



*UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA  
DE MÉXICO*

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

Evaluación de la especificidad de la respuesta inmune durante una infección secundaria con *Plasmodium* en ratones CBA/Ca utilizando la técnica de PCR en nido

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**LICENCIADO EN QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA**

P R E S E N T A

JANETTE REBECA RODRÍGUEZ LÓPEZ

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA**

MÉXICO, D. F.

ENERO, 2008



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.

## *Dedicatoria*

— A mi padre, a mis hermanas, a mi cuñado Olimpo y muy especialmente a mi mamita y mis abuelos con todo el amor, cariño y respeto que merecen.

— A mis sobrinas Jennifer y Ximena porque desde que llegaron se convirtieron en mi motivo para seguir adelante, ¡¡ siempre adelante !!

— A la Doctora Martha Legorreta por ser tan paciente conmigo y haberme dado la oportunidad de trabajar con ella, sobretodo porque todo su trabajo es digno de admiración y respeto

— A Marisol Molina Sigala y María Juana Martínez Briones porque con ellas viví la carrera como, aseguro, nadie lo habría hecho. ¡¡ Por la amistad que surgió desde un principio !!

## *Agradecimientos*

— A Dios por poner siempre en mi camino personas que me han exigido ser mejor en todo lo que haga, y que me permiten aprender de su experiencia

— A la UNAM por haberme acogido, tal cuál un segundo hogar desde la preparatoria y haber siempre conocido la mejor parte de ella y de su gente.

— A la Doctora Martha Legorreta por haberme permitido ser parte de su equipo de trabajo, y haberme enseñado más allá de lo teórico.

— A Adriana Ramos Ávila por haberme abierto las puertas a todo su conocimiento y trabajo.

— A Elia Rincón Simbrón y Ricardo Gerardo Silvestre por ser parte fundamental de está trabajo pues ellos son encargados de mantener en optimas condiciones a los ratones que se utilizaron en este trabajo

— A todos y cada uno de mis compañeros y profesores que me acompañaron durante la carrera.

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.	1
2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	3
2.1. La Malaria o Paludismo	3
2.2. Clasificación taxonómica del <i>Plasmodium</i>	6
2.3. Ciclo biológico	6
2.4. Patogénesis	9
2.4.1. La invasión de los eritrocitos	
2.4.2. Citoadherencia	
2.5. Cuadro Clínico	12
2.5.1. Anemia	
2.5.2. Hepatoesplenomegalia	
2.5.3. Pérdida de peso	
2.6. El modelo murino	16
2.6.1. <i>Plasmodium yoelli</i>	
2.6.2. <i>Plasmodium chabaudi</i>	
2.7. Mecanismos de la respuesta inmune en malaria	21
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
4. OBJETIVO GENERAL	28
5. OBJETIVOS PARTICULARES	28
6. HIPÓTESIS DE TRABAJO	29
7. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	29
8. MATERIALES	30
8.1. Material Biológico	30
8.2. Equipo	30
8.3. Reactivos	31
8.4. Material	33
9. MÉTODOS	34
9.1. Infección y reinfección	34

9.2. Análisis de la parasitemia	34
9.3. Obtención de peso	35
9.4. Índice esplénico	35
9.5. Análisis de Hemoglobina	35
9.6. Extracción de DNA	36
9.7. La Reacción en Cadena de la Polimerasa en Nido	37
10. <i>POBLACIÓN</i>	38
11. <i>CRITERIOS</i>	38
11.1. De inclusión	38
11.2. De exclusión	39
11.3. De eliminación	39
11.4. Variables	39
12. <i>DIAGRAMA DE FLUJO</i>	40
13. <i>RESULTADOS</i>	42
13.1. Evaluación de la concentración de hemoglobina	42
13.2. Pérdida de peso corporal	43
13.3. El índice esplénico	45
13.4. Evaluación de la parasitemia	47
13.5. Análisis por PCR en nido	49
14. <i>ANÁLISIS DE RESULTADOS</i>	51
15. <i>CONCLUSIONES</i>	57
16. <i>ANEXO</i>	59
16.1. Preparación de reactivos	59
16.1.1. Acrilamida/ bis-Acrilamida al 30%	
16.1.2. Amortiguador de Carga 5X	
16.1.3. Amortiguador de PCR 10X	
16.1.4. Buffer de Lisis	
16.1.5. Gel de Acrilamida al 3%	
16.1.6. TBE 10X	
16.1.7. Saponina 10%	
16.1.8. Pronasa E	

16.1.9. Bromuro de Etidio	
16.1.10. Persulfato de Amonio	
16.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa	62
16.2.1. Pasos de la amplificación en el termociclador.	
Programa ML1	
16.2.2. 1ª Reacción de amplificación especie-específica manejando el juego de primers ML1 + ML2	
16.2.3. Pasos de la amplificación en el termociclador.	
Programa SEGR	
16.2.4. 2ª Reacción de amplificación especie especifica manejando el juego de primers MCK4 + MCK5	
17. REFERENCIAS	65

## ABREVIATURAS

<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. ovale</i>	<i>Plasmodium ovale</i>
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
<i>P. malariae</i>	<i>Plasmodium malariae</i>
<i>P. vinckey</i>	<i>Plasmodium vinckey</i>
<i>P. berghei</i>	<i>Plasmodium berghei</i>
<i>P. yoelli</i>	<i>Plasmodium yoelli</i>
<i>P. chabaudi</i>	<i>Plasmodium chabaudi</i>
TCR	Receptores celulares T
PNM	Polimorfonucleares
Células NK	Células <i>Natural Killer</i>
INF- $\gamma$	Interferón gamma
Células CT	Células Citotóxicas
TNF- $\beta$	Factor de Necrosis Tumoral beta
IL- ...	Interleucina - ...
TNF- $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral alfa
IgG	Inmunoglobulina G
IgE	Inmunoglobulina E
HMC	Moléculas de Histocompatibilidad Humana
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
$\mu$ L	microlitro
Hb	Hemoglobina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
mM	milimolar
Rpm	Revoluciones por minuto
EP	Eritrocitos parasitados
CFU-GM	Unidad formadora de colonias gránulo-mielocíticas
CFU-E	Unidad formadora de colonias eritroides
SDS	Duodecil sulfato de sodio
APS	Persulfato de amonio

## Resumen

El desarrollo de nuevas técnicas de identificación de especies en parasitología permite que la gran mayoría de las enfermedades parasitarias, se diagnostiquen con mayor sensibilidad. En este trabajo, se utilizó la técnica de PCR en nido, que tiene gran importancia para esta enfermedad; ya que la infección por *P. falciparum* tiene el mayor índice de mortalidad en comparación con las otras dos especies causantes de Malaria en los humanos.

A pesar de ello en regiones endémicas, se han encontrado pacientes con inmunidad ante la infección de cualquier especie de *Plasmodium*, por lo que en este trabajo y a través de un modelo murino estudiamos lo que sucede con la respuesta inmune de los ratones que sufrieron una infección con una cepa letal de plasmodio y después de tratarlos con fármacos antimaláricos se retaron nuevamente con el parásito homólogo, con uno diferente y con una mezcla de ambos, se analizaron los niveles de la parasitemia, la pérdida de peso, la concentración de hemoglobina, el índice esplénico, así como la identificación de la especie parasitante en la mezcla de especies por medio de la técnica de PCR en nido.

Se encontró que después de la reinfección se desarrollo protección en contra de la especie homóloga, y que está protección también es inespecífica en los primeros días, pues también hay una disminución de la parasitemia de una nueva especie de parásito, y más aún cuando en el huésped se encuentra la mezcla de ambos parásitos, sin embargo, los parámetros de cuantificación de hemoglobina, pérdida de peso, se ven afectados de igual manera que en una infección primaria.

