



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“EVALUAR EL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN
DE LA TOXINA Y LA PROTOXINA Cry1Ac SOLAS
O EN COMBINACIÓN CON ANTÍGENOS
SOLUBLES SOBRE LOS NIVELES DE TNF- α E IL-10
EN RATONES INFECTADOS CON *P. berghei* ANKA”.

LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA MOLECULAR

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

LUIS MANUEL RODRÍGUEZ SÁNCHEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARTHA LEGORRETA
HERRERA.

ASESORA INTERNA: M. en C. CATALINA MACHUCA
RODRÍGUEZ



MÉXICO, D. F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología Molecular de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la UNAM, bajo la dirección a cargo de la Dra. Martha Legorreta Herrera.

Este proyecto fue financiado por DGAPA, UNAM Proyectos: PAPIIT IN220310-2, IN217412 y PAPIME PE200910.

AGRADECIMIENTOS

Primero y como más importante, me gustaría agradecer sinceramente a mi directora de tesis, **Dra. Martha Legorreta Herrera**, su esfuerzo y dedicación. Sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su persistencia, su paciencia y motivación han sido fundamentales para mi formación como investigador. A su manera, ha sido capaz de ganarse mi lealtad y admiración, así como sentirme en deuda con usted por todo lo recibido durante el periodo de tiempo que ha durado esta Tesis. Siempre le estaré agradecido.

A la **M. en C. Catalina Machuca Rodríguez** por las revisiones, comentarios, críticas y sugerencias hechas para enriquecer este trabajo

Al **M. en C. Armando Cervantes Sandoval** por contribuir de manera importante en esta Tesis, ya que sus conocimientos en Estadísticas fueron de gran ayuda para realizar el análisis estadístico de los datos.

A mis sinodales:

M. C. Raúl Zavala Chavero.

Dra. Martha Legorreta Herrera.

M. en C. Catalina Machuca Rodríguez.

Dra. María de Lourdes Mora García.

Dra. Elia Roldán Reyes.

por la revisión minuciosa de esta Tesis, ya que sus observaciones y aportaciones moldearon el desarrollo de este proyecto.

Y por último, pero no menos importante, estaré eternamente agradecido a mis compañeros de Laboratorio **Anita, Néstor, Fidel y Francisco**. Para mí son los mejores compañeros que se pueden tener. El ambiente en el Laboratorio es simplemente perfecto, y su visión, motivación y optimismo me han ayudado en momentos muy críticos de la Tesis. No todo el mundo puede decir lo mismo de sus compañeros de Laboratorio. Soy un hombre afortunado.

Para ellos,

muchas gracias por todo.

DEDICATORIA

La presente Tesis se la dedico a mi familia que gracias a su apoyo pude concluir mi carrera.

A ti mamá **Joaquina Sánchez** por estar a mi lado apoyándome y aconsejándome siempre para cumplir mis objetivos como persona y estudiante. Me has dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi perseverancia y mi empeño, y todo ello con una gran dosis de amor y sin pedir nunca nada a cambio. Este trabajo está inspirado y dedicado a ti mamá, gracias TE AMO.

A ti papá **Albino Rodríguez** por hacer de mi una mejor persona a través de tus consejos, enseñanzas y amor. Por los ejemplos de perseverancia y constancia que te caracterizan y que me has infundado siempre. Gracias por todo tu esfuerzo y sacrificio, lo que hizo posible el triunfo profesional alcanzado.

A mis abuelos **Rosa y Constancio** porque han compartido conmigo momentos llenos de amor y de sabios consejos, porque siempre han confiado en mi y por ser mi ejemplo de valor constancia; esto también se lo debo a ustedes.

A mis herman@s **Arminia, Verónica, Gilberto y César** por estar siempre presentes, acompañándome, por sus consejos y palabras de aliento. Porque siempre he contado con ustedes para todo, gracias a la confianza que siempre nos hemos tenido; por el apoyo incondicional y amistad. Los quiero mucho.

A mis sobrinas **Citlalli, Itzel y Patricia** por siempre contagiarme sus alegrías a través de sus ocurrencias, porque espero ser un buen ejemplo y motivación para ustedes. Las quiero mucho.

A **Xochiquetzali** por enseñarme a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento, por ser tal y como eres, por compartir los buenos y malos momentos.

A ti **Alejandra** por darme tu amor, apoyo, confianza y compartir nuevos e inolvidables momentos en mi vida.

A **Tere** por enseñarme diferentes maneras de ver y disfrutar la vida.

A **Miriam** por compartir momentos agradables y tristes, nada es por casualidad.

A **Fabiola** por tu apoyo moral y que de una u otra forma has contribuido y participado para alcanzar la meta trazada.

A **Samuel, Arturo e Iván** por que junto a ustedes he pasado buenos momentos, por esas pláticas que se alargaban todo un fin de semana; gracias a su apoyo y conocimientos hicieron de esta experiencia una de las más especiales.

A **Nubia, Jenny, Luis, Hugo, Areli, César, Gina, Roberto, Claudia, Clara, Rodolfo, Cristina, Chabela y Lenin** quienes me acompañaron en esta trayectoria de aprendizaje y conocimientos, por los viejos tiempos.

A **José, David, Richy, Mario, Peter, Crayo, Magnolia, Martha, Guisela y León** por todos esos buenos momentos de conbebenca.

A todos **los ratones** que fueron sacrificados para la realización del presente trabajo, su muerte no fue en vano ya que generaron conocimiento sobre los mecanismos que regulan la respuesta inmune contra el plasmodio.

A todo el resto de **familiares y amig@s** que no recordé al momento de escribir esto y que de una u otra forma me han llenado de sabiduría para terminar la Tesis. Ustedes saben quiénes son.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** y en especial a la **Facultad de Estudios Superiores Zaragoza** que me dieron la oportunidad de formar parte de ella. “Hecho en C.U. forjado en FES Zaragoza”. ¡Gracias!

No tengo palabras para expresar el gran regocijo que me da poder terminar esta carrera en donde maestros y compañeros dejaron parte de su vida, para dar espacio al desarrollo de las ilusiones y que hoy en día se hacen realidad.

Luis Manuel Rodríguez Sánchez

ABREVIATURAS

°C	Grado centígrado.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario.
Ag	Antígeno.
APC	Células presentadoras de antígeno.
APS	Persulfato de amonio.
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero.
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> .
Ct (threshold cycle)	El número de ciclos en el cual la fluorescencia alcanza el threshold fijado.
DEPC	Dietilpirocarbonato.
dNTP's	Desoxirribonucleótidos de trifosfatos.
dTT	Ditiotreitol.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
EP	Eritrocitos parasitados.
Hb	Hemoglobina.
IL-10	Interlucina 10.
INF- γ	Interferón gamma.
KDa	Kilodaltons.
μ g	Microgramo.
μ L	Microlitro.
μ M	Micromolar.
mL	Mililitro.
mM	Milimolar.
M	Molar.
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad.
MMLV-RT	Retrotranscriptasa del virus de leucemia murina molonil.
MPM	Marcador de peso molecular.
ng	Nanogramo.
nm	Nanómetro.
nM	Nanomolar.

NO	Oxido nitrico.
<i>P</i>	<i>Plasmodium</i> .
pb	Pares de bases.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
pCry1Ac	Proteína Cry1Ac.
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos.
PI	Post infección.
rpm	Revoluciones por minuto.
SDS	Dodecilsulfato sódico.
Taq	<i>Thermofilus acuaticus</i> .
TEMED	Tetrametiletilendiamina.
Th	Células cooperadoras.
Th1	Células T cooperadoras de tipo 1, inductoras de una respuesta inflamatoria vía activación de macrófagos.
Th2	Células T cooperadoras de tipo 2, en la maduración de células plasmáticas y producción de anticuerpos.
Th3 o Tr	Células T cooperadoras de tipo 3 o células reguladoras.
Threshold	Promedio de la desviación estándar de la fluorescencia de los primeros ciclos de la PCR. Umbral de detección de la fluorescencia.
Tm	Temperatura de fusión (por sus siglas en inglés)
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa.

TABLA DE FIGURAS

Figura	Pág.
1. Distribución geográfica de la malaria en el mundo.	6
2. Ciclo biológico del parásito.	9
3. Inmunidad en malaria.	13
4. Representación esquemática de la técnica de RT-PCR.	22
5. Electroforesis en gel de acrilamida.	37
6. Porcentaje de sobrevivencia en ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.	39
7. Curso de la parasitemia en ratones CBA/Ca infectados con <i>P. berghei</i> ANKA y tratados con Ag, toxina, protoxina y PBS.	40
8. Curso de la parasitemia en ratones CBA/Ca infectados con <i>P. berghei</i> ANKA y tratados con Ag, Ag junto con toxina, Ag junto con protoxina y PBS.	41
9. Curso de la parasitemia en ratones CBA/Ca infectados con <i>P. berghei</i> ANKA y tratados con Ag, protoxina, Ag junto con protoxina y PBS.	42
10. Curso de la parasitemia en ratones CBA/Ca infectados con <i>P. berghei</i> ANKA y tratados con Ag, toxina, Ag junto con toxina y PBS.	43
11. Porcentaje de peso ganado o perdido en ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.	45
12. Concentración de hemoglobina en ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.	46
13. Índice esplénico de ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.	47
14. Niveles de expresión de TNF- α respecto a β -actina en bazo de ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA en comparación con ratones sanos.	49
15. Niveles de expresión de TNF- α respecto a β -actina en hígado de ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA en comparación con ratones sanos.	50
16. Niveles de expresión de TNF- α respecto a β -actina en sangre de ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA en comparación con ratones sanos.	51
17. Niveles de expresión de IL-10 respecto a β -actina en bazo de ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA en comparación con ratones sanos.	52
18. Niveles de expresión de IL-10 respecto a β -actina en hígado de ratones infectados con <i>P. berghei</i> en comparación con ratones sanos.	53
19. Niveles de expresión de IL-10 respecto a β -actina en sangre de ratones infectados con <i>P. berghei</i> en comparación con ratones sanos.	54

ÍNDICE

	Pág.
ABREVIATURAS	V
TABLA DE FIGURAS	VII
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 MARCO TEÓRICO	3
1.1.1 Antecedentes Históricos	3
1.1.2 Generalidades de la Malaria	4
1.1.3 Distribución geográfica	4
1.1.4 Modelos experimentales empleados para el estudio de la malaria	6
1.1.5 <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	7
1.1.6 Ciclo Biológico del Parásito	7
1.1.7 Síntomas y patogenia	10
1.1.8 Inmunidad en Malaria	10
1.1.9 Proteína Cry1Ac de <i>Bacillus thuringiensis</i>	13
1.1.10 Características generales de la toxina y la protoxina Cry1Ac	14
1.1.11 Citocinas en malaria	15
1.1.11.1 Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α)	17
1.1.11.2 Interlucina 10 (IL-10)	18
1.1.12 Reacción de la Cadena en Polimerasa en Tiempo Real	20
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. HIPÓTESIS	26
5. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	27
5.1 Objetivo general	27
5.2 Objetivos particulares	27
6. MÉTODOS	28
6.1 Obtención del antígeno	28
6.2 Cuantificación de proteína	28
6.3 Electroforesis	29
6.4 Infección de los animales	29
	VIII

6.5	Monitoreo de las parasitemias	30
6.6	Evaluación de la pérdida de peso	30
6.7	Sobrevida	30
6.8	Cuantificación de la concentración de hemoglobina [Hb]	30
6.9	Determinación de índice esplénico	31
6.10	Extracción de ARN de sangre.	31
6.11	Extracción de ARN de bazo e hígado	31
6.12	Hidratación y cuantificación del ARN	32
6.13	Retrotranscripción	33
6.14	Preparación de los controles positivos y de los negativos.	33
6.15	Validación de la técnica de RT-PCR en tiempo real para β -actina, TNF- α e IL-10	34
6.16	Amplificación de los genes	35
6.17	Análisis estadístico	35
6.18	Método de X_0	35
7.	RESULTADOS	37
7.1	Obtención del antígeno	37
7.2	Sobrevida	38
7.3	Parasitemia	39
7.4	Pérdida de peso	43
7.5	Concentración de hemoglobina [Hb]	45
7.6	Índice esplénico	46
7.7	Efecto de la administración de toxina o protoxina sobre la expresión relativa de TNF- α en bazo de ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA	48
7.8	Efecto de la administración de toxina o protoxina sobre la expresión relativade TNF- α en hígado de ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA	50
7.9	Efecto de la administración de toxina o protoxina sobre la expresión relativa de TNF- α en sangre de ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA	51
7.10	Efecto de la administración de toxina o protoxina sobre la expresión relativa de IL-10 en bazo de ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA	52
7.11	Efecto de la administración de toxina o protoxina sobre la expresión relativa de IL-10 en hígado de ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA	53
7.12	Efecto de la administración de toxina o protoxina sobre la expresión relativa de IL-10en sangre de ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA	54
8.	DISCUSIÓN	55

9. CONCLUSIONES	60
10. REFERENCIAS	61
10.1 Referencias bibliográficas	61
10.2 Referencias electrónicas	69
11. APÉNDICES	70
11.1 MATERIAL	70
11.1.1 Material biológico	70
11.1.2 Material de laboratorio	70
11.1.3 Equipo	71
11.1.4 Reactivos	72
11.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	74
11.2.1 Soluciones para electroforesis	74
11.2.2 Soluciones para extracción de ARN	75
11.3 EFICIENCIA DE LAS CITOCINAS	76

RESUMEN

En la actualidad la malaria es un problema de salud pública en el mundo, anualmente se infectan 300 millones de personas y causa la muerte de más de un millón principalmente niños. Desafortunadamente es difícil lograr la erradicación de la malaria debido a diversos factores que involucran tanto al vector como al parásito, por ello las investigaciones en malaria se han enfocado al estudio y comprensión de los mecanismos de inmunidad desarrollados durante la infección con *Plasmodium*.

En el presente trabajo se estudió el efecto de la administración de la toxina y la protoxina Cry1Ac solas o en combinación con antígenos sobre los niveles de expresión de citocinas como un factor determinante en la resolución de una infección letal, utilizando un modelo murino de malaria. Para ello se trataron ratones CBA/Ca con la toxina o la protoxina solas o en combinación con el antígeno de *Plasmodium berghei* ANKA durante 4 semanas y después de 24 horas del último tratamiento se infectaron con eritrocitos parasitados de la cepa letal *Plasmodium berghei* ANKA.

Durante el curso de la infección se evaluó la parasitemia, la anemia, la pérdida de peso y el índice esplénico, considerados parámetros de patogenia, los resultados indicaron que en el transcurso de la enfermedad prevalece una protección pero ésta es temporal dado que en los primeros días post infección los grupos de ratones tuvieron parasitemias bajas y un tiempo de vida media considerando que el *P. berghei* ANKA es un parásito letal.

Palabras claves: pCry1Ac, *Plasmodium*, malaria.

1. INTRODUCCIÓN

La malaria o paludismo¹ es una enfermedad febril, con manifestaciones paroxísticas y periódicas, se presenta en los trópicos y subtrópicos, su causa es la infección con protozoarios parásitos del género *Plasmodium* (1), se transmite al humano a través de la picadura de la hembra infectada del mosquito *Anopheles sp* (2), su ciclo de vida involucra la reproducción asexual (en el humano o huésped intermediario) y la reproducción sexual (en el mosquito *Anopheles sp* hembra como huéspedes definitivos) (3).

Esta enfermedad es endémica de los países tropicales. Se caracteriza por fiebres ondulantes, malestar general y esplenomegalia, dolores musculares y complicaciones frecuentes, entre las cuales está la encefalitis, que produce mortalidad en los niños (4). El período de síntomas suele durar entre 15 a 60 minutos; luego se inicia el período febril, que dura aproximadamente de 2 a 6 horas, se caracteriza por sudoración y descenso de la temperatura. Sin la interferencia de profilaxis o tratamientos, la periodicidad de la fiebre puede variar dependiendo de la cepa de *Plasmodium*. La aparición ocasional de otros síntomas como diarrea, náuseas o vómito puede ocasionar errores en los diagnósticos iniciales. La gravedad de las manifestaciones clínicas del paludismo depende no sólo del tipo de plasmodio o la virulencia de una cepa determinada, sino también de la inmunidad previa de la persona infectada (5).

En conjunto, las citocinas participan en la inducción, expresión y modulación de las respuestas inmunitarias y en el desarrollo y regulación de las respuestas inflamatorias (6). El análisis de las citocinas en el laboratorio puede realizarse mediante bioanálisis (medición de las citocinas biológicamente activas utilizando animales vivos o líneas celulares), inmunoanálisis (mide la citocina biológicamente activa e inactiva ej. RIA y ELISA) o RT-PCR, este último método es el que se empleó para el desarrollo de este trabajo, en el cual se analizó la expresión del gene que codifica para TNF- α e IL-10 a

¹El término malaria tiene sus orígenes en el italiano medieval (*mala aria*, que significa *mal aire*). También se le conoce como paludismo, que proviene del latín *palus* y significa pantano. Esta connotación etimológica ilustra la forma más común de adquirir la enfermedad en el pasado, lo que ocurría habitualmente en lugares con agua estancada propicia para la reproducción del mosquito-vector que transmite la enfermedad al hombre. La malaria es una enfermedad infecciosa cuyo agente etiológico es un parásito del género *Plasmodium*, que se transmite a los humanos por la picadura de un mosquito hembra infectada de la especie *Anopheles* (8).

partir de ARN mensajero. Esta técnica es altamente sensible, ya que identifica pequeños cambios en la expresión de genes que no se podrían detectar por los métodos anteriores (7).

1.1 MARCO TEÓRICO

1.1.1 Antecedentes Históricos

La malaria probablemente se originó en África y su arribo al continente Americano ocurrió aproximadamente hace 500 años. Los primeros registros de la enfermedad se encuentran en los papiros egipcios de hace 3500 años. Los griegos conocían su existencia, Hipócrates hizo las primeras descripciones de la enfermedad y la asoció a los pantanos y las condiciones insalubres en las que vivían sus pacientes, de esta forma los griegos y los romanos asociaron a los pantanos y a las aguas estancadas con la malaria y su drenaje se practicó como medida de control desde el siglo VI A.C. Posteriormente, en el siglo VII los colonizadores españoles descubrieron que los indígenas de Sudamérica contaban con un remedio para curar las fiebres intermitentes (los polvos de la quinina). Pero fue hasta 1820 que Pelletier y Canventou extrajeron el principio activo y lo llamaron quinina. Un avance importante en el estudio de esta enfermedad lo realizó Alfonso Laveran en 1880 quien descubrió a los parásitos causantes del paludismo en un enfermo argelino en África. Un poco después, en 1899 Ross, Grass y Bigmani descubrieron que la transmisión de la malaria se lleva a cabo por medio de la picadura de mosquitos anofelinos. Pero fue hasta 1956 que la OMS estableció un programa internacional de erradicación de la malaria que incluyó a todos los países americanos que sufrían de esta enfermedad.

Sin embargo, el control de la malaria empezó a tener graves problemas puesto que en 1959 surgieron los primeros casos de parásitos resistentes a la droga de mayor uso, la cloroquina, aunado a esto, en los años 70's se hizo evidente el surgimiento de anofelinos transmisores resistentes al DDT. Para 1990 el panorama de la malaria, la enfermedad tropical más importante del planeta es el siguiente: ocurren más de 100 millones de nuevos casos cada año y se calcula que existen 207 millones de individuos infectados así como 2100 millones de personas en riesgo de adquirirla. La mortalidad anual de la malaria oscila entre uno y dos millones en los 103 países.

Según la OMS en el Informe Mundial Sobre el Paludismo de 2010, describe que en los últimos cinco años en 11 países de África se ha reducido el número de casos de malaria y las muertes en más del 50% y la malaria se ha movido de la primera causa de muerte entre los niños menores de cinco años en el 2000 en el África subsahariana a la tercera causa de muerte en 2010 (9).

La enfermedad se perpetúa como un círculo vicioso de la pobreza en el mundo en desarrollo y las enfermedades relacionadas con la malaria. Además, la economía de la mortalidad costó solo en África aproximadamente 12 millones de dólares americanos por año (9).

1.1.2 Generalidades de la Malaria

Diversas especies de *Plasmodium* causan infecciones en animales, pero solo cinco de ellas infectan a los humanos: *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* y más recientemente *P. knowlesi*, parásito de simios (10). Se transmiten a las personas por la picadura de mosquitos hembra infectadas del género *Anopheles*. Se estima que el 40% de la población mundial vive en áreas afectadas por la malaria, lo cual ha resultado en aproximadamente entre 300 y 500 millones de casos clínicos al año y entre 1.5 y 2 millones de muertes (5).

La forma grave de paludismo que sigue un ciclo febril de 48 horas (con paroxismos en los días 1 y 3 de cada ciclo) la ocasiona *P. falciparum* y se conoce como paludismo terciano maligno o paludismo falciparo, la forma más leve con ciclo semejante y que se debe a *P. vivax*, se llama paludismo terciano benigno o paludismo vivax. La enfermedad con ciclo febril de 72 horas que produce *P. malariae* se llama paludismo cuartano o paludismo palúdico. En 1922 se descubrió *P. ovale* y el nombre de la enfermedad que causa paludismo oval, no hace referencia a su forma cíclica (2).

1.1.3 Distribución geográfica

El paludismo ocurre principalmente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, en donde el clima es cálido y húmedo, incluyendo la mayoría del África subsahariana, las zonas rurales del sureste de Asia, algunos países de Oriente Medio,

partes de Oceanía, muchas áreas tropicales de América del Sur y Centroamérica, así como España. Su transmisión es más común en las zonas rurales; sin embargo, también se presenta en las ciudades del África subsahariana y en el subcontinente Indio. Aproximadamente 100 millones de personas sufren los síntomas de la malaria. Más de 1 millón de ellas, en su mayoría niños, mueren a causa de esta enfermedad cada año (9, 11) (Fig. 1).

En América Latina y el Caribe, la transmisión de la malaria continúa en 21 países, donde el 31% de la población vive en zonas donde persiste algún riesgo de transmisión aunque la contribución a la morbilidad global es significativamente menor, así como a la mortalidad. Se ha observado que la resistencia a múltiples fármacos origina casos severos por la presencia de infecciones mixtas y por limitaciones en el diagnóstico. Sin embargo, la publicación de reportes sobre manifestaciones clínicas en esta región es muy poco frecuente (12).

En México, las áreas maláricas comprenden un 58% del territorio nacional y más del 95% de los casos de malaria se originan por *P. vivax*, la malaria generada por *P. falciparum* solo se observa en 1 a 3%, y los casos por *P. malariae* habitualmente no llegan al 1%. *P. vivax* produce infecciones en todo el país, pero *P. falciparum* suele confinarse al sureste en los estados de Chiapas, Campeche, Quintana Roo y Oaxaca debido al clima tropical de la zona (13,14).

Tan sólo en el estado de Chiapas, se reportaron más de 140 mil casos por año desde 1998 (15).

Países sin malaria y países endémicos en fases de: control, pre-eliminación, eliminación y prevención de reintroducción, a finales de 2008.

