



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

PRESENTA: **OVIEDO MEZA RODRIGO**

Numero de cuenta: 09925535-8

Folio del alumno:

Año en que termino la carrera: 2008

Orientación: Análisis Bioquímico Clínico

Titulo del proyecto:

“Evaluación de las propiedades adyuvantes de la proteína Cry1Ac, en ratones CBA/Ca infectados con diferentes cepas de Plasmodium.”

Área específica del proyecto: Inmunología

Nombre del asesor: Martha Legorreta Herrera

Lugar donde se desarrolla: Laboratorio de Inmunología Molecular.

Opción de titulación: tesis experimental.



México, D. F. a 20 de Marzo del 2009



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.

No puedo arrepentirme de las decisiones que me trajeron hasta aquí.

Entiendo que el error más grande se comete cuando, por temor a equivocarse, te equivocas, dejando de arriesgar en el viaje hacia tus objetivos.

El dolor es inevitable, pero el sufrimiento es solo una opción.

La muerte es paz. Es fácil. La vida es más difícil.

R.O.M

Agradecimientos

Sería un ingrato si no agradeciera su apoyo a las muchas personas que me han ayudado a llegar hasta este punto tan importante en mi vida:

Todo mi amor y gratitud a mis padres Alejandra y Fernando, que han sido mi roca, por su comprensión y sacrificio constantes y por su apoyo en lo largo de mi vida.

Gracias a mi mamá, por ser mi mejor compañía y permitir que te caliente la cabeza con todas mis dificultades. Gracias igualmente por ser tan divertida, creativa e inteligente, y por haber agregado un poco de todas esas virtudes en mi mezcla genética.

Gracias a mi papá, por siempre estar a mi lado, pendiente de mi e interesarse en todo lo que hago.

A mi hermano, a mi primer amigo, que me enseñó a creer en que las cosas se pueden hacer de diferentes formas, que no solo existe “lo blanco y lo negro”.

A mi familia que me ha dado todo su afecto, comprensión y motivación para salir adelante, gracias a mi Tía Olga, Tía Cristina, Vera, Becky, Enrique, Janda y Adriana, sin ustedes no habría podido llegar hasta este punto, ya que he necesitado de su cariño y que siempre serán mi apoyo.

Dra Martha Legorreta que continúa guiando mi carrera con paciencia y dedicación, es un magnífico consuelo saber que estoy en tan buenas manos. Gracias por haber sintonizado tanto con lo que hay en mi cabeza y ayudarme a encontrar los mejores modos de expresarlo y sobre todo por soportar mi locura con una linda sonrisa.

A mis amigos Abraham, Ana, Lupita, Jesús, Miguel, Misael, Lizbeth que estuvieron conmigo y compartimos tantas aventuras, experiencias, desveladas y triunfos, gracias a cada uno por hacer que la universidad fuera muy divertida y en especial a “Mery” Tanya, una extraordinaria amiga que ha sido una gran ayuda para no perder la cordura, tanto dentro como fuera de la carrera. Poca gente tiene la suerte de encontrarse con una persona tan maravillosa, convivir juntos durante 5 años y seguir siendo mejores amigos, te estaré eternamente agradecido.

A las profesoras Patricia Vidal, Enriqueta Castrejón e Idalía Flores que me han cuidado de una forma tan asombrosa durante mi curso en la FES Zaragoza. Tengo que decir que sé que han puesto todo su amor, y lo aprecio más de lo que pueda demostrar.

Gracias a mis sinodales, primero por la fe que depositaron en este trabajo y segundo por pulirlo con sus inestimables aportaciones.

Este trabajo recibió financiamiento de la DGAPA, UNAM proyecto PAPIIT IN214007
y PAPIME PE-204105.

Abreviaturas

Ab	Anticuerpo.
Ag	Antígeno.
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i> .
CFA	Adyuvante completo de Freund.
GPI	Glucosilfosfatidilinositol.
IFA	Adyuvante incompleto de Freund.
IFN	Interferón.
Ig	Inmunoglobulina.
IL	Interleucina.
iNOS	Óxido nítrico sintetasa inducible.
IRO	Intermediarios reactivos del oxígeno.
NK	Natural killer.
OPD	Ortofenilendiamina.
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> .
<i>P. malarie</i>	<i>Plasmodium malaria</i> .
<i>P. ovale</i>	<i>Plasmodium ovale</i> .
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i> .
PAMP	Patrones moleculares asociados con los patógenos.
PBS	Solución buffer de fosfatos.
RNI	Intermediarios reactivos del nitrógeno.
RRP	Receptores de reconocimiento de patrones.
TLR	Receptores tipo Toll.

Índice

Resumen	1
1 Introducción.....	2
2 Marco teórico	
2.1 Generalidades de la proteína Cry1AC	3
2.1.1 Clasificación de las d-endotoxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	3
2.2 Inmunidad innata	4
2.2.1 Mecanismo celulares de la inmunidad innata.....	4
2.2.2 Papel de las células presentadoras de antígeno en la respuesta inmune innata ...	5
2.3 Mecanismos de la respuesta inmune adaptativa	5
2.4 Respuesta dada por parásitos intracelulares	5
2.5 Inmunoglobulinas estructura y funcion	6
2.5.1 Inmunoglobulina G (IgG).....	7
2.5.2 Inmunoglobulina M (IgM)	8
2.6 ¿Por qué estudiar a los parásitos murinos?.....	9
2.7 Adyuvantes	10
2.8 Generalidades de la Malaria	
2.8.1 Antecedentes.....	11
2.8.2 Generalidades	11
2.8.3 Ciclo Biológico.....	12
2.8.4 Zonas afectadas por Malaria.....	14
2.8.5 Inmunidad en Malaria.....	15
2.8.6 inmunidad no específica en Malaria.....	15
2.8.7 Inmunidad adaptativa en Malaria	15
2.9 Las pruebas de ELISA	16
2.9.1 ELISA indirecta.....	17
3 Planteamiento del problema	18
4 Objetivos	
4.1 Objetivo general	19
4.1 Objetivos Específicos	19
5 Hipótesis	19
6 Diseño experimental.....	20
6.1 Material biológico	20
6.2 Material de laboratorio	20

6.3 Equipo.....	20
6.4 Reactivos	21
6.5 Métodos	
6.5.1 Tratamiento.....	21
6.5.2 Monitoreo de las parasitemias	22
6.5.3 Obtencion de las muestras	22
6.5.4 Técnica de ELISA	23
6.5.5 Análisis estadístico	24
7 Resultados.....	25
7.1 Cinetica de la infección con P. chabaudi AS y con P. berghei ANKA	25
7.2 Determinacion de los diferentes isotipos de anticuerpos en ratones infectados con P. berghei	28
7.2 Determinacion de los diferentes isotipos de anticuerpos en ratones infectados con P. chabaudi	31
8 Discusion de resultados	34
9 Conclusiones.....	37
10 Referencias	38
11 Anexo	
11.1 Preparación de soluciones	41

Resumen

Debido al poco entendimiento de los mecanismos involucrados en el desarrollo de la inmunidad permanente contra cepas de *Plasmodium*, es importante estudiar los tipos de adyuvantes que pudieran utilizarse para potenciar la respuesta inmune contra *Plasmodium*.

En el presente trabajo se evaluó si la proteína Cry1Ac potencia la respuesta inmune humoral contra *Plasmodium*, por lo que se evaluaron los niveles de los diferentes isotipos de anticuerpos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG totales e IgM producidos en una infección contra *Plasmodium berghei* y *Plasmodium chabaudi* en ratones CBA/Ca previamente tratados con la proteína Cry1Ac. Este proyecto es importante dado que la proteína Cry 1Ac podría utilizarse para potenciar la respuesta inmune inespecífica contra la malaria que afecta a los humanos.

Para llevar a cabo este proyecto se trataron grupos de ratones CBA/Ca con 5 dosis semanales de 5 µg de proteína Cry1Ac durante 4 semanas y 24 h después se infectaron con las diferentes cepas de plasmodios. Diariamente se evaluó la parasitemia y los niveles de anticuerpos se determinaron en dos días diferentes durante la infección utilizando la técnica de ELISA.

Los ratones tratados con la proteína Cry 1Ac e infectados con el parásito letal, *Plasmodium berghei* ANKA, desarrollaron parasitemias significativamente menores que los ratones infectados con el mismo parásito que solo recibieron PBS, lo que se observó en la disminución significativa en el porcentaje de eritrocitos parasitados.

Los ratones infectados con el parásito no letal, *Plasmodium chabaudi* AS y tratados con la proteína Cry 1Ac se recuperaron más rápido que los ratones que recibieron únicamente PBS, debido a que en el día 18 después de la infección los ratones tratados con la proteína eliminaron completamente la parasitemia.

La inoculación de la proteína Cry 1Ac previa a una infección con *Plasmodium*, generó un incremento en los niveles de los diferentes isotipos de anticuerpos: IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgGt e IgM, sin embargo, este aumento en la síntesis de inmunoglobulinas solo resultó significativo en los anticuerpos IgG1 e IgG totales para *P. berghei* ANKA e IgG2a para *P. chabaudi* AS.

A los resultados obtenidos se les realizó un tratamiento estadístico para determinar si el tratamiento con la proteína Cry1Ac incrementó de forma significativa los niveles de los diferentes isotipos analizados.

En conclusión el tratamiento con la proteína Cry 1Ac generó protección contra ambas especies de *Plasmodium*, lo que se detectó como una disminución en los niveles de parasitemia, dado que se presentó una mayor sobrevivencia en los ratones inoculados con *P. berghei* ANKA y una eliminación más eficiente del parásito en los ratones infectados con *P. chabaudi* AS. También se detectó un incremento en los niveles de los isotipos de inmunoglobulinas específicas para *Plasmodium*.

1. Introducción

La malaria es la enfermedad infecciosa más importante en el mundo debido a la alta morbilidad, mortalidad y el impacto socioeconómico que ocasiona a las poblaciones humanas afectadas.

Esta enfermedad la causa un protozooario parásito del género *Plasmodium*; los miembros de este género que infectan al hombre son *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*, destacan las dos primeras especies en salud pública, debido a que *P. falciparum* resulta la más letal y *P. vivax* la más prevalente.

Cerca del 40% de la población mundial permanece expuesta a la malaria, se estima que cada año ocurren entre 300 a 500 millones de muertes. Uno de los principales obstáculos para el control de la transmisión de la enfermedad lo constituye el acelerado desarrollo de resistencia del mosquito *Anopheles* a los insecticidas que comúnmente los eliminaban y la propagación de cepas de parásitos maláricos resistentes a los fármacos utilizados para el tratamiento de la enfermedad. Por otra parte, el progresivo aumento de focos de malaria producto de los movimientos migratorios de individuos infectados y los cambios ambientales ecológicos o sociales, tales como aquellos derivados de la agricultura y otras explotaciones económicas en regiones selváticas, que dificultan también el control de la transmisión (Carrillo-Rosario, Díaz, 2005).

El desarrollo de vacunas efectivas contra el *Plasmodium* ha estado limitado por la no disponibilidad de adyuvantes efectivos, siendo el adyuvante completo de Freund (ACF) el que ha producido mejores resultados en modelos animales.

La proteína Cry1Ac producida por *Bacillus thuringiensis* posee una actividad adyuvante, tanto inmunopotenciadora como inmunomoduladora (Lopez-Revilla y Moreno-Fierros, 1999). En el presente trabajo se evaluó la capacidad de la proteína Cry 1^a para potenciar la respuesta inmune, mediante la medición de la concentración de los diferentes isotipos de anticuerpos por medio de la técnica de ELISA demostrando así la capacidad protectora de la proteína Cry1Ac.

2 Marco teórico

2.1 Generalidades de la proteína Cry 1 Ac

Esta proteína la produce *Bacillus thuringiensis* (*B. thuringiensis*) que es una bacteria gram positiva, aerobia estricta, morfológicamente relacionada con *B. cereus* y *B. anthracis*. Estas tres especies de bacterias, durante su ciclo de vida, presentan dos fases principales, la fase de crecimiento vegetativo y la fase de esporulación. La espora es una forma de vida latente que puede permanecer en el ambiente por periodos de tiempo muy largos (años) en ausencia de humedad y de nutrientes. A *B. thuringiensis* se le diferencia de *B. cereus* y *B. anthracis* por contener un cuerpo paraesporal conocido como cristal, el cual es de naturaleza proteica y tiene propiedades insecticidas e inmunogénicas (adyuvante). Este cristal está constituido por proteínas denominadas δ -endotoxinas, también conocidas como proteínas Cry y Cyt. Se ha encontrado que estas proteínas pueden ser tóxicas en diferentes órdenes de insectos, ciertos nemátodos y protozoarios. En la fase de esporulación la endospora se desarrolla en un esporangio que consiste de dos compartimentos celulares conocidos como la célula madre y la espora. La proteína Cry se acumula en la célula madre durante este proceso. La estructura primaria de las proteínas Cry presenta diferencias, pero comparte el mismo patrón de activación y modo de acción (Soberón y Bravo, 2007).

2.1.1 Clasificación de las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*.

Existen dos tipos de δ -endotoxinas: las proteínas Cry y las proteínas Cyt. La primera clasificación de las δ -endotoxinas se basó en la especificidad de actividad insecticida. En esta clasificación las toxinas CryI presentaban actividad contra lepidópteros, las toxinas CryII eran proteínas más pequeñas de 70kDa, activadas contra lepidópteros y dípteros, las toxinas CryIII eran proteínas activadas contra colópteros; las toxinas CryIV activadas contra dípteros y las CryV y CryVI activadas hacia nematodos, en donde CryVI era un grupo que no tenía homología con el grupo CryV. Sin embargo muy rápidamente se dieron cuenta que esta clasificación no era adecuada ya que empezaron a encontrar proteínas Cry que eran muy semejantes, pero con especificidad diferente o toxinas Cry con actividad dual, las cuales también llamaron CryV, creando una gran confusión en la nomenclatura. Esto propicio que se creara una nueva nomenclatura de las δ -endotoxinas, basada exclusivamente en la similitud de la estructura de la secuencia primaria. En esta nueva nomenclatura los números romanos se cambiaron por números arábigos. La definición de proteínas Cry es cualquier proteína paraesporal de Bt que muestre efecto tóxico hacia algún organismo, verificable por medio de bioensayos o cualquier proteína que muestre similitud con las proteínas Cry.

Las proteínas Cyt denotan a las proteínas paraesporales de *B. thuringiensis* que muestren actividad hemolítica o tengan similitud a la secuencia de las toxinas Cry.

A la fecha las proteínas Cry están agrupadas en 28 grupos y varios subgrupos y las proteínas Cyt en dos grandes grupos y varios subgrupos.

Las esporas de *B. thuringiensis* se utilizan sobre cultivos destinados para la alimentación humana o animal con el propósito de combatir insectos perjudiciales, el efecto de las proteínas Cry es la formación de agregados con aspecto de cristales alrededor de las esporas debilitando a los insectos y es por esto que son denominadas "Cry"(Soberón y Bravo, 2007).

2.2 Inmunidad innata

Los parásitos suelen expresar en su superficie residuos de manosa, que reconoce la proteína lecitina que une a manosa (MBL), lo que inicia la activación del complemento a través de la vía de las lectinas.

La vía alterna del complemento funciona como primera línea de defensa contra parásitos extracelulares. Su activación induce una reacción inflamatoria local, favorece la fagocitosis de los parásitos opsonizados y a través de la formación del complejo de ataque a la membrana, puede inducir la destrucción del patógeno (Chen, 2000).

Existen otros factores solubles que actúan como primera defensa frente a las infecciones parasitarias. Los más estudiados son los factores líticos específicos para tripanosomas (TFL). Estudios bioquímicos realizados en sueros humanos revelaron la presencia de al menos dos factores:

- TFL1, compuesto de apolipoproteínas y proteínas relacionadas con las haptoglobulinas.
- TLF2, que comparte algunos componentes con TLF1 pero además presenta IgM en su composición.

Los mecanismos por los cuales estos factores ejercen su acción citotóxica no están bien definidos pero su actividad peroxidasa sugeriría que la lisis de los parásitos estaría mediada por daño oxidativo.