**Evaluación de la especificidad de la respuesta inmune durante una infección secundaria con *Plasmodium* en ratones CBA/Ca utilizando la técnica de PCR en nido.**

**1. INTRODUCCIÓN.**

El *Plasmodium* tiene un ciclo de vida complejo por lo que al entrar en contacto con su huésped, se genera una respuesta inmune compleja, sin embargo, gracias a los modelos animales se ha logrado el avance en el conocimiento de algunos mecanismos de la respuesta inmune involucrados en la eliminación del parásito en el individuo infectado. Los modelos murinos de malaria han ayudado no sólo a entender el ciclo biológico del parásito, sino también a entender mejor la respuesta inmune. En el humano, existen 4 especies de *Plasmodium* que pueden generar la enfermedad: *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax* y *P. ovale*; también existen cuatro especies que afectan al ratón: *P. vinckeyi*, *P. berghei*, *P. yoelii* y *P. chabaudi*, éstos dos últimos son los más utilizados, por ciertas ventajas que se explicaran más adelante.

En este trabajo se estudia la especificidad de la inmunidad durante la infección secundaria en un modelo experimental de malaria. El desarrollo de la inmunidad adquirida contra paludismo en los individuos que viven en las regiones endémicas, requiere varios años y del contacto constante con las distintas especies del parásito, es decir, es necesaria la continua estimulación antigénica, además que la respuesta inmune es específica para cada especie. Lo anterior nos condujo a analizar lo que sucede con el sistema inmune después de haber estado en contacto con un parásito y volverse a encontrar con el mismo después de haberlo eliminado y cómo reacciona ante la presencia de otra especie, o bien, en la presencia al mismo tiempo de una mezcla de plasmodios (la especie con la que ya se había encontrado el sistema inmune y una especie diferente), situación en la que se encuentran las poblaciones de las áreas endémicas, ya que es común que en esas regiones los individuos se infecten con más de una de las especies del parásito.

## **2. FUNDAMENTACIÓN TEORICA**

### **2.1. La Malaria o Paludismo**

La Malaria o Paludismo es una infección causada por un parásito protozoario coccidiano del género *Plasmodium*, se transmite por la hembra del mosquito *Anopheles* spp [1]. Se caracteriza por episodios febriles comunes de acuerdo a la especie parasitante, con posteriores escalofríos intensos culminando con diaforesis; además se presenta hepatoesplenomegalía y anemia que puede variar de leve a grave [2].

La malaria representa una de las enfermedades documentadas más viejas de la humanidad e incluso de hoy en día, los parásitos del género *Plasmodium*, matan más gente que otras enfermedades infecciosas. Un dato relevante es que se han encontrado momias egipcias de más de 3000 años con esplenomegalia, probablemente debido a la malaria. Las fiebres mortales y la esplenomegalia se han descrito desde principios de 2700 a. C. en escritos egipcios y japoneses. Las descripciones más completas del paludismo se hicieron en la Roma antigua en donde la malaria causo enormes estragos. Desde el siglo I a.C. los escritores asociaron la enfermedad con la existencia de los mosquitos [3].

Debido a la ausencia de registros en el Nuevo Mundo antes del arribo de los exploradores europeos, conquistadores y colonos, se asume, que ellos importaron a *P. malariae* y *P. vivax* a América. Aparentemente la llegada de *P.*

*falciparum* coincide con la importación de esclavos africanos y desde principios de 1800 la malaria se encuentra en todo el mundo [3].

Esta enfermedad ha tenido gran impacto sobre la historia del mundo más que cualquier otra enfermedad infecciosa. Ha sido responsable de los resultados en diversas guerras y movimientos populares además del crecimiento y desarrollo de varias naciones en el mundo [3].

A pesar de que el conocimiento del parásito era mínimo, se comenzó a utilizar como tratamiento la infusión de la corteza de quina por Don Juan de Vega, para curar la malaria del conde de Chinchón, en 1631, lo que extendió su uso en toda Europa, y fue hasta 1880 que Laveran descubrió el agente etiológico. En 1884, Sajaron realizó la descripción detallada de *P. falciparum* y seis años más tarde Romanowski introdujo el método panóptico de coloración con azul de metileno y eosina al estudio de los plasmodios, sin embargo, fue hasta 1897 que Ross descubrió al transmisor del paludismo y más tarde, los experimentos realizados por varios investigadores, tal como, Bastieanelli, Gignami y Grassi ayudaron a la descripción detallada de todos los estadios morfológicos de la esporogonia que se desarrolla en el mosquito [2].

De las cuatro especies más comunes que infectan a los humanos, son *P. vivax* y *P. falciparum* los que ocasionan el 95% del total de las infecciones. Algunos estimados indican que *P. vivax* genera el 85% de la infecciones. Estas especies también tienen la más alta distribución y extensión en las zonas tropicales y subtropicales. El *P. falciparum* prácticamente esta confinado a los trópicos, El *P. malariae* se presenta esporádicamente, y *P. ovale* esta confinado principalmente al oeste de África central y algunas islas del Pacífico Sur [3].

Normalmente la asociación de la malaria con el paciente tiene una historia de viajes a un área donde la enfermedad es endémica, sin embargo, otras situaciones que pueden resultar en infecciones involucran la transfusión de sangre, el uso de agujas hipodérmicas contaminadas por prior uso (como por ejemplo, los adictos a drogas), las infecciones congénitas, y la transmisión por mosquitos nativos que adquieren el parásito de infecciones importadas [3].

Se estima que existen de 300 a 500 millones de individuos que están infectados con malaria en el mundo y cada año se infectan aproximadamente 1.5 a 2.7 millones de personas, de las cuales la mayoría son niños y mueren por la enfermedad. Los países africanos, donde existe el 90% de las muertes por malaria, son arrasados por la guerra y las naciones que financian la mayoría de las investigaciones en malaria cortan el presupuesto de las mismas. La prevención de esta enfermedad es difícil debido a que el parásito ha desarrollado resistencia a la mayoría de los fármacos disponibles. El estudio y perfeccionamiento de una vacuna efectiva todavía tiene un largo camino. Se ha presentado un incremento en el número de casos de malaria por *P. falciparum*, los cuales pueden estar relacionados con el incremento a la resistencia de la cloroquina [3].

Según el sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de la Secretaría de Salud el número total de casos de paludismo en México, mostró un acumulado de 641 casos de *P. vivax* hasta la semana 16 del 2007, mientras que no se registraron casos ocasionados por *P. falciparum* en el mismo periodo [4].

## **2.2. Clasificación taxonómica del Plasmodium [2]**

Phyllum: *Apicomplexa* (una sola célula)

Clase: *Sporozoea* (carecen de organelos de locomoción)

Subclase: *Coccidia*

Familia: *Plasmodiidae*

Género: *Plasmodium*

Especies

que afectan

al humano: *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*.

## **2.3. Ciclo biológico**

El vector de la malaria es el mosquito hembra *Anopheles*, cuando el vector toma su alimento sanguíneo, los esporozoitos presentes en las glándulas salivales del mosquito se descargan en la perforación y después de aproximadamente una hora, estos estadios infectivos se transportan vía sanguínea al hígado, donde penetran en los hepatocitos y comienzan a crecer, así se inicia el ciclo preeritrocítico o exoeritrocítico. Estudios detallados de la entrada de los esporozoitos dentro de los hepatocitos indican que el proceso involucra proteínas de superficie del parásito y moléculas del huésped. Los esporozoitos comienzan a

dividirse repetitivamente, estas esquizogonias generan un gran número de merozoitos exoeritrocitarios que salen del hígado e invaden a los eritrocitos, así inicia el ciclo eritrocítico. Se ha descrito una esquizogonia secundaria o inactiva que puede existir en *P. vivax* y *P. ovale*, puede permanecer en el hígado secuestrada por un largo tiempo, estos estadios se denominan hipnozoitos. La esquizogonia en reposo, no existe en *P. falciparum* y probablemente no exista en *P. malariae* [3].