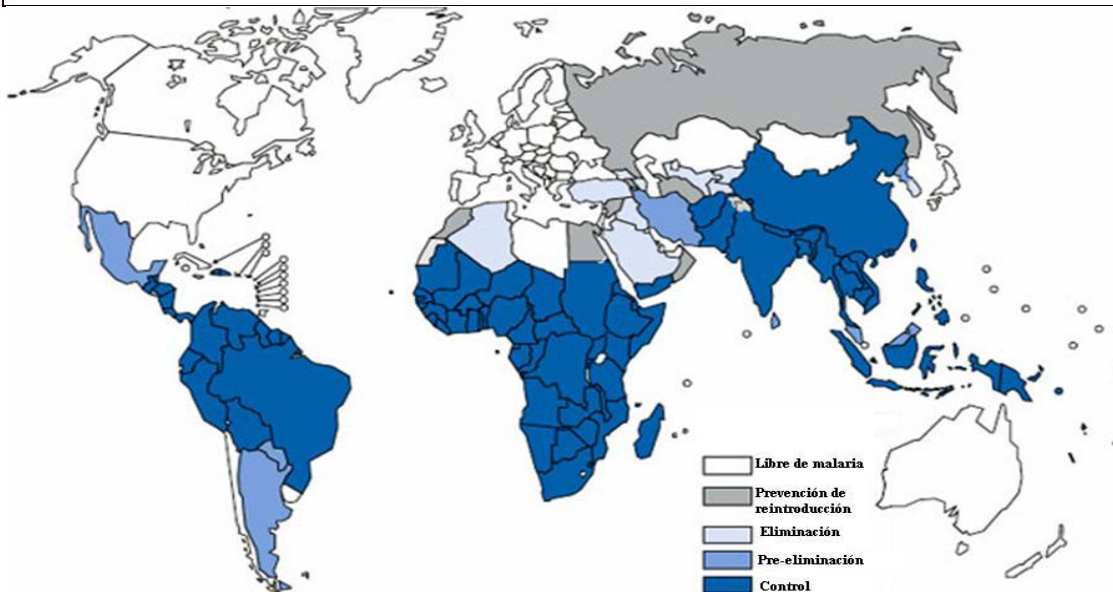


Figura 1. Mapa que muestra la distribución geográfica de la malaria en el mundo. Tomada de World Malaria Report 2009. WHO

1.1.4 Modelos experimentales empleados para el estudio de la malaria

Para poder tener un mejor entendimiento de la malaria humana se han utilizado modelos experimentales en animales, debido a la dificultad que implica interpretar estudios *in vitro*, en los que no están presentes todos los factores involucrados en la patología, en particular para el estudio del sistema inmune. Además, para la mayoría de los experimentos no es ético o práctico el uso de pacientes humanos.

Los modelos experimentales han demostrado ser una valiosa herramienta para investigar la patogenia de numerosas enfermedades infecciosas y autoinmunes que padecen los humanos, así como varias vacunas y terapias inmunes que están en uso en la actualidad, se desarrollaron y probaron previamente en modelos experimentales (16, 17).

Los modelos experimentales de malaria murina se utilizan ampliamente en un intento para entender la biología y la patología de la malaria humana. Los grandes avances que ha tenido la inmunología se deben en gran parte a los estudios que se han

hecho en modelos animales y muy particularmente en el modelo del ratón. Aunque el sistema humano difiere un poco del de ratón y la farmacocinética de las drogas difiere entre los humanos y el ratón, todas las especies de plasmodios tienen ciclos de vida comparables; además, su diversidad es análoga a la que se observa en las cinco especies que afectan al humano (18). Sin embargo, han existido diferencias de criterios dentro de la comunidad científica en relación a los modelos murinos y el nivel de similitud con la malaria humana para catalogarlos como relevantes y útiles (19).

1.1.5 *Plasmodium berghei* ANKA

Plasmodium berghei ANKA se ha utilizado en estudios de patogénesis. Además, sirve de modelo experimental de la malaria cerebral (ECM), de la variación genética en el desarrollo de ECM entre los ratones, el cual se ha asociado con la producción de citocinas proinflamatorias.

La infección de cepas susceptibles de ratones, tales como C57BL6 y CBA/Ca, lleva al desarrollo de una patología fatal, con signos clínicos tales como ataxia, dificultad respiratoria, anemia severa, etc. El momento de comienzo de los signos clínicos varía en dependencia de la dosis de infección, la genética del hospedero y el clon específico de los parásitos infectantes, pero es típicamente entre 5 y 10 días posteriores a la infección. Como en los humanos, existe un rápido deterioro en la condición de los animales infectados una vez que los síntomas clínicos aparecen y la muerte sobreviene (16, 20).

El modelo de *P. berghei* ANKA replica muchos eventos que se observan durante la malaria humana y se acepta que es el mejor entre los disponibles (16).

1.1.6 Ciclo Biológico del Parásito

El ciclo biológico del parásito es muy complejo. Se presenta en dos fases: la fase sexual conocida como esporogonia que ocurre en el tracto gastrointestinal del mosquito (huésped definitivo) y la fase asexual conocida como esquizogonia que se lleva a cabo en el hombre (huésped intermediario) (21).

La esquizogonia o ciclo asexual ocurre en el humano (22). El ciclo vital en el hombre comienza con la introducción de esporozoítos a la sangre desde la saliva del mosquito al picar. En el transcurso de 30 minutos los esporozoítos invaden a los hepatocitos. En esta fase extra-eritrocitaria, el parásito se multiplica y se diferencia a merozoíto, *P. vivax* y *P. ovale* producen una forma latente (hipnozoíto) en el hígado; esta forma ocasiona las recaídas que se observan en los individuos que se infectan con estas cepas de parásito (23). Después de 9 a 16 días se liberan miles de merozoítos al torrente sanguíneo, e infectan a los glóbulos rojos. Los merozoítos intra-eritrocíticos se desarrollan a trofozoítos y más tarde a esquizontes. Cuando los esquizontes se rompen liberan de 8 a 32 merozoítos maduros y de esta manera otra generación de parásitos infecta a nuevos glóbulos rojos. Después de varias divisiones en los eritrocitos, se desarrollan las formas sexuales, los macrogametocitos y microgametocitos que son las formas infectantes para el mosquito. En el glóbulo rojo, el parásito satisface sus requerimientos de aminoácidos al degradar a la hemoglobina y se obtiene hemozoína, así como material pirogénico, causante en parte de los episodios febriles (24). La liberación periódica de merozoítos causa los síntomas recurrentes característicos de escalofríos, fiebre y diaforesis que presentan los pacientes de paludismo (25).

La esporogonia o ciclo sexual se inicia cuando un mosquito hembra del género *Anopheles* ingiere gametocitos masculinos y femeninos al alimentarse de la sangre de un humano con paludismo. En el intestino del mosquito, los gametocitos maduran y se efectúa la fertilización. El cigoto diploide resultante sufre mitosis y se diferencia a oocineto móvil que penetra la pared intestinal del mosquito, se aloja por debajo de la membrana basal y forma una vacuola que da lugar a un ooquiste. Dentro de esta estructura se forman miles de esporozoítos, después, al aumentar de tamaño este quiste se rompe y libera esporozoítos haploides a la cavidad corporal del mosquito. Algunos penetran a las glándulas salivales, entonces el mosquito se vuelve infeccioso para los humanos y se inicia nuevamente el ciclo al infectar a otro individuo sano. El tiempo necesario para que se complete el ciclo en los mosquitos varía de una a tres semanas, depende de la especie de insecto y del parásito, y también de la temperatura y la humedad ambientales (Fig. 2) (22, 24, 25).

Malaria

(*Plasmodium spp.*)

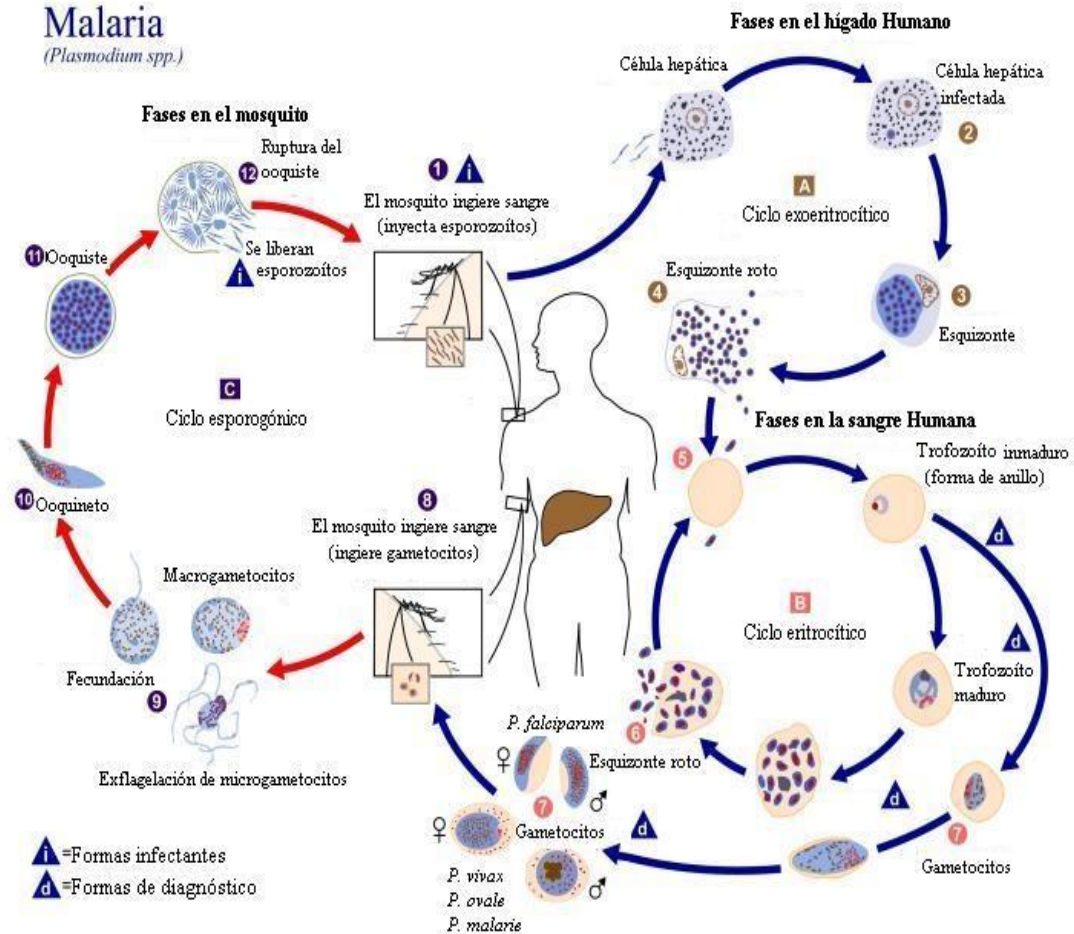


Figura 2. Ciclo biológico del parásito. *Plasmodium*. Tomada y modificada de <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>

El ciclo de vida del parásito de la malaria consta de dos huéspedes. En el proceso de hematofagia de un mosquito hembra del género *Anopheles* infectado de malaria, inocula los esporozoítos en el huésped humano (1). Los esporozoítos infectan a las células hepáticas (2) y maduran en esquizontes (3), dando lugar a la formación de merozoítos y al romperse los libera (4). Después de esta multiplicación en el hígado (esquizogonia exo-eritrocítica A), el parásito invade a los eritrocitos y se reproduce por esquizogonia (esquizogonia eritrocítica B). Los merozoítos infectan a los glóbulos rojos (5). Los trofozoítos anulares maduran para convertirse en esquizontes, que dan lugar a la formación de nuevos merozoítos y al romperse los libera (6). Algunos parásitos se diferencian sexualmente (gametocitos) (7). En las fases de la sangre algunos parásitos son responsables de las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

El mosquito hembra del género *Anopheles* ingiere a los gametocitos masculinos (microgametocitos) y femeninos (macrogametocitos) durante la hematofagia (8). La multiplicación del parásito en el mosquito se conoce como ciclo esporogónico C. En el intestino medio del mosquito, los microgametos fecundan a los macrogametos y se desarrollan los cigotos (9). El cigoto a su vez se convierte en móvil y alargado (ooquineto) (10), que invade la pared del intestino del mosquito donde se convierte en ooquiste (11). El ooquiste crece y desarrolla en su interior esporozoítos que al romperse los libera (12), y una vez liberados ascienden a las glándulas salivales del mosquito. La inoculación de los esporozoítos en un nuevo huésped humano perpetúa el ciclo de vida del plasmodio (1).

1.1.7 Síntomas y patogenia

Los síntomas de la infección se presentan durante el estadio sanguíneo, cuando los parásitos presentan ciclos de crecimiento, replicación dentro de los eritrocitos y ruptura del esquizonte maduro. Las formas clínicas que los pacientes presentan varían desde las asintomáticas hasta el progreso a complicaciones tales como dolor de cabeza, fiebre, escalofríos, sudoración, cefaléa, mialgias, artralgias y anemias. Con menos frecuencia, dolores abdominales, vómito y diarrea. Éstos pueden escalar rápidamente hacia una malaria severa, desarrollándose falla renal, falla hepática, trombocitopenia y edema pulmonar, entre otras (26–29). Sin embargo, las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo se atribuyen a las complicaciones observadas en anemia severa (hemoglobina por debajo de 5 g/dL) y malaria cerebral.

1.1.8 Inmunidad en Malaria

La respuesta inmune al parásito de malaria es sumamente compleja e insuficientemente entendida, ya que el desarrollo de la protección bajo condiciones naturales, requiere de una exposición continua con el parásito durante varios años, se logra solo después de que el individuo se infecta con un gran número de poblaciones de parásitos antigénicamente diferentes, es muy lenta y puede no ser absoluta dado que la parasitemia persiste en ausencia de enfermedad clínica. La variación antigénica es un mecanismo de evasión del sistema inmune y contribuye a la cronicidad y ocasionalmente a la recaída típica de la infección (30). Aunque se ha demostrado en diferentes modelos que los anticuerpos y las células T pueden controlar el crecimiento del parásito, la inmunidad natural a la malaria en regiones de alta endemicidad toma algunos años en desarrollarse debido a la variación y el polimorfismo antigénico que impiden en gran medida su desarrollo (31).

La respuesta inmune contra la malaria se puede clasificar en: pre-eritrocítica (dirigida al esporozoíto y a la etapa del parásito en el hígado) y la respuesta en las fases de la sangre (merozoítos, esquizontes, trofozoítos y gametocitos), la inmunidad pre-eritrocítica involucra respuestas celulares frente a los hepatocitos infectados que inhiben el desarrollo intracelular vía la inducción de intermediarios reactivos de nitrógeno, mientras que la respuesta contra los merozoítos extra-celulares e intra-

eritrocitarios considera el componente humoral. En la inmunidad pre-eritrocítica se inhibe el desarrollo del parásito mediante la inducción de iNOS, limitando así el desarrollo hepático del parásito, mientras que en la inmunidad de las fases sanguíneas, la respuesta humoral se dispara por las células T y B (32).

La infección por *Plasmodium* es capaz de estimular a las células NK (Natural Killer por sus siglas en inglés: Asesinas naturales), a los macrófagos, así como a las células T CD4⁺ y las T CD8⁺, éstas ejercen efectos protectores en diferentes fases de la infección por *Plasmodium*: las células T CD4⁺ intervienen en la respuesta inmune frente a la fase sanguínea de *P. yoelii*, mientras que en la fase hepática de la infección con *P. berghei* son las células T CD8⁺ las que ejercen el efecto protector, se cree que las células T CD8⁺ no afectan a los parásitos durante la fase sanguínea porque los eritrocitos no expresan moléculas MHC de clase I (33). Sin embargo, en nuestro grupo de trabajo, hemos demostrado que las células T CD8⁺ se activan, proliferan e incrementan la síntesis de INF- γ y los niveles de expresión del gene que codifica para esta citocina depende del óxido nítrico (34). La participación de los linfocitos T CD4⁺ es necesaria en el establecimiento de la inmunidad protectora contra el estadio eritrocítico asexual del parásito. Los linfocitos T CD8⁺ son importantes en la fase hepática de la infección, mientras que los macrófagos y las células NK desempeñan un papel central en el inicio de la infección (31, 35).

Los macrófagos y las células NK, funcionan como la primera línea de defensa contra la infección con *Plasmodium*. Ambas poblaciones celulares son las responsables de la secreción inicial de citocinas. Los macrófagos producen IL-12 que activa a las células NK, que son la fuente inicial de interferón gamma (IFN- γ) y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), lo que activa a la respuesta inmune celular. Los macrófagos ayudan al control de la infección mediante la fagocitosis de eritrocitos parasitados, también secretan citocinas (IL-12 y TNF- α) y participan en la síntesis de metabolitos reactivos del oxígeno y del óxido nítrico (36).

Diversas investigaciones sugieren que en la inmunidad en malaria participan los linfocitos B que desempeñan una función primordial en la producción de anticuerpos y en el establecimiento de una respuesta inmune celular contra el plasmodio (37), dado que también son células presentadoras de antígeno. Cuando las células T cooperadoras de tipo 1 (Th1) se estimulan simultáneamente con antígenos o con citocinas de las

células presentadoras de antígeno (APC) y por moléculas coestimuladoras de las APC, proliferan y producen otras citocinas que sostienen y expanden la respuesta inmune. Algunas de las citocinas producidas por las células Th1, como las quimiocinas, atraen a otras células linfoides al sitio de la reacción inmunitaria; otras citocinas como la interleucina-2 (IL-2), estimulan la proliferación de las células reclutadas; algunas como el IFN- γ , activan a los macrófagos, aumentando la expresión de moléculas del MHC II sobre su superficie, también incrementan la fagocitosis y otras citocinas como el TNF- α , a nivel celular es capaz de provocar un incremento en la expresión de moléculas de adhesión y de citocinas en las células endoteliales, epiteliales e inflamatorias. Además, es capaz de modular la sobrevivencia y activa genes a través de varios intermediarios, incluyendo proteincinasas, proteínfosfatasas, intermediarios reactivos de oxígeno, fosfolipasas, proteasas y factores de transcripción (6, 30,35, 38,39).

El IFN- γ y el TNF- α actúan sinérgicamente para inducir la muerte del parásito dentro de las células fagocíticas (40).

Simultáneamente a la activación de las células Th1 mediadoras de la inmunidad celular, ocurre la activación de las células T cooperadoras de tipo 2 (Th2). Las células Th2 responden a la estimulación antigénica y a las señales derivadas de las células presentadoras de antígeno, proliferando y produciendo nuevas citocinas, como IL-10 (6, 35). La IL-10 inhibe la liberación de citocinas proinflamatorias (Th1), incluyendo al TNF- α que proviene de monocitos y neutrófilos humanos, además inhibe la secreción de IFN- γ que sintetizan las células Th1, pero inclina el equilibrio regulador a favor de las respuestas inmunitarias humorales, su efecto predominante es reducir la inflamación debido en parte a que inhibe la función de las APC al suprimir la expresión de moléculas clase II del MHC en células dendríticas y macrófagos (Fig. 3) (41).

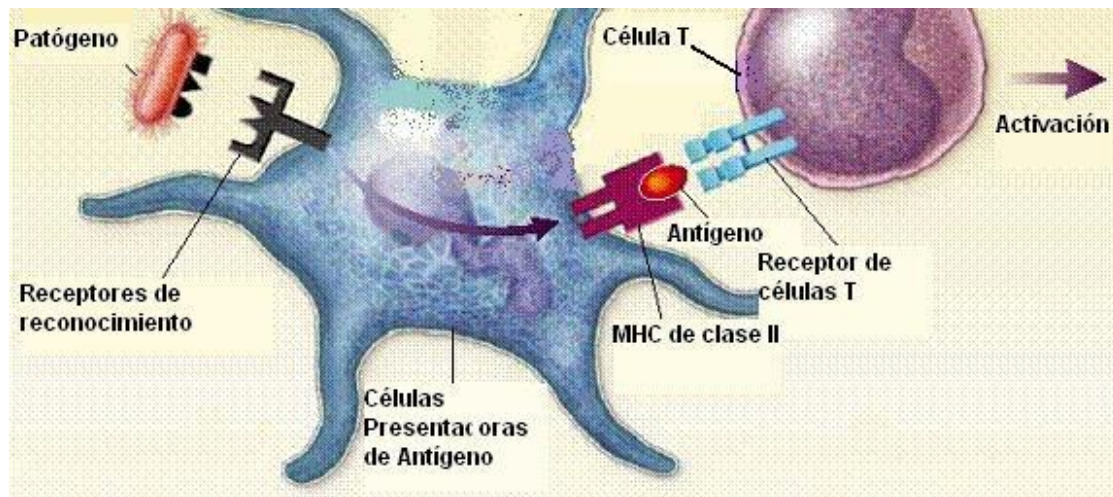


Figura 3. Tomada y modificada de http://epidemiologiamolecular.com/wp-content/uploads/2010/09/clip_image0081.gif. Las células dendríticas inmaduras disponen de mecanismos para capturar microorganismos invasores, engullen invasores a través de receptores en su superficie ingieren sorbos del líquido que les rodea y succionan a las bacterias y virus, después los encierran en vacuolas. Una vez dentro de los huéspedes se degradan en fragmentos (antígenos) que el sistema inmunitario puede reconocer. Los antígenos se unen a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I y II, algunas células dendríticas inmaduras provocan la destrucción inmediata de virus con la secreción de interferón alfa. Las células dendríticas son muy eficientes en la captura y presentación de antígenos incluso en cantidades muy pequeñas de bacterias y virus.

Conforme van procesando los antígenos las células dendríticas viajan por la sangre al bazo o hacia los ganglios linfáticos a través de la linfa. Una vez en su destino las células completan su maduración y presentan sus moléculas de MHC cargadas de antígenos a los linfocitos T vírgenes y las educan para que reconozcan como peligrosos a los antígenos, instan la intervención de los linfocitos B que sintetizan anticuerpos que se unirán al antígeno para su posterior inactivación, también activan alas células T asesinas que pueden destruir a las células infectadas por microorganismos. Algunas de estas células se transforman en células con memoria que sobreviven durante varios años para combatir futuras invasiones.

1.1.9 Proteína Cry de *Bacillus thuringiensis*

Esta proteína la produce *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) que es una bacteria Gram-positiva, aerobia estricta, se relaciona morfológicamente con *B. cereus* y *B. anthracis*. Estas especies presentan dos fases durante su ciclo de vida, la de crecimiento vegetativo en donde las bacterias se duplican por bipartición cada 30 a 90 minutos dependiendo del medio de cultivo en el que se encuentren y la fase de esporulación, que es una etapa de diferenciación de bacteria a espora, consta de siete estadios y se activa con la restricción de nutrientes (42, 43). *Bt* se considera una bacteria cosmopolita ya que se ha aislado de todas partes del mundo y de muy diversos sistemas como suelo, agua, hojas de plantas, insectos muertos, telarañas, etc. (44, 45).

Bt se diferencia de *B. cereus* y *B. anthracis* por su capacidad para producir endotoxinas en forma de cristales en el citoplasma durante la esporulación, recibe ese

nombre por tener un cuerpo paraesporal conocido como cristal que es de naturaleza proteica y tiene propiedades insecticidas e inmunogénicas (adyuvante). Dicho cuerpo paraesporal está constituido por proteínas denominadas δ -endotoxinas, también conocidas como proteínas Cry y Cyt (42, 45, 46).

Las proteínas Cry se han estudiado ampliamente desde hace mucho tiempo para evaluar su actividad bioinsecticida pero las propiedades fisiológicas o inmunológicas en vertebrados se han estudiado poco a pesar de la homología de *Bt* con la especie *B. cereus* (47).

Las proteínas Cry tienen una gran estabilidad, presentan alta resistencia a proteólisis, son solubles a pH alcalino, no son tóxicas para el hombre ni para los vertebrados y sus costos de producción son bastante económicos debido a que su gen se ha clonado en *E. coli* (48, 49).

1.1.10 Características generales de la toxina y la protoxina Cry1Ac

Se han detectado δ -endotoxinas activas contra lepidópteros, coleópteros, dípteros, himenópteros, ácaros y también contra otros invertebrados como nemátodos, gusanos planos y protozoarios (42).