2.2.1 Mecanismos celulares de la inmunidad innata

La fagocitosis mediada por macrófagos participa en la primera línea de defensa contra los protozoos. Los parásitos se detectan por estas células, a menudo como consecuencia de la opsonización mediada por el complemento, pero también por su interacción con los receptores, como los receptores de lecitina tipo C (RLC). Dentro de los macrófagos los parásitos deben enfrentarse a la hostilidad que representa el estallido respiratorio y el microambiente de los lisosomas. (Fainboim-Geffner, 2005).

Las células Natural Killer (NK), se activan por interleucina 12 (IL-12), producen grandes cantidades de interferón- γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), citocinas que actúan de modo sinérgico sobre los macrófagos e incrementan su potencialidad microbicida. El IFN- γ producido por las células NK favorece el desarrollo de respuestas Th1. Sus acciones se regulan en forma negativa por IL-10 y TGF- β , citocinas que median una actividad supresora que cobra importancia a la hora de proteger al hospedero del daño tisular inducido por el INF- γ . (Fainboim-Geffner, 2005).

Por otra parte, las células NK pueden ejercer su acción antiparasitaria por mecanismos clásicos de citotoxicidad mediados por granzimas y perforinas a través del sistema Fas-FasL.

Las células NKT y los linfocitos T con TCR $\gamma\delta$ también pueden secretar citocinas y mediar una respuesta rápida frente a las infecciones parasitarias.

Estas células T no convencionales expresan un TCR con escasa diversidad y reconocen estructuras conservadas presentes en diversos patógenos.

Las células T $\gamma\delta$ se encuentran en bajo porcentaje en la sangre y los órganos linfáticos periféricos, pero su proporción aumenta en los tejidos asociados con las mucosas, que representan la vía de entrada de muchos parásitos.

Los estudios realizados en modelos experimentales de infección por *Plasmodium* demostraron que las células T $\gamma\delta$ ejercen su función protectora a través de la secreción de IFN- γ y TNF- α e inducen la expresión endógena de la proteína de choque térmico (HSP) 65 en macrófagos murinos (Fainboim-Geffner, 2005).

2.2.2 Papel de las células presentadoras de antígeno en la respuesta inmune innata.

Las células presentadoras de antígeno reconocen y discriminan las estructuras de los agentes patógenos y se lleva a cabo por los RRP (receptores de reconocimiento de patrones). Estos receptores reconocen patrones moleculares asociados con los patógenos (PAMP), presentes en los agentes infecciosos, por lo general compartidos por patógenos del mismo género. En el caso de los protozoarios se describió que los lípidos de anclaje del tipo glucosilfosfatidilinositol (GPI) constituyen un grupo importante de PAMP. Los GPI de *P. falciparum* estimulan, en los macrófagos, la expresión de óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y la secreción de TNF- α e IL-1. (Fainboim-Geffner, 2005).

Los receptores de tipo Toll (TLR) son una importante familia de RRP. Cumplen un papel esencial en la respuesta inmune innata antibacteriana y antiviral.

2.3 Mecanismos de la respuesta inmune adaptativa.

La respuesta inmune adaptativa humoral y celular se induce específicamente contra un amplio número de antígenos del parásito y los efectores protectores varían según el tipo de parásito (intracelular o extracelular) contra el cual se dirige la respuesta inmune.

2.4 Respuesta dada por parásitos intracelulares

En relación con los mecanismos efectores mediados por las células T CD4⁺, la secreción de citocinas cumple un papel esencial en la activación de las células efectoras y/o células infectadas y la eliminación del parásito invasor.

Entre estas citocinas destaca el IFN- γ , que induce la expresión de iNOS y la generación subsecuente de intermediarios reactivos del nitrógeno (RNI) por las células infectadas. Así, por ejemplo el IFN- γ induce la producción de RNI e intermediarios reactivos del oxígeno (IRO) en hepatocitos invadidos por esporozoitos de *P. falciparum*, restringen de esta manera el desarrollo del patógeno. La principal función de los linfocitos T CD8⁺ es producir INF- γ , citocina clave en el control de las etapas hepáticas de *Plasmodium*.

Los parásitos intracelulares presentan etapas extracelulares breves, durante los periodos iniciales de la infección y al intentar invadir nuevas células. En estos periodos, los parásitos son susceptibles al ataque de los anticuerpos que, si bien no inducen la muerte directa del patógeno, restringen la infección al favorecer la captura del microorganismo por células fagocíticas y/o bloquear la invasión de nuevas células (Fainboim-Geffner, 2005).

Se ha observado el desarrollo de una “inmunidad natural adquirida” frente a *P. falciparum* en habitantes de zonas endémicas para este parásito. Esta forma de inmunidad se basaría en anticuerpos específicos para antígenos presentes en los estadios asexuales en la sangre, que serían protectores por aglutinar a los glóbulos

rojos infectados, inhibir la adherencia de éstos a los vasos sanguíneos pequeños y/o bloquear la invasión de los glóbulos rojos.

Esta observación sugiere que si bien los anticuerpos tienen un papel limitado en la resistencia a los parásitos intracelulares y actúan complementando las acciones mediadas por la inmunidad celular, se requiere de la respuesta humoral para conferir una protección completa al hospedero. (Martínez Rodríguez, 2004).

2.5 Inmunoglobulinas: estructura y función.

Las inmunoglobulinas son proteínas con actividad de anticuerpo, es decir, se combinan de manera específica con la sustancia que provocó su formación (antígeno) y constituye la rama humoral de la respuesta inmunitaria.

La mayoría de los anticuerpos se producen en respuesta a sustancias extrañas que se introducen al cuerpo. Son el resultado de respuestas inducidas. Las inmunoglobulinas, que circulan en los líquidos corporales, comprenden una familia muy heterogénea de proteínas, que constituyen alrededor del 20% de las proteínas plasmáticas totales. En la electroforesis del suero, la mayor parte de las inmunoglobulinas emigran a la región gamma, por lo cual se denominan gammaglobulinas.

Las dos características fundamentales de las inmunoglobulinas son: la especificidad de cada una por una estructura antigénica particular, y su diversidad como grupo que cumple con el requerimiento de enfrentarse a una amplia cantidad de antígenos ambientales. Algunas de las actividades secundarias de las inmunoglobulinas son por ejemplo la fijación del complemento, el paso transplacentario y la facilitación de la fagocitosis.

En la mayoría de los mamíferos superiores se han identificado cinco clases diferentes de inmunoglobulinas (Ig), concretamente IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Estas clases se diferencian entre sí en cuanto a su tamaño, carga, composición de aminoácidos y contenido de hidratos de carbono.

Cada molécula de Ig es bifuncional. Una región de la molécula es capaz de unirse al antígeno (Ag), mientras que otra región ejerce las denominadas funciones efectoras. Entre estas últimas se encuentran la unión de la Ig a los tejidos del huésped, a diversas células del sistema inmunitario, a algunas células fagocíticas y al primer componente (C1q) de la vía clásica del complemento.

La estructura bifásica de todas las moléculas de Ig está formada por dos cadenas polipeptídicas ligeras idénticas y dos cadenas polipeptídicas pesadas idénticas, unidas entre sí mediante enlaces disulfuro (Stites-Terr, 1991).

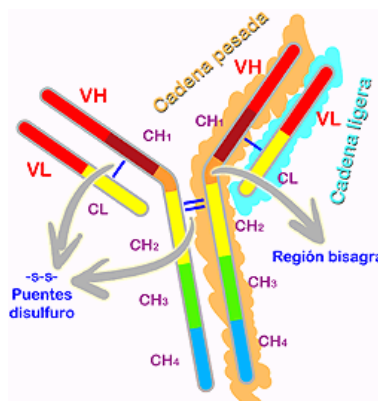


Figura 1. Estructura general de las inmunoglobulinas. (Inmunología humana y básica, en línea, 2008).

La clase y la subclase de una molécula de Ig dependen del tipo de cadena pesada que contenga. Así las cuatro subclases de IgG humana (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) poseen las cadenas pesadas γ_1 , γ_2 , γ_3 , γ_4 , que difieren ligeramente entre sí, aunque todas ellas se pueden considerar cadenas γ .

La abundancia relativa de cada una de las cuatro subclases de IgG humana (IgG1-IgG4) es del 66, 23, 7 y 4%, respectivamente. También existen subclases de IgA humana (IgA1 e IgA2), pero no se conocen subclases de IgM, IgD ni de IgE. Esta heterogeneidad de las Ig, que permite clasificarlas en clases y subclases, se denomina variabilidad isotípica.

Todas la Ig son glucoproteínas, pero su contenido en hidratos de carbono oscila entre 2-3% de las IgG y el 12-14% de las IgM, IgD e IgE. (Stites-Terr, 1991).

Propiedades de las inmunoglobulinas humanas					
	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Fijación del complemento (clásico)	+	0	++++	0	0
Concentración sérica (mg/100 dL)	1000	200	120	3	0.05
Vida media sérica (días)	23	6	5	3	2
Transferencia placentaria	+	0	0	0	0
Lisis bacteriana	+	+	+++	¿?	¿?
Actividad antiviral	+	+++	+	¿?	¿?

Tabla 1. Propiedades de las diferentes inmunoglobulinas.

2.5.1 Inmunoglobulina G (IgG).

En los adultos humanos normales, la IgG constituye alrededor del 75% del total de inmunoglobulinas séricas. Dentro de la clase IgG, las concentraciones relativas de las cuatro subclases son aproximadamente: IgG1, 60 al 70%; IgG2, 14 a 20%; IgG3, 4 a 8% e IgG4, 2 a 6%. Estas cifras varían de un individuo a otro y muestran correlación débil con la presencia de ciertos marcadores alotípicos de la región constante (región C) de la cadena pesada (cadena H). Por lo tanto, la capacidad de un sujeto dado para producir anticuerpos de una u otra subclase de IgG, puede estar bajo control genético.

Las IgG consisten en una única molécula tetracatenaria con un coeficiente de sedimentación de 7S y 146,000 daltons de peso molecular. Sin embargo las proteínas IgG3 son ligeramente mayores que las de otras subclases; esto se debe a la presencia de la cadena γ_3 , que es algo más pesada. Los anticuerpos de la clase IgG, que se encuentran ampliamente distribuidos en los compartimientos intra y extra vascular, son los predominantes en las respuestas inmunitarias secundarias, y los únicos que presentan actividad frente a las toxinas (Stites-Terr, 1991).

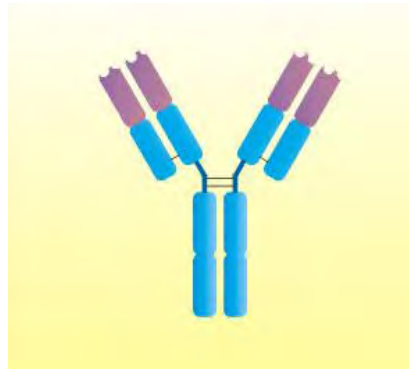


Figura 2. Estructura de la inmunoglobulina G (Inmunología humana y básica, en línea, 2008).

IgG es la única clase de inmunoglobulinas que puede atravesar la placenta en el hombre, y es responsable de la protección del recién nacido durante los primeros meses de vida. Las subclases no están dotadas de manera uniforme con esta propiedad, transfiriéndose IgG2 con más lentitud que las demás.

Además IgG es capaz de unirse al complemento sérico y de nuevo la función de las subclases es desigual en el orden siguiente: IgG2>IgG1>IgG3>IgG4, esta última es completamente incapaz de fijar complemento por la vía clásica, pero puede ser activa en la vía alterna.

Los macrófagos poseen receptores de superficie que se unen a IgG1 e IgG3 y a su fragmento cristalizante (Fc). La fijación pasiva de los anticuerpos por estos receptores para Fc es responsable del armado o activación de los macrófagos, que luego pueden funcionar como citotóxicos. Los receptores Fc en macrófagos facilitan también la fagocitosis de antígenos particulados, como bacterias, que estén recubiertos con anticuerpo, fenómeno conocido como opsonización (Rodrigo MJ, 1992).

Propiedades de subclase de IgG humana				
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Abundancia (% de IgG total)	70	20	6	4
Vida media en suero (días)	23	23	7	23
Pasaje placentario	+++	+	+++	+++
Fijación del complemento	++	+	+++	-
Fijación de receptores Fc	+++	+	+++	-

Tabla 2. Propiedades de la inmunoglobulina G.

2.5.2 Inmunoglobulina M (IgM)

Supone aproximadamente el 10% de las inmunoglobulinas totales. La molécula es un pentámero de la estructura tetracatenaria básica. Cada una de las cadenas pesadas presenta un peso molecular de 65, 000 daltons, aproximadamente, y la molécula completa tiene un peso molecular de 970, 000 daltons. La IgM se encuentra confinada en el espacio intravascular, y es el anticuerpo que aparece en mayor cantidad en las fases tempranas de la respuesta inmunitaria, es frecuente su

presencia en las respuestas frente a microorganismos infecciosos antigénicamente complejos.

IgM (con IgD) es la inmunoglobulina principal que se expresa en la superficie de las células B. También es la más eficiente para fijar complemento, basta una sola molécula de IgM unida para iniciar la cascada del complemento.

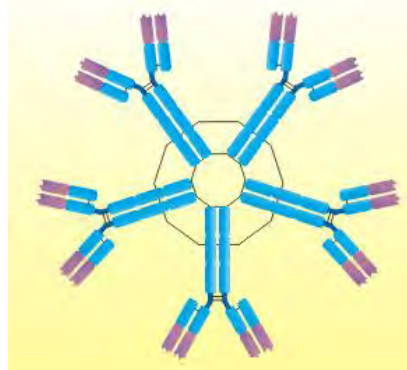


Figura 3. Estructura de una inmunoglobulina M (Inmunología humana y básica, en línea, 2008).

2.6 ¿Por qué estudiar a los parásitos de murinos?

Los parásitos de los roedores no son de preocupación directa para el hombre o para sus animales domésticos. El interés de los parásitos de la malaria en roedores es que son modelos importantes y prácticos para el estudio experimental de la malaria en mamíferos mayores. Estos parásitos son análogos a los de la malaria del hombre y otros primates en la mayoría de los aspectos esenciales de la estructura, la fisiología y el ciclo de vida (Parasitology – Malaria, en línea, 2008).

Por lo tanto, para la investigación de diferentes aspectos de la infección humana de la malaria, es adecuado el estudio experimental con parásitos de roedores, ya que con una cuidadosa evaluación y comparación de los resultados de los modelos experimentales con roedores, puede ser fundamental para el conocimiento de la infección parasitaria humana.

Los estudios de parásitos de la malaria en roedores han contribuido al conocimiento sobre la biología del desarrollo de parásitos de la malaria en general.

A pesar de las desventajas de estudiar en humanos parásitos de la malaria, los parásitos de roedores son reconocidos como un modelo valioso para la investigación de la biología del desarrollo de parásitos de la malaria, para la respuesta parásito-hospedero, el desarrollo de vacunas y pruebas de drogas, debido a que: a) la biología básica de roedores y parásitos humanos es similar; b) los procesos bioquímicos se conservan entre los roedores y parásitos humanos; c) la estructura y función de la vacuna candidata objetivo, antígenos, se conservan entre los roedores y parásitos humanos. (Parasitology – Malaria, en línea, 2008).

P. berghei es una de las muchas especies de parásitos de paludismo que infectan a los mamíferos, con excepción del al hombre. *P. berghei* es una de las cuatro especies que se han descrito en los roedores de África. *P. berghei* es un excelente modelo para la investigación sobre de la biología del desarrollo de parásitos de la malaria, debido a la disponibilidad de: a) tecnologías para el cultivo *in vitro* a gran escala y la producción y purificación de las diferentes etapas del ciclo de vida; b) el

conocimiento sobre la secuencia del genoma y la organización; c) existen metodologías para la modificación genética del parásito.

Otros parásitos como *Plasmodium chabaudi*, son muy valiosos en las diferentes áreas de investigación del paludismo y es un modelo útil reconocido para la investigación de los mecanismos de resistencia a medicamentos y variación antigénica (Cuello, 2006).