Cuando el sistema inmune o la terapia no eliminan al parásito y el número de eritrocitos parasitados incrementa de nuevo con síntomas clínicos subsecuentes se conoce como recrudescencia. Todas las especies pueden provocar una recrudescencia. El escenario en el cual, el eritrocito infectado se elimina y a pesar de ello, existe una recaída posterior debido a una nueva invasión de los eritrocitos por los merozoitos del hígado, se llama reaparición o recaída verdadera, teóricamente esto ocurre solamente en infecciones por *P. vivax* y *P. ovale* [3].

Los parásitos crecen y se alimentan de hemoglobina, (el producto metabolizado por el parásito se llama hemozoina) dentro de los eritrocitos, el merozoito (o trofozoito joven) se invagina y forma un anillo ameboide uninucleado, así entonces, desde que los núcleos comienzan a dividirse el trofozoito se llama esquizogonia, una vez que ha madurado contiene merozoitos (el número de merozoitos por esquizogonia depende de la especie), los cuales son liberados dentro del torrente sanguíneo muchos de ellos son destruidos por el sistema inmune, pero otros invaden a los eritrocitos, en los cuales comienza de nuevo el ciclo eritrocítico.

Después de varias generaciones eritrocíticas, parte de los merozoitos no se convierten en esquizogonias, se diferencian a gametocitos femeninos y masculinos. No se conoce si su desarrollo está predeterminado genéticamente o si es una respuesta a algún estímulo ambiental específico. El estímulo ambiental puede relacionarse directamente con el incremento de la densidad del parásito y es probable que pudiera tener alguna conexión directa entre las dosis subletales de cloroquina y un incremento en la gametocitogénesis, particularmente en parásitos resistentes a este fármaco [3].

Las formas sexuales y asexuales sólo se presentan en la fase eritrocítica. En el caso de *P. falciparum* el parásito dentro del glóbulo rojo continúa creciendo y la membrana del eritrocito se adhiere a las células endoteliales y a los capilares de los órganos internos. De esta forma sólo las formas anilladas y los gametocitos aparecen en sangre periférica [3].

Si los gametocitos ingresan cuando el mosquito ingiere sangre, maduran en gametos dentro del intestino del mosquito. Los microgametos masculinos sufren una división nuclear por un proceso llamado exaflagelación, en el cual el microgametocito se rompe fuera del eritrocito, comienza a moverse y penetra al macrogametocito femenino originando así al cigoto, que se vuelve elongado y móvil, se conoce como oocito. Este estado migra al intestino medio del mosquito, secreta una delgada pared y crece dentro del oocisto, el cual se dispersa en el hemocele del insecto. En unos pocos días a 2 semanas, el oocisto madura, con la formación de cientos de esporozoitos. Cuando el oocisto se rompe, los esporozoitos se liberan dentro del hemocele y se distribuyen por el cuerpo y algunos toman rumbo hacia las glándulas salivales. Cuando el mosquito toma su

siguiente alimento sanguíneo, los esporozoitos se inyectan junto con la saliva dentro del huésped [3].

#### **2.4. Patogénesis**

La malaria tiene uno de los pocos agentes infecciosos para los humanos que invade los eritrocitos, las cuatro especies de parásitos que afectan al humano tienen ciclos de vida similares que alternan entre el mosquito y el huésped

Los síntomas y los signos se producen cuando los eritrocitos infectados se rompen y los merozoitos (formas asexuales del parásito) recientemente formados, se liberan en los órganos y tejidos del cuerpo, lo que induce la segregación de diversas citocinas proinflamatorias [1, 5, 6]. Los síntomas de fiebre, dolor muscular, dolor de cabeza y náusea se relacionan con la parasitemia, la fiebre se modula por pirógenos endógenos segregados por monocitos y macrófagos respondiendo a la ruptura de los eritrocitos infectados y a la liberación de los merozoitos. Los pirógenos endógenos son citocinas que afectan el centro regulador de la temperatura en el hipotálamo e inducen la síntesis de prostaglandina  $E_2$ , la cual inicia la respuesta fisiológica que produce fiebre, escalofríos, vasoconstricción y otras manifestaciones clínicas [7].

Los esporozoitos inyectados por el insecto, los parásitos exoeritrocitarios, que se desarrollan en el hígado, y las formas sexuales del parásito (macro y

microgametocitos) de los que surgen las formas asexuales no causan la sintomatología clínica [1].

#### **2.4.1. La invasión de los eritrocitos**

Los merozoitos en la sangre periférica invaden a los eritrocitos (y ocasionalmente a las plaquetas), la proporción y el grado por la cual el parásito se multiplica parece relacionarse con la severidad de la enfermedad en individuos no inmunes. La invasión es un proceso altamente específico, ordenado y secuencial en el cual la forma invasiva, el merozoito, ataca a eritrocitos susceptibles, se reorienta para que su terminación apical este posicionada en la membrana del eritrocito y entonces se mueve lentamente dentro de una invaginación localizada. El proceso de entrada de la invasión se completa en 30 segundos. En la malaria causada por *P. falciparum*, el eritrocito se une al antígeno (EBA 175) y/o a las proteínas de superficie del merozoito (MSP-1 y MSP-2) al parecer interactúan con las sialoglicoproteínas (glicoforinas) del eritrocito. La adhesión y orientación continúa con la interiorización acompañada por la deformación de la membrana eritrocitaria [1].

### 2.4.2. Citoadherencia.

Es el proceso mediante el cual las células infectadas maduran específicamente adheridas a las células endoteliales dentro de las venúlas pos capilares, parecen jugar un rol central en la patogénesis de la malaria cerebral causada por *P. falciparum*, además, la citoadherencia de parásitos maduros:

- a) Evita su pase hacia el bazo, el sitio ideal para su destrucción,
- b) Favorece el crecimiento del parásito puesto que los sitios de maduración del parásito se encuentran en lugares de tensión de oxígeno reducida,
- c) Puede facilitar la invasión de eritrocitos no infectados.

La citoadherencia del parásito genera obstrucción microvascular, que focaliza los efectos de las toxinas parasitarias, las cuales activan a las células endoteliales y generan el daño que resulta de la liberación de citocinas. Durante la maduración del parásito un número de protuberancias regulares y simétricamente dispuestas aparecen sobre la superficie de la célula infectada, se piensa que son el sitio de sujeción del eritrocito a la célula endotelial. Un número elevado de proteínas parasitarias de alto peso molecular, sobresalen de estas protuberancias de las cuales la mejor conocida es la proteína de membrana eritrocitaria de *P. falciparum* (PfEMP)-1 codificada por los genes *var* (variantes) [1].

## **2.5. Cuadro clínico**

La malaria es una enfermedad febril, sin embargo las características clínicas pueden ser extremadamente diversas porque los eritrocitos parasitados circulan por todos los órganos y tejidos dentro del cuerpo y por lo tanto pueden producir una amplia variedad de patologías. En las regiones endémicas las manifestaciones de enfermedades severas en niños son principalmente las de malaria cerebral, frecuentemente con convulsiones, dolor respiratorio y anemia severa, mientras que en los adultos es más probable desarrollar fallas multiorgánicas como la renal y son menos probables las convulsiones o anemia severa. Entre las complicaciones de una infección prolongada, encontramos la esplenomegalia Malarial Hiperactiva (HMS) y el síndrome nefrótico debido a *P. malariae* [1].