La mayor parte de las proteínas Cry se producen como protoxinas (130-140 KDa), que para activarse requieren del rompimiento proteolítico por las proteasas del intestino medio de los insectos, lo que libera el fragmento tóxico. El procesamiento típico de las toxinas Cry se da por el corte de los primeros 28 residuos del extremo N-terminal en un sitio conservado y de los últimos 500 residuos del extremo C-terminal, de esta forma se origina un fragmento resistente a proteasas de entre 60 y 70 KDa que se le denomina “toxina” (42, 50). La protoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* es un potente adyuvante en las mucosas. Se conoce que la mayor parte de los agentes patógenos entran al organismo a través de la piel y las mucosas, ésta es una de las razones por las que resulta atractivo inhibir su adhesión, replicación y colonización desde los sitios en que penetran a nuestro organismo. Por lo tanto, la búsqueda de nuevos inmunopotenciadores de las mucosas representa una alternativa para la

obtención de complementos para vacunas y para la formulación de inmunopreparados (46).

La protoxina Cry1Ac potencia la respuesta celular contra patógenos de las mucosas; esto resulta importante en el diseño de vacunas y en el manejo de infecciones (51). Además, se ha descrito que la coadministración de la protoxina Cry1Ac sola o en combinación con lisados de amibas, incrementa notablemente la inmunidad protectora contra la meningoencefalitis en ratones infectados con *Naegleria fowleri* (52).

La mayoría de estudios sobre proteínas Cry se relacionan a su toxicidad en insectos, se ha descrito que la protoxina recombinante Cry1Ac del *Bacillus thuringiensis* modula la respuesta inmune en ratones infectados con *P. berghei* ANKA y *P. chabaudi* AS (53).

1.1.11 Citocinas en malaria

Se denominan genéricamente citocinas al conjunto de proteínas de bajo peso molecular (8–80 kDa), a menudo glicosiladas y generalmente monoméricas (54). Se sintetizan por una gran variedad de células tanto linfoides como no linfoides y tienen varios efectos sobre sus células blanco (6, 55).

Inmunológicamente podemos definir las citocinas como proteínas secretadas por células de la inmunidad innata y la adquirida que regulan muchas de las funciones de estas células. Las citocinas se producen en respuesta a microorganismos y a otros antígenos; además, estimulan diversas respuestas celulares involucradas en la inmunidad y en la inflamación. Entre las propiedades que tienen las citocinas tenemos que: su secreción es un evento corto y redundante, intervienen en la síntesis y actividad de otras citocinas, su acción puede ser local y sistémica, se unen a receptores específicos de membrana en sus células diana, la expresión de sus receptores se regula por señales externas y la respuesta de las células diana consiste de cambios en la expresión de genes lo que conduce a la expresión de nuevas funciones y algunas veces en la proliferación de las células diana (56).

Las fuentes celulares de las citocinas incluyen a los monocitos/macrófagos y a las células dendríticas, además de los linfocitos T y B; fibroblastos, neutrófilos, células endoteliales, células cebadas y otras. Los blancos celulares de las diversas citocinas incluyen: a los monocitos y a los macrófagos, a los linfocitos T, a las células B, a los neutrófilos, a las células hematopoyéticas de las series linfocítica y mieloide, a los fibroblastos, a las células cebadas y a los eosinófilos (6).

Los efectos de las citocinas incluyen la diferenciación, proliferación y activación de las “células blanco”, la expresión de receptores celulares para un sin número de ligandos y la inducción y secreción de otros mediadores que incluyen prostaglandinas, interleucinas, factores de crecimiento y de diferenciación, factores estimulantes de colonias, inmunoglobulinas y otros, así como la liberación de los mismos receptores solubles.

Las citocinas producidas durante la respuesta inmune transmiten señales entre diferentes tipos celulares y actúan como mediadores de la respuesta inmune, así mismo, el microambiente que producen estas citocinas es importante para establecer el tipo de respuesta que induce la proteína Cry1Ac; ya que las citocinas de tipo Th1 son importantes promotores de la respuesta inmune mediada por células, mientras que las citocinas Th2 inducen una respuesta mediada por anticuerpos (57); además, como parte de la respuesta contra antígeno es necesaria la participación de estas citocinas, que se producen principalmente en los linfocitos T y juegan un papel muy importante en la fase de activación de las células T y pueden regular el crecimiento y diferenciación de diferentes poblaciones de linfocitos (58).

En la enfermedad de malaria se ha descrito que las citocinas son un factor muy importante ya que determinan la severidad y curso de la infección con *Plasmodium* y por lo tanto son blancos potenciales para intervenciones terapéuticas. Algunos estudios sugieren que el balance entre citocinas proinflamatorias (TNF- α , INF- γ , IL-6, IL8) y antiinflamatorias (IL-4, IL-10) determina el grado de la parasitemia, el nivel de anemia, la severidad clínica de la enfermedad y su curso (59–61).

1.1.11.1 Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α)

Es una citocina proinflamatoria multifuncional que posee numerosas actividades biológicas que varían dependiendo de su concentración, el tiempo de la exposición celular y de la presencia de otros mediadores que pueden actuar en sinergismo con esta citocina. La sintetizan las células NK, los macrófagos activados por toxinas del parásito del estadio sanguíneo, los neutrófilos, los basófilos y los eosinófilos después de una estimulación con endotoxinas, con mediadores inflamatorios o con algunas citocinas como IL-1 (62, 63). Participa en la respuesta de la fase aguda durante una infección o daño, así como en la regulación del crecimiento y diferenciación celular; además, es clave en la activación de los macrófagos (64). Esta citocina se produce en la fase pre-eritrocítica estimulada por antígenos parasitarios en el tiempo de ruptura del esquizonte y en la fase eritrocítica durante la liberación de los merozoítos de los eritrocitos parasitados. Este factor junto con las citocinas IL-1, IL6, IL-12 e IFN- γ están involucradas en la disminución de la parasitemia en malaria, ya que son capaces de eliminar a los gametocitos, así como inactivar parásitos intraeritrocíticos indirectamente, induciendo la producción del intermediarios reactivos del nitrógeno (RNI) (65). El TNF- α es una citocina con efectos pleiotrópicos, posee actividad anti-microbiana (66). En la malaria, se ha demostrado que el TNF- α tiene efectos tanto benéficos como perjudiciales.

El TNF- α se detecta en la circulación durante la fase eritrocítica de la infección en los seres humanos (35, 66–68) y en los modelos experimentales en ratones (69, 70). Los niveles altos de esta citocina se han asociado con la fiebre (71) y la malaria cerebral (69,71). Por otro lado, el TNF- α también tiene una potente actividad antiparasitaria (72).

Además, el TNF- α puede promover directamente el crecimiento y la diferenciación de las células B, activar a los neutrófilos y a los macrófagos, estimular la hematopoyesis y producir diversos efectos sobre otro tipo de células no hematopoyéticas. También induce la expresión de muchas otras citocinas y mediadores que promueven la inflamación, por lo tanto, se le conoce como citocina proinflamatoria; no obstante, su importancia principal en la inmunidad tiene que ver con su capacidad para inducir la activación de linfocitos T cooperadores (Th) por medio de células presentadoras de antígeno (73). Los macrófagos activados son los

encargados de sintetizar al TNF- α . También actúan sobre las células Th aumentando la secreción de la IL-2 y la expresión de receptores de superficie para IL-2 e INF- γ ; contribuye al inicio de las respuestas inmunes tanto humorales como celulares (73). En combinación con el INF- γ induce la síntesis de cantidades altas de óxido nítrico (NO), controlando el pico de la parasitemia (74).

Los niveles elevados de TNF- α en el bazo correlacionan con la resistencia a la infección por *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS. El TNF- α , también contribuye a la disminución de la infección aguda por *P. chabaudi*, *P. yoelii* y *P. vinckei*, debido a que induce mediadores como el óxido nítrico y otros intermediarios reactivos del oxígeno (35, 75). Sin embargo, existen reportes contrarios que describen que es posible que el TNF- α no sea una citocina crítica que proporcione una respuesta de protección temprana, ya que los ratones con una deficiencia en los receptores para TNF- α , son capaces de controlar y reducir la parasitemia (35, 75).

1.1.11.2 Interleucina 10 (IL-10)

La IL-10 proviene de células Th2 y de las células Th3 o Tr (células T reguladoras), suprime la producción de citocinas en las células Th1. También se ha descrito que la sintetizan las células B, las células cebadas y bajo ciertas condiciones los macrófagos. Inhibe la actividad microbicida de los macrófagos activados por INF- γ suprimiendo la vía dependiente de arginina mediante la cual se produce el NO, también inhibe la producción de INF- γ de las células NK y bloquea la producción de TNF- α (76).

Simultáneamente a la activación de las células Th1 mediadoras de la inmunidad celular, ocurre la activación de las células T cooperadoras de tipo 2 (Th2). Las células Th2 responden a la estimulación antigénica y a las señales derivadas de las células presentadoras de antígeno, proliferando y produciendo nuevas citocinas, como IL-10 (6). La IL-10 se identificó inicialmente como un factor producido por las clonas de las células Th2, estas células poseen la capacidad de inhibir la producción de citocinas de las células Th1, cuando se estimulan a través de la presentación de antígeno de los macrófagos (77). La IL-10 induce la proliferación de las células B, la diferenciación de las células plasmáticas y la producción de inmunoglobulinas, es

esencial para la maduración de las células productoras de anticuerpos antimalariales. Estos efectos se generan por la participación de citocinas de tipo 2 (6). La IL-10 es un inhibidor potente de las respuestas inflamatorias e inmunes, debido en parte a que inhibe la función de las APC al suprimir la expresión de moléculas clase II del MHC en las células dendríticas y en los macrófagos. Es un producto de las células T CD8⁺ y las células Th2 activadas, células B, monocitos y queratinocitos. La IL-10 inhibe la producción de IL-2 e INF- γ en las células Th1, lo que favorece las respuestas dependientes de Th2; también inhibe la producción de citocinas en las células NK y en las especies reactivas del nitrógeno y proteínas de adhesión en los macrófagos (73). La IL-10, es una citocina que suprime o regula la respuesta inflamatoria, se ha demostrado que controla la inmunopatología en la infección severa de la enfermedad.

En malaria, la IL-10 protege a los ratones infectados con *P. berghei*, de desarrollar malaria cerebral por una regulación de INF- γ y TNF- α . En infecciones por *P. chabaudi* en los ratones hembras que tienen el gen de IL-10 inactivado, se incrementan los niveles de TNF- α e INF- γ (78). La IL-10 ejerce efectos principalmente inmunomoduladores e inmunosupresores, al afectar la pauta de producción de citocinas en las células T cooperadoras, designadas Th1 y Th2 (77). Aparte del efecto inhibidor que la IL-10 ejerce sobre las células T, esta citocina también tiene propiedades inmunomoduladoras y supresoras sobre células del linaje monocito-macrófago, como la disminución en la síntesis de diversas citocinas inflamatorias como TNF- α , IL-16, IL-1, IL-8 en los macrófagos. Asimismo, inhibe o estimula la producción de moléculas que participan en el metabolismo oxidativo en los macrófagos, como el óxido nítrico (77). Debido al efecto de la IL-10 sobre las células T cooperadoras, los macrófagos, las células B y los neutrófilos, resulta evidente que este factor puede tener importantes efectos reguladores y correguladores en el sistema inmune y que participa en procesos antiinflamatorios y antivirales (77).

Un estudio realizado en ratones deficientes de IL-10 e infectados con *P. chabaudi*, demostró que la falta de IL-10 no tiene efectos significativos en el curso de una infección primaria o en la resistencia en una infección secundaria, lo cual sugiere que esta citocina no es crucial en el desarrollo de una respuesta inmune efectiva; sin embargo, su ausencia ocasiona un incremento en la respuesta de las células T, lo cual genera una gran producción de IFN- γ . Por lo tanto, esta citocina juega un papel

importante en la regulación de la producción de TNF- α , IL-1 e IL-12 de los macrófagos; la proliferación de las células T y NK y de este modo la producción de IFN- γ (78).

1.1.12 Reacción de la Cadena en Polimerasa en Tiempo Real

La reacción en cadena de la polimerasa, cuyas iniciales en inglés son PCR (“Polymerase Chain Reaction”), es una técnica que desarrollo Kary Mullis en 1983. Con esta metodología se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico (79, 80), mediante una reacción enzimática que se repite por alrededor de 30 ciclos (81).

La PCR es un método *in vitro* de síntesis de ADN con el que un segmento particular de éste se amplifica utilizando un par de cebadores o iniciadores que lo flanquean. Su copiado se logra en forma exponencial a través de ciclos repetidos de diferentes periodos y temperaturas de incubación en presencia de la enzima ADN polimerasa termoestable. Así se obtienen en cuestión de horas millones de copias de la secuencia deseada del ADN (82).

La PCR es una técnica de biología molecular altamente específica, rápida, sensible y versátil para detectar cantidades extraordinariamente bajas de un cierto ADN específico, que posibilita su fácil identificación (82).

La técnica de PCR en tiempo real ha impulsado a la biología molecular permitiendo a los investigadores manipular el ADN de una manera más sencilla, haciendo más eficientes los procedimientos comunes. Esto es en parte por la rapidez, gran sensibilidad y la precisión de los productos de PCR que se pueden evaluar en el momento en que se van generando. Los métodos en tiempo real actuales implican generalmente moléculas que emiten “fluorescencia” para demostrar la cantidad de ADN presente en cada ciclo de PCR. El término de “PCR cinético” se refiere también a este proceso. “PCR cuantitativo” se refiere a la capacidad de cuantificar la cantidad que se obtiene de una secuencia específica del ADN. Además, se puede analizar la expresión génica si se obtiene ARNm y se retrotranscribe con la enzima transcriptasa reversa para obtener un ADN complementario (ADNc) y después se amplifican los

genes en estudio utilizando la reacción de PCR, a este proceso se le conoce como retrotranscripción acoplada a PCR (RT-PCR) (80).

Este método tiene una enorme capacidad de detección para la evaluación de la expresión génica *in vitro*, es decir, es de gran utilidad para estudiar los cambios en la expresión de los genes a nivel de ARN. Esta técnica se utiliza para amplificar ARNm de cualquier tipo de células. La mezcla inicial, contiene todos los componentes necesarios: muestra de ARN, transcriptasa inversa, cebadores y dNTP's. El proceso comienza con la síntesis de una hebra de ADNc por la acción de la transcriptasa inversa, una polimerasa de ADN dirigida por ARN, el ADNc permanece unido al molde como dúplex ARN: ADNc. En la segunda etapa se desnaturaliza el dúplex y comienza la amplificación de la hebra de ADN que actúa como molde para que la enzima polimerasa sintetice una segunda hebra de ADNc y luego el dúplex se amplifica en ciclos sucesivos. La estrategia para analizar cambios en la expresión de genes específicos a nivel de ARN es llevar a cabo una PCR doble, es decir, que identifique al mismo tiempo dos ARNm específicos; el de estudio comparado con otro que no sufra cambios significativos durante el proceso fisiológico o fisiopatológico. Para ello, se utiliza como estándar interno el producto de la expresión de genes constitutivos a nivel de ARN total de una misma muestra biológica, a partir de la cual se efectúa la transcripción inversa para obtener el ADNc total (83).

La reacción consta, por lo regular, de una treintena de ciclos repetitivos conformados cada uno de tres pasos: el primero consiste en la ruptura de los puentes de hidrógeno que unen las dos cadenas complementarias del ADN y lo desnaturalizan, por lo que se incuba a una temperatura de alrededor de 95°C, por un minuto. Este paso expone a las bases nitrogenadas del ADN blanco con los denominados cebadores o iniciadores (ADN sintético de hebra sencilla), a una temperatura que facilita el apareamiento de las bases nitrogenadas complementarias de ambas clases de ADN's. Esta temperatura de fusión depende de la (T_m) de los iniciadores, pero generalmente oscila entre 50 y 60°C. El tercer paso se efectúa a 72°C, temperatura a la que la polimerasa (obtenida a partir de una bacteria llamada *Thermofilus aquaticus* o Taq.) extiende la longitud de los cebadores, añadiendo los diferentes nucleótidos libres en el orden que le va dictando la secuencia de nucleótidos de la cadena que actúa como molde (Fig. 4) (82).

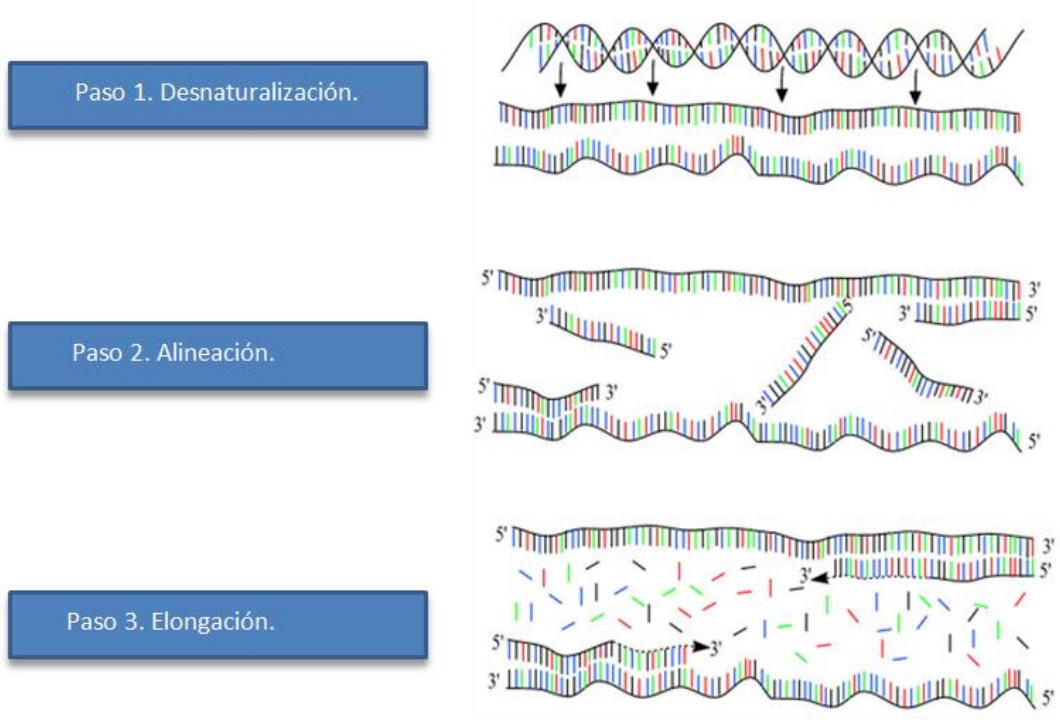


Figura 4. Representación esquemática de la técnica de RT-PCR. Tomada y modificada de <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La malaria o paludismo, tiene un impacto en la salud y en el bienestar económico de millones de personas. El 40% de la población mundial tiene riesgo de contraerla. Actualmente, no existe una vacuna efectiva y los medicamentos son la única terapia para la enfermedad.

A pesar de que ya han pasado más de 120 años desde el descubrimiento del parásito, continúan los esfuerzos médicos para controlarlo. Los esfuerzos por eliminar el paludismo han sido intensos en muchas partes del mundo, su erradicación se ha dificultado en gran parte por la variabilidad antigénica del parásito (9), así como su complejo ciclo de vida y la resistencia que han desarrollado los mosquitos vectores a los insecticidas residuales; además, de que han surgido cepas de *Plasmodium* resistentes a las drogas antimaláricas existentes (31). La malaria es la enfermedad infecciosa con el más alto índice de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. A pesar de la intensa investigación que se ha desarrollado durante décadas, se conoce muy poco sobre la inmunidad natural contra *Plasmodium* que es el parásito que la ocasiona (84, 85). El estudio de los mecanismos de respuesta inmune en el humano, en condiciones experimentales bien definidas está muy limitado, debido tanto a razones éticas como técnicas. Sin embargo, se pueden analizar críticamente utilizando modelos murinos de la enfermedad, lo que ha contribuido a entender parcialmente los mecanismos de inmunidad, aunando que ambos sistemas inmunes son sumamente parecidos y que se cuenta con la secuenciación de prácticamente todos los genes del ratón. En un estudio previo, se demostró que la protoxina Cry1Ac generó protección contra un protozooario letal como lo es *Naegleria fowleri*, esta protección se ha descrito tanto cuando se administra sola o en combinación con lisados de amebas, como resultado de esta administración se incrementa de forma importante la inmunidad protectora contra la meningoencefalitis provocada por *N. fowleri* en ratones (52).

En este trabajo se utilizó el modelo experimental de malaria en la cepa de ratones CBA/Ca y el parásito letal *Plasmodium berghei* ANKA, para analizar el efecto de activar a la inmunidad innata con la administración de la toxina Cry1Ac y la protoxina Cry1Ac solas o en combinación con lisados de *Plasmodium* previo a la infección con *P. berghei* ANKA para estudiar si esta estimulación es capaz de generar protección

específica para la infección contra *P. berghei* ANKA, de forma análoga a la que se logra con la administración de la protoxina Cry1Ac y la infección por *N. fowleri*. La protección se analizó evaluando la parasitemia y la sobrevivencia de los ratones tratados con la toxina o la protoxina Cry1Ac y se comparó con los datos obtenidos con el grupo que únicamente recibió el vehículo (PBS). Además, analizamos la expresión de ARN mensajero que codifica para TNF- α e IL-10 por RT-PCR en tiempo real. Finalmente, también estudiamos algunos parámetros de la patología como la pérdida de peso, la anemia, el índice esplénico a diferentes tiempos de la infección. Los resultados que se obtuvieron del presente proyecto contribuyen a incrementar el conocimiento sobre la inducción de inmunidad innata contra *Plasmodium*, lo que redundará en el posterior desarrollo de estrategias inmunológicas para el control del parásito. Lo anterior es extremadamente relevante para el diseño y aplicación de vacunas que sean efectivas contra malaria.

3. JUSTIFICACIÓN

Los intentos por erradicar la malaria han fallado, se ha descrito el desarrollo de resistencia del vector a los insecticidas y por otra parte el parásito también ha desarrollado resistencia a los medicamentos disponibles. Además, existe un conocimiento incompleto de los mecanismos de la respuesta inmune que controlan la proliferación del parásito y finalmente lo eliminan, ello ha dificultado el desarrollo de una vacuna eficaz contra la malaria. Por este motivo es importante realizar investigación sobre los mecanismos que conforman la respuesta inmune encargada de inhibir la proliferación o el crecimiento y finalmente eliminar al parásito.

En este proyecto evaluamos el efecto de la administración de la toxina y la protoxina Cry1Ac solas o en combinación con antígenos solubles sobre los niveles de expresión de ARN mensajero para TNF- α e IL-10, las cuales son importantes en la respuesta inmunológica que presenta el organismo en una infección por *Plasmodium*. Estos estudios ayudarán a entender los mecanismos de la respuesta inmune en malaria, con el fin de desarrollar nuevos y más eficaces tratamientos contra esta enfermedad.

Los resultados de este proyecto generarán conocimiento sobre los mecanismos que regulan la respuesta inmune contra el *Plasmodium*, lo que tendrá relevancia para el futuro diseño de vacunas contra la malaria.

