalidad (Jacobs et. al., 1996). Por lo anterior se sugiere que durante la infección primaria con la mezcla se favorece una respuesta tipo TH1.

En los ratones que se infectaron con *P. chabaudi* AS y que después se retaron con la mezcla de *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17XL, la expresión de IFN- $\gamma$  es significativamente menor que en los ratones que se infectaron por primera vez. Es importante indicar que en estos ratones, la expresión de IL-10 fue constante, por lo que se debe considerar la relevancia de esta citocina dada su participación como una molécula clave en la regulación de la respuesta inflamatoria (Winkler et. al., 1998), lo que puede influir en el balance del tipo de respuesta (TH1 y TH2) que presentan los ratones al infectarlos con la mezcla, después de una primera infección con *P. chabaudi* AS.



---

---

Las células CD4<sup>+</sup> producen IL-4 que es una citocina que estimula la proliferación y diferenciación de células B (Jasón, 2001). La participación de IL-4 en malaria se ha cuestionado, dado que algunos estudios han sugerido que esta citocina presenta una correlación negativa con la densidad de *P. falciparum* (Mashana, et. al., 1991). En los ratones infectados por primera vez con la mezcla de *P. chabaudi AS* y *P. yoelii 17 XL*, la expresión de IL-4 es baja durante todo el curso de la infección (gráfica 10), aunque la mayor expresión que presentó diferencia estadísticamente significativa fue en los días 8 y 10 postinfección por lo que podría estar asociada a la sobrevida, dado que se observó que la expresión de esta citocina es inversamente proporcional a la parasitemia. Nuestros resultados no concuerdan a lo descrito por Mashana y col. 1991, probablemente porque en nuestros experimentos los ratones se infectaron con dos diferentes cepas de parásitos.

En los ratones infectados con *P. chabaudi AS* y que después se retaron con la mezcla de *P. chabaudi AS* y *P. yoelii 17XL*, la expresión de IL-4 aumentó paulatinamente hasta llegar a un máximo entre los días 15 y 21 postinfección. Se ha descrito que IL-4 es un fuerte regulador de las citocinas inflamatorias TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . En nuestros experimentos, observamos que IL-4 se incrementó los mismos días que IFN- $\gamma$ , una explicación probable es que dado que IL-4 reprime la expresión de IFN- $\gamma$ , al estar elevado este último se intenta su regulación (Abbas, 2002; Rojas, 2001). En ratones infectados con *P. chabaudi AS* y re infectados únicamente con *P. chabaudi AS*, la expresión de IL-4 es mayor durante los primeros días y posteriormente disminuye (Ventura-Ayala, 2001). Cuando los ratones se infectan con *P. chabaudi AS* y se re infectaron con la mezcla, los niveles de expresión de IL-4 se incrementaron paulatinamente.

La IL-10, induce la proliferación de los linfocitos B para que se diferencien a células plasmáticas y se inicie la producción de inmunoglobulinas, antimalariales (Jasón et. al., 2001).

---

En los ratones infectados con la mezcla de *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17XL por primera vez, se observó que los niveles de expresión de IL-10 durante los días 4 y 12 postinfección fueron más altos y, esta diferencia fue estadísticamente significativa con respecto al grupo de ratones re infectados con la mezcla (gráfica 10), y a medida que avanzó la infección la expresión disminuyó notablemente, es probable que al inicio de la infección favoreció a una respuesta inmune tipo TH2, que posiblemente se deba a la infección con los dos parásitos, puesto que en un reto primario con *P. chabaudi* AS, durante la fase aguda de la infección la expresión de citocinas tipo TH2 se encontró disminuida. No obstante después del pico de la parasitemia, los valores se incrementaron (Ventura –Ayala, 2002).

Los ratones que se infectaron con *P. chabaudi* AS y que después se retaron con la mezcla de *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17 XL, presentaron niveles de expresión de IL-10 significativamente menores (días 4 y 12) que los ratones infectados por primera vez. La IL-10 actúa como un regulador de la respuesta tipo TH1 en la producción de IFN- $\gamma$  y de TNF- $\alpha$  que se expresaron en menor concentración.