### **2.5.1. Anemia**

La anemia que se genera por infecciones de malaria puede tener diversos orígenes [3]:

- a) Lisis directa de los eritrocitos en función del ciclo de vida del parásito

- b) La eliminación esplénica tanto de eritrocitos infectados como de aquellos que no lo están.
- c) Lisis autoinmune de eritrocitos infectados y no infectados.
- d) Descenso de la incorporación de hierro al grupo hemo.
- e) Incremento de la fragilidad de los eritrocitos, y
- f) Descenso en la producción de eritrocitos.

La anemia es normocítica y puede ser “grave” (Hb <4g/dL). Suele haber trombocitopenia (<100 000 plaquetas/ $\mu$ L) y en las formas más graves de la enfermedad se observa una leucocitosis periférica. Se puede elevar: la creatinina, las bilirrubinas y las enzimas séricas (p.e. aminotransferasas y 5'nucleotidasa). Los pacientes gravemente enfermos suelen tener acidosis, con pH bajo en el plasma capilar y concentraciones bajas de bicarbonato. Las alteraciones hidroeléctricas (sodio, potasio, cloro, calcio y fosfato) son variables. Tanto en el adulto como en el niño, las concentraciones de ácido láctico en la sangre y el líquido cefalorraquídeo están elevadas de forma proporcional con la gravedad de la enfermedad [8].

La anemia causada por *P. falciparum* es compleja y multifactorial. La caída de la hemoglobina es superior a la que ocasiona la pérdida de eritrocitos infectados [1].

El principal mecanismo en la patogénesis de la anemia es:

- a) Los plasmodios liberan antígenos que se adhieren a las membranas de los eritrocitos sanos, lo que induce cambios en su superficie que genera la formación de anticuerpos y la interacción con estas moléculas los

etiqueta como alterados y entonces cuando llegan al sistema reticuloendotelial son destruidos.

- b) Finalmente, la decadencia de la producción de eritrocitos debido a hipoplasia medular como se observa en las infecciones agudas y diseritropoyesis, un padecimiento que en términos funcionales resulta en eritropoyesis inefectiva.

### **2.5.2. Hepatoesplenomegalia**

El bazo presenta cambios inmediatos en la infección, tal como hiperemia y un ligero agrandamiento, después durante la fase crónica, el bazo aumenta de tamaño clínicamente aparente debido a que microscópicamente tanto la pulpa roja como la blanca se distienden por una hiperemia masiva, los eritrocitos y los macrófagos en su interior forman grandes racimos amorfos de pigmentos negros y estos se encuentran diseminados en todo el órgano. Las observaciones histológicas evidencian una hiperplasia linfoide de la pulpa blanca y una proliferación de las células madre hematopoyéticas como resultado de la anemia

En el hígado los cambios aparentes suceden durante la infección clínica, se presenta una sobrecarga de fluido, donde existe una distensión de las sinusoides, por el incremento del número de macrófagos con

pigmentos así como una cantidad mayor de células polimorfonucleares y las células de Kuffer se repletan de pigmento lo que ocasiona necrosis focal con infiltración por polimorfonucleares y linfocitos [7].

### **2.5.3. Pérdida de Peso Corporal**

La pérdida de peso se debe en gran medida a las consecuencias provocadas por la anemia, ya que, al igual que en los humanos la deficiencia de oxígeno en el cuerpo hace que los órganos de mayor importancia reciban la mayor cantidad de éste, mientras que al sistema digestivo, por ejemplo, sea el menos beneficiado con fluido sanguíneo y ello involucra que la absorción de nutrientes sea menor, esto a su vez, implica un decrecimiento en la masa muscular, tanto por una menor cantidad de fluido sanguíneo recibido, así como también por la escasa cantidad de nutrientes disponibles

## **2.6. El modelo murino**

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 de 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 inmune del 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 observamos en las cuatro especies que afectan al humano [9].

Aunque en los últimos años el conocimiento de la respuesta inmune en el humano ha avanzado considerablemente, sigue siendo válido el concepto de que el sistema inmune mejor conocido es el del ratón. Las similitudes que hay en la organización y funcionamiento del sistema inmune de los mamíferos ha hecho posible el extrapolar al humano, conceptos adquiridos al estudiar el sistema inmune del ratón, sin embargo, hay que recordar que el sistema inmune del ratón no es una copia exacta del sistema inmune del humano y por lo tanto, las extrapolaciones ratón-humano deben estar sujetas a comprobación experimental.

Los modelos de malaria murina se iniciaron cuando en la década de los cuarentas del siglo pasado Vincke I. H. estudio el mosquito *Anopheles duremi millcampsi* y estableció que el huésped vertebrado natural de este plasmodio era

la rata de campo *Grammomys surdaster*. Infectó a la rata con el mosquito y en 1948 aisló el parásito *Plasmodium berghei*, esto impulso la investigación sobre la malaria pero el parásito era letal para los ratones, así que en 1952 aisló otro parásito al que denominó *Plasmodium vinckei* que infecta fácilmente al ratón. Posteriormente se aislaron dos especies más *P. chabaudi* y *P. yoelii* en África, con el tiempo se detectaron diferentes cepas de las 4 especies ya descritas con distintas propiedades incluyendo infecciones no letales que permiten estudiar la respuesta inmune en la infección [10].

En 1974, el doctor Killick-Kendrick propuso una clasificación de los diferentes plasmodios de roedores que es la que se usa actualmente. La clasificación se basa en las propiedades morfológicas, biológicas y la presencia de diferentes isoenzimas [10].

De esta forma los plasmodios murinos se distribuyeron en dos grupos: el primero *Berghei*, que se caracteriza por infectar preferentemente a los reticulocitos, producir de 10 a 18 merozoitos por eritrocito infectado y causar infecciones no sincrónicas, asimismo pueden infectar ratas, ratones y hamsters y el segundo grupo *Vinckei*, que infecta preferentemente a los eritrocitos maduros, que producen de 6 a 12 merozoitos y causan infecciones sincrónicas, además estos plasmodios pueden infectar ratones de laboratorio pero no ratas ni hamsters. Los dos grupos pueden agruparse según la siguiente tabla [10]:

### Clasificación Killick- Kendrick para los plasmodios murinos

GRUPO	ESPECIES	SUBESPECIES
BERGHEI	<i>P. berghei</i>	
	<i>P. yoelii</i>	<i>P. yoelii yoelii</i>
		<i>P. yoelii killicki</i>
		<i>P. yoelii nigeriensis</i>
VINCKEI	<i>P. vinckei</i>	<i>P. vinckei vinckei</i>
		<i>P. vinckei petteri</i>
		<i>P. vinckei lentum</i>
		<i>P. vinckei brucechwatti</i>
	<i>P. chabaudi</i>	<i>P. chabaudi chabaudi</i>
		<i>P. chabaudi adami</i>

Kumate J, Martínez PA, comp. *A cien años del descubrimiento de Ross. El paludismo en México*. México: Editorial El Colegio Nacional, 1998:145-148

A continuación se describirán las características biológicas de las especies de parásitos que se utilizan en el modelo experimental de malaria de este trabajo. Los estadios de los esporozoitos y de las esquizogonias preeritrocíticas son más o menos similares en las diferentes especies, probablemente porque se reproducen con menor frecuencia que los estadios sanguíneos, en contraste, los ciclos sexual y asexual muestran muchas diferencias específicas [9].

### 2.6.1. *Plasmodium yoelii*

*Esporogonia*. Su temperatura ideal de maduración esta entre 23-25° C con una óptima de 24° C

*P. yoelii nigeriensis* es una de las especies que produce más oocitos en *A. stephensi*, de 400 a 600 oocitos por mosquito, lo que lo convierte en un portador mortal. Cuando existe una infección masiva de esporozoitos, se vuelven menos infectivos, también sucede lo mismo cuando más de 100 hembras se alimentan del mismo roedor, pues parece ser que la eficiencia de la esporogonia depende del número de mosquitos alimentados de un solo donador de gametocitos.