4. HIPÓTESIS

En un estudio previo se demostró que la protoxina recombinante Cry1Ac del *Bacillus thuringiensis* modula la respuesta inmune en ratones infectados con *P. berghei* ANKA y *P. chabaudi* AS en una dosis de 5 µg/ratón (53). Además, se ha reportado que la protoxina Cry1Ac generó protección contra la meningoencefalitis provocada por *N. fowleri*, por ser una proteína que tiene propiedades inmunogénicas (52). Por lo anterior, si se administra la toxina o la protoxina Cry1Ac solas o en combinación con el antígeno de *Plasmodium berghei* ANKA en una dosis 10 veces más alta, se modificará la expresión de ARNm que codifica para TNF- α y para IL-10 en ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA, y por lo tanto se generará una mejor inmunidad protectora contra *P. berghei* ANKA, a la que se tenía descrita con 5 µg de protoxina Cry1Ac.

5. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

5.1 Objetivo general

Determinar si al administrar la toxina o la protoxina Cry1Ac solas o en combinación con el antígeno de *Plasmodium* en ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA, se modifican los niveles de expresión de TNF- α e IL-10 mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real.

5.2 Objetivos particulares

- Evaluar el efecto del antígeno de *P. berghei* ANKA cuando se administra solo o en combinación con la protoxina o la toxina Cry1Ac en ratones infectados con *P. berghei* ANKA.
- Determinar si los tratamientos previos a la infección por *P. berghei* ANKA inducen o modifican la inmunidad protectora.
- Analizar los efectos sobre diferentes parámetros de la patología de la enfermedad como la pérdida de peso corporal, sobrevida, parasitemias, concentración de hemoglobina, índice esplénico en ratones tratados con la toxina o la protoxina Cry1Ac solas o en combinación con el antígeno e infectados con *P. berghei* ANKA.
- Extraer y purificar el ARN a partir de bazo, hígado y sangre periférica de los ratones tratados e infectados con *P. berghei* ANKA y retrotranscribirlo para generar ADNc.
- Validar y amplificar los genes que codifican para β -actina, TNF- α e IL-10 a partir de los ADNc utilizando RT-PCR en tiempo real.
- Analizar la expresión de TNF- α e IL-10 mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real.

6. MÉTODOS

6.1 Obtención del antígeno

Se infectaron 10 ratones CBA/Ca vía intravenosa con 5×10^4 eritrocitos parasitados con *P. berghei* ANKA, se evaluó la parasitemia diariamente hasta que los ratones alcanzaron un 30% de eritrocitos parasitados. Posteriormente, los ratones se sacrificaron y se les extrajo la sangre que se adicionó a un tubo Eppendorf de 1.5 mL con PBS conteniendo heparina, la sangre se pasó a través de una columna de celulosa CF11 para eliminar a los leucocitos, los eritrocitos así obtenidos se lavaron con solución salina de Krebs y se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el botón y los eritrocitos se lisaron con saponina al 10%, se centrifugó a 3,000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el botón celular se lisó con solución de lisis (Tritón X-100 al 1%, 100 mM TRIS-HCl, 5Mm EDTA), se centrifugó a 14,000 rpm por una hora a 4°C y se le almacenó en alícuotas a -70°C. Después al extracto crudo de antígeno de *P. berghei* ANKA obtenido, se le cuantificó la concentración de proteínas utilizando una curva estándar de albúmina y el reactivo de BIO-RAD.

6.2 Cuantificación de proteína

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (86) mediante una curva tipo de proteínas empleando albúmina como estándar (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y se calculó la concentración de proteínas. Se etiquetaron 7 tubos Eppendorf en la siguiente forma: B, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16. Para diluir una parte del reactivo en cuatro partes de agua se colocaron 200 μL de agua estéril en los tubos etiquetados. Después se adicionaron 0.5 μg , 1 μg , 2 μg , 4 μg , 8 μg y 16 μg de albúmina estándar a los tubos 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 respectivamente, el tubo B correspondió al blanco. Posteriormente, a cada tubo se le agregaron 50 μL del reactivo para cuantificar proteínas (Bio-Rad Protein Assay, [®]BIO-RAD) y se agitó. Se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Luego de este tiempo se midió la absorbancia a 595 nm.

Para la cuantificación de proteínas de las muestras se realizó lo siguiente: en un tubo Eppendorf se colocaron 200 μL de agua, 1 μL de la muestra y 50 μL del reactivo

de BIO-RAD[®], se agitó e incubó a temperatura ambiente por 5 minutos y se procedió a medir la absorbancia a 595 nm.

6.2 Electroforesis

Se mezclaron 50 µg de proteína total con 4 µL del amortiguador de carga Laemmli 5X (Apéndice 11.2.1) y se hirvió durante 5 minutos e inmediatamente se colocó en hielo y después se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 segundos.

Se utilizó un gel concentrador al 5% (Apéndice 11.2.1) y un gel separador al 12% (Apéndice 11.2.1). Posteriormente, el marcador de peso molecular y las muestras se colocaron en los pozos. Se corrió la electroforesis en amortiguador de corrimiento 1X, para la concentración de las muestras se sometió a un voltaje de 60 volts/1 hora y la separación de las bandas fue a 90 volts/4 horas. Luego de este tiempo el gel se tiñó con azul de Coomassie y después de 24 horas el gel se lavó con solución desteñidora rápida (Apéndice 11.2.1).

6.4 Infección de los animales

A 6 grupos de 12 ratones cada uno, se les administró intraperitonealmente la toxina o la protoxina Cry1Ac solas o en combinación con el antígeno de *Plasmodium berghei* ANKA. Al primer grupo se le administraron 50 µg de antígeno junto con 50 µg de protoxina Cry1Ac, al segundo grupo se le administraron 50 µg de antígeno junto con 50 µg de toxina Cry1Ac, al tercer grupo se le administraron 50 µg de antígeno junto con PBS por ratón, al cuarto grupo se les administraron 50 µg de protoxina Cry1Ac, al quinto grupo se les administraron 50 µg de toxina Cry1Ac y el sexto grupo que fue el control se les administraron 100 µL de PBS por ratón. Los tratamientos se repitieron una vez por semana durante 4 semanas. 24 horas después del último tratamiento los ratones se infectaron vía intravenosa con 1×10^3 eritrocitos parasitados con *Plasmodium berghei* ANKA (día 0). En los días 6 y 9 post infección se extrajo el bazo y el hígado de tres ratones de cada grupo, para aislar el ARN mensajero.

6.5 Monitoreo de las parasitemias

A partir del día 3 post infección diariamente se tomaron muestras de sangre de la cola del ratón para evaluar la parasitemia en frotis teñidos con Giemsa. La lectura de las parasitemias se efectuó con un microscopio óptico utilizando el objetivo de 100X. Se evaluó la parasitemia como el número de eritrocitos parasitados, cuando las parasitemias eran menores a 2 eritrocitos parasitados por campo se contaron 50 campos y cuando las parasitemias eran mayores a 2 EP por campo se contaron 200 eritrocitos y de ellos se evaluó el porcentaje de glóbulos rojos parasitados.

6.6 Evaluación de la pérdida de peso

Los ratones se pesaron antes y durante el curso de la infección para realizar las gráficas de pérdida de peso corporal. Se consideró que el peso registrado en el día cero correspondía al 100%.

6.7 Sobrevida

El monitoreo de los ratones infectados, se llevó a cabo diariamente hasta el deceso de todos los ratones.

6.7 Cuantificación de la concentración de hemoglobina [Hb]

En los días 6 y 9 post infección se tomaron muestras de sangre de los ratones infectados para cuantificar la concentración de hemoglobina y evaluar la anemia. Se determinó la concentración de Hb por la reacción de la cianometahemoglobina. Se empleó el reactivo de Drabkin y un estándar de Hb, la dilución de la muestra fue de 1:251 (1µL de sangre se adicionó en 250 µL del reactivo), se agitó vigorosamente y después de 10 minutos se leyó la absorbancia a 540 nm.

6.9 Determinación de índice esplénico

El índice esplénico se obtuvo de la relación entre el peso del bazo y el peso del ratón.

6.10 Extracción de ARN de sangre

Se sacrificó a cada ratón en una cámara de cloroformo y se extrajo la sangre que se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Posteriormente, las muestras de sangre se centrifugaron a 5,000 rpm durante 15 minutos y se desechó el sobrenadante. El botón formado se resuspendió en 1 mL de agua destilada, se mezcló y se centrifugó a 5,000 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se agregaron 400 µL del reactivo de TriPure y se agitó en el vortex para homogenizar. Después se adicionaron 200 µL de la mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (49:1). Se agitó en el vortex 15 minutos y se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 minutos. Posteriormente, se separó la fase acuosa y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Se adicionó un volumen igual al de la fase acuosa de isopropanol previamente enfriado a -20°C y se mezcló suavemente. Se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm durante 15 minutos y se desechó el sobrenadante. Después se adicionaron 500 µL de etanol al 80% en agua DEPC (Apéndice 11.2.2), se agitó suavemente y se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm por 15 min y se desechó el sobrenadante. Los tubos se taparon con papel parafilm al que se le hicieron perforaciones con una aguja estéril para permitir que se evapore el etanol. Se colocaron en un desecador a temperatura ambiente durante toda la noche. Una vez secos se retiró el papel parafilm, se taparon perfectamente y finalmente se almacenaron a -20°C hasta que se utilizaron.

6.11 Extracción de ARN de bazo e hígado

Se sacrificó a cada ratón en una cámara de cloroformo y se extrajo el bazo e hígado. Los órganos se colocaron en una tapa de un tubo Falcon estéril por separado. El bazo se pesó en una balanza analítica para determinar el índice esplénico. En la campana de flujo laminar se maceró el bazo con el émbolo de una jeringa, pasando el tejido a través de una tela de organza estéril y se adicionaron 500

μL de PBS (Apéndice 11.2.2) libre de calcio y magnesio (lo mismo se realizó para el hígado). Posteriormente, las muestras de tejido (bazo o hígado) se centrifugaron a 3,000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se desechó el sobrenadante. Luego de este tiempo el botón formado se resuspendió en 1 mL de agua destilada y se agitó en el vortex. A la suspensión de tejido (bazo o hígado) obtenida, se le adicionaron 400 μL del reactivo de TriPure y se agitó en el vortex para homogenizar. Se pasó el contenido a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se adicionaron 200 μL de la mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (49:1). Se agitó en el vortex 15 minutos y se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 minutos. Posteriormente, se separó la fase acuosa y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Se adicionó un volumen igual al de la fase acuosa de isopropanol previamente enfriado a -20°C y se mezcló suavemente. Se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm durante 15 minutos y se desechó el sobrenadante. Después se adicionaron 500 μL de etanol al 80% en agua DEPC (Apéndice 11.2.2), se agito suavemente y se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm por 15 min y se desechó el sobrenadante. Los tubos se taparon con papel parafilm al que se le hicieron perforaciones con una aguja estéril para permitir que se evaporará el etanol. Se colocaron en un desecador a temperatura ambiente durante toda la noche. Una vez secos se retiró el papel parafilm, se taparon perfectamente y finalmente se almacenaron a -20°C hasta que se utilizaron.

6.12 Hidratación y cuantificación del ARN

Las muestras se hidrataron de la siguiente forma:

- 20 μL de agua DEPC para sangre.
- 100 μL de agua DEPC para bazo.
- 100 μL de agua DEPC para hígado.

Se colocó en un tubo Eppendorf 2 μL de ARN y se adicionaron 198 μL de agua estéril dilución (1:100). La concentración y pureza del ARN de las muestras se determinó mediante la lectura espectrofotométrica a 260 y 280 nm. Se determinó la concentración de ARN, considerando que una 1 unidad de absorción a 260 nm equivale a 40 μg de ARN por mL, mediante la siguiente fórmula:

$$[\text{ARN}] = \frac{\text{Abs } 260 \text{ nm} \times 40\mu\text{g} \times 100}{1000\mu\text{L}} = \mu\text{g}/\mu\text{L}$$

Donde:

Abs 260 nm = Absorbancia de la dilución a 260 nm.

40 $\mu\text{g}/1000 \mu\text{L}$ = Concentración de ARN cuando la absorbancia es 1.

100 = Factor de dilución.

La relación entre A_{260}/A_{280} permite determinar la calidad (pureza) de los ácidos nucleicos. Se considera que el ARN puro tiene una relación de 2, y consideramos un buen grado de pureza el intervalo de relaciones comprendidas entre 1.2 y 2 (87). La concentración del ARN total se calculó realizando diluciones como se mencionó anteriormente, las muestras se colocaron en cubetas de cuarzo y se leyeron en un espectrofotómetro UV a OD260 y OD280 nm y se calculó el radio de las muestras.

6.13 Retrotranscripción

Se retrotranscribieron 1.5 μg de ARN. En un tubo Eppendorf de 0.5 mL se colocaron 1 μL de Oligo dT, agua estéril y el ARN en un volumen total de 10 μL . Se incubó a 65°C por 10 minutos en el termociclador. Luego de este tiempo se colocó en hielo durante 5 minutos y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 segundos. En seguida se volvió a colocar en hielo y se le adicionaron 10 μL de la mezcla de retrotranscripción (4 μL de amortiguador First Strand 5X, 2 μL de dTT 1 M, 20 U de enzima MMLV-RT, 4 U de inhibidor de RNAsa, 2 μL de dNTP's 5 mM, 1.8 μL de agua estéril). Se incubó a 37°C durante 1 hora en el termociclador, nuevamente se incubó a 95°C durante 5 minutos. Se colocó en hielo durante 5 minutos y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 segundos. Después se adicionaron 80 μL de agua estéril libre de nucleasas y se agitó en el vortex. Finalmente se almacenó en alícuotas a -20°C hasta su posterior utilización.

6.14 Preparación de los controles positivos y negativos

Se descongelaron los parásitos de *P. chabaudi* AS y se inocularon en dos ratones CBA/Ca. Se sacrificaron los ratones a los 7 días para obtener la sangre y los eritrocitos

parasitados (EP). Posteriormente, se infectaron 5 ratones CBA/Ca con 5×10^4 EP. Se sacrificaron los ratones a los 7 días post infección para obtener el ARN de sangre. Se retrotranscribió el ARN para generar el ADNc.

A partir del ADNc se amplificaron las muestras para obtener los controles positivos para β -actina, TNF- α e IL-10. Para los controles negativos en lugar de adicionar ADNc a las muestras, se sustituyó con agua estéril.

6.15 Validación de la técnica de RT-PCR en tiempo real para β -actina, TNF- α e IL-10

Se programó el termociclador Applied Biosystems 7500 software v2.0.5 RT-PCR system, el tipo de estudio fue el corrimiento de una curva estándar, al final de la amplificación se programó el análisis de la curva de fusión, se señalaron las muestras a correr, las concentraciones de ADNc empleadas, su posición dentro de la placa, los fluorocromos: JOE para β -actina y FAM para TNF- α e IL-10.

Se preparó la siguiente mezcla de reacción para β -actina, TNF- α e IL-10. La mezcla de reacción contenía los siguientes reactivos: 0.5 μ L de amortiguador 10X, 3 mM de cloruro de magnesio, 0.025 U de Taq polimerasa, 200 nM de cada oligonucleótido, 0.1 μ L de ROX 50X. Después se adicionaron 0.5 μ L de ADN de cada dilución (3 ng/ μ L, 0.6 ng/ μ L, 0.12 ng/ μ L y 0.02 ng/ μ L) y cada dilución se corrió por triplicado. Dependiendo del gene a validar (β -actina, TNF- α o IL-10) se adicionaron los primers adecuados a cada mezcla de reacción. Se procedió a llenar la placa. Se selló perfectamente con film óptico y se centrifugó a 360 rpm por 2 minutos a 4°C y se colocó en el equipo ABI 7500, para la amplificación se siguió el siguiente programa:

(1) 50°C durante 2 minutos, (2) 95°C por 2 minutos, (3) 95°C durante 45 segundos, (4) 65°C por 45 segundos, (5) 72°C durante 45 segundos, se repitieron los pasos 3 a 5 por 45 ciclos. Se incluyó una curva de fusión con los siguientes parámetros: 90°C por 15 segundos, 60°C durante 1 minuto, 90°C por 30 segundos y 60°C durante 15 segundos.

6.16 Amplificación de los genes

Se preparó la mezcla de reacción como se describió anteriormente y se adicionaron los oligos de β -actina, TNF- α , o IL-10 a una concentración de 200 nM. A cada tubo se le adicionó 0.5 μ L de ADN problema y cada muestra se corrió por triplicado. Los tubos se colocaron en hielo y se protegieron de la luz. Después se adicionó igual volumen de agua estéril a los tubos etiquetados como controles negativos. Las muestras (5 μ L) se depositaron en la placa de PCR. Se cubrió la placa con film óptico y se centrifugó a 360 rpm por 2 min a 4°C. Luego de este tiempo se colocó la placa en el termociclador Applied Biosystems 7500 software v2.0.5 RT-PCR system y se corrió el siguiente programa de ciclaje:

(1) 50°C durante 2 minutos, (2) 95°C por 2 minutos, (3) 95°C durante 45 segundos, (4) 65°C por 45 segundos, (5) 72°C durante 45 segundos, se repitieron los pasos 3 a 5 por 45 ciclos. Se incluyó una curva de fusión con los siguientes parámetros: 90°C por 15 segundos, 60°C durante 1 minuto, 90°C por 30 segundos y 60°C durante 15 segundos.

6.17 Análisis estadístico

Los datos se colocaron en una hoja de cálculo y se utilizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida por la prueba estadística de Tukey con el programa StatGraphics. Los datos se expresan como la media geométrica \pm el error estándar. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de P fue menor o igual a 0.05% ($P \leq 0.05$).

6.18 Método de X_0

Para graficar nuestros datos nos basamos en el método de X_0 empleado por Thomsen y cols (88).

1. $X_0 = 2^{\hat{Ct}} - Ct$ promedio (blanco y endógeno). Se tomó en cuenta la eficiencia de los genes (Apéndice 11.4) para hacer el cálculo de X_0 .

2. $N = X_0 \text{ blanco} / X_0 \text{ endógeno}$.
3. $M = N \text{ (Muestra - tratamiento)} / N \text{ (calibrador)}$ (Se calculó el promedio y la SD por cada día de sacrificio (6 y 9)).
4. Graficar.

El software ABI 7500 proporciona automáticamente el Ct promedio

7. RESULTADOS

7.1 Obtención del antígeno

Al determinar la pureza e integridad de la pCry1Ac y del antígeno mediante la realización de una electroforesis en un gel de acrilamida de acuerdo con el método descrito, se observó que las bandas no presentaban deterioro lo que indicó que la proteína como el antígeno no presentaban degradación y se encontraban en buenas condiciones (figura 5). En los carriles 2, 3 y 4 se puede observar una banda muy marcada que corresponde al peso molecular de la protoxina (134 KDa) y la toxina (67 KDa) que coincidió con el esperado (42, 50).

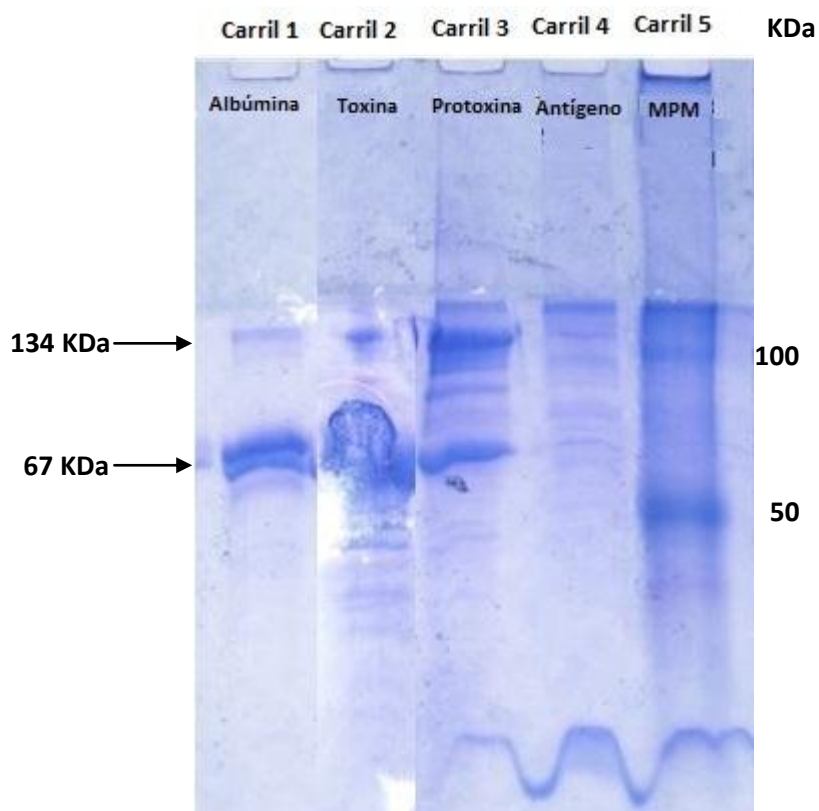


Figura 5. Electroforesis en gel de acrilamida donde se observa la toxina, la protoxina y el antígeno para determinar su pureza e integridad.

7.2 Sobrevida

La infección con *Plasmodium berghei* ANKA es letal en los ratones CBA/Ca por lo que un incremento en el tiempo de sobrevida se puede interpretar como protección, así como también una disminución en los niveles de parasitemia con relación al grupo testigo indicaría cierto grado de protección. Por otro lado, se conoce que la protoxina Cry1Ac y la toxina Cry1Ac inducen inmunidad contra el protozooario *Naegleria fowleri* que genera meningoencefalitis que de otra forma resulta letal para los ratones BALB/c. Además, la administración de la protoxina Cry1Ac también tiene propiedades inmunomoduladoras y adyuvantes, que podrían explicar esa protección. Por lo anterior, en este trabajo se evaluó si la administración previa de toxina o protoxina Cry1Ac induce protección contra *P. berghei* ANKA. En un trabajo anterior utilizando una dosis de 5 µg/ratón se observó cierto grado de protección contra el plasmodio (53), por lo que en este trabajo se probó una dosis diez veces más alta para analizar si se incrementaba el efecto protector y si además la coadministración de la toxina o la protoxina junto con el antígeno de plasmodio mejoraba la protección antes descrita.

Se administró semanalmente una dosis de 50 µg de proteína (toxina, protoxina o antígeno del parásito) por separado a tres grupos de ratones diferentes, también se coadministró antígeno y toxina a otro grupo de ratones y del mismo modo se coadministró al antígeno junto con la protoxina, todos los grupos de ratones recibieron 4 inyecciones (una por semana) y 24 horas después de la última inyección se infectaron intravenosamente con *P. berghei* ANKA. Los resultados se describen a continuación:

La administración de la toxina o la protoxina Cry1Ac disminuyó la sobrevida en comparación con el grupo control que recibió únicamente PBS (los ratones murieron los días 13 y 14 post infección (PI) respectivamente), mientras que el grupo control (PBS) sobrevivió hasta el día 16 PI. La administración de antígeno mejoró por un día la sobrevida (día 17 PI) en relación al grupo control (Fig. 6).