Este parásito presenta una variación antigénica de larga duración durante ciclo, lo que hace que no sea letal. En contraste con *P. berghei* que produce infecciones que suelen ser rápidamente letales para los roedores y puede dificultar el estudio *in vivo*.

2.7 Adyuvantes

La estructura de un antígeno es muy importante para su inmunogenicidad, un antígeno soluble es menos inmunogénico que uno particulado. Con objeto de incrementar la inmunogenicidad de los antígenos solubles se ideó el uso de adyuvantes (también llamados coadyuvantes). Los adyuvantes son vehículos que, cuando se mezclan con los antígenos inoculados mejoran su inmunogenicidad. Aunque hay varios tipos de adyuvantes, el más utilizado en animales de experimentación es el adyuvante de Freund y de éste hay dos variedades: el adyuvante incompleto (IFA, Incomplete Freund Adjuvant) y el adyuvante completo (CFA, Complete Freund Adjuvant). El adyuvante incompleto de Freund consiste en una mezcla de un detergente y un aceite mineral, usualmente arlacel (1 parte) y drakeol (9 partes), respectivamente; el adyuvante completo contiene además 1 mg/mL de una micobacteria muerta (*M. bovis* u otra). Los antígenos se mezclan con estos adyuvantes, volumen a volumen, se emulsifican hasta formar una mezcla estable y así se inoculan en los animales de experimentación. Las vías de inoculación más comunes de las emulsiones de antígeno y adyuvante son la intradérmica, la subcutánea y la intramuscular, aunque también se usa la intraperitoneal. La inoculación intravenosa no se usa, ya que existe el riesgo de causar obstrucción (trombosis) de los vasos sanguíneos.

La manera en que funcionan los adyuvantes es la siguiente: a) permiten la conversión de un antígeno soluble en “uno particulado”; b) las partículas o micelas de la emulsión permiten concentrar la cantidad de antígeno administrado; c) el antígeno permanece retenido más tiempo en el sitio de inoculación, prolongando así el tiempo de estimulación; d) la forma particulada del antígeno inoculado facilita su captura por las células fagocíticas procesadoras y presentadoras de antígeno; e) además, la micobacteria presente en el adyuvante completo de Freund estimula la respuesta inmune celular, la producción de citocinas, la atracción, acumulación y activación de macrófagos, el procesamiento de antígenos y la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B.

Debido a que el adyuvante de Freund, sobre todo el CFA, induce el desarrollo de reacciones inflamatorias molestas y aparatosas, tales como granulomas, abscesos y ulceraciones, su uso está restringido a los animales de experimentación. Para los animales de importancia económica y para los humanos, los adyuvantes recomendados son los geles de aluminio (hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio) sobre los que se adsorben los materiales de baja inmunogenicidad, como los toxoides diftérico y tetánico (Rojas-Espinosa, 2001).

Se conoce que la proteína Cry1Ac es capaz de funcionar como adyuvante en mucosas, así como también in Vitro estimula la proliferación de monocitos cuando se administra junto con lisados de *S. pyogenes* (Rodríguez-Orozco, 2006), lo que tendría relevancia para el desarrollo de vacunas.

2.8 Generalidades de la Malaria

2.8.1 Antecedentes

El paludismo es una parasitosis que se conoce desde hace mucho tiempo. Hipócrates hablaba de la fiebre, e incluso hizo una diferenciación entre la fiebre continua y la no continua, en ese tiempo empieza a recibir el nombre de malaria, en función de “mal aire”, porque el padecimiento se asociaba con aquellas personas que vivían cercanas o contiguas a zonas pantanosas o malolientes. Posteriormente, en el siglo XVI o XVII, se le dio el nombre de paludismo, por palustre, que quiere decir zona pantanosa. Finalmente, estos fueron los dos términos con los que subsiste hasta la fecha: malaria o paludismo (Romero Cabello, 2007).

El paludismo es una enfermedad que tiene una gran historia, en el siglo XIX Levan demostró el protozoo responsable en la sangre que después recibiría el nombre de *Plasmodium*. Con esto empieza el conocimiento clínico de la enfermedad; posteriormente la participación de algunos investigadores, culmina con los trabajos de Ross, quien demostró que un mosquito es indispensable como parte del ciclo biológico del género *Plasmodium* (Romero Cabello, 2007).

El género *Plasmodium* pertenece al *subphylum Apicomplexa*. Se conocen más de 100 especies de *Plasmodium* que infectan a mamíferos, aves y reptiles, pero sólo cuatro infectan al hombre: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malarie*, *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium ovale* (Romero Cabello R. 2007).

2.8.2 Generalidades

Plasmodium carece de órganos de locomoción, flagelos, cilios y pseudópodos, por lo que se transporta por los líquidos en donde se encuentra. Su morfología es diversa y posee un ciclo de vida muy complejo, que requiere de un huésped intermediario y un huésped definitivo. El hombre es el huésped intermediario, dado que en él se encuentran las formas asexuadas o sexualmente inmaduras. En cambio, el huésped definitivo es el mosquito hembra del género *Anopheles*, pues en este invertebrado se encuentran las formas sexuadas maduras. El mosquito es el agente transmisor de la infección humana: con la picadura de la hembra *Anopheles* infectada se inoculan formas infectantes, los esporozoitos. Para que esto suceda, es necesaria la presencia de factores ecológicos, como climas tropicales o templados y acúmulos de agua, incluso es suficiente una lata tirada en donde se estanca agua de lluvia. Ahí puede completarse el ciclo biológico de los mosquitos; todo acúmulo de agua con poco movimiento permite establecer criaderos de *Anopheles*. Además de la picadura de *Anopheles* infectados, existen otros mecanismos de transmisión para el paludismo menos importantes en frecuencia, pero que también están presentes, como es el caso de la transfusión sanguínea, ya que un individuo parasitado hace que el receptor reciba la infección palúdica. El género *Plasmodium* puede atravesar la barrera placentaria y por lo tanto puede infectar al producto; cuando esto ocurre la entidad se denomina Paludismo congénito (Romero Cabello, 2007).

2.8.3 Ciclo Biológico

El esporozoíto se inocula al hombre a través de la picadura del mosquito hembra. De ahí, el esporozoíto se transporta por la circulación hasta el hígado y penetra a un hepatocito para multiplicarse por fragmentación nuclear. Se estima que es capaz de originar más de 30, 000 nuevas células en esta primera gran multiplicación, en donde cada fragmento es un núcleo. Cuando son ya muchas células, el hepatocito se rompe, liberando nuevas células que se llaman merozoítos de primera generación. En el caso de la especie *P. vivax* y *P. ovale*, hay formas del parásito que a nivel hepático se desarrollan lentamente y permanecen en forma latente por meses o más tiempo, por lo que se les da el nombre de hipnozoítos. En el ciclo hepático de *P. vivax*, los hipnozoítos permanecen latentes y pueden activarse por factores aun no determinados; pero cuando estos hipnozoítos se reactivan, continúan su desarrollo, produciendo nuevos merozoítos lo cual provoca la recaída de los pacientes en los que aparentemente se había eliminado la enfermedad. El ciclo eritrocítico se inicia cuando uno de los merozoítos que se liberaron del hígado invade un eritrocito. En esta célula roja, el merozoíto cambia de forma, a un trofozoíto inmaduro. Posteriormente, evoluciona hasta trofozoíto maduro el cual rompe su núcleo en varias porciones y se convierte en un esquizonte. Esto origina la esquizogonia, a la reproducción por multifragmentación nuclear. El esquizonte presenta dos fases, el esquizonte inmaduro y el esquizonte maduro. Este último contiene nuevas células rodeadas de citoplasma. Finalmente se rompe el eritrocito, liberando a los merozoítos que circulan libremente, y pueden invadir o parasitar una célula roja, en la cual se transforman en trofozoítos, continuando nuevamente el ciclo, mismo que recibe la denominación de ciclo eritrocítico. Algunos merozoítos dan lugar a la gametocitogénesis y se diferencian sexualmente en el eritrocito, en gametocitos, microgametocitos y macrogametocitos. El microgametocito es la célula macho y macrogametocito la célula hembra. "Cito" significa que no están maduros, son células sexuadas pero inmaduras. En el hombre no pueden progresar hasta células maduras, todo el tiempo que permanezcan en el ser humano siguen siendo células inmaduras. Si la hembra de *Anopheles*, pica a un individuo parasitado, y le succiona la sangre con eritrocitos parasitados (estos últimos, si contienen trofozoítos o esquizontes, se destruyen porque el mosquito no es el huésped adecuado para esas formas), los micro y macrogametocitos, como han llegado al huésped idóneo, evolucionan a células sexuales maduras, capaces de cumplir con los fenómenos de reproducción. En el intestino del mosquito continúan su desarrollo hasta convertirse en gametos: el macrogametocito se convierte en macrogameto y el microgametocito vuelve a multiplicarse antes de madurar, su núcleo se fragmenta, y se transforma en una estructura alargada, como un flagelo, que se libera de la célula original. A este fenómeno se le llama exflagelación. Cada uno de esos flagelos se libera y madura. Esta célula alargada es un microgameto masculino maduro, por tropismo localiza un macrogameto, penetra en el y se fusiona con el núcleo y lo fecunda lo que origina un huevo u oquinete, el cual tiene la peculiaridad que se mueve, gracias a ese movimiento se desplaza en las cavidades; en el estómago o en el intestino medio del mosquito. Posteriormente, penetra en la pared intestinal para localizarse por debajo de la cubierta, ahí deja de ser móvil para convertirse en un huevo fijo que se llama ooquiste. Entre la pared del epitelio y la membrana basal del intestino, el ooquiste presenta síntesis del ADN y una gran cantidad de divisiones celulares que generan miles de esporozoítos. Estos quedan libres en los líquidos y en los tejidos del mosquito,

circulando en la hemolinfa. Muchos esporozoítos llegan a las glándulas salivales, y cuando este mosquito pica a otro mamífero, le inocula los esporozoítos, cerrándose así el ciclo completo. Esta fase se llama el ciclo esporogónico, porque el resultado es la formación de esporozoítos. El ciclo previo que referimos en el hombre se llama esquizogónico, porque ahí se forman los esquizontes (Romero Cabello, 2007).



Figura 4. Ciclo biológico del *Plasmodium* (The malaria research programme of the medical research council, South Africa, 2008).

2.8.4 Zonas afectadas por Malaria

El paludismo se presenta en zonas tropicales en África, Asia y Latinoamérica, es endémico de 91 países y en ocho tiene pequeñas áreas de transmisión. De las cuatro especies de *Plasmodium* que infectan al hombre, *P. vivax* se encuentra ampliamente distribuida y es la más común en regiones templadas. *P. falciparum* produce las formas mas graves y es muy importante en África Subsahariana y en áreas tropicales. *P. ovale* se localiza casi solo en África. *P. malariae* se ubica en África, Latinoamérica y Nueva Guinea (Romero Cabello, 2007).

En México, el número de defunciones por paludismo antes de la campaña de erradicación, correspondía a un porcentaje importante de las muertes en el país; en el año de 1954, había un promedio de 25, 000 defunciones en el país por paludismo, considerando que en ese entonces el número de habitantes era alrededor de 25 millones en el territorio nacional. Así comenzó la Campaña Nacional de erradicación del Paludismo en 1955. Ya en los años siguientes, como resultado de la campaña, el número de defunciones fue disminuyendo: 25, 000 en 1955, 18, 000 en 1956, 16, 353 en 1957, 14, 575 en 1958, 9, 000 en 1959, 7, 000 en 1970 y 2, 000 en 1971. A partir de 1979, empezó una tendencia de incremento que se controló. En los últimos años se han presentado un promedio de 4, 000 personas infectadas con *Plasmodium*, fundamentalmente por *P. vivax*. Chiapas es el estado donde se reportaron el 60% de estos casos, seguido de Sinaloa y Chihuahua, con el 13 y 9%, respectivamente. Existen diversos factores sociales, económicos y biológicos que intervienen en el paludismo (Romero Cabello 2007).

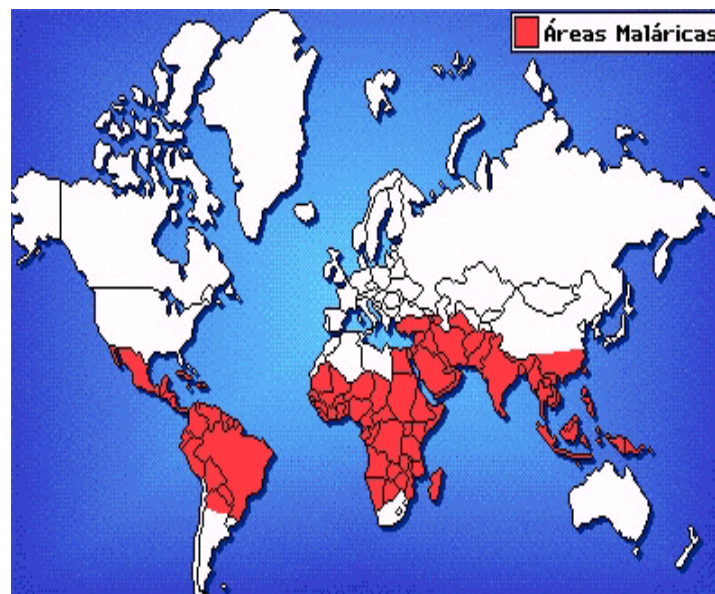


Figura 5. Regiones donde la malaria es endémica. (The malaria research programme of the medical research council, South Africa, 2008).

2.8.5 Inmunidad en malaria.

El *Plasmodium* debido a su ciclo de vida tiene la capacidad de entrar y de salir de diferentes células tanto en el hospedero como en el vector. Para esto, el parásito debe cambiar no sólo su forma sino la constitución y modo de presentación de sus proteínas y/o receptores. En consecuencia los antígenos que expresa difieren entre los diferentes estados del parásito, lo que resulta en una respuesta inmune compleja. De modo tal que el sistema inmune de un individuo infectado se puede desafiar desde diferentes frentes. Una de las claves para la supervivencia del parásito radica, entonces, en su capacidad de confundir al sistema inmune del hospedero de modo tal que cuando ciertos antígenos han desencadenado una respuesta inmune, ya se eliminaron o procesaron para montar nuevos antígenos, frente a los cuales es necesario iniciar otra respuesta. En consecuencia, las respuestas inmunes generadas durante la infección malárica tienden a ser específicas no sólo de especie sino también de estadio (Regueiro, 2002).

2.8.6 Inmunidad no específica en Malaria.

Se ha observado que la administración de agentes no relacionados con *Plasmodium* puede llevar a la adquisición de resistencia en forma no específica contra los parásitos que causan malaria. En los modelos experimentales con ratones se ha confirmado que la exposición previa a *Mycobacterium bovis* (BCG) resulta en una respuesta protectora a la infección malárica. En forma similar, la inoculación con *Propionibacterium acnés* muerto es capaz de conferir algún grado de protección contra diversos Plasmodios. Además, la exposición a una gama de productos puede ser responsable de la eliminación no específica del parásito. Entre estos se incluye la concavalina A, lipopolisacárido, extracto de *Coxiella burnetti*, extracto crudo de taquizoitos de *Toxoplasma gondii*, y silicato de magnesio.

Aunque los mecanismos de la respuesta inmune no-específica activan diversos sistemas efectoros para el control de *Plasmodium* no se han esclarecido completamente para todas las especies del parásito, pero se postula que estos incluyen la activación de macrófagos, además de un aumento en el número de las células NK (Carrillo-Rosario, 2005).

2.8.7 Inmunidad adaptativa en Malaria.

El desarrollo de inmunidad específica contra la malaria depende del nivel de endemidad de la infección en una población dada. En humanos, la inmunidad adquirida contra antígenos del *Plasmodium* se hace evidente durante los primeros días de la segunda semana después de que la parasitemia se puede detectar, lo cual conduce a una reducción de la tasa de multiplicación del parásito. Después de un periodo de tiempo, la inmunidad puede llevar a la parasitemia a niveles bajos o indetectables, lo cual reduce los síntomas clínicos de la infección. Sin embargo, en términos generales, la inmunidad contra la enfermedad sólo resulta después del desarrollo de una respuesta inmune contra un limitado número de antígenos parasitarios implicados en la inmunopatología del parásito, pero no necesariamente contra antígenos que son responsables de desencadenar una respuesta inmune eficaz para la eliminación del parásito de la circulación del hospedero.