En general los ratones re infectados mostraron menores niveles de citocinas que los infectados por primera vez, sin embargo, esos niveles de expresión fueron suficientes para no permitir que la parasitemia matara a los ratones.

El factor transformador del crecimiento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) se caracteriza por su actividad reguladora negativa de la inmunidad y la hematopoyesis, inhibe la proliferación y activación de los linfocitos T y B, de los macrófagos y de las células endoteliales, además de suprimir la producción de la mayor parte de las linfocinas y monocinas (Abbas, 2001). Se considera un moderador esencial de la inflamación en la malaria inducida en ratones (Omer et. al., 2003). Se ha demostrado que los niveles de TGF- $\beta$  son inversamente relacionados con la severidad de la infección con *Plasmodium*, es decir, que el TGF- $\beta$  juega un papel regulador en la producción del potencial patogénico de las citocinas proinflamatorias. Nuestros resultados en

---

---

relación a los niveles de expresión de TGF- $\beta$  durante la primera infección con *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17 XL (gráfica 9) indicaron un incremento significativo el día 8 y que a partir del día 10 disminuye lentamente, dada la función que desempeña TGF- $\beta$  como regulador de citocinas inflamatorias, como el IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$ , era de esperarse que durante la infección por primera vez con la mezcla se presentara una alta expresión de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  y como consecuencia la expresión de TGF- $\beta$  fue también alta, como un intento de regular la respuesta inflamatoria tan intensa. La expresión alta de TGF- $\beta$  se debió probablemente a la presencia del parásito letal, que es *P. yoelii* 17XL, ya que investigaciones similares realizados por Fakhereldin y col, 1998, mostraron que en una infección con *P. berghei*, parásito letal, en ratones BALB/c, la expresión de TGF- $\beta$  es similar, al inicio es alta y después disminuye paulatinamente (Fakhereldin et. al., 1998).

En los ratones infectados con *P. chabaudi* AS y que posteriormente fueron retados con la mezcla, detectamos que los niveles de expresión de TGF- $\beta$  (gráfica 9) se mantuvieron constantes en el curso de la infección a excepción del día 8 postinfección en que los niveles disminuyeron significativamente, sin embargo se presentó un nuevo incremento en la expresión de TGF- $\beta$  que alcanza un pico el día 21, en el cual la parasitemia no logró eliminarse. Estos resultados podrían indicar que el TGF- $\beta$  está asociado a la eliminación del parásito como lo describe (Omer et. al. 2003) y al no eliminarse la parasitemia, la expresión de TGF- $\beta$  siguió en aumento hasta el día mencionado.

Se han descrito tres isoformas diferentes de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS), la cual produce el óxido nítrico, la NOS neuronal que se produce en el cerebro, la NOS endotelial y la NOS inducible (iNOS). La iNOS se expresa principalmente por células del sistema inmune como, macrófagos y neutrófilos que juegan un papel importante en la defensa antimicrobiana (Van der Heide, 2000). En el caso de los ratones infectados con la mezcla de *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17 XL la expresión de iNOS fue estadísticamente baja, y las concentraciones de óxido

---

---

nítrico (NO) fueron superiores a las de los ratones sanos (50-55 $\mu$ m), alrededor de 80 $\mu$ M, la mayor concentración de NO se detectó en el día 14 postinfección, sin que esta diferencia fuera estadísticamente significativa a la del otro grupo de ratones (gráfica 12), pero no correspondió al pico de la parasitemia, estos resultados están de acuerdo con investigaciones similares en donde se ha mostrado que el óxido nítrico no es necesario para la eliminación de *P. chabaudi* AS en modelos murinos (Taylor-Robinson, 1996; Favre et. al. 1998), y que en nuestro caso, al infectar con la mezcla de plasmodios, la concentración de óxido nítrico no se pudo asociar a la eliminación del parásito.