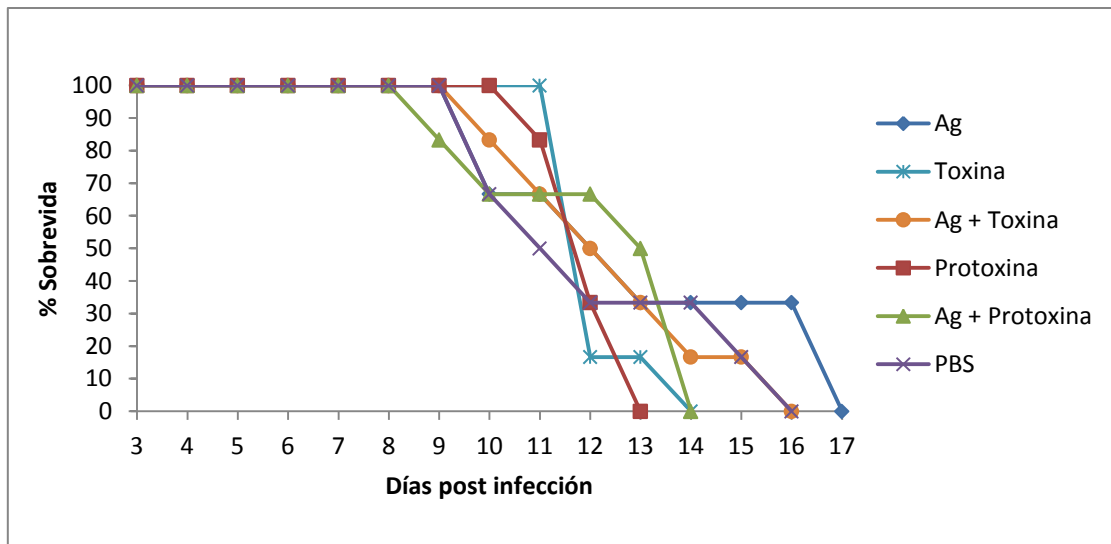


Figura 6. Efecto de la administración de la toxina o la protoxina solas o en combinación con antígeno de *P. berghei* ANKA sobre la sobrevida en ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA. A diferentes grupos de ratones CBA/Ca se les administró la toxina, la protoxina solas o junto con 50 µg de antígeno una vez por semana, durante 4 semanas. Un día después de la última inyección todos los ratones se infectaron vía intravenosa con 1×10^3 eritrocitos parasitados con *P. berghei* ANKA. El número de ratones con el que se inició el experimento se consideró como el 100% y a medida que los ratones morían se calculó el % al que correspondía.

7.3 Parasitemia

En este trabajo, se analizó si la administración de la toxina o la protoxina Cry1Ac junto con antígeno del parásito previo a la infección, modificaba la parasitemia de los ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA. Para lo anterior: al primer grupo se le administraron 50 µg de antígeno junto con 50 µg de protoxina Cry1Ac, al segundo grupo se le administraron 50 µg de antígeno junto con 50 µg de toxina Cry1Ac, al tercer grupo se le administraron 50 µg de antígeno de *P. berghei* ANKA, al cuarto grupo se les administraron 50 µg de protoxina Cry1Ac, al quinto grupo se les administraron 50 µg de toxina Cry1Ac y el sexto grupo que fue el control se les administraron 100 µL de PBS por ratón. Al día siguiente de la última inyección los 6 grupos de ratones CBA/Ca se infectaron por vía intravenosa utilizando 1×10^3 EP con *P. berghei* ANKA por ratón.

La parasitemia se determinó diariamente en cada uno de los grupos a partir del día 3 post infección (PI). Cada punto en las gráficas representa la media geométrica de los resultados obtenidos por día en cada grupo.

En la figura 7 se observa el porcentaje de parasitemia de los grupos de ratones tratados con antígeno (Ag), toxina y el grupo control (PBS), no se detectaron diferencias significativas hasta el día 6 post infección, el grupo al que se le administró toxina a partir del día 7 PI desarrolló un incremento en la parasitemia hasta alcanzar un máximo del 28% en el día 13 PI este valor fue el más alto en comparación con los grupos tratados con Ag, protoxina y PBS. El grupo tratado con protoxina incremento la parasitemia a partir del día 5 PI en el que el nivel fue mayor que los grupos tratados con Ag, toxina y PBS. Sin embargo, a partir del día 7 PI desarrolló niveles menores de parasitemia que los ratones tratados con antígeno, toxina, inclusive que el grupo control en los días 8, 9 y 10 post infección. Además, este grupo tratado con protoxina alcanzó el pico máximo en el día 12 PI con alrededor del 13%, posterior a este día se presentó una ligera disminución de la parasitemia que continuo hasta el día 13 PI cuando perecieron todos los ratones de este grupo. El grupo tratado con antígeno desarrolló parasitemias similares que el tratado con protoxina, pero a partir del día 11 post infección la parasitemia fue menor y sobrevivieron por mayor tiempo (Fig. 7).

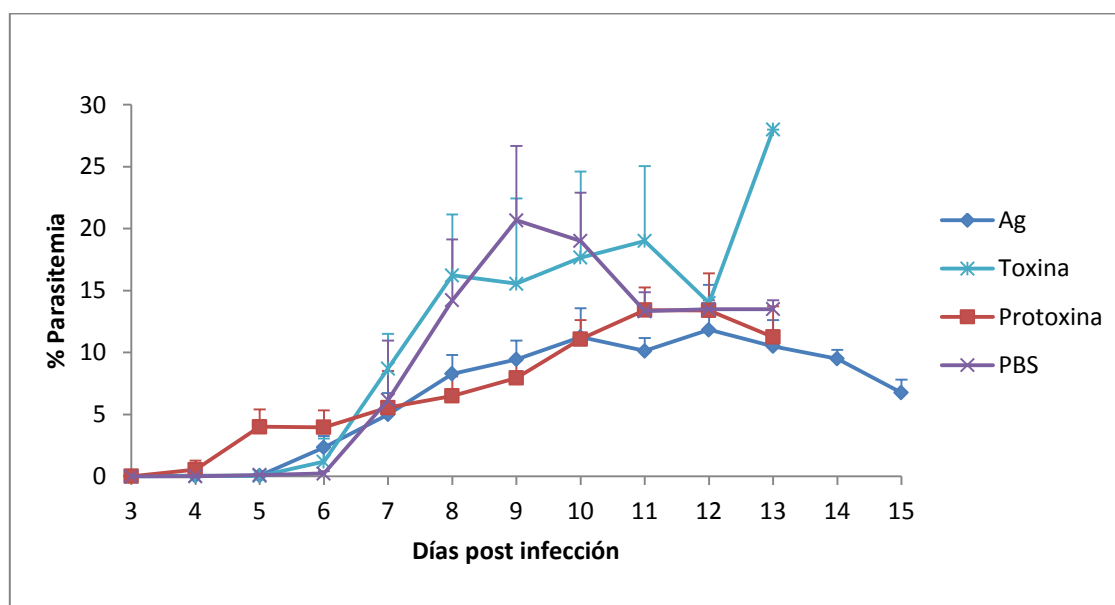


Figura 7. Efecto del tratamiento con Ag, toxina, protoxina y PBS sobre los niveles de parasitemia en ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA. A diferentes grupos de ratones CBA/Ca se les administraron 50 µg de Ag o toxina o protoxina en un volumen final de 100 µL de PBS una vez por semana, durante 4 semanas. Un día después de la última inyección todos los ratones se infectaron vía intravenosa con 1×10^3 eritrocitos parasitados con *P. berghei* ANKA. Diariamente se evaluó la parasitemia por microscopía óptica en frotis sanguíneos fijados con metanol y teñidos con Giemsa.

Para evaluar si la administración del antígeno de *P. berghei* ANKA en combinación con la toxina o con la protoxina Cry1Ac inducían una mejor protección que cuando se

administraban solas, se trataron diferentes grupos de ratones con un extracto crudo de antígeno de *P. berghei* ANKA que se les administró junto con 50 µg de toxina o 50 µg de protoxina o PBS.

La parasitemia se incrementó de manera similar en la mayoría de los grupos y no se detectaron diferencias significativas hasta el día 6 post infección, a excepción del grupo tratado con Ag junto con la protoxina donde la parasitemia se incrementó a partir del día 5 PI, no obstante se desarrolló un incremento moderado de la parasitemia desde el día 5 PI hasta alcanzar un máximo del 13% en el día 10 PI. Interesantemente, este grupo fue el que desarrolló mejor protección contra la infección de *P. berghei* ANKA dado que los niveles de parasitemia fueron los más bajos en comparación con los grupos tratados con Ag junto con la toxina, el grupo control (PBS) e inclusive el antígeno, a excepción de los días 5, 6, 7 y 10 post infección (Fig. 8).

En contraste, el grupo de ratones tratados con antígeno junto con la toxina desarrolló parasitemias mayores en comparación con los grupos tratados con antígeno, antígeno junto con la protoxina y el grupo control a partir del día 7 post infección, incrementando hasta el día 13 PI, cuando alcanzó un máximo del 28.5%, mostrando una ligera disminución de la parasitemia el día 10 PI (Fig. 8).

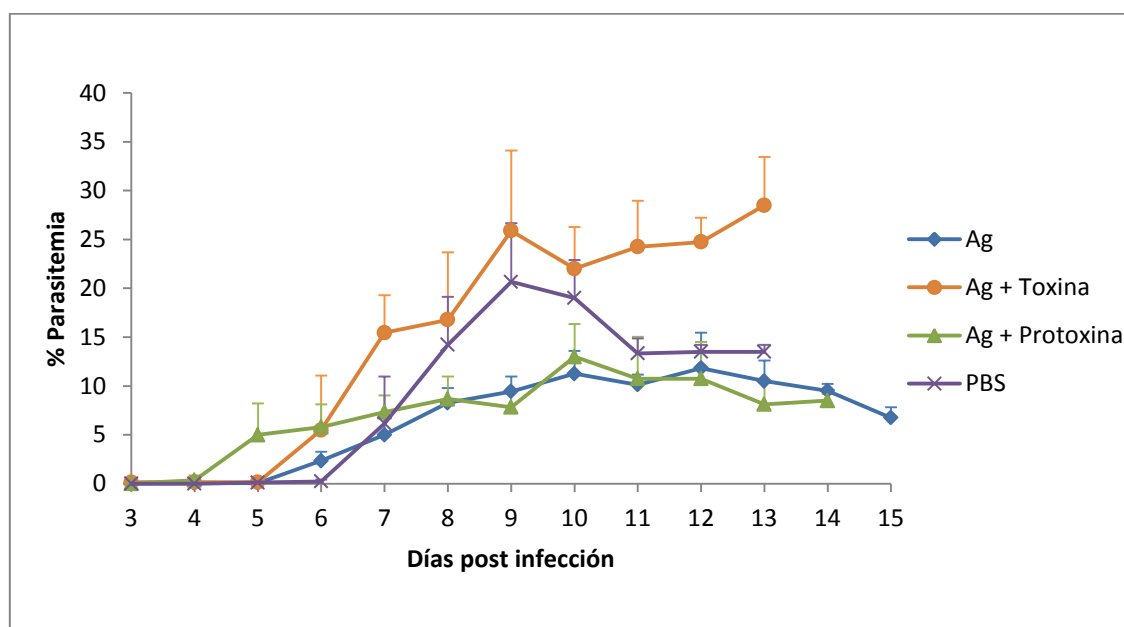


Figura 8. Efecto de la coadministración de antígeno con toxina y protoxina sobre los niveles de parasitemia en ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA. A diferentes grupos de ratones CBA/Ca se les administraron 50 µg de Ag, o 50 µg de toxina junto con 50 µg de Ag, o 50 µg de protoxina junto con 50 µg de Ag una vez por semana, durante 4 semanas. Un día después de la última inyección todos los ratones se infectaron vía intravenosa con 1×10^3 eritrocitos parasitados con *P. berghei* ANKA. Diariamente se evaluó la parasitemia por microscopía óptica en frotis sanguíneos fijados con metanol y teñidos con Giemsa.

El grupo de ratones tratados con el antígeno, no mostró diferencias significativas en comparación con el grupo control hasta el día 7 post infección, en que el grupo tratado con el antígeno incrementó la parasitemia hasta alcanzar un máximo alrededor del 10% en el día 12 PI, posterior a ese día se presentó una progresiva disminución de la parasitemia hasta el día 15 PI en el que este grupo de ratones murió. En el grupo de ratones tratados con el vehículo (PBS), los niveles de parasitemia se incrementaron de forma rápida después del día 6 PI y alcanzó el pico máximo (20%) el día 9 PI. Posteriormente, se presentó una disminución y los ratones murieron el día 13 PI (Fig. 9).

Los grupos de ratones tratados con antígeno y antígeno junto con la protoxina desarrollaron niveles de parasitemia similares, hasta el día 10 post infección, posteriormente, el grupo que recibió la protoxina Cry1Ac desarrolló un ligero incremento en los niveles de parasitemia a partir del día 10 PI en comparación con el grupo de ratones tratados con antígeno. Asimismo, los grupos tratados con antígeno y antígeno coadministrado con protoxina sobrevivieron por más tiempo y con parasitemias menores que los grupos control y el que solo se administró la protoxina, lo que sugiere que la concentración de protoxina utilizada en combinación con el antígeno protegió ligeramente mejor que la administración del antígeno solo (Fig. 9).

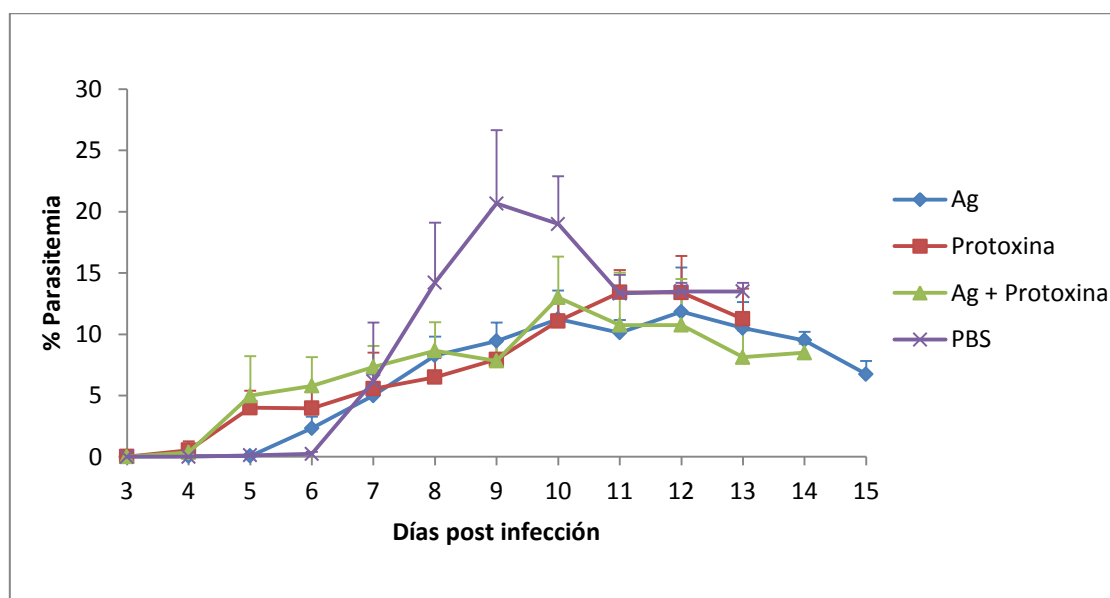


Figura 9. Efecto del tratamiento con Ag, protoxina, Ag junto con protoxina y PBS sobre los niveles de parasitemia en ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA. A diferentes grupos de ratones CBA/Ca se les administraron 50 µg de Ag en un volumen final de 100 µL de PBS, 50 µg de protoxina junto con 50 µg de Ag en un volumen final de 100 µL de PBS una vez por semana, durante 4 semanas. Un día después de la última inyección todos los ratones se infectaron vía intravenosa con 1×10^3 eritrocitos parasitados con *P. berghei* ANKA. Diariamente se evaluó la parasitemia por microscopía óptica en frotis sanguíneos fijados con metanol y teñidos con Giemsa.

El grupo de ratones tratado con la toxina Cry1Ac desarrolló un incremento en la parasitemia a partir del día 6 post infección y no presentó diferencias significativas en comparación con el grupo que recibió Ag junto con la toxina Cry1Ac, hasta el día 5 PI, en donde la parasitemia fue menor que en el grupo control; sin embargo, posteriormente desarrolló parasitemias mayores que el grupo control. Interesantemente, el grupo de ratones al que se le coadministró Ag junto con la toxina desarrollo los niveles más altos de parasitemia a partir del día 5 PI en comparación con los grupos que únicamente recibieron toxina o antígeno, lo que sugiere que a las concentraciones utilizadas la combinación de antígeno con toxina Cry1Ac no generó protección (Fig. 10).

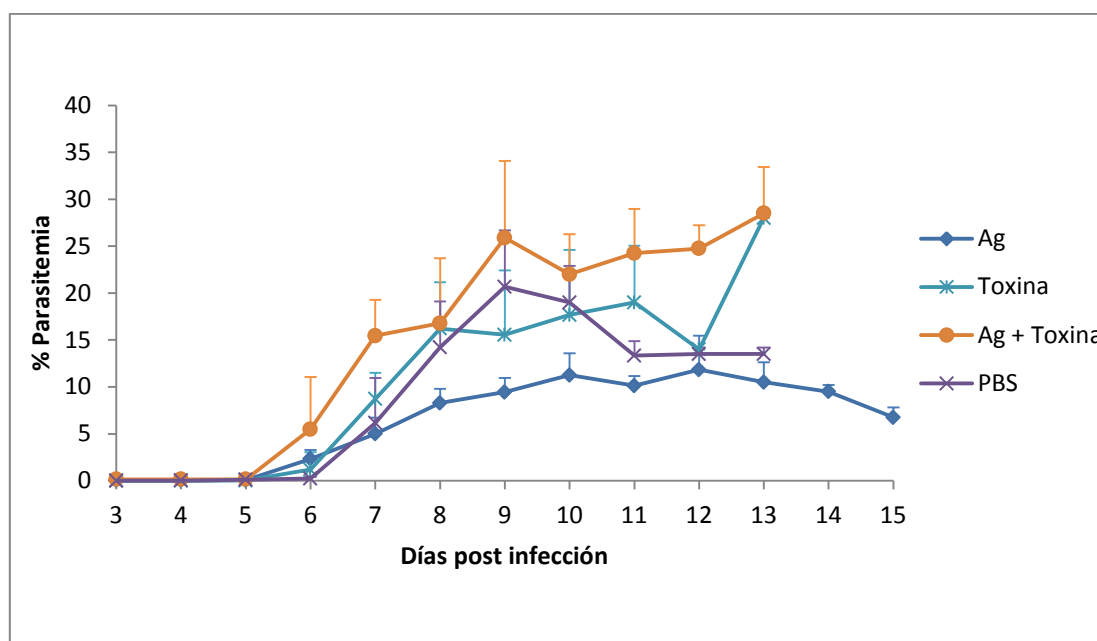


Figura 10. Efecto del tratamiento con Ag, toxina, antígeno junto con toxina y PBS sobre los niveles de parasitemia en ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA. A diferentes grupos de ratones CBA/Ca se les administraron 50 µg de Ag en un volumen final de 100 µL de PBS, 50 µg de toxina junto con 50 µg de Ag en un volumen final de 100 µL de PBS una vez por semana, durante 4 semanas. Un día después de la última inyección todos los ratones se infectaron vía intravenosa con 1×10^3 eritrocitos parasitados con *P. berghei* ANKA. Diariamente se evaluó la parasitemia por microscopía óptica en frotis sanguíneos fijados con metanol y teñidos con Giemsa.

7.4 Pérdida de peso

La pérdida de peso en la infección por plasmodio puede deberse a múltiples factores, uno de los más importantes es la citocina TNF- α que induce caquexia e incrementa el metabolismo de lípidos y proteínas ocasionando la pérdida de peso, el

TNF- α es una citocina proinflamatoria, que está involucrada en la activación de macrófagos para la eliminación del plasmodio, pero también esta asociada a la patología que se observa en esta enfermedad (64).

El día que se infectaron los ratones con el *Plasmodium* se registró el peso de cada ratón y se consideró como el día 0, ese valor correspondió al 100%, a partir del día 3 post infección los ratones se pesaron diariamente para evaluar los cambios en el peso corporal. Cada punto en las gráficas representa el porcentaje de la pérdida de peso en relación con el 100% que tenían al iniciar la infección con el plasmodio.

En los primeros 10 días de la infección el grupo control presentó la mayor pérdida de peso lo que indica que tanto la administración de la protoxina, la toxina o el antígeno modulan la respuesta inmune evitando al menos en parte la pérdida de peso. La administración de la protoxina generó menor pérdida de peso que la administración de la toxina (Fig. 11).

La administración de Ag solo o combinado con protoxina generó que los primeros días de la infección los ratones no perdieran peso e inclusive incrementaran peso en los primeros 7 días PI. Los ratones tratados únicamente con antígeno presentaron una tendencia a recuperar peso a partir del día 11 PI en comparación con los grupos que se coadministraron con antígeno y protoxina o antígeno y toxina (Fig. 11).

Un hallazgo interesante es que durante los primeros días post infección los ratones tratados con el antígeno, la protoxina, Ag junto con la protoxina y la coadministración del Ag junto con la toxina tuvieron una ganancia de peso, esto continuó hasta el día 7 PI cuando empezaron a perder peso (Fig. 11).

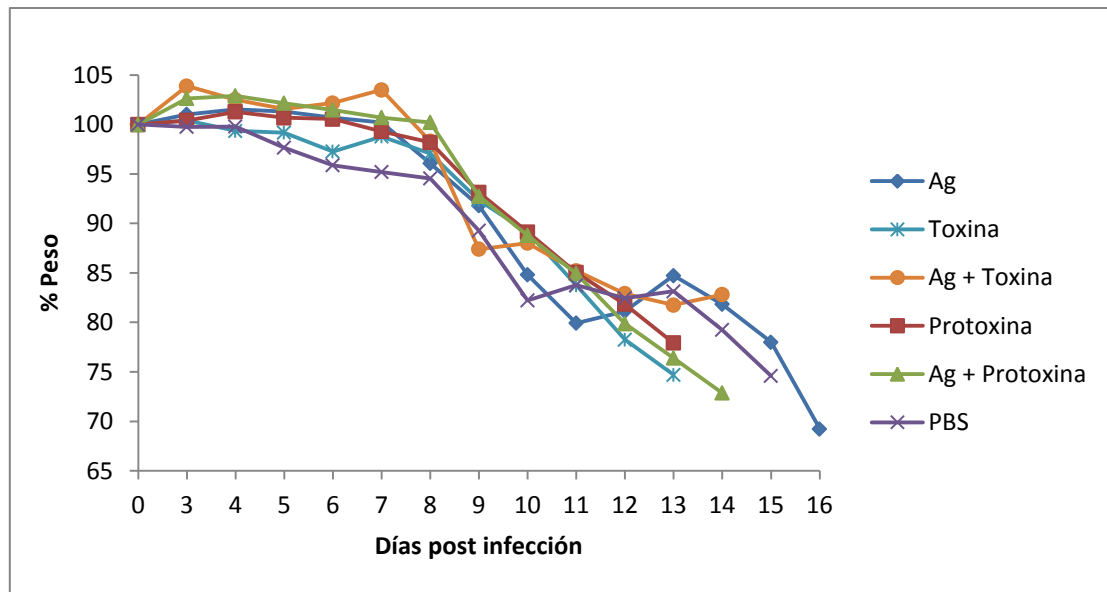


Figura 11. Efecto de la coadministración de antígeno con la toxina o la protoxina o el antígeno sobre la pérdida de peso en los ratones infectados con *P. berghei* ANKA. A diferentes grupos de ratones CBA/Ca se les administraron 50 µg de Ag, 50 µg toxina o 50 µg protoxina o PBS, 50 µg de Ag junto con 50 µg de toxina y 50 µg de Ag junto con la protoxina una vez por semana, durante 4 semanas. Un día después de la última inyección todos los ratones se infectaron vía intravenosa con 1×10^3 eritrocitos parasitados con *P. berghei* ANKA, los ratones se pesaron antes y diariamente después de la infección, se tomó como 100% el peso en el día que se infectaron los ratones (día 0) representando el porcentaje de la pérdida de peso en el transcurso de la infección.