Debido a que la inmunidad adquirida es corta, se requiere de una exposición constante del parásito, con el fin de mantenerla. La presencia de inmunidad estéril ha sido descrita con roedores infectados con *P. berghei*, pero los estudios epidemiológicos realizados en humanos, indican que es poco probable que exista en la especie humana. (Legorreta-Herrera y Sánchez-Cruz, 1999)

La respuesta inmune adaptativa es específica del estadio del parásito, dado que se presentan diferentes antígenos en formas pre-eritrocíticas (esporozoitos y formas hepáticas), formas asexuadas (merozoitos, esquizontes) y formas sexuadas (gametocitos).

La inmunidad específica en malaria contra antígenos de la fase sanguínea, incluye anticuerpos dirigidos contra las moléculas necesarias para la invasión al eritrocito y anticuerpos capaces de estimular la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (Good y Doolan, 1999). Otros anticuerpos reconocen proteínas variantes y adhesivas expresadas sobre la superficie de los eritrocitos, que puede inhibir la adhesión de eritrocitos infectados a ligandos del huésped e incrementar la fagocitosis de eritrocitos infectados por macrófagos esplénicos y/o ser destruidos por citotoxicidad dependiente de anticuerpos (Bull y Marsh, 2002).

2.9 Las pruebas de Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA)

Los ensayos inmunológicos son procedimientos en los cuales se utilizan anticuerpos como reactivos enlazantes “específicos”. Se utilizan para la determinación o cuantificación de fármacos, diversas sustancias biológicas, agentes infecciosos o anticuerpos de respuesta del huésped en el suero, en la orina, en el líquido cefalorraquídeo, en y en cualquier líquido biológico donde se encuentre la sustancia a investigar (Guzmán-Vázquez, 2004).

En el ensayo ELISA se utiliza una enzima como marcador para mediar la formación de complejos antígeno-anticuerpo. Existen diversas variaciones al método ELISA para detectar y cuantificar ligandos de alto peso molecular (>30,000 daltons), el marcador enzimático que se emplea en estos análisis se conjuga con un ligando, que puede ser un antígeno, un anticuerpo específico para el antígeno de interés o un anticuerpo para el anticuerpo primario (Cardona, 2005).

Casi todas las pruebas ELISA son ensayos en fase sólida en los cuales se absorbe un antígeno o un anticuerpo sobre un soporte sólido, el material que se utiliza como fase sólida pueden ser tubos, microplacas, esferas, discos; los cuales pueden ser de celulosa, nylon polivinilo, poliacrilamida, poliestireno y partículas de agarosa. La inmovilización del antígeno o anticuerpo en la fase sólida es por enlace covalente o por adsorción continua de interacciones no covalentes, las altas concentraciones de antígeno o anticuerpo reducen los enlaces inespecíficos y mejora los específicos. Algunos de los protocolos se basan en las reacciones de enlace competitivo y otras en reacciones de enlace no competitivo, pero en todas las pruebas ELISA se requiere de un paso de separación para eliminar el conjugado enzimático libre antes de proceder a determinar la cantidad de conjugado enzimático enlazado. Para lo cual se añade el sustrato de la enzima y se mide la reacción catalítica entre la enzima y el sustrato. Las enzimas son marcadores muy sensibles y versátiles. Una sola proteína enzimática puede transformar en algunos minutos gran número de moléculas de sustrato en una cantidad igualmente abundante de producto final, produciendo un cambio de color amplificado que se detecta con facilidad. En el método ELISA de inhibición, el cambio de color se reduce, porque la actividad

enzimática se inhibe cuando el anticuerpo se enlaza al conjugado enzimático (Guzmán-Vázquez, 2004).

La prueba de ELISA se basa en los siguientes principios:

- 1) El antígeno y el anticuerpo pueden enlazarse a una superficie portadora insoluble y retener su reactividad inmunológica.
- 2) Las enzimas tienen actividad específica alta y convierten una gran cantidad de sustrato en producto colorido, lo que permite detectar concentraciones muy bajas de ligando.
- 3) La actividad enzimática o reactividad inmunológica de los conjugados se preserva y permanece estable durante el análisis y el almacenamiento.
- 4) Las enzimas no están presentes en el líquido biológico que se va a analizar.

Las combinaciones de enzima sustrato que se emplean en los diversos métodos de ELISA incluyen:

- 1) Peroxidasa de rábano y su sustrato, peróxido de hidrógeno que en presencia de el cromógeno o-fenilendiamina produce un color amarillo-naranja medible.
- 2) Beta-Galactosidasa y su sustrato o-nitrofenil-beta-D-galactopiranosido que se transforma en un producto derivado del p-nitrofenol de color amarillento medible por espectrofotometría.
- 3) Fosfatasa alcalina y su sustrato p-nitrofenilfosfato que también se transforma en nitrofenolato. Se utiliza ácido sulfúrico para inhibir la actividad enzimática y estabilizar el producto final de reacción que tiene color (Guzmán-Vázquez, 2004).

2.9.1 ELISA indirecto

Es el método más utilizado para la determinación de anticuerpos. Básicamente, consiste en la inmovilización a la placa de ELISA del antígeno del que queremos conocer si en el suero problema existen anticuerpos específicos. Se pueden utilizar como antígenos, proteínas virales o bacterianas e incluso virus completos.



Figura 6. Fase de la técnica Elisa indirecto. (1) El antígeno se pega a la placa (2) Se añade el suero problema. (3) posteriormente, el conjugado. (4) y por último, el sustrato.

3 Planteamiento del Problema

La malaria representa la enfermedad parasitaria más importante en humanos. Esta es responsable de 2,1 millones de muertes anuales. Existen varios grupos de riesgo sujetos a infecciones por las diferentes cepas de *Plasmodium*: los niños y las mujeres embarazadas que sufren severas enfermedades relacionadas con la entrada de parásitos en la placenta. La mejor solución a este problema sería el desarrollo de una vacuna efectiva contra malaria. Sin embargo, este objetivo no se ha logrado debido a múltiples razones, entre las que se encuentra un escaso entendimiento de los mecanismos que regulan la respuesta inmune contra el *Plasmodium*; la pobre inmunogenicidad de los antígenos del parásito, la gran variación antigénica y el escaso conocimiento sobre el tipo de adyuvantes adecuado.

En estudios previos se ha demostrado la capacidad adyuvante que tiene la proteína Cry1Ac, lo que le confiere la propiedad de potenciar la respuesta inmune cuando se administra por vía intragástrica a ratones y su eficacia se ha comparado con la toxina del cólera, que es el adyuvante más potente conocido hasta ahora. Por lo que en este trabajo se estudió si la proteína Cry1Ac posee actividad inmunopotenciadora contra malaria en un modelo experimental de paludismo murino. En particular se analizó si la administración previa de la proteína vía intraperitoneal podía potenciar la respuesta humoral contra *Plasmodium*, para lo anterior, se analizaron los niveles de los diferentes isotipos IgG así como los niveles de IgM específicos contra dos cepas diferentes de *Plasmodium* (*P. berghei* ANKA y *Plasmodium chabaudi* AS). La información que aporte este proyecto será de utilidad para el desarrollo de vacunas eficientes contra *Plasmodium*.

4 Objetivos

4.1 Objetivo General

- Evaluar los niveles de isotipos de anticuerpos en ratones tratados previamente con la proteína Cry1Ac e infectados con *Plasmodium berghei* o *P. chabaudi*.

4.2 Objetivos Específicos

- Evaluar los niveles de IgM en ratones tratados con la proteína Cry1Ac e infectados con *P. berghei* o *P. chabaudi*.
- Evaluar los niveles de IgG-1 en ratones tratados con la proteína Cry1Ac e infectados con *P. berghei* o *P. chabaudi*.
- Evaluar los niveles de IgG-2a en ratones tratados con la proteína Cry1Ac e infectados con *P. berghei* o *P. chabaudi*.
- Evaluar los niveles de IgG-2b en ratones tratados con la proteína Cry1Ac e infectados con *P. berghei* o *P. chabaudi*.
- Evaluar los niveles de IgG-3 en ratones tratados con la proteína Cry1Ac e infectados con *P. berghei* o *P. chabaudi*.
- Evaluar los niveles de IgG-T en ratones tratados con la proteína Cry1Ac e infectados con *P. berghei* o *P. chabaudi*.

5 Hipótesis

Se ha descrito previamente que la proteína Cry1Ac potencia la respuesta inmune en infecciones provocadas por *Neigleria* un protozooario letal para el hombre y el ratón, además la proteína Cry1Ac induce un incremento en los niveles de anticuerpos contra ese protozoo. Por lo que proponemos que la administración de la proteína Cry1Ac previa a la infección con *Plasmodium* aumentará la sobrevivencia de los ratones CBA/Ca e incrementará los niveles de anticuerpos específicos contra *Plasmodium*.

6 Diseño experimental.

Se inyectaron semanalmente dos grupos de ratones CBA/Ca con la proteína Cry1Ac, y dos grupos con PBS. A la cuarta semana cada grupo se infectó con 5×10^4 eritrocitos parasitados con *P. chabaudi* AS o con *P. berghei* ANKA y se analizaron los siguientes parámetros: la parasitemia en frotis teñidos con Giemsa y la sobrevivencia a diferentes tiempos de la infección se tomaron muestras de suero para medir los niveles de anticuerpos: IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgGt e IgM por la técnica de ELISA indirecta.

6.1 Material biológico

Ratones CBA/Ca hembras de 12 a 18 semanas de edad, mantenidos bajo condiciones libres de patógenos específicos y alimentados con Harlan TD9936.

Eritrocitos parasitados con *P. chabaudi* AS, criopreservados en nitrógeno líquido.

Eritrocitos parasitados con *P. berghei* 17XL, criopreservados en nitrógeno líquido.

Suero normal de ratón CBA/Ca.

Suero de conejo hiperinmune a *P. chabaudi*.

Suero de conejo hiperinmune a *P. berghei*.

Glóbulos rojos normales de ratón CBA/Ca.

Proteína Cry1Ac.

Antígeno de *P. berghei* 17XL.

Antígeno de *P. chabaudi* AS.

6.2 Material de laboratorio.

Cubre bocas.

Gorros y botas para trabajar en áreas limpias.

Gradillas para tubos Eppendorf.

Gradillas para tubos Falcon.

Guantes de hule látex.

Jeringas de insulina nuevas y estériles.

Papel secante.

Película plástica auto adherente Egapack.

Placas de ELISA Corning.

Puntas para micropipetas: 2.5µL, 10µL, 250µL, 1000µL nuevas y estériles.

Tubos Eppendorf: 1.5mL nuevos y estériles.

Tubos Falcon: 15mL, 50mL nuevos y estériles.

6.3 Equipo.

Autoclave, Tuttnauer Brinkmann 254OM.

Balanza analítica, SCIENTECH.

Balanza granataria, Ohaus.

Campana de flujo laminar, Veco.

Centrifuga refrigerada, Eppendorf.

Congelador, Nieto.

Lector de ELISA, Stat fax-2100, Awareness Technology Inc.

Microcentrifuga, Eppendorf.

Micropipeta Eppendorf 8 x 200µL.

Micropipetas, Eppendorf: 2.5µL, 10µL, 20µL, 100µL, 1000µL.
Microscopio óptico, Carl Zeiss estándar 25.
Placa de agitación, Corning.
Refrigerador, Maytag.
Sonicador VC505, Vibra-Cell.
Tanque de nitrógeno líquido, 34XT, Taylor-Wharton.
Ultracongelador, REVCO, Legaci Refrigeration System.
Vórtex Genie 2, Daigger.

6.4 Reactivos

Ácido cítrico.
Agua desionizada Theissier.
Anticuerpo anti-IgG1, Zymed.
Anticuerpo anti-IgG2a, Zymed.
Anticuerpo anti-IgG2b, Zymed.
Anticuerpo anti-IgG3, Zymed.
Anticuerpo anti-IgGT, Zymed.
Anticuerpo anti-IgM, Zymed.
Bicarbonato de sodio.
Carbonato de sodio, Sigma.
Citrato de sodio, Sigma.
Cloruro de potasio, USB/Amersham..
Cloruro de sodio, USB/Amersham.
Colorante de Giemsa, Sigma.
Etanol al 97%.
Fosfato de potasio monobásico, Aldrich.
Fosfato de sódio monobásico, Sigma.
Hidróxido de sodio.
Leche en polvo, Svelty.
OPD, ortofenilendiamina.
Protein Assay (reactivo para cuantificar proteínas), BIO-RAD.
Streptavidina-peroxidasa.
Tween 20, Sigma.

6.5. Métodos

6.5.1 Tratamiento.

Se formaron 6 grupos de 6 ratones CBA/Ca.
A los grupos 1 y 2 se les administró 5µg de proteína Cry 1AC por ratón, vía intraperitoneal una vez a la semana, durante 4 semanas.
Al día siguiente de la administración de la última inyección con la proteína Cry1Ac, al grupo 1 se le inoculó con 5×10^4 eritrocitos parasitados con *P. chabaudi* AS que es una cepa no letal; al grupo 2 se inoculó con 5×10^4 eritrocitos parasitados con *P. berghei* ANKA que es una cepa letal.
A los grupos 3 y 4 se les administró PBS por vía intraperitoneal (en mismo volumen que el de los grupos que tienen proteína Cry1Ac).
Al grupo 3 se le inoculó con 5×10^4 eritrocitos parasitados con *P. chabaudi* AS; al grupo 4 se le infectó con 5×10^4 eritrocitos parasitados con *P. berghei* ANKA.

Diariamente se evaluó la parasitemia en frotis teñidos con Giemsa.

A los grupos 5 y 6 únicamente se les administró PBS y proteína Cry1Ac respectivamente.

Se tomaron 2 muestras de sangre (al inicio, cuando la parasitemia es alta y al final del experimento), en el caso de los ratones infectados con *P. berghei* ANKA (letal) se les tomó la muestra un día antes de que murieran (de acuerdo a un experimento anterior) y en esos mismos días se tomaron muestras a los ratones no infectados y tratados con PBS y con la proteína Cry1Ac.

De la muestra de sangre separamos el suero se congeló en alícuotas para evaluar los niveles de anticuerpos contra *P. chabaudi* AS y contra *P.berghei* ANKA, isotipos: IgG1; IgG2a, IgG2b, IgG3, IgGt e IgM por ELISA.

Tratamiento	Ag de la placa de ELISA	Anticuerpo a determinar
PBS + <i>P. berghei</i>	<i>P. berghei</i>	Ab. <i>P. berghei</i>
Cry 1Ac + <i>P. berghei</i>		Ab. Cry 1Ac
PBS + <i>P.chabaudi</i>	<i>P. chabaudi</i>	Ab. <i>P.chabaudi</i>
Cry 1Ac + <i>P. chabaudi</i>		Ab. Cry 1Ac
PBS	Cry 1Ac	Ab Cry 1Ac
Cry 1Ac		Ab Cry 1Ac

Tabla 3. Diseño experimental para detectar los niveles de isotipos de anticuerpos en las muestras de suero de ratón.

6.5.2 Monitoreo de las parasitemias.

Se realizaron frotis sanguíneos y se tiñeron con Giemsa.

La lectura de las parasitemias se efectuó con un microscopio óptico utilizando el objetivo de 100X y de acuerdo a los siguientes criterios:

Cuando existen menos de 2 eritrocitos parasitados por campo, se leyeron 50 campos.

Cuando existían 2 o más glóbulos rojos parasitados por campo, se contaron 200 eritrocitos.

De acuerdo al número de eritrocitos parasitados, se calculó la parasitemia.

6.5.3 Obtención de las muestras

Cada grupo estaba compuesto por seis ratones hembra CBA/Ca, estos grupos se dividieron en subgrupos de tres ratones. En los grupos que se infectaron con *P. berghei* ANKA, se sacrificaron tres ratones en el día 4 y los otros tres ratones se sacrificaron en el día 8 después del la infección.