El tiempo de maduración de los oocitos es corto, (9 y 10 días), y un gran número de esporozoitos alcanzan las glandulas salivales cerca del 11° día después de haberse alimentado.

*Esquizogonia preeritrocítica*. Los esquizontes hepáticos maduran en promedio de tiempo de 45 hs en los ratones. Se producen aproximadamente 20,000 merozoitos en ratones.

*Esquizogonia eritrocítica*. Muestra una afinidad por los reticulocitos, y uno de ellos podría contener hasta 10 parásitos, sin embargo, también pueden invadir a los normocitos, dependiendo de la virulencia de la especie. La parasitemia de *P. yoelii yoelii* 17X y 265BY, depende de la producción de

reticulocitos por el huésped, no obstante, *P. yoelii nigeriensis* crece rápidamente e invade todos los eritrocitos disponibles. La duración del ciclo de la esquizogonia es de 18 hs y la infección es asincrónica. Esta especie es más resistente a la cloroquina que las otras especies.

*Gametocitos*. La producción de gametocitos es constante en la infección. En el laboratorio, estos no tienen un tiempo circadiano preferencial para la infección de mosquitos

#### **2.6.2. *Plasmodium chabaudi*.**

*Esporogonia*. Semejante a otros parásitos, la maduración de los oocitos ocurre a 24° C y toma de 12 a 13 días.

*Esquizogonia preeritrocítica*. Es poca la información disponible sobre este estadio pero su tiempo de maduración es de 54 h. para *P. chabaudi chabaudi* y 58 h. para *P. chabaudi adami*.

*Esquizogonia eritrocítica*. Las subespecies de esta especie invaden a los normocitos y a los reticulocitos. La duración de un ciclo de esquizogonia es de 24 h. y es sincrónico. Las esquizogonias aparecen por la noche entre las 00:00 y las 03:00 h. donde el periodo de luz es diurno y al medio día cuando

el periodo de luz esta invertido. Ambas especies son muy sensibles a la cloroquina.

*Gametocitos.* Una pequeña cantidad de gametocitos se observa alrededor del día 3 y 4, pero mucha de la producción de gametocitos ocurre durante y después de la crisis, alrededor del día 8, cuando la infectividad de los gametocitos esta inhibida. El número de gametocitos y su infectividad se puede incrementar en ratones por la inducción de reticulocitosis, ya sea, por repetidos sangrados o por la inyección de hidrocloreuro de fenilhidrazina

## **2.7. Mecanismos de la respuesta inmune en malaria.**

Existen varios tipos de respuesta inmune antiparasitarias, mediadas tanto por linfocitos T como B, que poseen receptores (TCR) específicos de antígenos en su membrana capaces de reconocer distintos determinantes antigénicos, como por otros tipos celulares, polimorfonucleares (PMN) macrófagos, etc. [11]

La respuesta inmune que controla o elimina al estadio sanguíneo de plasmodio, depende principalmente de los linfocitos T, sin embargo para eliminar completamente a este parásito se requiere la participación de los linfocitos B [12, 13]. La infección por *P. yoelii* y *P. berghei* no se puede controlar o eliminar sin células B, la inmunidad depende de anticuerpos; mientras que, para las

infecciones primarias provocadas por *P. chabaudi chabaudi* y *P. chabaudi adami*, así como, las infecciones secundarias por *P. vinckei* se pueden controlar, por un mecanismo independiente de anticuerpo,

La respuesta inmune para los estadios sanguíneos de las distintas especies sigue, por lo regular el mismo comportamiento, comenzando como primera línea de defensa, la participación de macrófagos y células NK [6], además de los linfocitos T CD4+, los cuales son prescindibles para la adquisición de inmunidad tanto celular como humoral. A continuación se describe a detalle esta participación.

Las células NK son una fuente importante de interferón gamma (INF- $\gamma$ ), una citocina que juega un papel muy importante en la activación de otras células con el mecanismo inmune antígeno independiente, tal como los macrófagos, que eliminan los parásitos tanto intra como extracelulares [14]. El principal mecanismo por el cual, las células NK controlan el crecimiento de patógenos intracelulares, involucra la producción de INF- $\gamma$  [6, 11], además contribuye a la resistencia durante las fases tempranas de la infección, las células NK influyen en la naturaleza de la respuesta inmune adaptativa [15], juegan un papel como células efectoras en la resistencia innata y como células reguladoras en la inmunidad adaptativa [16].

Las células T CD4+ reconocen a los antígenos en el contexto de sus receptores celulares T (TCR)  $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$ . Según estudios realizados en ratones, las células T con TCR  $\alpha\beta$  son primordiales para la resolución de la malaria en

estadios sanguíneos, mientras que, las células T con TCR  $\gamma\delta$  están más bien involucradas en la patogénesis de la enfermedad [16].

El reconocimiento de un antígeno específico por parte de las células T CD4+ con la interacción del TCR  $\alpha\beta$ , da lugar a la activación de dos subpoblaciones de células T CD4+: Th1 y Th2 que producen patrones característicos de citocinas con actividad en otras células, tal como T y B, así como macrófagos con la función de erradicar la infección [11]. Así pues, las células T CD4+ actuando con ambas subpoblaciones de Th1 y Th2 pueden mediar la protección [5].

Langhorne *et al* (1989) demostraron que las células T CD4+ correspondían al tipo inflamatorio o subpoblación Th1 y predominaban en un inicio o fase aguda, mientras que, durante fase crónica de la infección predominaba la subpoblación Th2, las cuales cooperan para la producción de anticuerpos por las células B, esto es que la activación de las células Th1 median los mecanismos de la inmunidad mediada por células, la cual controla la parasitemia aguda, mientras que la posterior activación de las células Th2, participan en la proliferación y la diferenciación de las células B para eliminar la infección por mecanismos que dependen de anticuerpos.

Los linfocitos Th1 están involucrados principalmente en la activación de las células citotóxicas (TC y NK) y macrófagos debido a la producción de citocinas, tal como, IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$  (conocida también como linfotóxina alfa) e interleucina 2 (IL-2) [11, 13], al parecer la secreción de INF- $\gamma$  activa a los macrófagos, los cuales secretan IL-12, IL-1 y TNF- $\alpha$  así como la producción de grandes cantidades de NO

(óxido nítrico), el cual inhibe el desarrollo de los estadios exoeritrocitarios de *Plasmodium berghei* y *P. yoelii in vitro* y derivados del mismo matan a los estadios eritrocitarios asexuales de *P. falciparum in vitro*. Alternativamente el NO puede tener un efecto indirecto a causa de la vasodilatación de los vasos sanguíneos, contribuyendo a una menor eficacia de los macrófagos en el secuestro de los parásitos en los capilares tisulares profundos [5], sin embargo, en estudios realizados con ratones infectados con *P. chabaudi* AS se ha propuesto que los niveles elevados de NO en el bazo, pudieran proteger contra el daño tisular [16], Otro contribuyente a la protección del huésped es la IL-12 producida por los mismos macrófagos, es un potente factor de crecimiento de progenitores de la hematopoyesis, así como también progenitores celulares eritroides [18].

El INF- $\gamma$ , regula la opsonización y la producción de las inmunoglobulinas que fijan complemento como la IgG2a y la IgG3 involucradas en la fagocitosis, así como la regulación de la citotoxicidad celular anticuerpo-dependiente. El INF- $\gamma$  junto con las citocinas asociadas a las células Th1 y al TNF- $\alpha$ , pueden controlar la parasitemia aguda, existen expectativas de que una cadena de citocinas que involucran a la IL-12, INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  son de gran importancia para lograr este efecto [16].