De acuerdo a lo obtenido, los niveles de expresión de iNOS, correlacionaron con la concentración sérica de óxido nítrico, durante la primera infección y estos niveles se asociaron a una respuesta tipo TH1. A medida que se incrementó la concentración de óxido nítrico se observó una disminución de IL-10, este resultado sugiere que IL-10 esta involucrada en la regulación de la expresión de iNOS y por lo tanto también podría regular la concentración de óxido nítrico.

En los ratones reinfectados con la mezcla, la expresión de la iNOS y la concentración de óxido nítrico mostraron diferencias estadísticas significativamente menores (gráficas 11 y 12) con relación a los ratones infectados con la mezcla de plasmodios por primera vez, ya que la expresión de iNOS fue mínima, así como las concentraciones de óxido nítrico que fueron bajas. Por otro lado, se ha descrito en la literatura que los ratones infectados únicamente con *P. chabaudi* AS, producen óxido nítrico, cuyas concentraciones se incrementan durante la fase aguda de la infección, hasta llegar a un pico. Después los ratones entran en un periodo de inmunosupresión o de tolerancia inmunológica, que dura varios meses y que al retarlos nuevamente en este periodo con *P. chabaudi* AS, la expresión de iNOS disminuye y por ende también la concentración de óxido nítrico es baja y en algunos casos es indetectable (Taylor-Robinson, 1996; Ventura-Ayala, 2002). En el presente trabajo, cuando los ratones se infectaron por primera vez con *P. chabaudi*

---

---

AS y posteriormente se retaron después con la mezcla de *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17 XL, el comportamiento fue similar, no importando si la reinfección es con un parásito letal o con uno no letal. Es importante indicar que los niveles de óxido nítrico son regulados directamente (en una primera infección) por los niveles de ciertas citocinas, que pueden reducir la transcripción de mRNA para iNOS. Además de que IL-4, IL-10 o TFG- $\beta$  pueden inhibir sinérgicamente la actividad citotóxica de los macrófagos (James, 1995).

---

## CONCLUSIONES

- Los ratones infectados con *P. chabaudi* AS desarrollaron protección cruzada, misma que se evidenció al retarlos con la mezcla de *P. chabaudi* AS (no letal) y *P. yoelii* 17XL (letal), dado que sobrevivieron, aunque no lograron eliminar completamente a la parasitemia.
- Los niveles de hemoglobina bajos y el índice esplénico alto en el día 14 postinfección se asociaron a la sobrevida en los ratones.
- El óxido nítrico no se asoció con la sobrevida en ninguno de los dos grupos de ratones.
- El TFG- $\beta$  ejerce una regulación sobre la expresión de las citocinas pro y anti-inflamatorias, por lo que su expresión se podría asociar a la resistencia al parásito.
- En los grupos de ratones, infectados por primera vez y en los re infectados con la mezcla de plasmodios, los niveles de expresión de las citocinas analizadas son diferentes.

---

## ANEXO

### PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y MATERIALES

#### 1.- Acril-Bisacrilamida al 30%.

Acrilamida	29.0g
Bisacrilamida	1.0g
Agua bidestilada	cbp 100mL

**Nota:** usar guantes y cubrebocas para la preparación.

#### 2.- Gel de acrilamida al 5%.

Reactivos	1 gel
Agua bidestilada	36.1mL
TBE 10X	5.0mL
Acrilamida : Bisacrilamida al 30%	8.4mL
APS 10%	500 $\mu$ L
TEMED	30 $\mu$ L

#### 3.- Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

Reactivos	Cantidad
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 100 mL

**Nota:** Se utiliza para la extracción de RNA, tiene que estar libre de calcio y magnesio, a transferir en frascos de 250mL y esterilizar.