En los grupos de ratones que se infectaron con *P. chabaudi*, se sacrificaron 3 ratones en el día 8 y los ratones restantes se sacrificaron en el día 16 después de la infección.

6.5.4 Técnica de ELISA

1. Las placas de ELISA se sensibilizaron con 100µL de una solución que contenía una concentración de 10µg/mL de proteína de los antígenos: *P. chabaudi* AS o *P. berghei* ANKA y como controles: proteína Cry 1Ac o glóbulos rojos de ratón sano).
2. Se incubaron las placas durante toda la noche a 4°C.
3. Se realizaron 5 lavados con la solución amortiguadora de fosfatos (PBS) con 0.05% de tween.
4. Se adicionaron 100 µl por pozo de la solución de bloqueo (ver anexo).
5. Las placas de ELISA se taparon con una película plástica auto adherible.
6. Se incubaron a 37°C durante 2 hrs.
7. Se realizaron 5 lavados con la solución de PBS + 0.05% de Tween.
8. El suero de los ratones se diluyó 1:20 en la solución de (PBS + 0.05% de Tween y 0.02% de leche), se añadieron 100µL de esta dilución en cada pozo de la placa.
9. Se incubó a 37°C durante una hora.
10. Se realizaron 5 lavados con la solución de PBS + 0.05% de Tween.
11. Los anticuerpos anti- IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgGt e IgM se diluyeron en la menor concentración recomendada por el fabricante, para tener un volumen final mínimo de 4 mL de cada suero anti-Ig de ratón, de la siguiente manera:

ANTICUERPO	DILUCION	CANTIDAD
IgG1	1:2000	2µL + 4 mL
IgG2a	1:3000	1.3 µL + 4 mL
IgG2b	1:2000	2 µL + 4 mL
IgG3	1:3000	1.3 µL + 4 mL
IgM	1:7000	1 µL + 7 mL
IgGt	1:5000	1 µL + 5mL

12. Se incubaron las placas a 37°C durante una hora con los sueros anti-Ig de ratón.
13. Se realizaron 5 lavados con la solución de PBS + 0.05% de Tween.
14. Se adicionaron 100µL de Streptavidina-Peroxidasa 1:2500 en cada pozo de la placa, diluida con la solución de PBS + 0.05% de Tween.
15. Se incubaron las placas a 37°C durante una hora.
16. El sustrato O-fenilendiamina (OPD), se debe preparar en el momento para evitar la oxidación del reactivo.
17. Incubar de 15 a 20 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz.
18. Las placas se leyeron en un lector de ELISA a 450 nm con filtro de 630 nm.

6.5.5 Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó con el programa Statgraphics versión 5.1, se analizó si existe o no efecto inmunopotenciador al tratar a los ratones con la proteína Cry 1Ac. Para ello se empleó el análisis de varianza de un factor (ONE-WAY), que sólo nos permitió conocer que existía diferencia en por lo menos uno de los tratamientos, por lo que se utilizó la prueba de Turkey para comparar todos los tratamientos y conocer si la proteína Cry1Ac genera protección. Las gráficas de caja que se muestran en los resultados se generaron con el programa Statgraphics versión 5.1, los cuadrados de color rosa indican la región donde se encuentra la mayoría de los datos de la población en cada grupo, las líneas horizontales azules dentro de las cajas representan la moda; las X color rojo corresponden al valor de las medias, y las barras verticales de color negro que salen de las cajas representan la desviación estándar.

7 Resultados

El principal objetivo de este trabajo fue evaluar si los niveles de los isotipos de anticuerpos específicos para las cepas de *Plasmodium chabaudi* AS y *P. berghei* ANKA se modificaban por la administración de la proteína Cry1Ac en un modelo experimental de malaria en ratones CBA/Ca.

Para cubrir ese objetivo se infectaron grupos de ratones CBA/Ca tratados y no tratados con la proteína Cry1Ac con *P. chabaudi* AS o con *P. berghei* ANKA, se tomaron muestras de sangre a diferentes tiempos durante la infección como se detalla en materiales y métodos. Se permitió que la sangre coagulara, se separó el suero y se congeló en alícuotas a -70°C hasta su análisis.

Los niveles de anticuerpos se evaluaron por la técnica de ELISA, para lo cual se generaron los controles positivos (suero hiperinmune). Se infectó con *P. berghei* ANKA y después de 5 días los ratones se trataron con pirimetamina para eliminar el parásito dado que es letal y de otra forma los ratones fallecerían. Un mes posterior se reinfectaron y se procedió a tratarlos con la droga de igual forma después del día 5 de la infección. Se realizaron dos infecciones posteriores con un mes de diferencia en cada infección, en el día 12 de la cuarta reinfección se sacrificaron los ratones, se tomaron muestras de sangre, se permitió que coagulara y se separó el suero al que se le denominó suero hiperinmune anti-*P. berghei* ANKA.

De la misma forma se procedió a generar el suero hiperinmune anti- *P. chabaudi* AS, sólo que para esta cepa de parásito no se requirió tratar a los ratones con pirimetamina puesto que *P.chabaudi* AS no es un parásito letal.

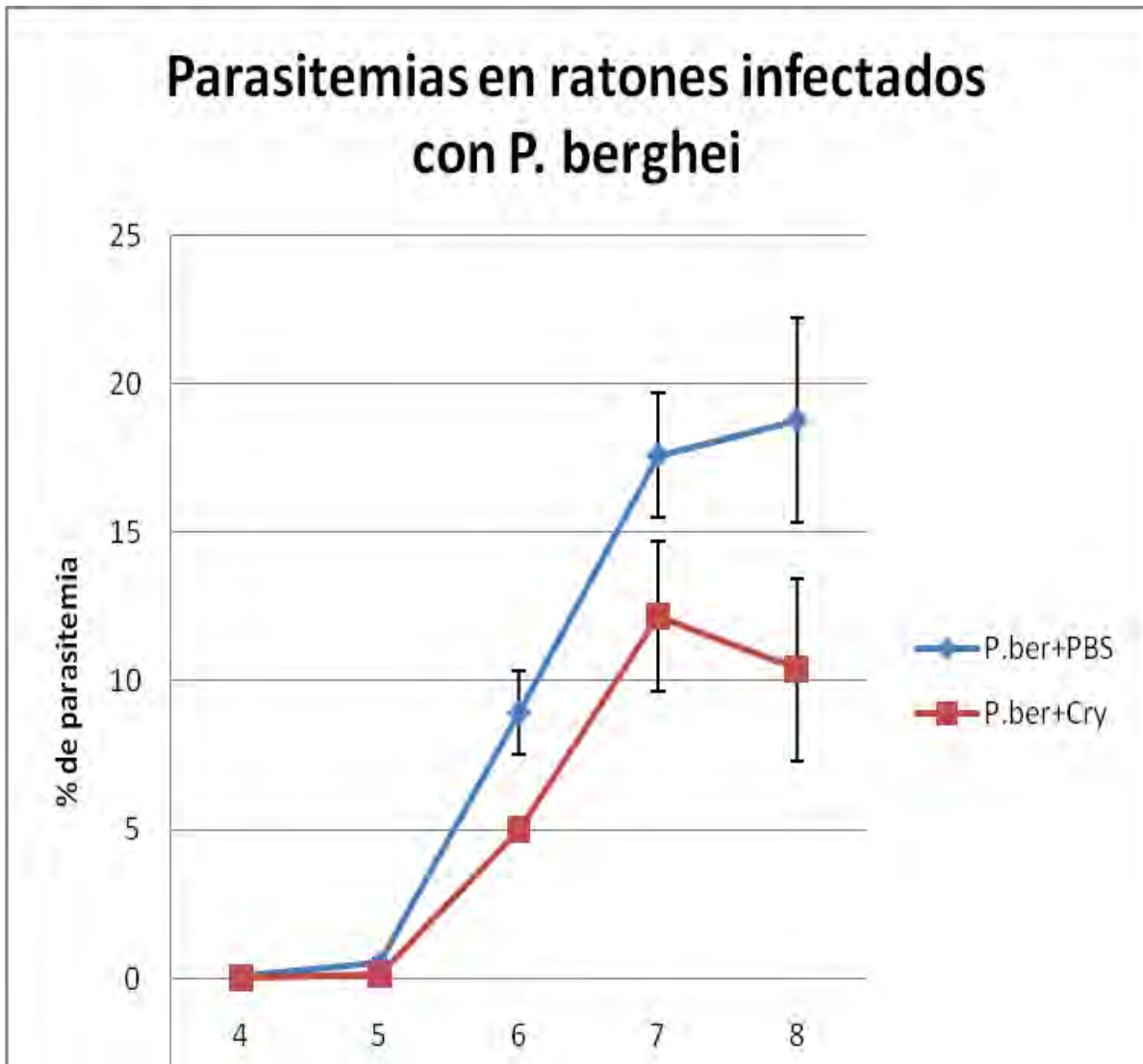
Una vez que se contó con los controles positivos, se procedió a desarrollar la técnica de ELISA para evaluar los niveles de los siguientes isotipos de anticuerpos: IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG totales e IgM para cada una de las diferentes cepas de *Plasmodiums* en los diferentes días de la infección. Los resultados de absorbancia de cada una de las placas de ELISA se procesaron en una hoja de cálculo y se realizó un tratamiento estadístico como se indica en materiales y métodos.

Cada muestra se analizó por duplicado. Los resultados de absorbancia para cada isotipo de anticuerpo y para cada subgrupo de ratones se colocaron en hojas de cálculo y se determinó la media y la desviación estándar.

7.1 Cinética de la infección con *P. chabaudi* AS y con *P. berghei* ANKA

Para estudiar el efecto de la proteína Cry1Ac sobre la parasitemia de dos cepas de *Plasmodium* una letal (*P. berghei* ANKA) y la otra no letal (*P. chabaudi* AS) se infectaron grupos de ratones CBA/Ca con cada uno de los parásitos y se analizó la parasitemia diariamente.

Los ratones infectados con *P. berghei* ANKA tratados con PBS desarrollaron parasitemias significativamente más altas que los ratones tratados con la proteína Cry 1Ac. El curso de la infección en los ratones tratados con la proteína Cry 1Ac infectados con *P. berghei* muestra una disminución significativa en su % de eritrocitos parasitados



en el día 8 de la infección.

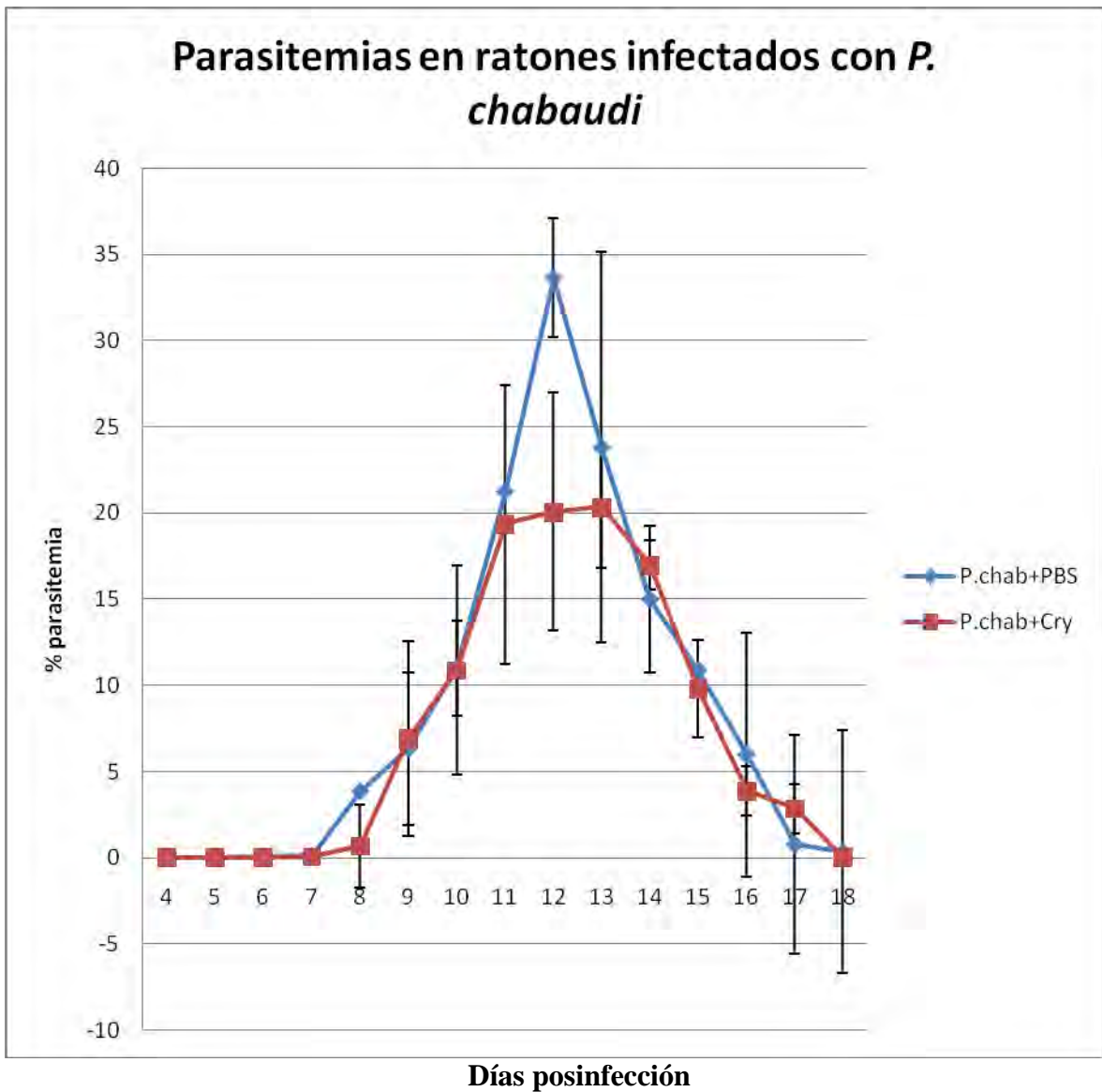
Días pos infección

Esquema 1. Curso de la infección en ratones infectados con *Plasmodium berghei* ANKA.

Un grupo de ratones CBA/Ca se trató con la proteína Cry 1Ac durante 4 semanas y un día después de la última dosis se infectó con 5×10^4 eritrocitos parasitados con *P. berghei* ANKA (P.ber+Cry). El grupo control recibió PBS en lugar de la proteína Cry 1Ac y se infectó con el mismo número de eritrocitos parasitados (P.ber+PBS). Diariamente se realizaron frotis sanguíneos que se tiñeron con Giemsa. Los resultados muestran la parasitemia promedio (media geométrica) de 6 ratones.

Los ratones infectados con *P. chabaudi* AS y tratados con la proteína Cry 1Ac desarrollaron parasitemias significativamente menores que los ratones infectados que solo se trataron con PBS, ya que el día 12 después de la infección se detectaron parasitemias de 20.07% y 33.63% respectivamente.

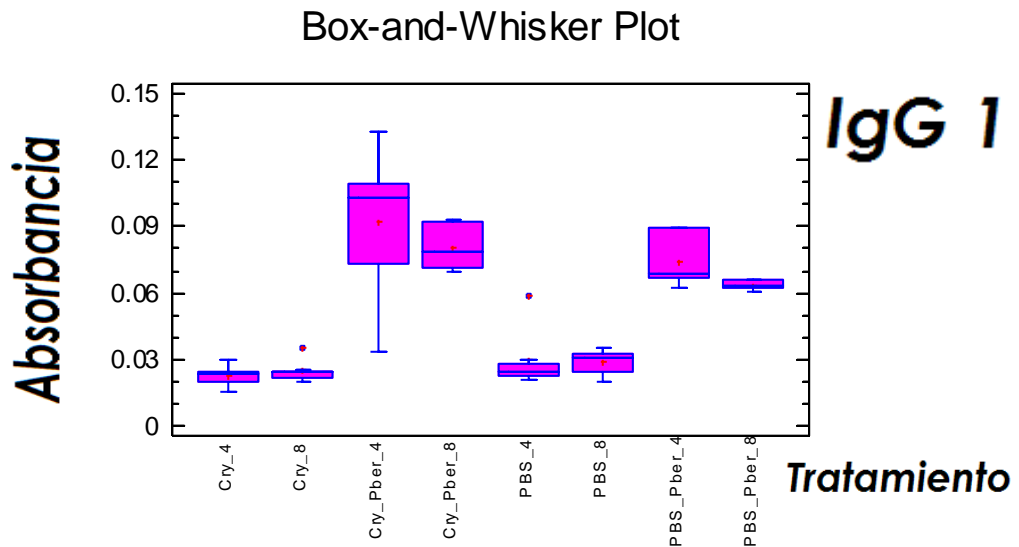
Pese a que los ratones infectados se recuperan de manera natural de la infección debido a que es un parásito no letal, los ratones que se trataron con la proteína Cry 1Ac se recuperaron más rápido que los ratones que recibieron únicamente PBS dado que en el día 18 después de la infección los ratones tratados con Cry1Ac eliminaron completamente la parasitemia.