Las células Th2 cooperan en la producción de anticuerpos, secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 [11,13]. La IL-4 es un factor de proliferación para las células B que favorece la producción de anticuerpos IgG1 e IgE [19]. Las citocinas IL-4, IL10 e IL-13, tienen propiedades antiinflamatorias que pueden antagonizar la respuesta de las células Th1, debido a sus efectos inhibitorios sobre la activación

de los macrófagos. La producción de citocinas por las células Th2 ejerce una función sobre las células B, puesto que estimulan la producción de IgM, tanto en humanos como en ratones y los isotipos de IgG no fijadores de complemento, IgG1 e IgG4, en ratones y humanos respectivamente, así también como la producción de IgE.

El estadio preeritrocítico del parásito es más susceptible a los efectores del sistema inmune, porque el hepatocito es la única célula huésped capaz de expresar moléculas HMC de clase I y clase II. El uso de roedores como modelo ha ayudado a revelar el valor de los estadios hepáticos como blanco de defensa y a permitido describir un gran número de mecanismos capaces de inhabilitar el desarrollo de los parásitos intrahepáticos, encontrando que en este estadio son susceptibles anticuerpos, actuando solos o en conjunto con células no parénquimales como son células de Kupffer, las células NK, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, las células CD8+, las células T CD4+ o las células T  $\gamma\delta$ , citotoxicidad y también un gran número de citocinas y otros mediadores. La capacidad de las células T CD4+ y CD8+ de roedores para inhibir los parásitos en estadio hepático radica en la presencia de antígenos en los hepatocitos en asociación con las moléculas de MHC clase I y clase II. Los hepatocitos de roedores normalmente expresan bajos niveles de moléculas de MHC clase I y la expresión de moléculas MHC clase II pueden inducirse por el IFN- $\alpha$  y el INF- $\gamma$  [20].

La respuesta de las células T CD8+ es extremadamente efectiva inhibiendo el desarrollo de los estadios hepáticos y en corto tiempo después que los esporozoitos invadieron a los hepatocitos, el mecanismo molecular por el cual se

## 7. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Tipo de estudio: Experimental

## 8. MATERIALES

### 8.1. Material Biológico

- Eritrocitos infectados con cepas de *P. yoelii* 17XL y *P. chabaudi* AS criopreservados en nitrógeno líquido.
- Ratones CBA/Ca Infectados con: *P. yoelii* 17XL y re infectados con *P. chabaudi* AS, *P. yoelii* 17XL y la mezcla de ambos parásitos.

### 8.2. Equipo

<i>Equipo</i>	<i>Marca</i>
Balanza Analítica	Scientech SA210
Balanza Granataria	Sartorius BL610
Cámara de electroforesis	BIO-RAD

Campana de Flujo Laminar	Veco
Congelador	REVCO (-70° C) Nieto (-20° C)
Equipo para fotografía de geles	
Espectrofotómetro	WPA Lightwave
Fuente de Poder	BIO-RAD Power Pac 300
Incubadora de CO <sub>2</sub>	LAB-LINE
Microcentrífuga	Eppendorf 5804R
Micropipetores	Wilson y Finepipette
Microscopio	Zeiss Estándar 25 ICS
Refrigerador	MayTag
Termociclador	MJ Research Inc. PTC-100
Transiluminador UV	BIO-RAD GelDoc 1000
Vortex	Daigger Genie 2

### **8.3. Reactivos**

<i>Reactivo</i>	<i>Marca</i>	<i>Concentración</i>
Aceite Mineral	Sigma	
Acetato de sodio	Sigma Molecular Biology	
Acrilamida	Sigma	
bisAcrilamida	UBS	
Alcohol Isopropilico	Burdick & Jackson	
Agua milliQ	UBS	
Agua bidestilada	Hidropura	
AmpliTaq	Roche	
Ficoll	Sigma	
Sacarosa	Sigma	
Duodecil Sulfato de Sodio (SDS)	UBS	
TRIS	Gibco BRL	
EDTA	Sigma	

Anaranjado G	Sigma Molecular	
	Biology	
Primers MCK4 + MCK5	Oswell	
Primers ML1+ML2	Oswell	
Azul de Bromofenol	Sigma	
Xilen cianol	Sigma	
Cloruro de Potasio	Sigma MB	
Gelatina	Sigma	
Bromuro de Etidio	BDH Chemical	
Cloruro de Magnesio	Roche	25 mM
dNTP's	Invitrogen	5 mM
Etanol Absoluto	Merck	
TEMED	Sigma MB	
Metanol	Aldrich	
Mezcla Fenol:Cloroformo:Alcohol	Sigma	25:24:1
Isoamílico		
Persulfato de Amonio (APS)	Sigma	
Pronasa	Sigma	
Saponina	Sigma	
Ácido Bórico	USB	

#### **8.4. Material**

- Estuche de disección
- Puntas estériles para micropipetas ( 10  $\mu$ L, 200  $\mu$ L y 1000  $\mu$ L)
- Tubos Eppendorff de 1.5 mL
- Tubos Eppendorff de 200  $\mu$ L de pared delgada
- Laminillas de vidrio
- Vasos de precipitados
- Micropipetores
- Papel Parafilm
- Aguja para jeringa estéril

#### **9. MÉTODOS:**

##### **9.1. Infección y reinfección.**

Se infectó un lote de 90 ratones CBA/Ca con *P. yoelii* 17XL y al día 7 post infección, cuando la parasitemia fue alrededor de un 30%, se trataron con pirimetamina. Ocho semanas después el lote se dividió en 3 grupos de ratones, los cuales se re infectaron con  $5 \times 10^4$  eritrocitos parasitados de:

- |         |                           |
|---------|---------------------------|
| Grupo 1 | <i>P. chabaudi</i> AS     |
| Grupo 2 | <i>P. yoelii</i> 17XL     |
| Grupo 3 | mezcla de ambos parásitos |

## **9.2. Análisis de la parasitemia.**

A partir del día 4 post infección, se tomaron muestras de sangre diariamente de cada ratón para evaluar la parasitemia en frotis teñidos con Giemsa, los resultados se evaluaron por microscopía óptica.

## **9.3. Obtención de peso.**

Los ratones se pesaron diariamente, se consideró el 100% el peso registrado el día cero, con los datos así obtenidos, se calculó la pérdida de peso corporal.

## **9.4. Índice esplénico.**

Se extrajo el bazo de los ratones y se pesó para obtener la relación entre el peso del bazo y el peso del ratón lo cual determina el índice esplénico del ratón.

### **9.5. Análisis de Hemoglobina (Hb).**

Para la cuantificación de Hb en sangre se utilizó el reactivo de Drabkin y un estándar de Hb. La dilución de la muestra fue de 1:251 (1  $\mu$ L de sangre en 250  $\mu$ L de Drabkin), se agitó hasta la lisis completa y después de 10 min se leyó la absorbancia a 540 nm.

### **9.6. Extracción de DNA**

Diariamente se tomaron muestras de sangre a cada ratón (aproximadamente 10  $\mu$ L) en tubos Eppendorf que contenían 450  $\mu$ L de solución salina de Krebs heparinizada.

A cada tubo se le adicionaron 2  $\mu$ L de saponina al 10% y se mezcló por inversión hasta la lisis completa de los eritrocitos, los tubos se centrifugaron 5 minutos a 7000 rpm, se eliminó el sobrenadante evitando tocar el botón celular que se obtuvo al centrifugar.

El botón así obtenido se resuspendió con 80  $\mu$ L del amortiguador de lisis con pronasa y se incubó a 37° C por una hora, se adicionaron 320  $\mu$ L de acetato de sodio 375 mM y se incubó a 37° C durante 1 h.