#### 4.- Persulfato de amonio (APS) al 10%

Persulfato de amonio	10.0g
Agua bidestilada	cbp 100mL

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

---

### 5.- Amortiguador Tris-Ácido Bórico-EDTA (TBA) 10X

Reactivo	Cantidad
TRIS 1M	121.10g
Ácido bórico 1M	61.83g
EDTA 50mM	14.61g
Agua bidestilada	cbp 1000mL

**Nota:** calentar la solución para disolver rápidamente los reactivos.

### 6.- Amortiguador de PCR 10X con Mg<sup>+2</sup>.

Stock	Reactivo	[final] PCR 1X (1 reacción)	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	1000mM
20mg/mL	Gelatina	0.1 mg/mL	0.5mL	1mg/mL
	Agua millipore		6.8mL	

### 7.- Amortiguador de carga 5X.

Reactivos	Concentración
TRIS, pH=8	50mM
EDTA, pH=8	75 mM
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

### 8.- NADPH 1.25mg/mL.

1.25mg de NADPH se colocan en un tubo eppendorf y se le adiciona 1mL de PBS 1X, se conserva a -70° C.



---

---

**9.- Nitrato reductasa (*Aspergillus*) 5U/mL.**

La solución Stock es de 20U. Se hidrata con 2mL de PBS 1X, se realizan alícuotas de 0.25mL, se guardan a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Cuando se utiliza, le enzima se lleva a 1 mL y se conserva a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

**10.- Sulfanilamida al 1% en ácido fosfórico al 5%.**

Para 40 mL, se colocan 0.4 g de sulfanilamida en 37.6mL de agua bidestilada, se adiciona 2.4mL de ácido fosfórico. Se conserva a  $-4^{\circ}\text{C}$  protegido de la luz.

**11.- Naftilendiamina (NED) al 0.1% en agua estéril.**

Para 40mL., se colocan 0.04g de NED en 40 mL de agua estéril. Se conserva a  $-4^{\circ}\text{C}$  en un frasco ámbar.

**12.- Ácido tricloroacético al 10%.**

Se colocan 10g de ácido tricloroacético en 100mL de agua estéril. Se conserva a  $-4^{\circ}\text{C}$  protegido de la luz.

**13.-Nitrato de sodio ( $\text{NaNO}_3$ ) al 0.7mM.**

Se colocan 0.001932g de  $\text{NaNO}_3$  en 40 mL de agua estéril.

---

---

## BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas A, Litchman A. Inmunología Celular y Molecular. 4ed. McGraw-Hill. Madrid, 2002:243-255.
2. Arredondo J, Calderon E. Conceptos clínicos de Infectología. 10 ed. Méndez editores. México, 1995: 563-567.
3. Bate C, Taverne J, Play fair J. Malaria parasites induce TNF production by macrophages. Immunol 1988; 64: 227-231.
4. Bjorkman A. Malaria associated anemia, drug resistance and antimalarial combination therapy. Int J Parasitol 2002; 32 (13): 1637-1643.
5. Brunet L. Nitric oxide in parasitic infections. Int Immunopharmacol 2001; 1: 1457-1467.
6. Castro Gómez, Taype A, Ezpinoza J. Producción de TNF- $\alpha$  por monocitos de pacientes con formas clínicas diversas de tuberculosis y polimorfismo genético en el locus humano -308 TNF- $\alpha$  en el Perú. Enf del Tórax 2003; 46 (2): 1027-2674.
7. Cross C, Langhorne J. *Plasmodium chabaudi chabaudi* (AS): Inflammatory Cytokines and Pathology in an Erythrocytic-Stage in Mice. Exp Parasitol 1998; 90: 220-229.
8. Duran S, Muegga K. Cytokine Knockouts. Humana Press. New Jersey, 1998:89-95, 103-105.
9. Elased K, Taverne J, Playfair J. Malaria, blood glucose, and the role of tumour necrosis factor (TNF) in mice. Clin Exp Immunol 1996; 105: 443-449.
10. Fakhereldin B, Riley E. Transforming Growth Factor  $\beta$  Production Is Inversely Correlated with Severity of Murine Malaria Infection. J Exp Med 1998; 188 (1): 39-48.