Esquema 2. Curso de la infección en ratones infectados con *Plasmodium chabaudi* AS.

Un grupo de ratones CBA/Ca se trató con la proteína Cry 1Ac durante 4 semanas y un día después de la última dosis se infectó con 5×10^4 eritrocitos parasitados con *P. chabaudi* AS (P.chab+Cry). El grupo control recibió PBS en lugar de la proteína Cry 1Ac y se infectó con el mismo número de eritrocitos parasitados (P.chab+PBS). Diariamente, se realizaron frotis sanguíneos que se tiñeron con Giemsa. Los resultados muestran la parasitemia promedio (media geométrica) de 6 ratones.

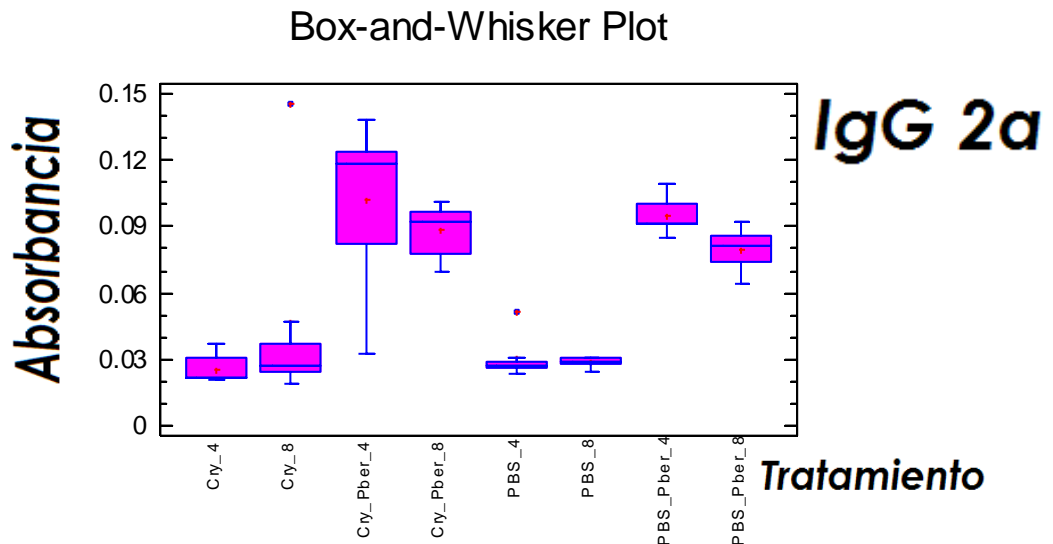
7.2. Determinación de los diferentes isotipos de anticuerpos en ratones infecta



Gráfica 1. Efecto del tratamiento con la proteína Cry1Ac en los niveles de IgG1 en ratones infectados con *Plasmodium berghei* ANKA.

En la gráfica se muestran los niveles de anticuerpos IgG1 específicos para *P. berghei* en los diferentes grupos de ratones infectados con el mismo parásito.

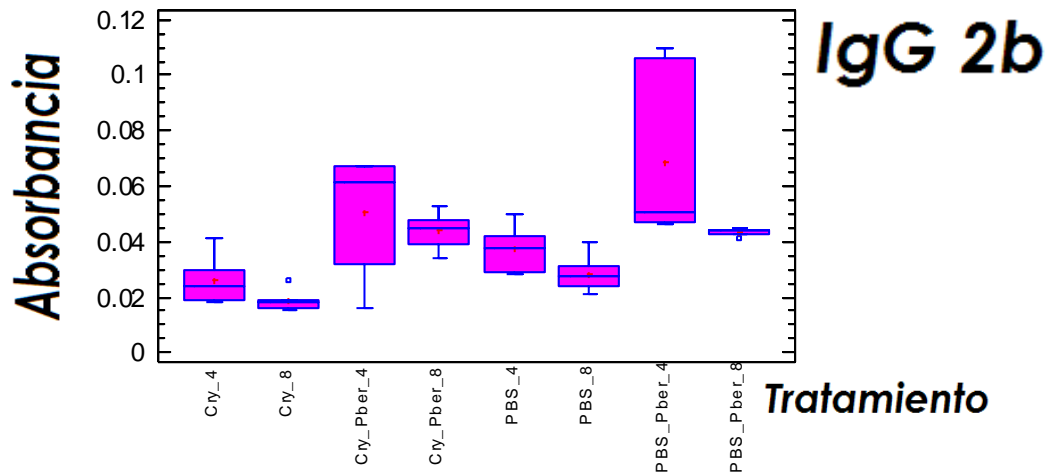
La infección con *P. berghei* incrementó los niveles de IgG1. La administración de la proteína Cry1Ac indujo un mayor incremento de esta inmunoglobulina en comparación con el grupo que sólo recibió PBS sin embargo ese incremento fue estadísticamente signific



Gráfica 2. Efecto del tratamiento con la proteína Cry1Ac en los niveles de IgG2a en ratones infectados con *Plasmodium berghei* ANKA.

La infección con *P. berghei* ANKA indujo un incremento en la síntesis de IgG2a, este incremento fue mayor en los grupos de ratones que además recibieron la proteína Cry1Ac en particular en el día 4 post infección. Sin embargo los valores son tan dispersos que no presentan una diferencia estadísticamente significativa en comparación con los ratones infectados que no se trataron con la proteína Cry 1Ac.

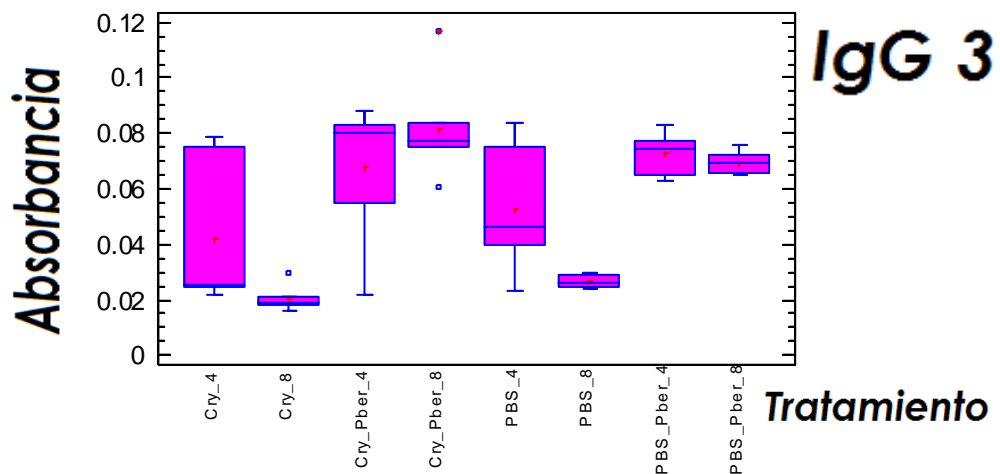
Box-and-Whisker Plot



Gráfica 3. Efecto del tratamiento con la proteína Cry1Ac en los niveles de IgG2b en ratones infectados con *Plasmodium berghei* ANKA.

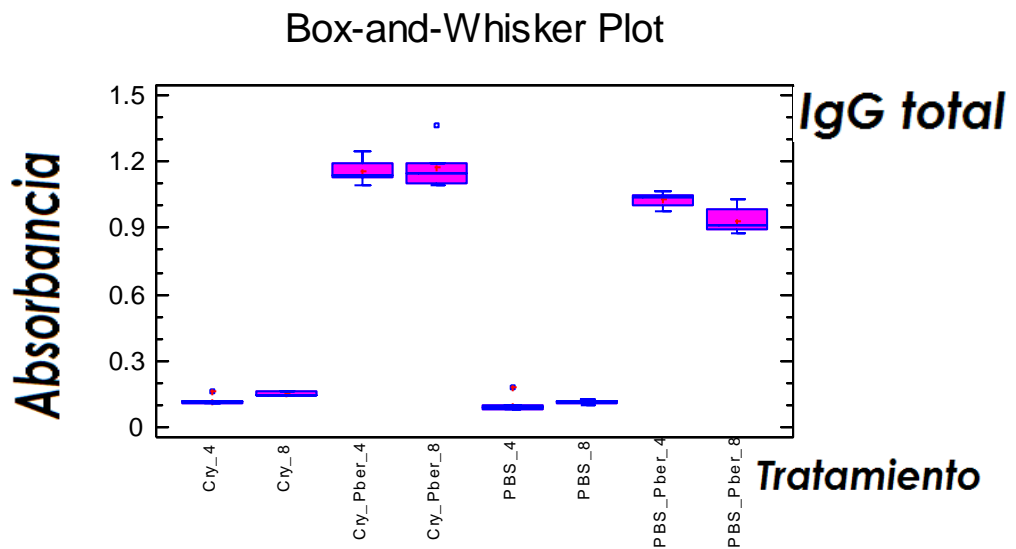
La infección con el parásito indujo un incremento en los niveles de IgG2b, a diferencia de los otros isotipos, en el grupo control (ratones tratados con PBS en el día 4) se detectaron los niveles más elevados comparados con el grupo tratado con la proteína Cry1Ac. Sin embargo esta diferencia no resultó estadísticamente significativa como lo muestra el traslape con la barra de la desviación estándar que corresponde a los ratones infectados tratados con la proteína Cry 1Ac, debido a que existió una mayor dispersión.

Box-and-Whisker Plot



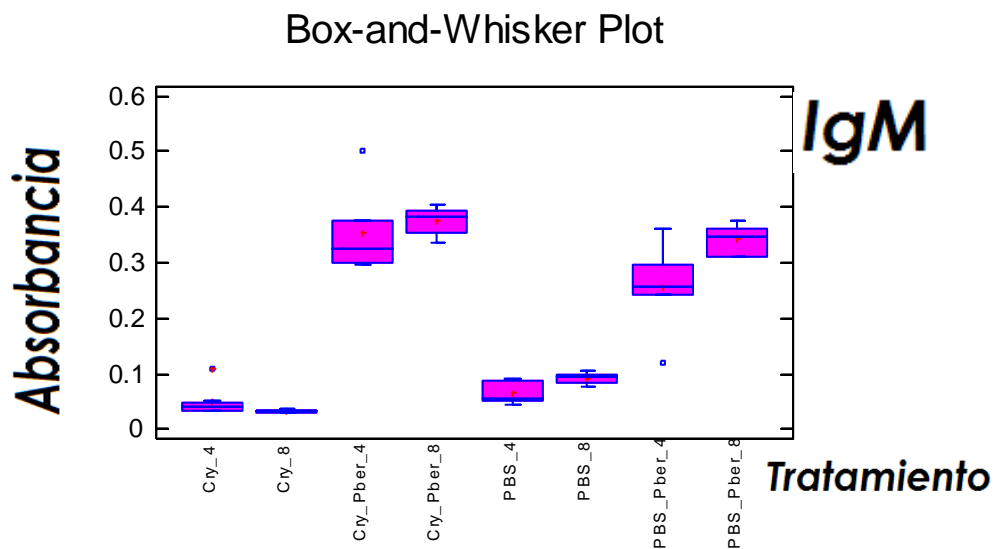
Gráfica 4. Efecto del tratamiento con la proteína Cry1Ac en los niveles de IgG3 en ratones infectados con *Plasmodium berghei* ANKA.

Los niveles del isotipo de IgG3 en ratones infectados con *P. berghei* no se modificaron por la inoculación de la proteína Cry 1Ac, interesantemente los niveles de este isotipo son mayores en el día 4 después de la infección, sin embargo, esta diferencia no es estadísticamente significativa para ninguno de los diferentes tratamientos.



Gráfica 5. Efecto del tratamiento con la proteína Cry1Ac en los niveles de IgG en ratones infectados con *Plasmodium berghei* ANKA.

Los niveles de IgG reflejan el total de los anticuerpos IgG que se produjeron en cada uno de los grupos de ratones. Los valores más elevados se detectaron en los ratones infectados y tratados con la proteína Cry, no hubo diferencia significativa entre los días los niveles

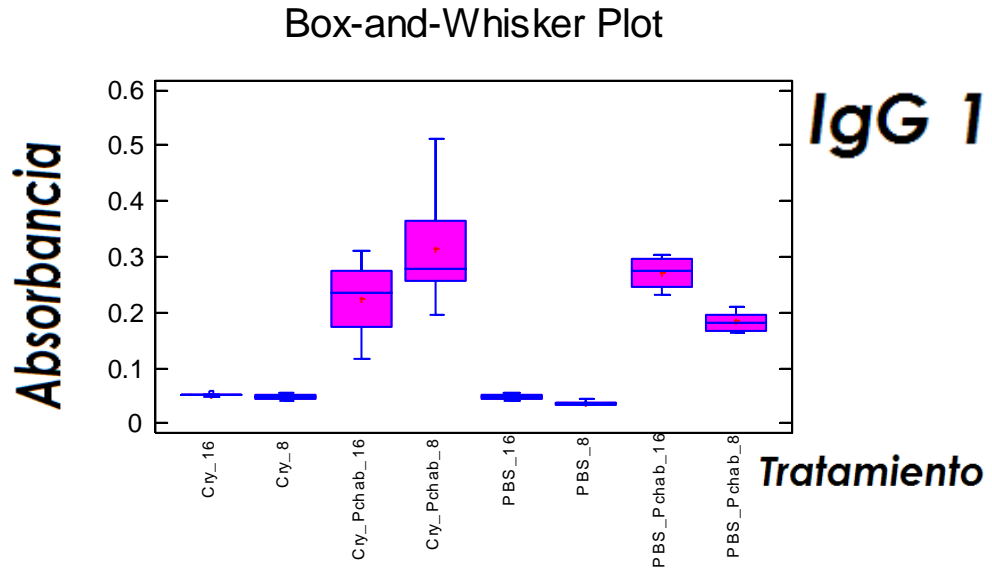


Gráfica 6. Efecto del tratamiento con la proteína Cry1Ac en los niveles de IgM en ratones infectados con *Plasmodium berghei* ANKA.

Los ratones infectados y tratados con la proteína Cry1Ac desarrollaron niveles de IgM más elevados, que se detectaron en los ratones infectados y tratados con PBS en ambos grupos los niveles más elevados fueron el día 8 postinfección, sin embargo debido a la dispersión de los datos, no existió diferencia significativa cuando los niveles se compararon con los de los ratones infectados tratados con PBS.