7.5 Concentración de hemoglobina [Hb]

La hemoglobina es una molécula que se encuentra en el interior de los eritrocitos y su función principal es transportar oxígeno a los tejidos. El parásito se alimenta de hemoglobina y por lo tanto disminuye el aporte de oxígeno a los tejidos, lo que genera la señal para la producción de nuevos eritrocitos, sin embargo, estos nuevos eritrocitos también se infectan o se destruyen y cuando el organismo no puede compensar esa pérdida se presenta la anemia que también se ha asociado con las citocinas IL-10 y TNF- α (89, 90). Por lo tanto la anemia es una medida de la patología que se genera en malaria y analizar la concentración de hemoglobina podría servir como parámetro para medir la protección generada por la toxina o la protoxina solas o en combinación con el antígeno de plasmodio.

La destrucción masiva de eritrocitos en los individuos infectados con *Plasmodium*, se debe principalmente que tanto a eritrocitos parasitados como aquellos sanos que han fijado en su superficie antígenos solubles del parásito, se destruyen por el sistema retículo endotelial al pasar por el bazo, dado que son reconocidos por el sistema inmune como extraños, es decir, la respuesta inmune es la responsable en mayor parte

de la destrucción de eritrocitos sanos lo que genera la anemia característica en malaria (89).

A medida que transcurre la infección, en todos los grupos se presentó una disminución de la concentración de hemoglobina, los grupos que presentaron los niveles más elevados fueron los tratados con antígeno y antígeno con toxina en el día 6 PI. Mientras que no se detectaron diferencias significativas en los grupos tratados con protoxina, antígeno con protoxina y toxina respecto al grupo control en ese mismo día. En el día 9 PI los niveles en todos los grupos fueron similares, no obstante al grupo que se coadministró el antígeno junto con la toxina y el grupo de antígeno fueron los que presentaron los niveles más bajos respecto al grupo control. Los resultados indican que la administración de antígeno solo o en combinación con la toxina induce una protección temporal para el rompimiento de eritrocitos (Fig. 12).

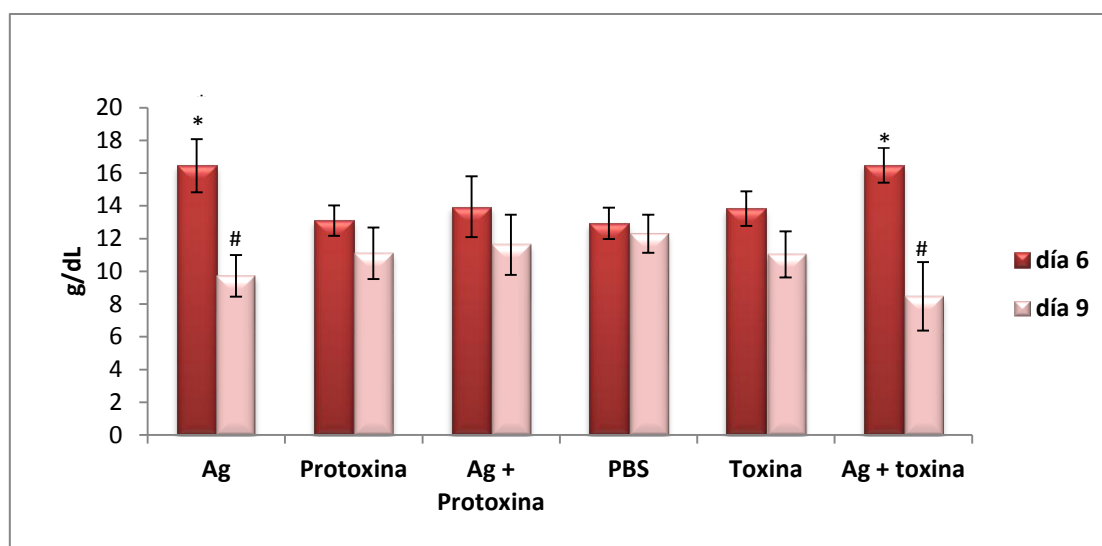


Figura 12. Efecto del tratamiento con protoxina o toxina Cry1Ac solas y en combinación con el Ag de *Plasmodium* sobre los niveles de hemoglobina en ratones infectados con *P. berghei* ANKA. A diferentes grupos de ratones CBA/Ca se les administraron 50 µg de Ag, 50 µg de protoxina, 50 µg de Ag junto con 50 µg de protoxina, 50 µg de toxina, 50 µg de Ag junto con la toxina en un volumen de 100 µL de PBS una vez por semana, durante 4 semanas. Un día después la última administración, se infectaron vía intravenosa con 1×10^3 EP de *P. berghei* ANKA. Los ratones se sacrificaron a los días 6 y 9 post infección en los que se determinó la concentración de hemoglobina por la reacción de la cianometahemoglobina. Se utilizó el reactivo de Drabkin y un estándar de Hb, se leyó la absorbancia a 540 nm. Para el análisis de los resultados se utilizó ANOVA seguida por la prueba estadística de Tukey $P \leq 0.05$ (StatGraphics). *Indica diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control en el día 6. #Indica diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control en el día 9.

7.6 Índice esplénico

El índice esplénico es una forma de evaluar la proliferación de células del bazo que es proporcional a la estimulación antigénica.

La fase sanguínea de la primoinfección por *Plasmodium* en el humano, se caracteriza por un incremento en la fragilidad del bazo con esplenomegalia, este fenómeno es en parte el resultado de la activación del sistema inmune lo que genera proliferación de las células T y B del bazo así como de un incremento en la actividad fagocítica del sistema retículo endotelial (91).

En todos los grupos de ratones el índice esplénico fue mayor en el día 9 post infección, lo que corresponde a una mayor estimulación antigénica como se evidencia en los niveles de parasitemia. En el día 6 PI el mayor índice esplénico se detectó en los grupos de ratones tratados con antígeno, antígeno con toxina y toxina. Sin embargo, los ratones a los que se les coadministró el antígeno junto con la toxina mostraron un índice esplénico menor al de los ratones que recibieron el antígeno o la toxina únicamente (Fig. 13).

En el día 9 post infección los grupos que presentaron el mayor índice esplénico fueron los que recibieron antígeno, toxina y antígeno junto con toxina. Además, en este día los ratones que recibieron antígeno fueron los que desarrollaron el mayor índice esplénico, la administración de protoxina sola o en combinación con el antígeno generó una disminución del índice esplénico en comparación con el grupo que recibió antígeno únicamente en el día 9 (Fig.13).

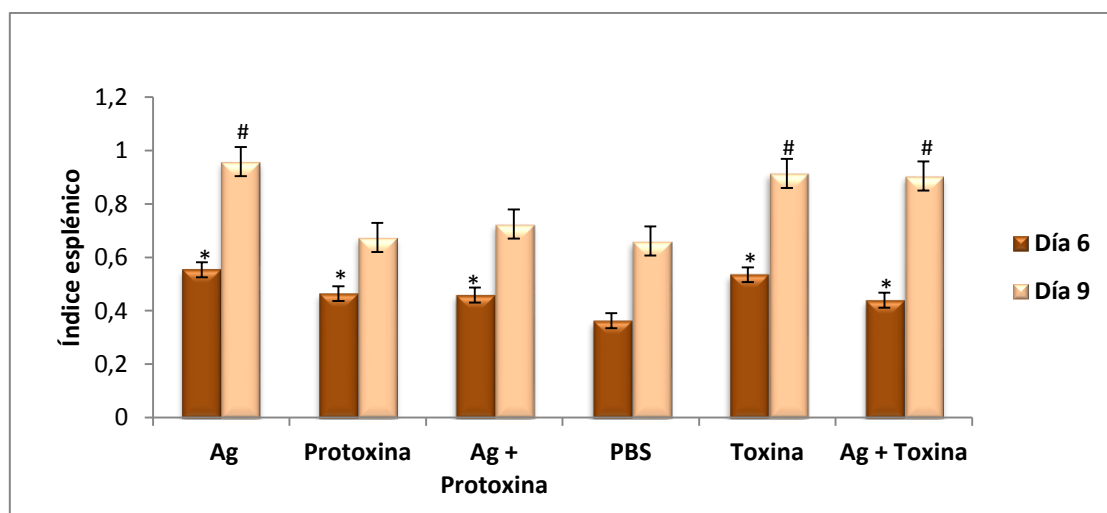


Figura 13. Efecto de la administración de la protoxina o la toxina Cry1Ac solas y en combinación con el Ag de *Plasmodium* sobre los niveles del índice esplénico. A diferentes grupos de ratones CBA/Ca se les administraron 50 µg de Ag, 50 µg de protoxina, 50 µg de Ag junto con 50 µg de protoxina, 50 µg de toxina, 50 µg de Ag junto con toxina, durante 4 semanas. Un día después de la última administración, todos los grupos se infectaron con 1×10^3 EP en 100 µL de PBS vía intravenosa. Los ratones se sacrificaron a los días 6 y 9 post infección, se extrajo el bazo y se determinó el índice esplénico, el cual se obtuvo de la relación entre el peso del bazo y el peso del ratón. Para el análisis de los resultados se utilizó ANOVA seguida por la prueba estadística de Tukey $P \leq 0.05$ (StatGraphics). *Indica diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control en el día 6. #Indica diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control en el día 9.

7.7 Efecto de la administración de toxina o protoxina sobre la expresión relativa de TNF- α en bazo de ratones infectados con *P. berghei* ANKA

Las células dendríticas se activan *in vivo* en el bazo, procesan y presentan los antígenos de la malaria durante la infección, originando citocinas que contribuyen a la polarización de la respuesta de las células TCD4⁺. Las células dendríticas fagocitan a los eritrocitos infectados y presentan los péptidos de las proteínas del parásito en un contexto de moléculas del complejo de histocompatibilidad (MHC)-II, los antígenos estimulan el incremento en la expresión de moléculas coestimuladoras en células dendríticas y estas inducen la producción de citocinas proinflamatorias como IL-12, TNF- α e IL-6 (35).

Además, se ha descrito que durante la infección con plasmodio se desarrolla una fuerte respuesta proinflamatoria que se caracteriza por un incremento en la producción de citocinas como IFN- γ y TNF- α que están involucradas tanto en la eliminación del parásito como en la patología. En este trabajo se evaluó si la administración de la toxina o la protoxina administradas solas o en combinación con antígeno de plasmodio modificaban la expresión de TNF- α en la sangre y en el bazo. Se determinó la expresión en el bazo dado que es el sitio de eliminación del plasmodio (92) y en la sangre dado que la infección se presenta en los eritrocitos que tienen una circulación sistémica.

En general se detectaron niveles más elevados en el día 6 que en el día 9 post infección, lo que indica que esta citocina tiene una expresión de corta duración. La administración de protoxina moduló negativamente la expresión de TNF- α en el día 6 y no se modificó en el día 9 con respecto al grupo control. Cuando la protoxina se administró junto con el Ag no se modificó la expresión en el día 6 pero en el día 9 se sobreexpresó en relación al grupo control. La administración de toxina moduló positivamente la expresión de TNF- α en el día 6 y no se modificó en el día 9 en comparación con el grupo control. La administración de antígeno de plasmodio no modificó la expresión de esta citocina en los días 6 y 9 en relación al grupo control. Los grupos tratados con Ag, Ag junto con la protoxina y Ag junto con la toxina no mostraron diferencia significativa respecto al grupo control (PBS) en el día 6 PI. (Fig. 14).

Interesantemente, cuando la protoxina se coadministró con el Ag se detectó una mayor expresión de TNF- α en el día 9 PI con respecto al grupo donde solo se administró a la protoxina.

En el día 9 PI la expresión de TNF- α disminuyó en todos los grupos, los grupos de ratones a los que se les coadministró Ag junto con la protoxina y la toxina junto con el Ag fueron los que presentaron una mayor expresión de TNF- α respecto a los grupos tratados con Ag, protoxina y toxina inclusive que el grupo control. No se detectaron diferencias significativas de los grupos tratados con Ag, protoxina y toxina solas con respecto al grupo control en el día 9 PI. Así como tampoco hubo diferencia significativa en el grupo de ratones tratados con la toxina comparado con el grupo tratado con Ag (Fig. 14).

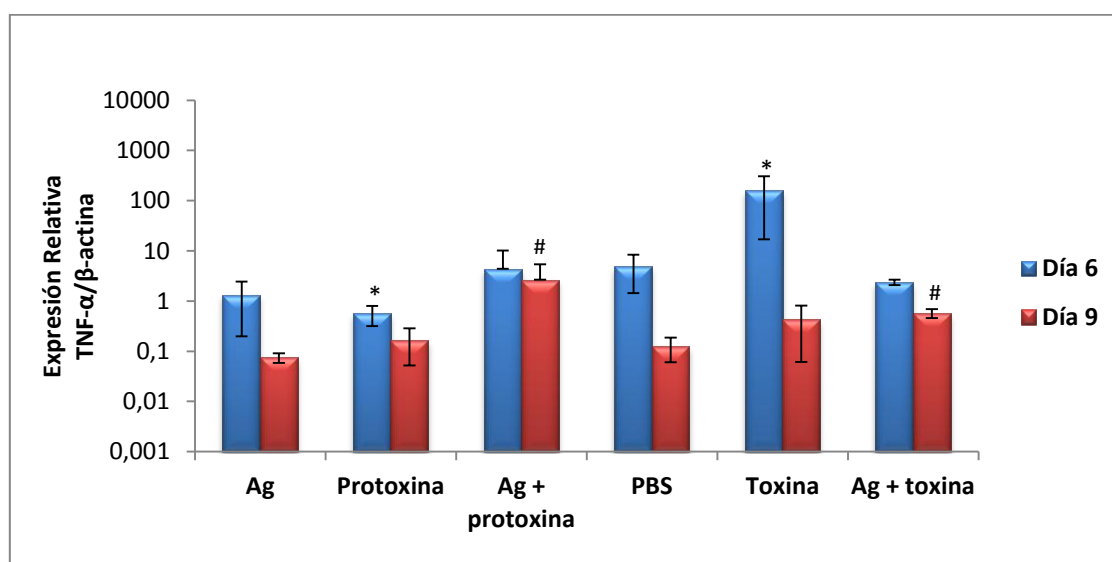


Figura 14. Efecto de la administración de protoxina Cry1Ac, toxina Cry1Ac solas o en combinación con antígeno de plasmodio sobre la expresión relativa de TNF- α en relación a la expresión de β -actina en el bazo de ratones infectados con *P. berghei* ANKA. Los ratones se trataron con la protoxina, la toxina solas o en combinación con el antígeno de plasmodio durante cuatro semanas (1 vez por semana) un día después de la última administración, los ratones se infectaron con *P. berghei* ANKA. Tres ratones de cada grupo se sacrificaron los días 6 y 9 post infección y se les extrajo el ARN de bazo, el cual se retrotranscribió y se amplificó por PCR en tiempo real. Se utilizó el método de X_0 para realizar las gráficas. Para el análisis de los resultados se utilizó ANOVA seguida por la prueba estadística de Tukey $P \leq 0.05$ (StatGraphics). *Indica diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control en el día 6. #Indica diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control en el día 9.

7.8 Efecto de la administración de toxina o protoxina sobre la expresión relativa de TNF- α en hígado de ratones infectados con *P. berghei* ANKA

Dado que la infección por plasmodio también se afecta al hígado, en este trabajo se analizó si la administración de la toxina Cry1Ac o de la protoxina Cry1Ac solas o en combinación con el antígeno modificaban la expresión de TNF- α en el hígado.

Los grupos de ratones tratados con Ag, protoxina, toxina, Ag junto con la toxina no presentaron diferencia significativa con respecto al grupo control en los días 6 y 9 PI. Únicamente, el grupo que se coadministró con Ag junto con la protoxina tuvo una expresión significativamente mayor que el grupo control en el día 6 PI. En el día 9 PI no se detectaron diferencias significativas en ninguno de los grupos de ratones con relación al grupo control (Fig. 15).

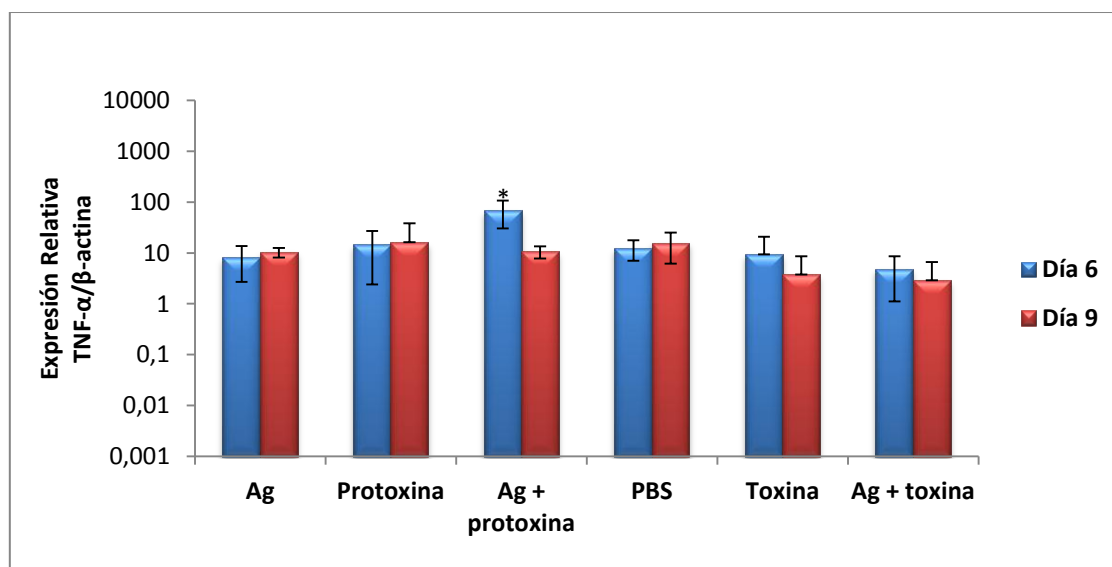


Figura 15. Efecto de la administración de protoxina Cry1Ac, toxina Cry1Ac solas o en combinación con antígeno de plasmodio sobre la expresión relativa de TNF- α en relación a la expresión de β -actina en el hígado de ratones infectados con *P. berghei* ANKA. Los ratones se trataron con la protoxina, la toxina solas o en combinación con el antígeno de plasmodio durante cuatro semanas (1 vez por semana) un día después de la última administración, los ratones se infectaron con *P. berghei* ANKA. Tres ratones de cada grupo se sacrificaron los días 6 y 9 post infección y se les extrajo el ARN de hígado, el cual se retrotranscribió y se amplificó por PCR en tiempo real. Se utilizó el método de X_0 para realizar las gráficas. Para el análisis de los resultados se utilizó ANOVA seguida por la prueba estadística de Tukey $P \leq 0.05$ (StatGraphics). *Indica diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control en el día 6.

7.9 Efecto de la administración de toxina o protoxina sobre la expresión relativa de TNF- α en sangre de ratones infectados con *P. berghei* ANKA.

Dado que el parásito circula de forma sistémica en el organismo, decidimos evaluar la expresión de TNF- α en la sangre.

Los niveles más altos se detectaron en los grupos tratados con protoxina y toxina en el día 6 PI. Ningún tratamiento modificó la expresión de TNF- α en el día 6 PI. Los grupos tratados con Ag, Ag junto con la protoxina y Ag junto con la toxina tuvieron expresiones significativamente menores que el grupo control. Este resultado sugiere que la administración del Ag solo o combinado junto a la toxina o la protoxina modula negativamente la expresión de TNF- α en la sangre de los ratones infectados con *P. berghei* ANKA (Fig. 16).

En el día 9 PI detectamos que la administración de antígeno moduló negativamente la expresión de TNF- α en la sangre en los grupos que recibieron únicamente antígeno y antígeno coadministrado con protoxina, mientras que la administración de antígeno junto con la toxina y la toxina sola moduló positivamente la expresión de esta citocina con respecto al grupo control (Fig. 16).

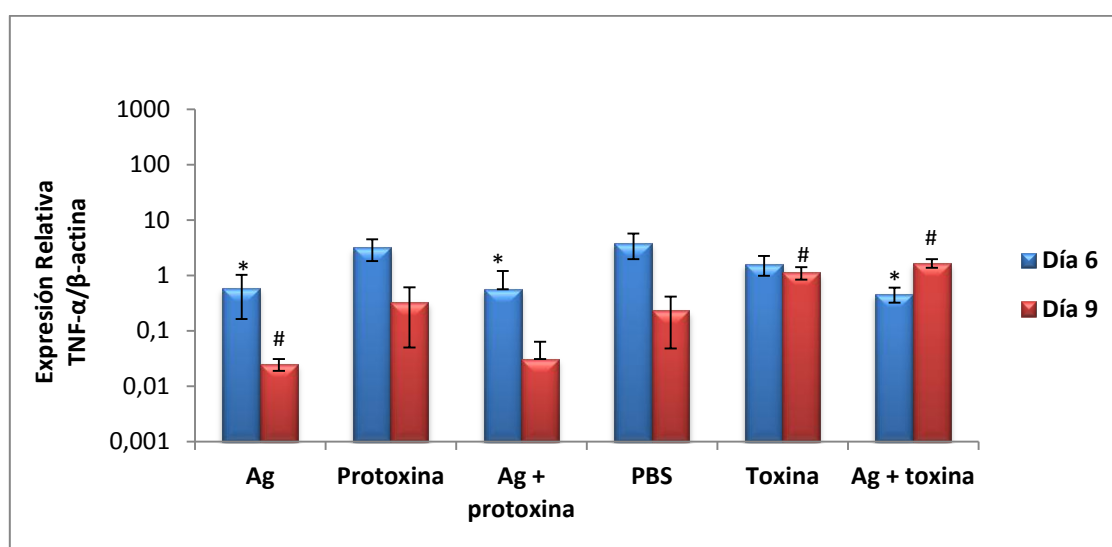


Figura 16. Efecto de la administración de protoxina Cry1Ac, toxina Cry1Ac solas o en combinación con antígeno de plasmodio sobre la expresión relativa de TNF- α en relación a la expresión de β -actina en la sangre de ratones infectados con *P. berghei* ANKA. Los ratones se trataron con la protoxina, la toxina solas o en combinación con el antígeno de plasmodio durante cuatro semanas (1 vez por semana) un día después de la última administración, los ratones se infectaron con *P. berghei* ANKA. Tres ratones de cada grupo se sacrificaron los días 6 y 9 post infección y se les extrajo el ARN de sangre periférica, el cual se retrotranscribió y se amplificó por PCR en tiempo real. Se utilizó el método de X_0 para realizar las gráficas. Para el análisis de los resultados se utilizó ANOVA seguida por la prueba estadística de Tukey $P \leq 0.05$ (StatGraphics). *Indica diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control en el día 6. #Indica diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control en el día 9.

7.10 Efecto de la administración de toxina o protoxina sobre la expresión relativa de IL-10 en bazo de ratones infectados con *P. berghei* ANKA

En este trabajo, también analizamos la expresión de IL-10 una citocina reguladora de la respuesta inmune importante en la infección causada por plasmodio. En el día 6 PI la expresión más alta de IL-10 la presentó el grupo tratado con la toxina en donde se detectó diferencia significativa con respecto al grupo control. En el día 9 post infección, el grupo tratado con antígeno, el coadministrado con antígeno junto con la toxina y el que recibió únicamente a la toxina, modularon negativamente la expresión de esta citocina con respecto al grupo control (Fig. 17).

En general los niveles de expresión de la IL-10 fueron más elevados en el día 9 PI a excepción del grupo tratado con la toxina que desarrolló niveles más elevados en el día 6 comparados con el día 9 (Fig. 17).