- 
11. Favre N, Ryffel, Rudin W. Parasite killing in murine malaria does not require nitric oxide production. *Parasitology* 1999; 118: 139-143.
  12. Fossati L, Merino J, Izuis. CD4+ T-cell play a major role for IgM and IgG anti-DNA production in mice infected with *Plasmodium yoelii*. *Clin Exp Immunol* 1990; 79: 291-296
  13. Gershon D. Malaria research tools up for the future. *Nature* 2002; 419: 4-5.
  14. Good M & Doolan D. Immune effector mechanisms in malaria. *Immunol* 1999; 11: 412-419
  15. Goodman CA, Coleman PG, Mills AJ. Cost-effectiveness of malaria control in sub-Saharan Africa. *Lancet* 1999; 354; 378-385.
  16. Greenwood B, Mutabingwa T. malaria in. *Nature* 2002; 415: 670-672
  17. Hernández-Urzúa, MA, Alvarado-Navarro, A. Interleucinas e inmunidad innata, *Biomed* 2001; 12: 272-280.
  18. Hirunpetcharat C, Finkelman F, Clark I, Good M. Malaria parasite-specific Th1-like T cells simultaneously reduce parasitemia and promote disease. *Parasite Immunol* 1999; 21: 319-329.
  19. Hoffee P. *Medical Molecular Genetics*. Fence Creek Publishing. Baltimore, 1998: 119-126.
  20. Holder A. Malaria vaccines. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 1167-1169.
  21. James S. Role of Nitric Oxide in Parasitic Infections. *Microbiol Rev* 1995;59 (4): 533-547.
  22. Jason J, Archibald L, Nwanyanwu O, Bell M, Buchanan I, Larned J, et al. Cytokines and Malaria Parasitemia. *Clin Immunol* 2001;100 (2): 208-218.
  23. Korenromp E, Williams B, Gouws E, Dye C, Snow R. Measurement of trends in childhood malaria mortality in Africa: an assessment of progress toward targets based on verbal autopsy. *Lancet Infect Dis* 2003; 3 (6): 349-358.
  24. Kowdley K. TNF- $\alpha$  in Chronic Hepatitis C: The Smoking Gun?. *Am J Gast* 1999; 94 (5): 1132-1135.

- 
25. Kumaratilake LM, Ferrante A, Rzepczyk C. The role of lymphocytes in immunity to *Plasmodium falciparum*. Enhancement of neutrophil-mediated parasite killing by lymphotoxin and IFN- $\gamma$ : Comparisons with tumor necrosis factor effects. *J Immunol* 1991; 146: 762-767.
  26. Kumate J, Muños O, Gutiérrez G, Santos J. Manual de Infectología Clínica. 16<sup>a</sup> ed. Méndez editores. México 2002: 671-681.
  27. Kurtis J, Lanar D, Opollo M, Duffy P. Interleukin-10 responses to Liver-Stage Antigen 1 Predict Human Resistance to *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* 1999; 67 (7): 3424-3429.
  28. Maitland K, Marsh K. Pathophysiology of severe malaria in children. *Acta Tropica* 2004; 90 (2): 131-140.
  29. Majed O. The role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the pathogenesis of complicated *Falciparum* malaria. *Cytokine* 2001 ; 14 (1): 11-18.
  30. Marletta M. Nitric Oxide Synthase Structure and Mechanism. *Biol J* 1993; 268 (17):12231-12234.
  31. Meltzer S. Methods in Molecular Biology. Humana Press. New Jersey, 1997: 239-244.
  32. Nicholls H, News B. Milking goats for malaria vaccine. *Drug discovery Today* 2004; 9 (6): 248.
  33. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer L. Cytokine signaling-regulation of the immune response in normal and critical ill states. *Crit Care Med* 2000; 28 (Suppl): 3-12.
  34. Perlmann P, Perlmann H, ElGhazali G. IgE and tumor necrosis factor in malaria infection. *Immunolo Lett* 1999; 65: 29-33.
  35. Phillips R, Mathers K, Taylor-Robinson A. T cells in immunity to *Plasmodium chabaudi chabaudi*; operation and regulation of different pathway or protection. *Res Immunol* 1994; 145: 406-411.
  36. Playfair J. Infection and Immunity. Oxford University Press. Oxford, 1995: 55-57.