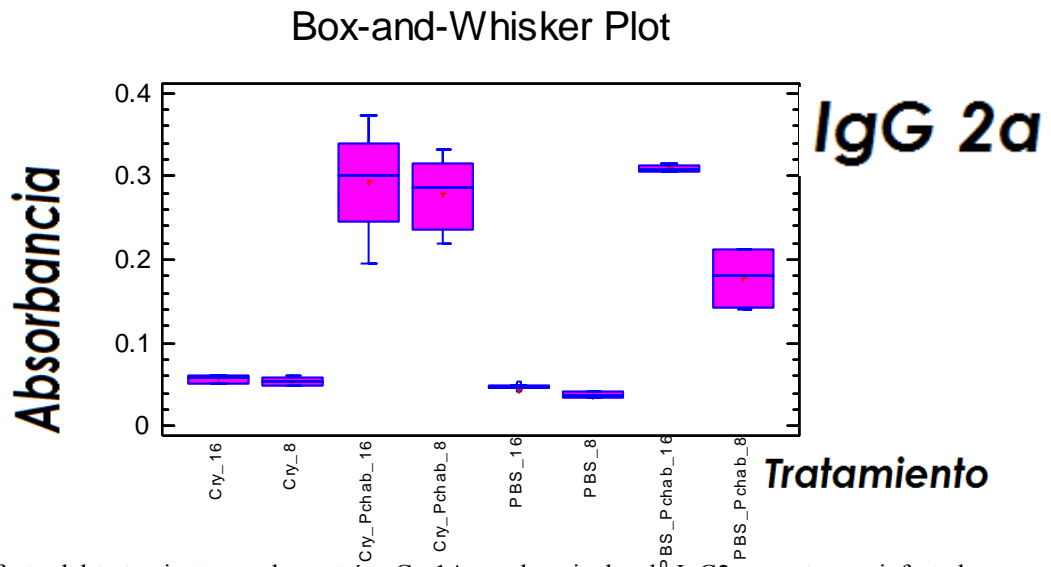
7.3 Determinación de los diferentes isotipos de anticuerpos en ratones infectados con *P. chabaudi*.

Para evaluar si el tratamiento con la proteína Cry1Ac modifica de forma diferente los niveles de anticuerpos específicos contra otra cepa de *Plasmodium*, se repitió el experimento pero esta vez se utilizó una cepa no letal (*Plasmodium chabaudi* AS). Para poder medir los niveles de anticuerpos se tomaron muestras de sangre a los días 8 y 16.



Gráfica 7. Efecto del tratamiento con la proteína Cry1Ac en los niveles de IgG1 en ratones infectados con *Plasmodium chabaudi* AS.

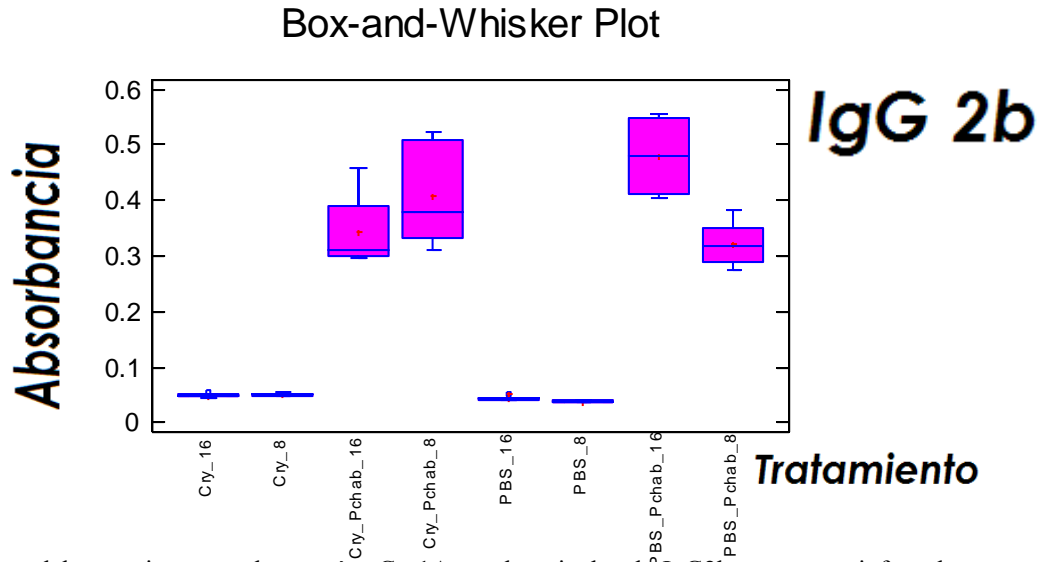
La infección con *P. chabaudi* AS incrementó los niveles de IgG1, este aumento fue mayor en el día 8 en los ratones tratados con la proteína Cry1Ac, mientras que en los ratones tratados con PBS el aumento fue menor.



Gráfica 8. Efecto del tratamiento con la proteína Cry1Ac en los niveles de IgG2a en ratones infectados con *Plasmodium chabaudi* AS.

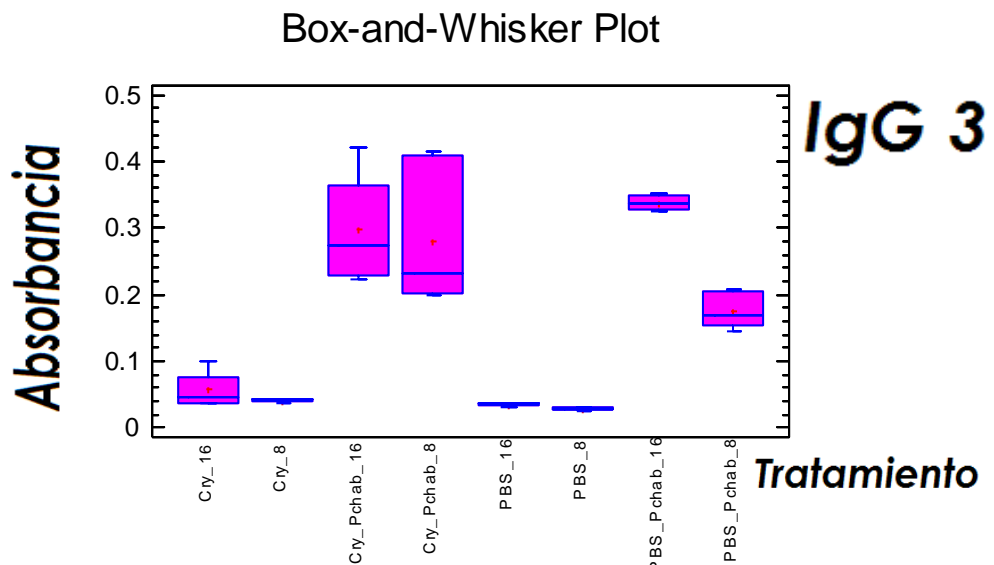
Los ratones infectados que se trataron con la proteína Cry 1Ac desarrollaron los niveles más elevados de IgG2a en el día 16 postinfección. Sin embargo, los valores se encuentran tan dispersos que no se alcanza una diferencia significativa comparados con los ratones infectados que recibieron PBS. En el día 8 después de la infección el tratamiento con la proteína Cry1Ac sí indujo un incremento significativo en los niveles de IgG.

PBS.



Gráfica 9. Efecto del tratamiento con la proteína Cry1Ac en los niveles de IgG2b en ratones infectados con *Plasmodium chabaudi* AS.

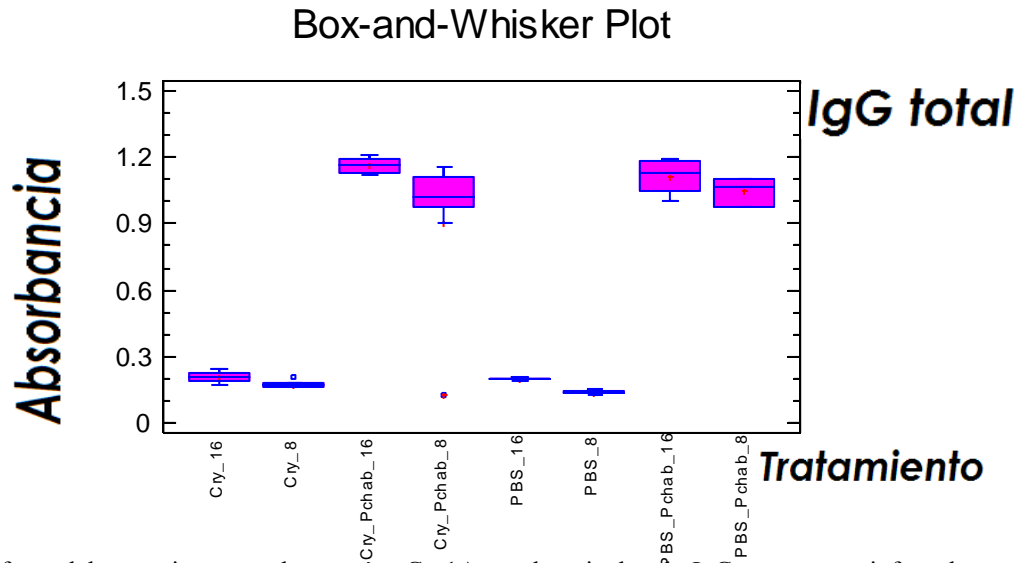
La infección indujo un incremento en los niveles de IgG2b. Los niveles más elevados se detectaron en el día 8 postinfección y se presentaron en los ratones tratados con la proteína Cry1Ac, sin embargo, en el día 16 el grupo tratado con PBS alcanzó niveles mayores que el que recibió la proteína Cry1Ac, esta diferencia no es significativa como lo muestran los ratones



Gráfica 10. Efecto del tratamiento con la proteína Cry1Ac en los niveles de IgG3 en ratones infectados con *Plasmodium chabaudi* AS.

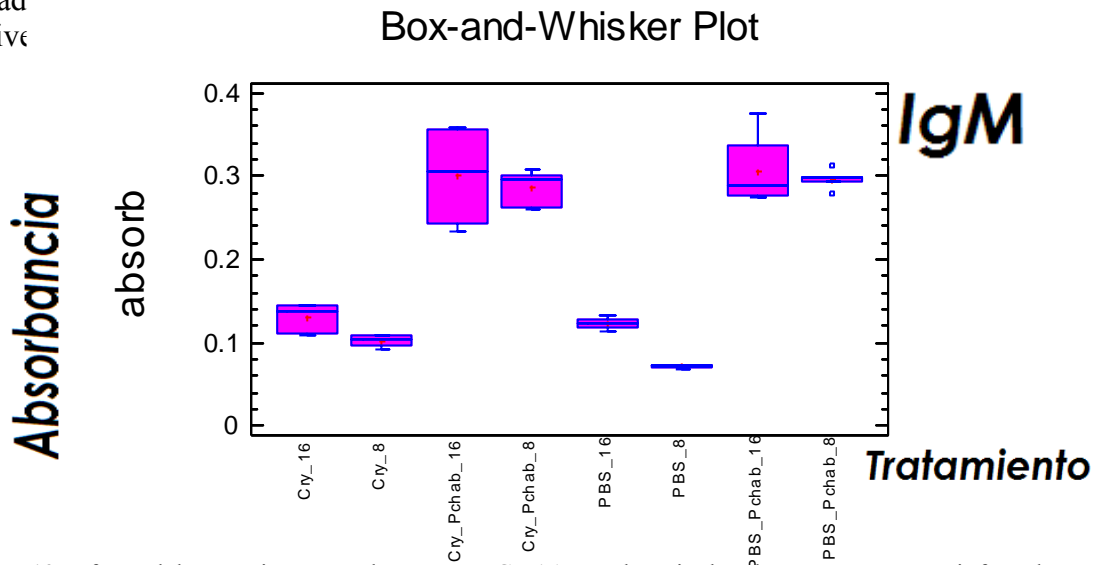
Los niveles del isotipo de IgG3 en los ratones infectados con *P. chabaudi* son más elevados en el grupo de ratones tratados con la proteína Cry 1Ac tanto en el día 8 como en el día 16. En los ratones que sólo se trataron con PBS se presentan niveles más elevados de este isotipo en el día 16 después de la infección. Sin embargo, debido a la

dispersi
signific



Gráfica 11. Efecto del tratamiento con la proteína Cry1Ac en los niveles de IgGt en ratones infectados con *Plasmodium chabaudi* AS.

Los niveles de IgGt representan la sumatoria de los niveles de todos los isotipos G de las inmunoglobulinas dirigidos contra *P. chabaudi* AS. La infección con *P. chabaudi* AS incrementa los niveles de IgGt, los niveles no se modificaron con el tratamiento con la proteína Cry1Ac en ninguno de los dos días analizados, dado que se translapen las barras.



Gráfica 12. Efecto del tratamiento con la proteína Cry1Ac en los niveles de IgM en ratones infectados con *Plasmodium chabaudi* AS.

La infección con *P. chabaudi* AS incrementa los niveles de IgM, los niveles no se modificaron con el tratamiento con la proteína Cry1Ac en ninguno de los dos días analizados, dado que se translapen las barras.

8 Discusión de resultados.

La Malaria afecta aproximadamente entre el cinco y el diez por ciento de la población mundial. Hoy en día la terapia con fármacos es la única propuesta que ha dado resultado para el control de este padecimiento, sin embargo, los parásitos responsables de esta enfermedad se están haciendo rápidamente resistentes a diversas drogas entre ellas la cloroquina. Debido a la complejidad del parásito, tanto en su ciclo de vida, como en su estructura y componentes antigénicos, el desarrollo de vacunas se ha convertido en una tarea difícil.

En estudios previos (Jarillo-Luna y Moreno-Fierros, 2008), se ha demostrado que la administración de la proteína Cry1Ac confiere resistencia contra *Neigleria* y otros parásitos. Dado que para tratar la malaria no se ha desarrollado todavía una vacuna efectiva y en vista del potencial de la proteína Cry1Ac para conferir protección contra otros parásitos, en el presente trabajo analizamos si la proteína Cry1Ac potencia la producción de los diferentes isotipos de anticuerpos específicos contra *Plasmodium*. Para esto grupos de ratones se trataron semanalmente con la proteína Cry1Ac o con PBS y a la tercera semana se infectaron con dos diferentes cepas de *Plasmodium* (*P. berghei* ANKA que es letal y *P. chabaudi* AS que es una cepa no letal).

De inicio se observó que el tratamiento de los ratones con la proteína Cry 1Ac, confirió protección después de la infección con el *Plasmodium*, lo que se detectó como una disminución del pico de la parasitemia que condujo a una recuperación en menor tiempo en los ratones con *P. chabaudi* AS (**Esquema 2**), y una disminución en los niveles de la parasitemia en los ratones infectados con *P. beghei* ANKA (**Esquema 1**). Se ha descrito que la infección con *Plasmodium* induce al mismo tiempo ambos tipos de respuestas inmunes (Ventura-Ayala, 2006), por lo que es probable que esta protección se deba a un mecanismo celular y en menor medida a uno humoral, por lo tanto, es importante cuantificar los niveles de los isotipos de los anticuerpos específicos para cada cepa.

La infección con *P. berghei* ANKA induce un incremento en los niveles de IgG1, este aumento fue más evidente en los ratones tratados con la proteína Cry 1Ac, sin embargo, esta diferencia sólo fue significativa en el día 8 después de la infección (**Gráfica 1**). Es probable que este incremento se deba a que la proteína Cry1Ac potencia la respuesta inmune, y además, que la previa inoculación de la misma haya generado una respuesta de memoria mediada por los anticuerpos, debido a que los mecanismos de respuesta inmune ya estaban activados.

De igual manera ocurrió con los isotipos IgG2a, IgG2b e IgG3 (**Gráficas 2, 3 y 4**), sin embargo, en estos casos la diferencia no fue significativa debido a la dispersión en los datos obtenidos. Es probable que el tratamiento con la proteína Cry1Ac por inducir un tipo de inmunidad no específica no modifica los niveles de estos isotipos específicos contra *P. berghei* ANKA; otra posibilidad es que la dosis utilizada no sea la óptima para inducir una respuesta más intensa que pudiera modificar significativamente los niveles de esos isotipos de anticuerpos.

Los valores de IgG totales reflejan la sumatoria de los niveles de todos los isotipos de IgG, los datos tienen menor dispersión en comparación a los isotipos analizados por separado y evidencian que el tratamiento con la proteína Cry1Ac induce un incremento significativo de los niveles de IgG totales en los ratones infectados con *P. berghei* ANKA (**Gráfica 5**). Lo que muestra que la infección con este parásito induce una estimulación intensa de la respuesta inmune, misma que se potencia cuando los ratones han tenido contacto previo con la proteína Cry1Ac.