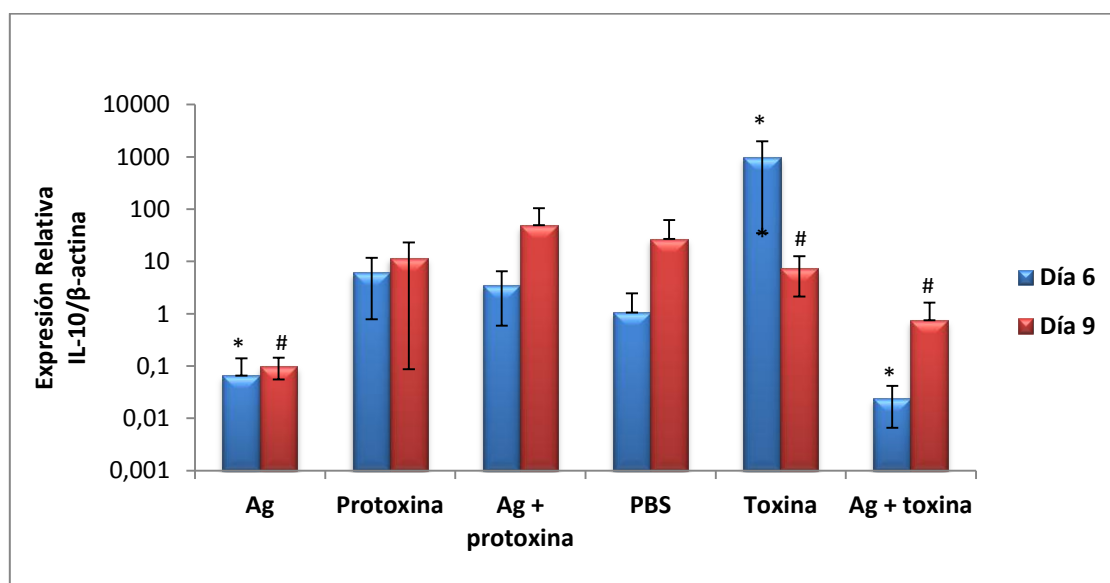


Figura 17. Efecto de la administración de protoxina Cry1Ac, toxina Cry1Ac solas o en combinación con antígeno de plasmodio sobre la expresión relativa de IL-10 en relación a la expresión de β-actina en bazo de ratones infectados con *P. berghei* ANKA. Los ratones se trataron con la protoxina, la toxina solas o en combinación con el antígeno de plasmodio durante cuatro semanas (1 vez por semana) un día después de la última administración, los ratones se infectaron con *P. berghei* ANKA. Tres ratones de cada grupo se sacrificaron los días 6 y 9 post infección y se les extrajo el ARN de bazo, el cual se retrotranscribió y se amplificó por PCR en tiempo real. Se utilizó el método de X_0 para realizar las gráficas. Para el análisis de los resultados se utilizó ANOVA seguida por la prueba estadística de Tukey $P \leq 0.05$ (StatGraphics). *Indica diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control en el día 6. #Indica diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control en el día 9.

7.11 Efecto de la administración de toxina o protoxina sobre la expresión relativa de IL-10 en hígado de ratones infectados con *P. berghei* ANKA

En el día 6 PI la expresión de la IL-10 es mucho menor que la que se observó en el día 9 PI.

En el día 6 todos los grupos de ratones mostraron niveles de IL-10 significativamente menores que el grupo control. En el día 9 post infección se repitió la tendencia de una expresión de IL-10 significativamente menor con respecto al grupo control. Los resultados sugieren que los tratamientos modulan negativamente la expresión de IL-10 en el hígado de los ratones infectados con el plasmodio tanto en el día 6 como en el día 9 (Fig. 18).

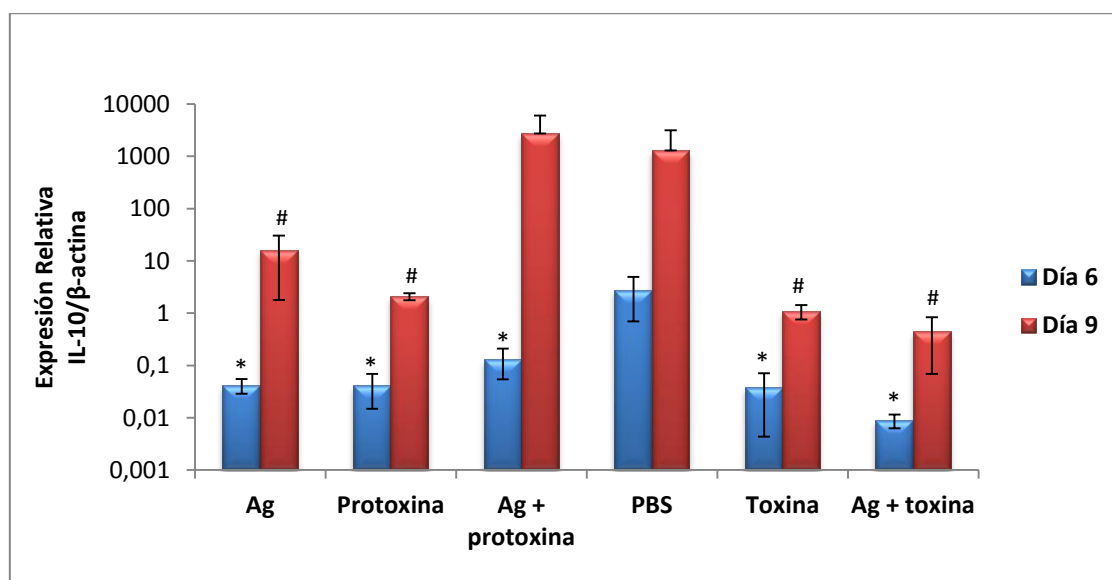


Figura 18. Efecto de la administración de protoxina Cry1Ac, toxina Cry1Ac solas o en combinación con antígeno de plasmodio sobre la expresión relativa de IL-10 en relación a la expresión de β -actina en hígado de ratones infectados con *P. berghei* ANKA. Los ratones se trataron con la protoxina, la toxina solas o en combinación con el antígeno de plasmodio durante cuatro semanas (1 vez por semana) un día después de la última administración, los ratones se infectaron con *P. berghei* ANKA. Tres ratones de cada grupo se sacrificaron los días 6 y 9 post infección y se les extrajo el ARN de hígado, el cual se retrotranscribió y se amplificó por PCR en tiempo real. Se utilizó el método de X_0 para realizar las gráficas. Para el análisis de los resultados se utilizó ANOVA seguida por la prueba estadística de Tukey $P \leq 0.05$ (StatGraphics). *Indica diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control en el día 6. #Indica diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control en el día 9.

7.12 Efecto de la administración de toxina o protoxina sobre la expresión relativa de IL-10 en sangre de ratones infectados con *P. berghei* ANKA

En el día 6 existió una mayor expresión de IL-10 en comparación con el día 9 post infección. No se detectaron diferencias significativas entre los grupos tratados con respecto al grupo control.

En el día 9 PI el grupo que tuvo una mayor expresión fue el que se trató con la toxina y presentó una diferencia significativa respecto al control. Los grupos tratados con Ag y Ag junto con la protoxina presentaron niveles de expresión de IL-10 significativamente menores que el grupo control y presentaron diferencias significativas entre ellos en el día 9 PI (Fig. 19).

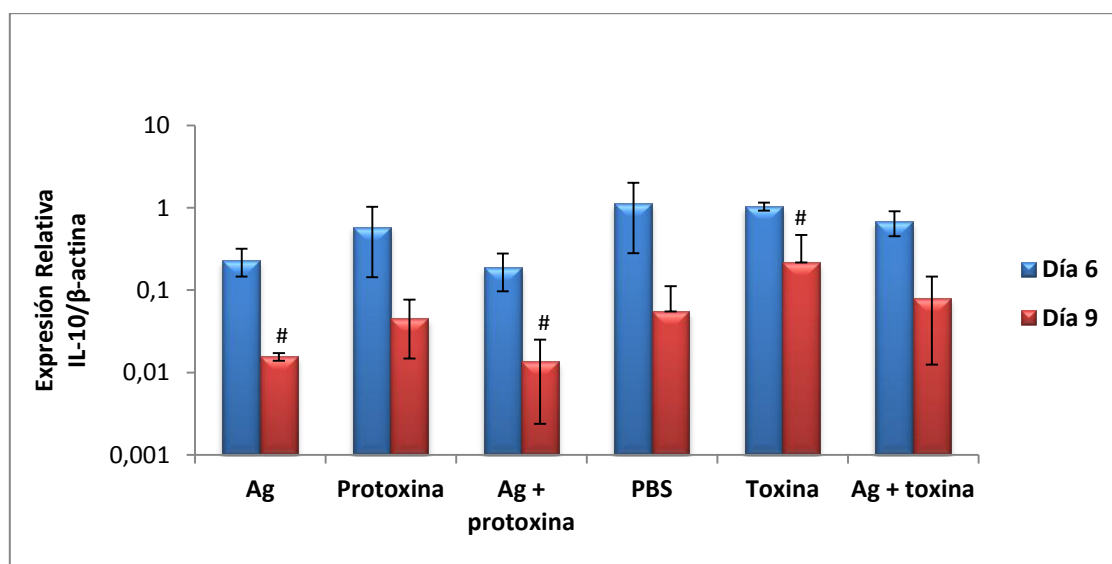


Figura 19. Efecto de la administración de protoxina Cry1Ac, toxina Cry1Ac solas o en combinación con antígeno de plasmodio sobre la expresión relativa de IL-10 en relación a la expresión de β -actina en la sangre de ratones infectados con *P. berghei* ANKA. Los ratones se trataron con la protoxina, la toxina solas o en combinación con el antígeno de plasmodio durante cuatro semanas (1 vez por semana). Un día después de la última administración, los ratones se infectaron con *P. berghei* ANKA. Tres ratones de cada grupo se sacrificaron los días 6 y 9 post infección y se les extrajo el ARN de sangre periférica, el cual se retrotranscribió y se amplificó por PCR en tiempo real. Se utilizó el método de X_0 para realizar las gráficas. Para el análisis de los resultados se utilizó ANOVA seguida por la prueba estadística de Tukey $P \leq 0.05$ (StatGraphics). #Indica diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control en el día 9.

8. DISCUSIÓN

La infección con *P. berghei* ANKA es letal en los ratones CBA/Ca, lo que lo convierte en un modelo adecuado para estudiar protección (93–95), un aumento en el tiempo de supervivencia o una disminución en la patología podría considerarse como protección. En este trabajo se analizó el efecto de coadministrar a la protoxina Cry1Ac, o a la toxina Cry1Ac solas o en combinación con un extracto soluble de antígeno de *Plasmodium berghei* ANKA sobre diferentes parámetros tanto de la patología como de la respuesta inmune de los ratones, para evaluar las propiedades potencialmente protectoras e inmunomoduladoras de la protoxina y la toxina Cry1Ac.

Es importante mencionar que la patología que se presenta en los individuos infectados con malaria se debe principalmente a la respuesta inmune exagerada que se desarrolla contra el plasmodio, por lo que el desarrollo de vacunas que induzcan una respuesta inmune muy intensa podría ser peligroso para quien recibe la vacuna.

Lo primero que evaluamos fue si la administración de la protoxina Cry1Ac o la toxina Cry1Ac administradas solas o en combinación con el antígeno modificaban la supervivencia de los ratones infectados con *P. berghei* ANKA, como grupo control se utilizó un grupo de ratones que recibió PBS y que se infectó con el plasmodio.

También se estudió un grupo tratado únicamente con el antígeno de plasmodio y dos grupos adicionales que se coadministraron con la protoxina junto con el antígeno o bien con la toxina en combinación con el antígeno. Los resultados muestran que el grupo de ratones que sobrevivió por mayor tiempo fue el que se trató con la toxina, puesto que sobrevivieron el 100% hasta el día 12. Sin embargo, después de ese día solo transcurrieron dos días más (día 14) para que muriera todo el grupo. En el grupo que recibió la protoxina ocurrió algo similar, ambos grupos perecieron inclusive antes que el grupo control. La coadministración de antígeno junto con la protoxina o con la toxina mejoró la supervivencia solo en uno y dos días respectivamente. Sin embargo, este resultado no superó la supervivencia del grupo control que únicamente recibió PBS.

Otra forma de estudiar la protección es analizar los niveles de parasitemia. En este sentido, la administración del antígeno, la protoxina y la coadministración del antígeno junto con la protoxina mostraron efecto protector parcial, dado que estos grupos desarrollaron menores parasitemias que el grupo control. No obstante, la

administración de la toxina no mejoró esa protección e inclusive en el grupo que se coadministró con la toxina y el antígeno se detectaron los niveles de parasitemia más altos. Los resultados de parasitemia sugieren que la coadministración de antígeno con la toxina Cry1Ac no confieren protección contra el desarrollo del plasmodio, mientras que el antígeno y la combinación de antígeno con la protoxina si disminuyeron los niveles de parasitemia en relación al grupo control.

En los individuos infectados con plasmodio se presenta pérdida de peso que se debe en parte a las fiebres que se generan por la ruptura de eritrocitos parasitados (esquizontes maduros) que liberan pirógenos endógenos y también al incremento de citocinas como el TNF- α , que se ha asociado a la pérdida de peso (96, 97). Nuestros resultados sugieren que la administración de antígeno solo o coadministrado con la protoxina o la toxina protegen de la pérdida de peso puesto que en nuestros experimentos esos grupos pierden menos peso que el grupo control.

Otro parámetro asociado con la patología en malaria es la anemia, medida como la disminución de la concentración de hemoglobina (98–100). Además, se ha descrito que las citocinas proinflamatorias tales como el TNF- α , IL-6 e IL-12 y las antiinflamatorias como la IL-10, además del NO juegan un papel fundamental en la eritropoyesis. En anemias severas, se ha informado la presencia de elevadas cantidades de variantes polimórficas de TNF- α , mientras se han asociado niveles elevados de IL-10 en la protección contra la anemia. La eritropoyesis al parecer afecta la producción desequilibrada de las citocinas proinflamatorias y las antiinflamatorias lo que lleva al desarrollo de anemia, sobre todo por el secuestro de hierro por el sistema monocito/macrófago y por una inadecuada respuesta medular a la eritropoyetina (101–103). Por lo anterior, evaluamos la concentración de hemoglobina en todos los grupos de ratones. Detectamos que a medida que transcurre la infección disminuye la concentración de hemoglobina. La administración de antígeno solo o combinado con toxina ayuda a mantener e incluso a incrementar los niveles de hemoglobina en el día 6 post infección; sin embargo, esta protección es solo temporal dado que en el día 9 no se detectó que ninguno de los tratamientos mejorara los niveles de hemoglobina con relación al grupo control.

Para evaluar si la administración de la protoxina o la toxina solas o en combinación con el antígeno inducían la proliferación de las células de la respuesta inmune en el

bazo que es sitio de eliminación del parásito (92), evaluamos el índice esplénico en todos los grupos de ratones. Los resultados indican que la protoxina y la toxina administradas solas o en combinación con el antígeno de plasmodio inducen proliferación de las células de bazo puesto que los ratones desarrollaron índices esplénicos significativamente mayores que el grupo control en el día 6 post infección, posteriormente se detectó que solo el antígeno, la toxina y la combinación de antígeno con toxina indujeron mayores índices esplénicos y por lo tanto mayor estimulación de las células del bazo que el grupo control.

La eliminación del plasmodio o la muerte del huésped dependen en buena parte de que se module la respuesta inmune, si bien es necesaria la estimulación de las células de la respuesta inmune, una sobreestimulación genera respuestas tan intensas que pueden conducir a la muerte (19, 66). Por lo anterior, decidimos evaluar en diferentes tejidos (bazo, hígado y sangre) la expresión de la citocina TNF- α que se ha asociado a la fiebre en malaria (35, 71). Además, el TNF- α promueve el crecimiento y la diferenciación de las células B, para que produzcan anticuerpos, además de activar a los neutrófilos, a los macrófagos, y estimular la hematopoyesis (73, 104). El TNF- α también induce la expresión de otras citocinas y mediadores que promueven la inflamación (73). La expresión de TNF- α se modificó dependiendo del día de infección y del tejido. En general detectamos que su expresión es mayor en el día 6 que en el día 9 en todos los tejidos analizados (bazo, hígado y sangre). Los niveles más altos los detectamos en bazo, después en hígado y la expresión menor se detectó en la sangre. La toxina indujo los niveles más altos en bazo, mientras que en el hígado y en la sangre fue la coadministración de antígeno con protoxina lo que indujo el mayor nivel de TNF- α .

Interesantemente, los niveles más altos de parasitemia y los ratones que empezaron a morir más rápido se detectaron en el grupo que se coadministró con antígeno y toxina, por lo que es probable que esta combinación este generando una respuesta inmune muy intensa que resulta tóxica para los ratones vía niveles altos de TNF- α . Sin embargo, el índice esplénico mayor en el día 6 se detectó en el grupo tratado con el antígeno, lo que indica que existen diferentes subpoblaciones en el bazo que proliferan pero no todas producen TNF- α .

Finalmente, también se evaluó la expresión de IL-10 una citocina reguladora con propiedades antiinflamatorias (19, 105). De forma análoga a la expresión de TNF- α , la expresión de IL-10 varió en relación al tiempo de la infección y al tejido analizado. Los niveles más elevados se detectaron en el hígado, después en el bazo y finalmente, los niveles menores se detectaron en sangre periférica. En general los niveles más elevados se detectaron en el día 9 tanto en bazo como en hígado. Sin embargo, en sangre periférica, los niveles más elevados se detectaron en el día 6. En el tejido del bazo la expresión más alta de IL-10 se detectó en los ratones que se trataron con la toxina, lo que indica que ese grupo tenía una fuerte respuesta proinflamatoria (los niveles de TNF- α se dispararon en el día 6 en el bazo) y el incremento en la expresión de IL-10 podría significar un intento de la respuesta inmune de tratar de compensar este desbalance con el incremento de una citocina antiinflamatoria. Por otro lado, la respuesta que se presenta en el hígado es distinta a la de bazo y a la de sangre. En este tejido los niveles más elevados de IL-10 se presentaron en el grupo coadministrado con el antígeno y la protoxina y coincide que en el día 6 post infección fue el grupo que presentó los niveles más altos de TNF- α , es probable que a esto se deba el incremento tan marcado de IL-10 en el hígado en el día 9 post infección en este grupo de ratones. Finalmente, los niveles de IL-10 en la sangre fueron más altos en el día 6 que en el día 9, lo que en general esta acorde con los niveles de TNF- α ya que en este tejido la mayor expresión se presentó en el día 6, lo que indica que el sistema inmune esta tratando de regular la respuesta inmune proinflamatoria tan intensa con niveles más altos de la citocina IL-10.

Evidentemente, la respuesta inmune en malaria es extremadamente compleja, en este trabajo se analizaron solo algunos parámetros de ella. Nuestros resultados sugieren que con las dosis de toxina, protoxina y antígeno que empleamos en estos experimentos (50 μ g/ratón semanal durante 4 semanas) no se generó mejor protección que la que ya se había descrito previamente utilizando 5 μ g/ratón (53), lo anterior podría explicarse porque una mayor dosis induce respuestas más intensas que lejos de eliminar más eficientemente al parásito generan eventos tóxicos que culminan con la muerte de los ratones, de ahí la importancia de ensayar diferentes dosis y de evaluar distintos aspectos de la respuesta inmune. Otra probable respuesta es que una dosis alta tanto de protoxina, toxina, antígeno o de la combinación de antígeno con

protoxina y antígeno con toxina podrían saturar al sistema inmune y eso evitar que se inicien otros mecanismos asociados con la protección.

9. CONCLUSIONES

Si bien las dosis de antígeno, protoxina y toxina que se utilizaron en el presente estudio no generó una mejor protección que la que se generó en investigaciones previas, se puede concluir lo siguiente:

- La protección que genera la protoxina o la toxina Cry1Ac es por un periodo muy corto de tiempo (antes de los 6 días post infección).
- Con las dosis que se emplearon para la coadministración de la protoxina junto con el antígeno de plasmodio o bien a la toxina junto con el antígeno **no** se logró mejor protección que cuando se administró la protoxina, la toxina o el antígeno por separado.
- La administración de la toxina **no** disminuyó la parasitemia mientras que el antígeno y administrar la combinación de antígeno con protoxina **si** disminuyeron la parasitemia en relación al grupo control.
- La combinación de antígeno y protoxina generó una respuesta inmune sumamente intensa que resultó tóxica para los ratones como lo demuestran los elevados niveles de TNF- α .
- La expresión de TNF- α y de IL-10 varió con respecto al tiempo de la infección y al tejido analizado. Los niveles más elevados se detectaron en hígado después en bazo y los menores en sangre periférica.
- Se observó un mayor incremento en los niveles de expresión de TNF- α en comparación con los niveles de la IL-10. Esta condición favoreció el estado patológico y la mortalidad de los ratones.

10. REFERENCIAS

10.1 Referencias bibliográficas

1. Tay-Zavala J. Microbiología y Parasitología Médicas. 3ª ed. México: Méndez Editores 2003.
2. Stuart WT. Microbiología. 5ª ed. México: Editorial McGraw-Hill Interamericana 2000.
3. Joklik WK, Willet HP, Amos DB, Wilfert CM. Zinsser Microbiología. 20ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana 1998.
4. Del Rey EC, Basombrío MA, Sánchez AM. La prevención de la malaria: costos y beneficios. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 1997;**92**:137–143.
5. Gascón J. Malaria. Barcelona España: Revista Jano Medicina y Humanidades 2003;**64**:29–380.
6. Rojas-Espinosa O. Inmunología de memoria. 2ª ed. México: Editorial Médica Panamericana 2001.
7. Gause WC, Adamovicz E, Diefenbach CW, Dveksler GS. Use of PCR to quantitative relative differences in gene expression, PCR primer: a laboratory manual. United States of America. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1995.
8. Hommel M. Morphology, biology and life-cycle of *Plasmodium* parasites. Bull Acad Natl Med 2007;**191**:1235–1245.
9. World Health Organisation. World Malaria Report. Geneva: WHO 2010.
10. Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, Ratnam S, et al. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. Clin Infect Dis 2008;**46**:165–171.
11. Ingraham JL, Ingraham CA. Introduction to Microbiology. 2ª ed. United States America: Editorial Brooks/Cole 2000.
12. Arevalo-Herrera M, Quiñones ML, Guerra C, Céspedes N, Giron S, Ahumada M, et al. Malaria in selected non-Amazonian countries of Latin America. Acta Trop 2012;**121**:303–314.
13. Tay-Zavala J. Microbiología y Parasitología Médicas, 2ª ed. México: Méndez Editores 1993.

14. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Inmunología celular y molecular. 2ª ed. México: Editorial McGraw Hill-Interamericana 1995.
15. Henry-Rodríguez M, Ulloa-García A, Ramsey-Willoquet JM. Manual para la vigilancia y el control del paludismo en Mesoamérica. Instituto Nacional de Salud Pública, México 2008.
16. Lou J, Lucas R, Grau GE. Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. Clin Microbiol Rev 2001;**14**:810–820.
17. Martins YC, Smith MJ, Pelajo-Machado M, Werneck GL, Lenzi HL, Daniel-Ribeiro CT, et al. Characterization of cerebral malaria in the outbred Swiss Webster mouse infected by *Plasmodium berghei* ANKA. Int J Exp Pathol 2009;**90**:119–130.
18. Landau I, Gautret P. Animal models: Rodents. In: Sherman IW, editor. Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis and Protection. Washington, D.C.: American Society for Microbiology 1998.
19. Hunt NH, Grau GE. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. Trends Immunol 2003;**24**:491–499.
20. Bucher K, Dietz K, Lackner P, Pasche B, Fendel R, Mordmüller B, et al. *Schistosoma* co-infection protects against brain pathology but does not prevent severe disease and death in a murine model of cerebral malaria. Int J Parasitol 2011;**41**:21–31.
21. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas en color. 5ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana 1999.
22. Ryan KJ, Ray CG. Microbiología Médica. 4ª ed. México: Editorial MacGraw-Hill Interamericana 2005.
23. Shailja S, Mahmood A, Pal-Bhowmick I, Brzostowski JA, Chitnis CE. Distinct External Signals Trigger Sequential Release of Apical Organelles during Erythrocyte Invasion by Malaria Parasites. PLoS Pathog 2010;**6**:e1000746.
24. Ferreira MU, Nunes M, Wunderlich G. Antigenic diversity and immune evasion by malaria parasites. Clin Diagn Lab Immunol 2004;**11**:987–995.
25. Malaguarnera L, Musumeci S. The immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. Lancet Infect Dis 2002;**2**:472–478.
26. Tay-Zavala J, Lara AR, Velasco CO, Gutiérrez QM. Parasitología Médica. 5ª ed. México: Méndez Editores 1995.

27. Segura C, Blair S. Mitochondria in the *Plasmodium* genera. *Biomedica* 2003;
23:351–363.
28. Good MF, Xu H, Wykes M, Engwerda CR. Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. *Annu Rev Immunol* 2005;**23**:69–99.
29. Martins YC, Carvalho LJM, Daniel-Ribeiro CT. Challenges in the determination of early predictors of cerebral malaria: lessons from the human disease and the experimental murine models. *Neuroimmunomodulation* 2009;**16**:134–145.
30. Phillips RS, Mathers KE, Taylor-Robinson AW. T cell in immunity to *Plasmodium chabaudi chabaudi*: operation and regulation of different pathways of protection. *Res Immunol* 1994;**145**:406–412.
31. Good MF, Xu H, Wykes M, Engwerda CR. Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. *Annu Immunol* 2005;**23**:69–99.
32. McCall MB, Sauerwein RW. *Interferon-γ*-central mediator of protective immune responses against the pre-erythrocytic and blood stage of malaria. *J Leukoc Biol* 2010;**88**:1131–1143.
33. White E. Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev* 1996;**10**:1–15.
34. Legorreta-Herrera M, Rivas-Contreras S, Ventura-Gallegos JL, Zentella-Dehesa A. Nitric oxide is involved in the upregulation of INF- γ and IL-10 mRNA expression by CD8⁺ T cell during the blood stages of *P. chabaudi* AS infection in CBA/Ca mice *Int J Biol Sci* 2011;**7**:1401–1411.
35. Langhorne J, Albano FR, Hensmann M, Sanni L, Cadman E, Voisine C, et al. Dendritic cells, pro-inflammatory responses, and antigen presentation in a rodent malaria infection. *Immunol Rev* 2004;**201**:35–47.
36. Taylor-Robinson AW. Regulation of immunity to malaria: valuable lesson learned from murine models. *Parasitol Today* 1995;**11**:335–341.
37. Good MF, Doolan DL. Immune effector mechanisms in malaria. *Curr Opin Immunol* 1999;**11**:412–419.
38. Richards AL. Tumor necrosis factor and associated cytokines in the host's response to malaria. *Int J Parasitol* 1997;**27**:1251–1263.
39. Szatmáry Z. Tumor necrosis factor-alpha: molecular-biological aspects minireview. *Neoplasma* 1999;**46**:257–266.

40. Omer FM, de Souza JB, Riley EM. Differential induction of TGB-beta regulates proinflammatory cytokine production and determines the outcome of lethal and nonlethal *Plasmodium yoelii* infections. *J Immunol* 2003;**171**:5430–5436.
41. Deloron P, Dumont N, Nyongabo T, Aubry P, Astagneau P, Ndarugirire F, et al. Immunologic and biochemical alterations in severe *falciparum* malaria: relation to neurological symptoms and outcome. *Clin Infect Dis* 1994;**19**:480-485.
42. Soberón M, Bravo A. Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. *Biotecnología* 2007;**14**:303–314.
43. Sauka DH, Sánchez J, Bravo A, Benintende GB. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins against bean shoot borer (*Epinotia aporema* Wals.) larvae, a major soybean pest in Argentina. *J Invertebr Pathol* 2007;**94**:125–129.
44. Cannon RJC. *Bacillus thuringiensis* use in agriculture: a molecular perspective. *Biol Rev* 1996;**71**:561–636.
45. Derbyshire DJ, Ellar DJ, Li J. Crystallization of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and its complex with the receptor ligand *N*-acetyl-D-galactosamine. *Acta Cryst* 2001;**57**:1938–1944.
46. Rodríguez-Orozco AR. Efecto coadyuvante de la protoxina Cry1Ac en la inmunidad celular al administrarla con un buen agente patógeno de mucosas. *Rev Alergia Mex* 2006;**53**:125–129.
47. Zahener V, Momen H, Salles CA and Rabinovitch L. A comparative study of enzyme variation in *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *J Appl Bacteriol* 1989;**67**:275–282.
48. Höfte H, Whiteley HR. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Mol Biol Rev* 1989;**53**:242–255.
49. Knowles BH, Knight PJ, Ellar DJ. *N*-acetyl galactosamine is part of the receptor in insect gut epithelia that recognizes an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Proc Biol Sci* 1991;**245**:31–35.
50. Travis J, Potempa J. Bacterial proteinases as targets for the development of second-generation antibiotics. *Biochim Biophys Acta* 2000;**1477**:35–50.
51. Rodríguez-Orozco AR, Ruiz-Reyes H, Sánchez-Nafarrete S. Efecto de la toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* sobre el crecimiento de algunos hongos alérgicos aislados de pacientes con rinitis alérgica. *Rev Mex Mic* 2009;**29**: 43–50.

52. Rojas-Hernández S, Rodríguez-Monroy MA, López-RevillaR, Reséndiz-Albor AA, Moreno-Fierros L. Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria* meningoencephalitis. *Infect Immun* 2004;**72**:4368–4375.
53. Legorreta-Herrera M, Meza R, Moreno-Fierros L. Pretreatment with Cry1Ac protoxin modulates the immune response, and increases the survival of *Plasmodium*-infected CBA/Ca mice. *J Biomed Biotechnol* 2010;**2010**:198921.
54. Regueiro JR, López C, González S, Martínez E. *Inmunología, Biología y patología del sistema inmune*. 3^a ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana 2003.
55. Meanger A. *Cytokines*. United States of America: Prentice Hall 1991.
56. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Celular and molecular immunology*. 4^a ed. United States America: W. B. Saunders Company 2000.
57. Trinchieri G. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cell with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cell type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood* 1994;**84**:4008–4027.
58. De Zubiría A. *Conceptos Básicos en Asma Bronquial*. Colombia: Editorial Multiletras Editores Ltda 1999.
59. Urquhart AD. Putative pathophysiological interaction of cytokines and phagocytic cell in severe human *falciparum* malaria. *Clin Infect Dis* 1994;**19**:117–131.
60. Winkler S, Willheim M, Baier K, Schmid D, Aichelburg A, Graninger W, et al. Reciprocal Regulation of Th1 - and Th2-Cytokine-Producing T Cell during Clearance of Parasitemia in *Plasmodium falciparum* Malaria. *Infect Immun* 1998;**66**:6040–6044.
61. Jason J, Archibald LK, Nwanyanwu OC, Bell M, Buchanan I, Larned J, et al. Cytokines and malaria parasitemia. *Clin Immunol* 2001;**100**:208–218.
62. Camussi G, Albano E, Tetta C, Bussolino F. The molecular action of tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Biochem* 1991;**202**:3–14.
63. Castro JC, Taype CA, Espinoza J, Accinelli R. Producción de TNF- α por monocitos de pacientes con formas clínicas diversas de tuberculosis y polimorfismo genético en el locus humano- 308 TNF- α en el Perú. *Enf del Tórax* 2003;**46**:1027–2674.
64. Bate CA, Taverne J, Playfair JH. Malaria parasites induce TNF production by macrophages. *Immunol* 1988;**64**:227–231.

65. Long CA. Immunity to blood stages of malaria. *Curr Opin Immunol* 1993;**5**:548–556.
66. Grau GE, Taylor TE, Molyneux ME, Wirima JJ, Vassalli P, Hommel M, et al. Tumor necrosis factor and disease severity in children with *falciparum* malaria. *N Engl J Med* 1989;**320**:1586–1591.
67. Kern P, Hemmer CJ, Van Damme J, Gruss HJ, Dietrich M. Elevated tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 serum levels as markers for complicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Med* 1989;**87**:139–143.
68. Kwiatkowski DP, Hill AV, Sambou I, Twumasi PM, Castracane J, Manogue KR, et al. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet* 1990;**336**:1201–1204.
69. Grau GE, Fajardo LF, Piquet PF, Allet B, Lambert PH, Vassalli P. Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria. *Science* 1987;**237**:1210–1212.
70. Amani V, Vigário AM, Belnoue E, Marussig M, Fonseca L, Mazier D, et al. Involvement of IFN- γ receptor-mediated signaling in pathology and anti-malarial immunity induced by *Plasmodium berghei* infection. *Eur J Immunol* 2000;**30**:1646–1655.
71. Karunaweera ND, Grau GE, Gamage P, Carter R, Mendis KN. Dynamics of fever and serum levels of tumor necrosis factor are closely associated during clinical paroxysms in *Plasmodium vivax* malaria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;**89**:3200–3203.
72. Clark IA, Hunt NH, Butcher GA, Cowden WB. Inhibition of murine malaria (*Plasmodium chabaudi*) in vivo by recombinant interferon-gamma or tumor necrosis factor, and its enhancement by butylated hydroxyanisole J *Immunol* 1987;**139**:3493–3496.
73. Parslow T, Stites D, Terr A, Imboden J. *Inmunología básica y clínica*. 10^a ed. México: El Manual Moderno 2002;**169**:178-182.
74. Nahrevanian H. Immune effector mechanisms of the nitric oxide pathway in malaria: cytotoxicity versus cytoprotection. *Braz J Infect Dis* 2006;**10**:283–292.
75. Li C, Langhorne J. Tumor necrosis factor alpha p55 receptor is important for development of memory responses to blood-stage malaria infection. *Infect Immun* 2000;**10**:5724–5730.

76. Oswald IP, Wynn TA, Sher A, James SL. Interlukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma-induced activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;**89**:8676–8680.
77. Soto-Cruz I, Cáceres-C J, Mendoza-Rincón JF, Weiss B. Las citocinas en la hematopoyesis y el sistema inmunológico: mecanismos celulares y moleculares. México: Plaza y Valdés Editores 1999.
78. Li C, Sanni LA, Omer F, Riley E, Langhorne J. Pathology of *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection and mortality in interleukin-10-deficient mice are ameliorated by anti-tumor necrosis alpha and exacerbated by anti-transforming growth factor beta antibodies. *Infect Immun* 2003;**71**:4850–4856.
79. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* 2002;**30**:1292–1305.
80. Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Advan Physiol Edu* 2005;**29**: 151–159.
81. Farfán MJ. Introducción a la tecnología del ADN aplicada en el laboratorio forense. Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. Departamento de Sevilla España 2006.
82. Rodríguez IP, Barrera HA. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL* 2004;**7**:323–335.
83. Panduro A. Biología molecular en la clínica. México: Editorial McGraw-Hill Interamericana 2000.
84. Bull PC, Marsh K. The role of antibodies to *Plasmodium falciparum*-infected-erythrocyte surface antigens in naturally acquired immunity to malaria. *Trends Microbiol* 2002;**10**:55–58.
85. Doolan DL, Dobaño C, Baird JK. Acquired immunity to malaria. *Clin Microbiol Rev* 2009;**22**:13–36.
86. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;**72**:248–254.
87. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2ª ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.

88. Thomsen R, Sølvesten CA, Linnet TE, Blechingberg J, Nielsen AL. Analysis of qPCR data by converting exponentially related Ct values into linearly related X_0 values. *J Bioinform Comput Biol* 2010;**8**:885–900.
89. Clark IA, Chaudhri G. Tumor necrosis factor may contribute to the anaemia of malaria by causing dyserythropoiesis and erythrophagocytosis. *Br J Haematol* 1988;**70**:99–103.
90. Day NP, Hien TT, Schollaardt T, Loc PP, Chuong LV, Chau TT, et al. The prognostic and pathophysiologic role of pro- and antiinflammatory cytokines in severe malaria. *J Infect Dis* 1999;**180**:1288–1297.
91. Buffet PA, Safeukui I, Deplaine G, Brousse V, Prendki V, Thellier M, et al. The pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria in humans: insights from splenic physiology. *Blood* 2011;**117**:381–392.
92. Chotivanich K, Udomsangpetch R, McGready R, Proux S, Newton P, Pukrittayamee S, et al. Central role of the spleen in malaria parasite clearance. *J Infect Dis* 2002;**185**:1538–1541.
93. Killick-Kendrick R, Peters W eds. *Rodent Malaria*. Academic Press, 1978.
94. Janse CJ, Ramesar J, Waters AP. High-efficiency transfection and drug selection of genetically transformed blood stages of the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Nat Protoc* 2006;**1**:346–356.
95. Silve O, Mota MM, Matuschewski K, Prudêncio M. Interactions of the malaria parasite and its mammalian host. *Curr Opin Microbiol* 2008;**11**:352–359.
96. Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM, Bernheim HA, Beutler B, Cerami A, et al. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J Exp Med* 1986; **163**:1433–1450.
97. Tracey KJ, Wei H, Manogue KR, Fong Y, Hess DG, Nguyen HT, et al. Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation. *J Exp Med* 1988;**167**:1211–1227.
98. Francis SE, Sullivan DJ Jr, Goldberg DE. Hemoglobin metabolism in the parasite *Plasmodium falciparum*. *Annu Rev Microbiol* 1997;**51**:97–123.
99. Allen RJW, Kirk K. The membrane potential of the intraerythrocytic malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* 2004; **279**:11264–11272.
100. Richard JW, Allen RJ, Kirk K. Cell volume control in the *Plasmodium*-infected erythrocyte. *Trends Parasitol* 2004;**20**:7–10.

101. Martiney JA, Sherry B, Metz CN, Espinoza M, Ferrer AS, Calandra T, et al. Macrophage migration inhibitory factor release by macrophages after ingestion of *Plasmodium chabaudi*-infected erythrocytes: possible role in the pathogenesis of malarial anemia. *Infect Immun* 2000;**68**:2259–2267.
102. Chaisavaneeyakorn S, Othoro C, Shi YP, Otieno J, Chaiyaroj SC, Lal AA, et al. Relationship between plasma interleukin-12 (IL-12) and IL-18 levels and severe malarial anemia in an area of holoendemicity in western Kenya. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;**10**:362–366.
103. Lyke KE, Burges R, Cissoko Y, Sangare L, Dao M, Diarra I, et al. Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12 (p70) in Malian children with severe *Plasmodium falciparum* malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls. *Infect Immun* 2004; **72**:5630–5637.
104. Muniz-Junqueira MI, dos Santos-Neto LL, Tosta CE. Influence of tumor necrosis factor-alpha on the ability of monocytes and lymphocytes to destroy intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* in vitro. *Cell Immunol* 2001;**208**:73–79.
105. Ho M, Schollaardt T, Snape S, Looareesuwan S, Suntharasamai P, White NJ. Endogenous interleukin-10 modulates proinflammatory response in *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 1998;**178**:520–525.

10.2 Referencias electrónicas

1. Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta. [actualizado 9 de noviembre de 2012/revisado 8 de febrero de 2010; acceso 30 de abril de 2013]. CDC Malaria; [aproximadamente 2 pantallas]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>
2. Epidemiología Molecular de Enfermedades Infecciosas. c2013 [acceso 14 de febrero de 2013]. Sistemap de EMEI; [aproximadamente 2 pantallas]. Disponible en: http://epidemiologiamolecular.com/wp-content/uploads/2010/09/clip_image0081.gif.
3. Principle of the PCR. [actualizado 20 de mayo de 2012; acceso 13 de abril de 2013]. University of Ghent; c2007-2012; [aproximadamente 2 pantallas]. Disponible en: <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>

11. APÉNDICES

11.1 MATERIAL

11.1.1 Material biológico

Ratones singénicos de la cepa CBA/Ca machos de 8 semanas de edad mantenidos en condiciones libres de patógenos específicos.

Eritrocitos de ratón parasitados con la cepa *Plasmodium berghei* ANKA y criopreservados en nitrógeno líquido.

Eritrocitos de ratón parasitados con la cepa *Plasmodium chabaudi* AS y criopreservados en nitrógeno líquido.

Protoxina Cry1Ac.

Toxina Cry1Ac.

Antígeno de *Plasmodium. berghei* ANKA.

11.1.2 Material de laboratorio

Cubetas de cuarzo.

Film óptico[®]Platemax.

Gorros y botas para áreas estériles.

Gradillas para tubos Eppendorf.

Gradillas para tubos Falcon.

Guantes de hule de látex.

Guantes de nitrilo.

Jeringas.

Parafilm.

Pinzas de disección.

Pipetas Pasteur de vidrio.

Placa para PCR en tiempo real[®]Axygen.

Portaobjetos.

Puntas para micropipetas[®] Axygen: 10 μ L, 30 μ L, 200 μ L, 1000 μ L, nuevas, libres de nucleasas y estériles.

Tela de organza.

Tijeras de disección.

Tubos Eppendorf: 0.2 mL, 0.6 mL, 1.5 mL y 2 mL, nuevos, libres de nucleasas y estériles.

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

11.1.3 Equipo

Autoclave[®] Tuttnauer Brinkmann 2540M.

Balanza analítica[®] Scientech.

Cámara para electroforesis[®] BIO-RAD, Protean II xi Cell 16 cm.

Campana de flujo laminar[®] Veco.

Centrifuga[®] Eppendorf.

Congelador[®] Nieto.

Congelador Biological Frizzer[®] Sanyo.

Espectrofotómetro UV[®] WPA.

Equipo analizador de geles; Gel Doc 1000[®] BIO-RAD.

Fuente de poder[®] BIO-RAD.

Microcentrífuga[®] Eppendorf 5415C.

Micropipetas[®] Eppendorf: 10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L y 1000 μ L.

Micropipetas[®] Gilson: p20, p200, p1000.

Microscopio óptico[®] Carl Zeiss Estándar 25.

Refrigerador[®] May Tag.

Tanque de nitrógeno líquido 34XT[®] Taylor-Wharton.

Termociclador[®] Applied Biosystems 7500 (96 wells) software v2.0.5 RT-PCR system.

Termociclador Master Cycler[®] Eppendorf.

Ultracongelador[®] REVCO, Legaci Refrigeration System.

Vortex Genie 2[®] Daigger.

11.1.4 Reactivos

Aceite mineral[®] Sigma.

Acrilamida[®] USB/Amersham.

Agua desionizada estéril[®] Hidropura.

Albúma sérica bovina[®] Sigma.

Amortiguador para retrotranscripción 5X (5X First Strand buffer)[®] Invitrogen.

APS[®] Sigma

Azul de Coomassie[®] Sigma.

Bisacrilamida[®] Sigma.

Bromuro de etidio[®] Sigma.

Citrato de sodio[®] Sigma.

Cloroformo[®] Burdick&Jackson.

Cloruro de magnesio (MgCl₂)[®] Sigma.

Colorante de Giemsa[®] Sigma.

Columnas de celulosa.

DEPC[®] Sigma.

dNTP's[®] Invitrogen.

dTT[®] Invitrogen.

EDTA[®] Sigma.

Enzima MMLV-RT[®] Invitrogen

Etanol absoluto[®] Merck.

Etanol al 70%.

Éter[®] JT Baker.

Fenol ácido[®] Sigma.

Fluorocromo ROX[®] Invitrogen.

Fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄)[®] USB/Amersham.

Fosfato de sodio monobásico (Na₂HPO₄)[®] USB/Amersham.

Gelatina[®] Sigma.

Glicerol[®] Sigma.

Heparina de sodio[®] Sigma.

Inhibidor de RNAsa[®] Promega.

Isopropanol[®] Sigma.

Marcador de peso de molecular 50 pb[®] Promega.

Metanol[®] JT Baker.

Oligo dT[®] Promega.

Reactivo de BIO-RAD[®].

Reactivo de Drabkin.

SDS[®] Sigma.

Taq polimerasa[®] Applied Biosystems.

TEMED[®] Sigma.

Tris base[®] Sigma.

TriPure[®] Roche.

Oligonucleótidos iniciadores para la amplificación de los genes[®] Invitrogen: β-actina, TNF-α e IL-10.

➤ β-actina

(5' a 3'): (DNA) – CGG GTG AGG TAG TCT GTC AGG TCC [JOE] G

(5' a 3'): (DNA) – CTA TGC TCT CCC TCA CGC CAT C

- TNF- α
 (5' a 3'): (DNA) – CGG CTG TCT TTG AGA TCC ATG C [FAM] G
 (5' a 3'): (DNA) – CGT CGT AGC AAA CCA CCA AGT G

- IL-10
 (5' a 3'): (DNA) – CGG-TTC-TGG-ACA-ACA-TAC-TGC-TAA-C [FAM] G
 (5' a 3'): (DNA) – TGG-ATC-ATT-TCC-GAT-AAG-GCT-TC

11.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

11.2.1 Soluciones para electroforesis

- Amortiguador de carga 5X (Laemmli)

Tris-HCl 1 M, pH 8	50 mM
EDTA pH 8	75 mM
SDS	0.5% P/V
Sacarosa	30% P/V
Ficoll	10.0 % P/V
Azul de bromofenol	0.12% P/V
Agua estéril	10 mL

Disolver el SDS en el agua y posteriormente adicionar los reactivos restantes.

- Acrilamida/Bis acrilamida al 30%

Acrilamida	29.0 g
Bisacrilamida	1.0 g
Agua estéril	100 mL

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

- Gel concentrador al 5%

Acrilamida/Bisacrilamida 30%	1.67 mL
Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	2.5 mL
SDS 10%	100 μ L

TEMED	10 μ L
APS 10%	40 μ L
Agua estéril	5.7 mL

- Gel separador al 12%

Acrilamida/Bisacrilamida 30%	3.9 mL
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	2.5 mL
SDS 10%	100 μ L
TEMED	13 μ L
APS 10%	40 μ L
Agua estéril	3.5 mL

- Bromuro de Etidio (10 mg/mL)

Bromuro de Etidio	1 g
Agua estéril	100 mL

- Solución desteñidora rápida

Ácido acético	1 mL
Metanol	4.5 mL
Agua estéril	4.5 mL

11.2.2 Soluciones para extracción de ARN

- Amortiguador de fosfatos (PBS)*, libre de calcio y magnesio

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g
Agua estéril	1000 mL

Pesar todos los reactivos y disolverlos en el agua estéril.

NOTA: Antes de aforar ajustar el pH a 7.2 con NaOH.

*Esterilizar a 121 °C y 15 libras durante 20 minutos.

- Agua DEPC 0.1%

Dietilpirocarbonato 1g

Agua estéril 1000 mL

NOTA: Distribuir en frascos de 205 mL, dejar actuar el DEPC durante 4-12 horas y remover el DEPC por esterilización.

11.3 EFICIENCIA DE LAS CITOCINAS

Citocina	Eficiencia
β -actina	103.9%
TNF- α	93.91%
IL-10	107.77%