- 
37. Rasti N, Wahlgren M, Chen Q. Molecular aspects of malaria pathogenesis. *Immunol Med Microbiol* 2004;1-9.
  38. Rockett K, Awburn M, Cowden W, Clark I. Killing of *Plasmodium falciparum* In Vitro by Nitric Oxide Derivatives. *Infect Immunol* 1991; 59: 3280-3283.
  39. Rodella L, Rezzani R, Agostini C, Bianchi R. Expression of NADPH-diaphorase and colocalization with in the brain neurons of the rat following visceral noxious stimulation. *Brain Res* 1999; 834: 173-177.
  40. Rodríguez T, Ruíz R, Boggiano G. Malaria por *Plasmodium vivax*: efectos del tratamiento sobre los niveles de inmunoglobulinas y variación en la expresión del antígeno CD23. *Med Intern* 2000; 16 (2): 1-11.
  41. Sachs J, Malaney P. The economic and social burden of malaria . *Nature* 2002; 415 (7):680-685.
  42. 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.
  43. Tay J, Gutiérrez M, López R, Manjarres E, Molina J. *Microbiología y Parasitología Médicas*. Méndez editores. México, 2003: 490-500.
  44. Tay J, Velasco O, Lara R, Gutiérrez M. *Parasitología Médica*. 7ª ed. Méndez editores. México, 2002: 167-180.
  45. Taylor-Robinson A, Severn A, Philips S. Kinetics of nitric oxide production during infection and reinfection of mice with *Plasmodium chabaudi*. *Parasite immunol* 1996; 18: 425-430.
  46. Taylor-Robinson AW, Smith E. A dichotomous role for nitric oxide in protection against blood stage malaria infection. *Immunol Lett* 1999; 67: 1-9.
  47. Taylor-Robinson AW. Regulation of Immunity to Malaria: Valuable Lessons Learned from Murine Models. *Parasitol Today* 1995; 11(9): 335-341.

- 
48. Terapia génica en malaria . Iladiba 2004; XVII (1): 1-8.
  49. Titheradge M. Nitric Oxide Protocols. Humana Press. New Jersey, 1998: 1-5, 75-79.
  50. Troye-Blomberg M. Human T-cell responses to blood stage antigens in *Plasmodium falciparum* malaria. Immunol Lett 1994; 41: 103-107.
  51. Van der Heyde H, Gu Y, Zhang Q, Sun G, Grisham M. Nitric oxide is neither necessary nor sufficient for resolution of *Plasmodium chabaudi* malaria in mice. J Immunol 2000; 165: 3317-3323.
  52. Van Lieshout M, Kovats RS, Livermore M, Martens P. Climate change malaria: analysis of the SRES climate and socio-economic scenarios. Glob Env Chan 2004; 14 (1): 87-99.
  53. Ventura-Ayala L. Determinación de inmunidad en malaria durante la reinfección con un parásito heterólogo. Tesis de licenciatura en Química Farmacéutico Biológica. UNAM-Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. México DF. 2002.
  54. Villagrán LE. Participación del óxido nítrico en la regulación de la respuesta inmune en malaria. Tesis de licenciatura en Química Farmacéutico Biológica. UNAM-Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. México DF. 2003.
  55. Wenisch C, Parschalk B, Burgmann H, Looareesuwan S, Graninger W. Decreased serum levels of TGF- $\beta$  in patients with acute *Plasmodium falciparum* malaria. J Clin Immunol 1995; 15: 69-73.
  56. White B. PCR Protocols. Humana Press. New Jersey, 1993: 1-25.
  57. White E. Overview of apoptosis. Inglaterra: Amersham life science 1996: 8-15.
  58. Wilson W. Diagnóstico y Tratamiento de Enfermedades Infecciosas. Manual Moderno. México, 2002: 921-927.

- 
59. Winkler S, Willheim M, Baier K, Schmid D, Aichelburg A, Graninger W, et al. Reciprocal Regulation of Th1- and Th2-Cytokine-Producing T Cells during Clearance of Parasitemia in *Plasmodium falciparum* Malaria. *Infect Immun* 1998: 6040-6044.
60. Youmans PG, Paterson YP, Sommers MH. *Infectología Clínica*. 2a edición. Nueva editorial Interamericana, 1984: 799-810.