Los anticuerpos IgM están relacionados con una respuesta inmune primaria (Rojas-Espinoza, 2001). En este trabajo, los grupos de ratones infectados con *P. berghei*

ANKA incrementaron los niveles de este tipo de inmunoglobulina en respuesta a la infección y nuevamente la administración de la proteína Cry1Ac indujo un incremento en los niveles de esta inmunoglobulina en relación a los ratones tratados con PBS, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa como lo muestran la dispersión de los datos (**Gráfica 6**). Es probable que la proteína Cry1Ac estimule la respuesta innata que es inespecífica y no tenga nada que ver con este tipo de inmunoglobulina. Otra posibilidad es que se requiera una mayor dosis de la proteína para detectar algún efecto, dado que si existe cierta tendencia a incrementar los niveles.

Se ha descrito que las diferentes especies de *Plasmodium* inducen distintos tipos de respuesta inmune en los modelos murinos de malaria (Martínez Rodríguez, 2004). Para evaluar si la proteína Cry1Ac pudiera tener algún efecto de forma diferente en la estimulación de la inmunidad inespecífica para otra especie de *Plasmodium*, se realizó el mismo análisis pero ahora con una cepa no letal como lo es *P. chabaudi* AS.

El tratamiento con la proteína Cry1Ac redujo el pico de la parasitemia además, el parásito se eliminó en menor tiempo (**Esquema 2**), lo que sugiere que la proteína Cry1Ac protege de forma inespecífica, probablemente activando mecanismos innatos de inmunidad.

La infección con este parásito indujo un incremento en los niveles de IgG1, el tratamiento con la proteína Cry1Ac aumentó aun más este isotipo, en particular en el día 8, sin embargo el incremento no resultó estadísticamente significativo al comparar con los niveles de los ratones infectados que recibieron PBS (**Gráfica 7**). Lo anterior sugiere que el tratamiento con la proteína Cry1Ac induce una mejor eliminación del parásito sin embargo no se encontró asociación con los niveles de IgG1.

En relación al isotipo IgG2a la proteína Cry1Ac indujo un incremento significativo en día 8 después de la infección en comparación con el grupo tratado con PBS. Una posible explicación a este hallazgo es que sólo se ve el efecto del tratamiento con la proteína Cry1Ac al inicio de la infección dado que se activan mecanismos inespecíficos de inmunidad. Otra explicación es que se genera una respuesta tipo Th1, que previamente se ha descrito para este parásito, (Legorreta-Herrera y Sanchez-Cruz, 1999) al inicio de la infección y después en el día 16 es probable que ya se presentó el switch a una respuesta tipo Th2 por lo tanto, este isotipo de inmunoglobulina tiende a disminuir sus niveles. Otra posibilidad es que la protección que genera la administración de la proteína Cry1Ac no se asocie con los niveles de IgG2a (**Gráfica 8**).

En relación a los anticuerpos IgG2b e IgG3 en ambos días (8 y 16 post infección), la infección incrementó los niveles de estos isotipos, ese aumento fue mayor en el grupo tratado con la proteína Cry1Ac, sin embargo no fue significativo al compararlo con el grupo control tratado con PBS (**Gráficas 9 y 10**). Es probable que se requiera de una mayor dosis de la proteína Cry1Ac para detectar un efecto significativo o bien que no exista relación entre la protección que se observó y los niveles de estos isotipos al menos en los días que se evaluaron. Los niveles de IgG total reflejan la sumatoria de los diferentes isotipos IgG. La dispersión de los datos es menor, sin embargo no se detectó diferencia significativa al comparar los grupos de ratones tratados con la proteína Cry1Ac en relación a los que recibieron PBS (**Gráfica 11**). En ambos grupos se detectaron niveles mas elevados en el día 16. Es probable que la protección que se observa como una disminución en el pico de la parasitemia y una eliminación mas rápida del parásito no esté asociada con los niveles de anticuerpos específicos tipo IgG y se deba a mecanismos de inmunidad inespecíficos como podrían ser activación de macrófagos o inclusive producción de citocinas para lo que se propone determinar los

niveles de citocinas en estos ratones. También existe la posibilidad de que se requiera una mayor dosis de proteína para poder detectar la correlación.

La IgM es un tipo de inmunoglobulina comúnmente asociado con una respuesta inmune tipo Th1 por lo que esperaríamos que los niveles de IgM fueran mayores al inicio de la infección, es decir en el día 8. Sin embargo, en nuestros experimentos observamos que los niveles fueron más altos en el día 16 (**Gráfica 12**). Una posible explicación a este hallazgo es que el parásito desarrolle variación antigénica y en el día 16 los niveles elevados de IgM reflejen la respuesta a antígenos nuevos que no habían estimulado la respuesta previamente y por lo tanto se incrementen los niveles de IgM en ese día.

Nuestros resultados sugieren que la proteína Cry1Ac induce protección contra *Plasmodium* que se manifiesta como una disminución del pico máximo de la parasitemia, así como de una mejor eliminación del parásito en el caso de *P. chabaudi* AS, mientras que para *P. berghei* ANKA esa protección se observó como un mayor tiempo de sobrevivencia (datos no mostrados), así como en una menor carga parasitaria en sangre. El tipo de respuesta inmune que se estimula con la proteína Cry1Ac no parece ser de tipo específica, es decir, mediada por anticuerpos, porque si bien se observaron tendencias a un aumento, este incremento no fue estadísticamente significativo en la mayoría de los isotipos al comparar con los niveles del grupo control tratado con PBS. Por lo que proponemos que el tipo de respuesta que se potencia con la administración de la proteína Cry1Ac es de tipo inespecífico, probablemente de tipo celular. Este estudio se complementaría con la evaluación de los niveles de citocinas.

9 Conclusiones

El tratamiento con la proteína Cry1Ac indujo protección contra ambas especies de *Plasmodium*, lo que se manifestó como una disminución en el pico máximo de la parasitemia y una eliminación más eficiente de *P. chabaudi* AS, mientras que para *P. berghei* ANKA que es letal, se incrementó el tiempo de sobrevida y se desarrollaron menores niveles de parasitemia.

La proteína Cry1Ac indujo un incremento en los niveles de los isotipos de las inmunoglobulinas específicas para *Plasmodium*. Sin embargo este incremento no resultó significativo en la mayoría de los isotipos analizados.

Es probable que la proteína Cry1Ac potencia la respuesta inmune innata, que de forma inespecífica disminuye la carga parasitaria, lo que se refleja como una disminución en la parasitemia.

Se podría intentar con una dosis mayor de proteína para ver si la protección se incrementa o se hace más evidente en los niveles de los anticuerpos específicos contra *Plasmodium*.

10 Referencias

1. Biology of malaria. Medicines for malaria venture. (en línea) (Geneva, Suiza) (Consultado el 9 de Abril 2008) http://www.mmv.org/pages/content_frame.asp?ThePage=page1_00040001001_1.htm&Nav=00040001000
2. Bracho G, Petrovski N, Pérez O y Zayas C. Cocleato como adyuvante para antígenos de malaria. Instituto Finlay, 2006.
3. Brauch DI, Gamain, Barnwell, Sullivan, Stowers, Galland, Miller and Collins. Immunization of *Aotus* monkeys with a functional domain of the Plasmodium falciparum variant antigen induces protection against a lethal parasite line. PNAS 2002; 99 (6)
4. Bull PC and Marsh K. The role of antibodies to Plasmodium falciparum infected-erythrocytes surface antigens in naturally acquired immunity to malaria. Trends Microbiol. 2002; 10: 55-58.
5. Cardona NI, Lora F y Gómez JE. Estandarización del inmunoensayo ELISA para la detección de IgG anti-*Toxoplasma gondii* en ratón. Parasitología latinoamericana 2005; 60.
6. Carrillo-Rosario T, Díaz A. Actividad antimalárica de extractos crudos de plantas en ratones infectados con *Plasmodium berghei*. Revista de la facultad de farmacia 2005; 47 (1).
7. Chen Q., Schlichtherle and Wahlgren. Molecular aspects of severe Malaria. Clinical Microbiology Reviews 2000; 13 (3)
8. Chitnis C.E. and Blackman M. J. Host cell invasion by malaria parasites. Parasitology Today 2000; 16 (10).
9. Cooke B. M., Wahlgren M. and Coppel R. L. *Falciparum* Malaria: Sticking up, Standing out and Out-standing. Parasitology Today 2000.
10. Cuello M, Pérez O, Cabrera O y Pérez R. Obtención de tres modelos de malaria murina. Instituto Finlay 2006.
11. Esquivel-Perez R and Moreno-Fierros L. Mucosal and systemic adjuvant effects of Cholera toxin and Cry1 Ac protoxin on the specific antibody response to HIV-1 C4/V3 peptides are different and depend on antigen Co-administered. Viral immunology. 2005; 4: 695-708.
12. General Malaria Information. The malaria research programme of the medical research council, South Africa. (en línea)(Africa)(Consultado el 14 de Enero 2008).
13. Good MF and Doolan DL. Immune effector mechanisms in malaria. Curr. Opin. Immunol. 1999; 11: 412-419.
14. Gratepanche S., Gamain, Smith, Robinson, Saul and Miller. Induction or crossreactive antibodies against the Plasmodium falciparum variant protein. PNAS; 100(22).
15. Guzmán-Vázquez. Las pruebas Elisa. Gaceta Médica de México 2004; 140 (3).
16. Hafalla J, Morrot, Sano, Milon, Lafaille and Zavala. Early self-regulatory mechanisms control the magnitude of CD8+ T cell responses against liver stages of murine malaria. The journal of immunology 2003; 171.
17. Helg A, Muller MS, Joss A, Poltl-Frank, Stuart, Robinson, Pluschke. Comparison of analytical methods for the evaluation of antibody responses against epitopes of polymorphic protein antigens. Journal immunology methods 2003; 276 (1-2).

18. Iracheta M, Galán-Wong L, Ferré-Manzanero y Pereyra-Alfárez. Selección de toxinas Cry contra *Trichoplusia ni*. Ciencia UANL 2001; 4 (1).
19. Jarillo_luna y Moreno –Fierros. Intranasal immunization whit Naegleria fowleri lysates and Cry1AC induces mataplasia in the olfactory epithelium and increases IgA secretion. Parasite Immunology, 2008; 30, 31-33.
20. La inmunidad provoca el aumento de la virulencia en un modelo experimental de malaria. Revista panamericana de salud publica, 2004; 16 (1).
21. Legorreta-Herrera M y Sanchez-Cruz P. la respuesta inmune celular contra el Plasmodium: agente etiológico de la malaria. Vertientes revista especializada en ciencias de la salud. 1999; 2: 3-8.
22. Lopes D, Rungsihirunrat K, Nogueira F, Seugorn A, Gil JP, do Rosario VE and Cravo P. Molecular characterization of drug-resistan Plamodium falciparum from Thailand. Malar J. 2002; 1 (1): 12-18.
23. Lopez-Revilla R y Moreno-Fierros L. La protoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* es un potente adyuvante sistémico y de mucosas. Scand J Immunology 1999; 49.
24. Luzardo MC, Gzgezowska YM, Calderon, Lanio ME y Alonso ME. Anticuerpos IgG1, IgG2a e IgG2b y respuesta de hipersensibilidad retardada (HR) en ratones NMRI inmunizados con EGFhr conjugado o no a P64k y encapsulado en liposomas. Revista biológica 2003; 17 (2).
25. Mackinnon MJ, Walker PR, Rowe JA. *Plasmodium chabaudi*: resetting in a rodent malaria model. Exp Parasitology 2002; 101 (2-3).
26. Margos G, Navarette S, Butcher G, Davies A, Willers C, Sinden Robert and Lachmann PJ. Interaction between host complement and mosquito-midgut-stage *Plasmodium berguei*. Infection and Immunity; 69 (8).
27. Martínez Rodríguez CF. El bazo de los ratones CD1 et/et durante el curso de una infección por *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS. Tesis de maestría en ciencias con especialidad en inmunología. Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas 2004.
28. Miller Louis H., Baruch, Marsh & Doumbo. The patogenic basis of malaria. Nature 2002; 415.
29. Nuevo tipo de vacuna contra la malaria es eficaz en ratones. Howard Hughes Medical Institute 2002.
30. Parasitology - Malaria. The plasmodium berghei research model of malaria. Leiden University Medical Center. (en linea)(Consultado en 25 de Julio 2008)
<http://www.lumc.nl/rep/cod/redirect/1040/research/malaria/model01.html>
31. Phillips RS, Brannan LR, Balmer P, Neuville P. antigenic variation during malaria infection-the contribution from the murine parasite *Plasmodium chabaudi*. Parasite immunology 1997; 19 (9).
32. Pouniotis DS, Proudfoot, Minigo, Hanley and Plebanski. Malaria parasite interactions with human host. Journal Postgrad Med 2004; 50.
33. Radha Krishna Murthy K. Animal experimentation and research in India. Journal of Postgraduate Medicine 2000; 46 (4).
34. Regueiro JR, González S, López C, Matínez E. Inmunología biología y patología del sistema inmune. Editorial Panamericana, 2002: 29, 45, 53.
35. Rodrigo MJ, Codina R, de Gracia J, Morell F y Pascual C. Valores normales de las subclases de la inmunoglobulina G en una población de

- adultos. Su importancia en el estudio del déficit de las mismas. Medicina clínica 1992; 98 (5).
36. Rodríguez Orozco AR. Efecto coadyuvante de la protoxina Cry1Ac en la inmunidad celular al administrarla con un buen agente patógeno de mucosas. Revista alergia México 2006; 53 (4).
 37. Romero Cabello R. Microbiología y Parasitología Humana, bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias 2007; 1439-1454.
 38. Roth I, Brostoff J, Male D. Inmunología. Editorial Elsevier, 2003: 71-77.
 39. Soberón M y Bravo A. *Bacillus thuringiensis* y sus toxinas insecticidas. Departamento de microbiología molecular/Instituto de biotecnología/universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos. México, 2007.
 40. Talisuna AO, Bloland P and D'Alessandro. History, dynamics, and public health importance of malarie parasite. Clinical microbiology reviews 2004; 17 (1).
 41. Thomas Jacobs. Murine malaria is exacerbated by CTLA-4 Blockade. The journal of immunology 2002; 169.
 42. Ventura Ayala ML. Correlación entre la producción de oxido nítrico y la expresión de citosinas durante la infección con *Plasmodium*. Tesis de maestría en ciencias biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza 2006.
 43. Whitty C, Rowland M, Sanderson, Mutabinwa. Malaria. Bmj Journals 2002; 325.

11 Anexo.

11.1 Preparación de soluciones.

PBS 10X

Disolver 8 gramos de cloruro de sodio (NaCl), 0.2 gramos de cloruro de potasio (KCl), 1.44 gramos de fosfato de sodio (Na₂HPO₄) y 0.24 gramos de fosfato de potasio (KH₂PO₄), en 800 mL de agua destilada.

Llevar al aforo de 1L.

Esterilizar durante 30 minutos a 121°C en autoclave.

Solución amortiguadora de carbonatos (CO₃)

Mezclar 18mL de carbonato de sodio (NaCO₃) 0.2M y 32 mL de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) 0.2M en 150 mL de agua destilada.

Llevar al aforo de 200mL.

Solución de carbonato 0.2M (NaCO₃)

Disolver 21.2 gramos de carbonato de sodio en 1000mL de agua destilada.

Solución de bicarbonato de sodio 0.2M (NaHCO₃)

Disolver 16.8 gramos de bicarbonato de sodio en 1000mL de agua destilada.

Solución de lavados, PBS+0.05% TWEEN.

Mezclar 250µL de TWEEN en 500mL de solución PBS.

Solución de bloqueo.

Disolver 3 gramos de leche en polvo en 80mL de solución amortiguadora de CO₃.

Llevar al aforo de 100mL.

Solución amortiguadora de citratos (preparación del sustrato).

0.05M citrato de sodio.

0.15M cloruro de sodio.

0.05M ácido cítrico.

Disolver 14.7 gramos de citrato de sodio, 8.76 gramos de cloruro de sodio y 14.7 gramos de ácido cítrico en 800mL de agua destilada.

Ajustar el pH a 5 con solución de NaOH.

Llevar al aforo de 1000mL.

Sustrato (OPD).

Disolver 0.04 mg en 1mL de solución amortiguadora de citratos adicionada con el 0.03% de H₂O₂