Se adicionaron 480  $\mu$ L de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó en vortex por 5 min, se centrifugó a 13000 rpm por 15min y se separó el sobrenadante en otro tubo Eppendorf al cual se le adicionó el mismo

volumen de isopropanol frío, y se incubó durante 20 min. a  $-20^{\circ}\text{C}$ , se centrifugó a 14000 rpm por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , y se eliminó la mayor cantidad de alcohol evitando tocar el botón de DNA.

El DNA se secó en el termociclador a  $56^{\circ}\text{C}$  hasta que se evaporó completamente el alcohol.

### **9.7. La Reacción en Cadena de la Polimerasa en Nido**

Para la PCR en nido se realizaron los cálculos para el número de reacciones a analizar, así como del registro de cada una de las muestras en la primera amplificación de PCR en nido. Se realizó la mezcla maestra de reacción, como se indica en el Anexo 16.2.2 y se adicionaron  $19\ \mu\text{L}$  a cada tubo Eppendorf de  $200\ \mu\text{L}$ , posteriormente se colocaron  $50\ \mu\text{L}$  de aceite mineral, y fuera de la campana, se añadieron las muestras de DNA. Los tubos de reacción se colocaron en el termociclador en el programa ML1 correspondiente a los oligos ML1+ML2 (Anexo 16.2.1).

Se preparó la mezcla maestra para la segunda reacción de PCR, se utilizaron los oligos Mck4 y Mck5, se adicionaron  $50\ \mu\text{L}$  de aceite mineral y fuera de la campana  $1\ \mu\text{L}$  del producto de amplificación de la primera reacción de PCR, se colocaron los tubos en el termociclador de acuerdo al programa SEGR para los oligos MCK4+MCK5 (Anexo 16.2.4).

A los productos obtenidos de la segunda amplificación se le agregaron 10  $\mu$ L de solución de carga, y se preparó un tubo extra que contenía un marcador de peso molecular de 50 pb (pares de bases). Todos los productos de PCR se resolvieron e identificaron por electroforesis en un gel de acrilamida al 3%. El corrimiento electroforético se llevó a cabo por aproximadamente dos horas y cuarenta y cinco minutos a 180 V, el gel se tiñó con bromuro de etidio durante 3 minutos, se lavó y se eliminó el exceso de agua y los resultados se visualizaron en un trasiluminador de luz UV, la imagen se capturó utilizando una cámara de video conectada a una computadora y el análisis de las bandas se llevó a cabo con el software del aparato analizador de geles Bio-Rad GelDoc 1000.

## **10. POBLACIÓN**

Ratones CBA/Ca machos de 8 -12 semanas

## **11. CRITERIOS**

### ***11.1. De inclusión***

Cepa de ratones singénicos: CBA/Ca

Sexo:	machos
Edad:	8 -12 semanas
Condiciones:	libres de patógenos

### **11.2. De exclusión**

Ratones de diferente cepa.

Ratones hembra.

Ratones fuera del intervalo de edad ya establecido.

Ratones con otro tipo de infección o padecimiento.

### **11.3. De eliminación**

Solamente en caso de muerte por la infección.

### **11.4. Variables**

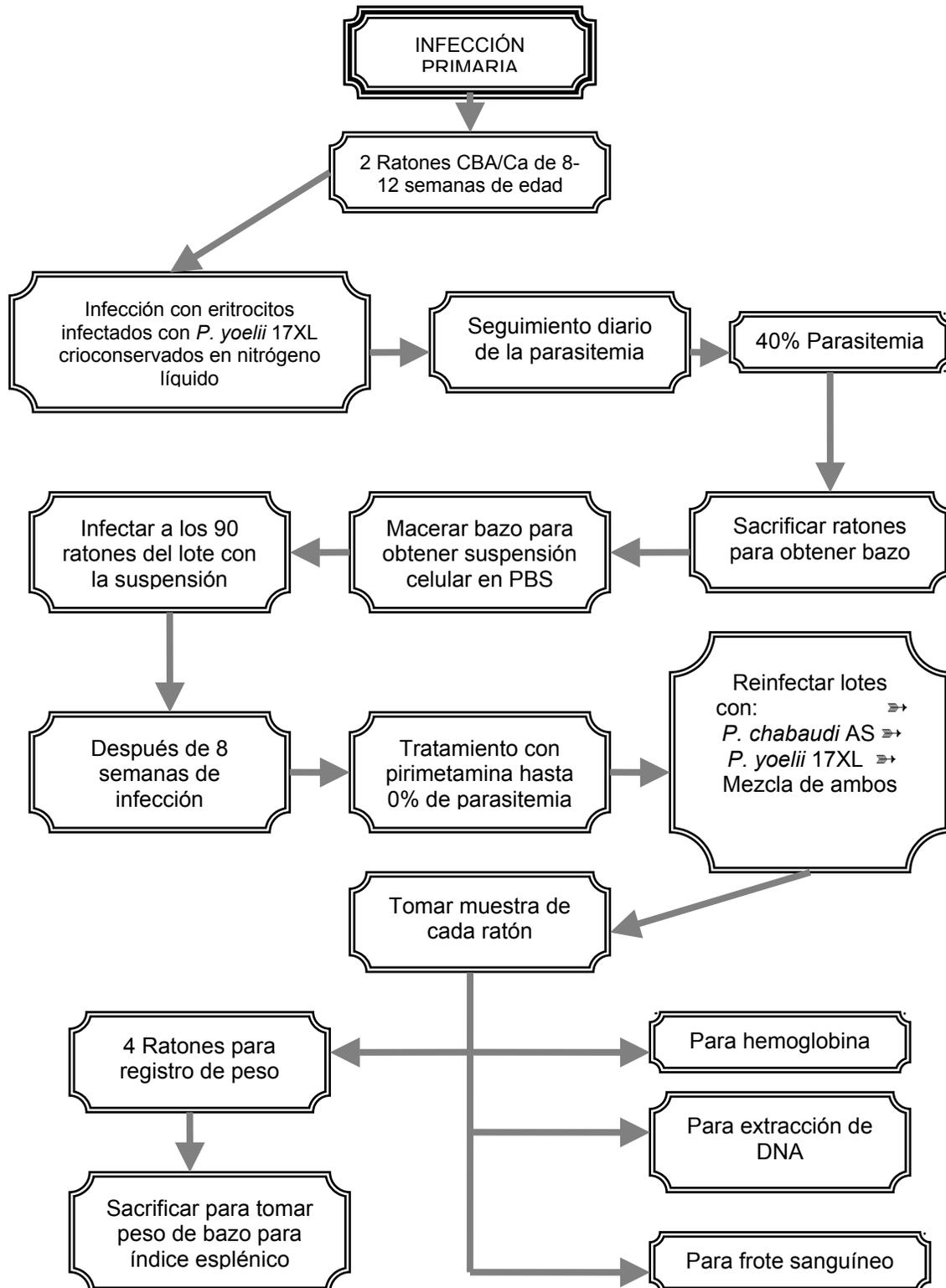
Parasitemia.

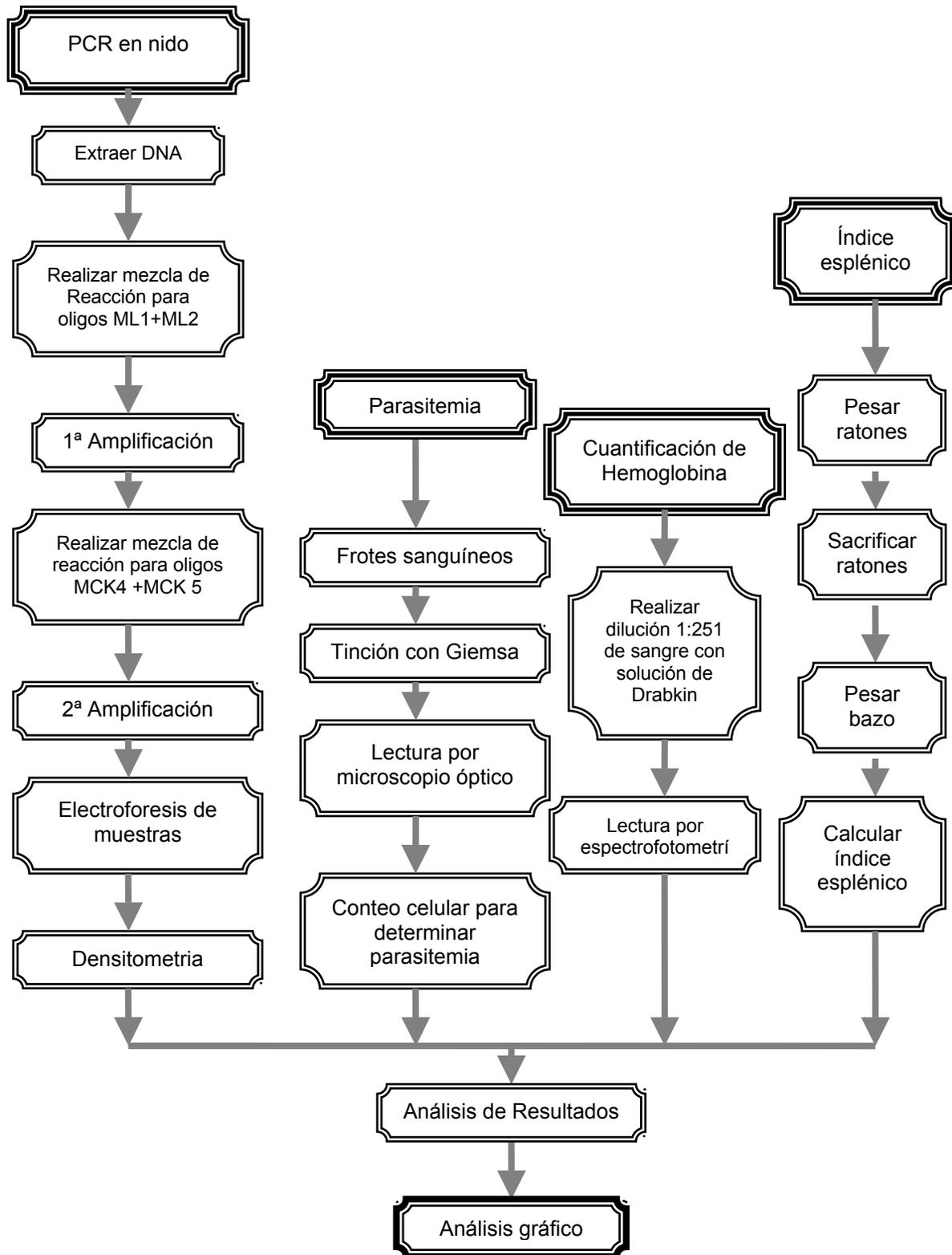
Índice esplénico.

Concentración de Hemoglobina.

Peso corporal.

## 12. DIAGRAMA DE FLUJO



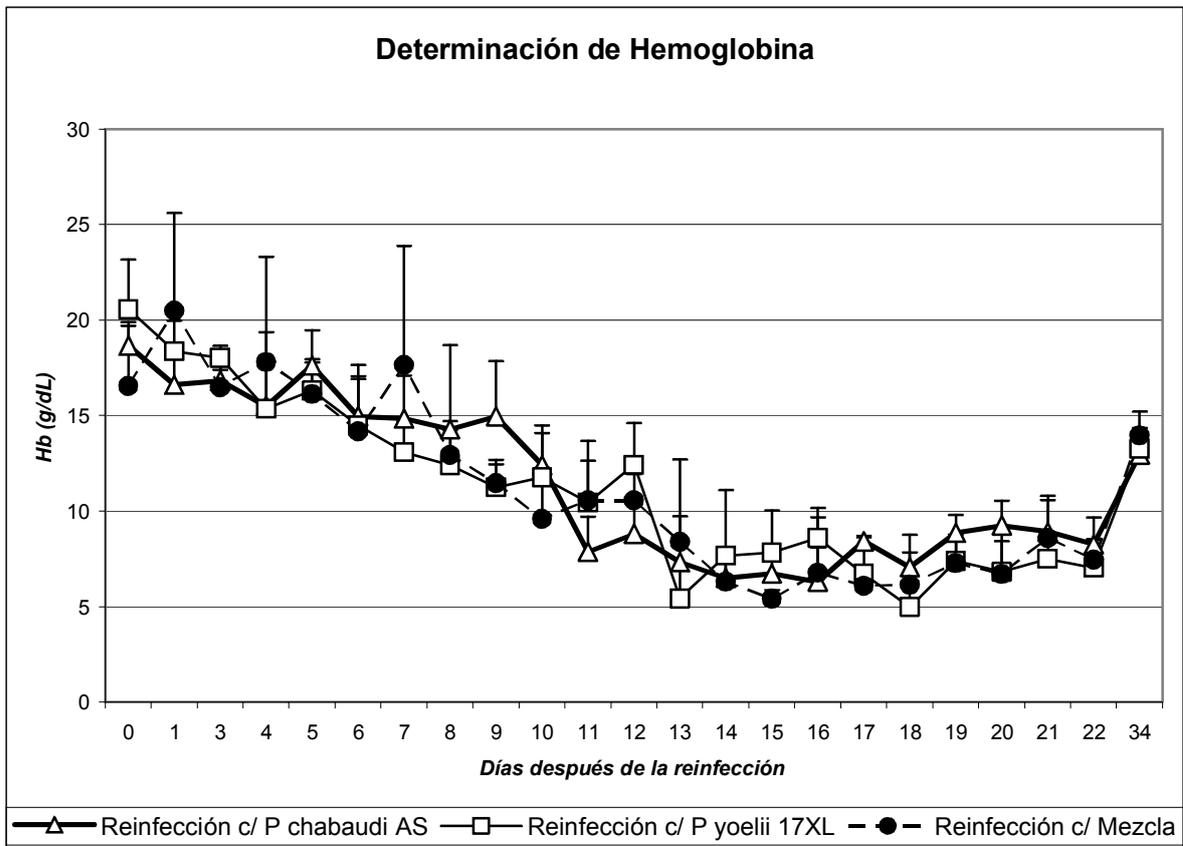


## 13. RESULTADOS.

### 13.1. Evaluación de la concentración de hemoglobina

Un lote de 90 ratones CBA/Ca se inocularon con *P. yoelii* 17XL al día 7 post infección se trataron con pirimetamina y 8 semanas después se dividieron en 3 grupos que se re infectaron con. A) *P. yoelii* 17XL, B) *P. chabaudi* AS y C) una mezcla de ambos plasmodios. Diariamente se tomó 1  $\mu$ L de sangre y se le adicionaron 250  $\mu$ L del reactivo de Drabkin, 10 minutos después se leyó la absorbancia a 540 nm y se evaluó la concentración de Hb (Gráfica 1) utilizando una curva estándar.

Los resultados muestran que disminuye paulatinamente la concentración de hemoglobina en los tres grupos de ratones. No se encontró diferencia significativa entre los niveles de Hb en los 3 grupos de ratones. A partir del día 18 los ratones empiezan a incrementar la concentración de hemoglobina, sin embargo, el último día de la evaluación (día 34 post infección) los ratones todavía no recuperaban sus niveles normales de hemoglobina (Gráfica 1).

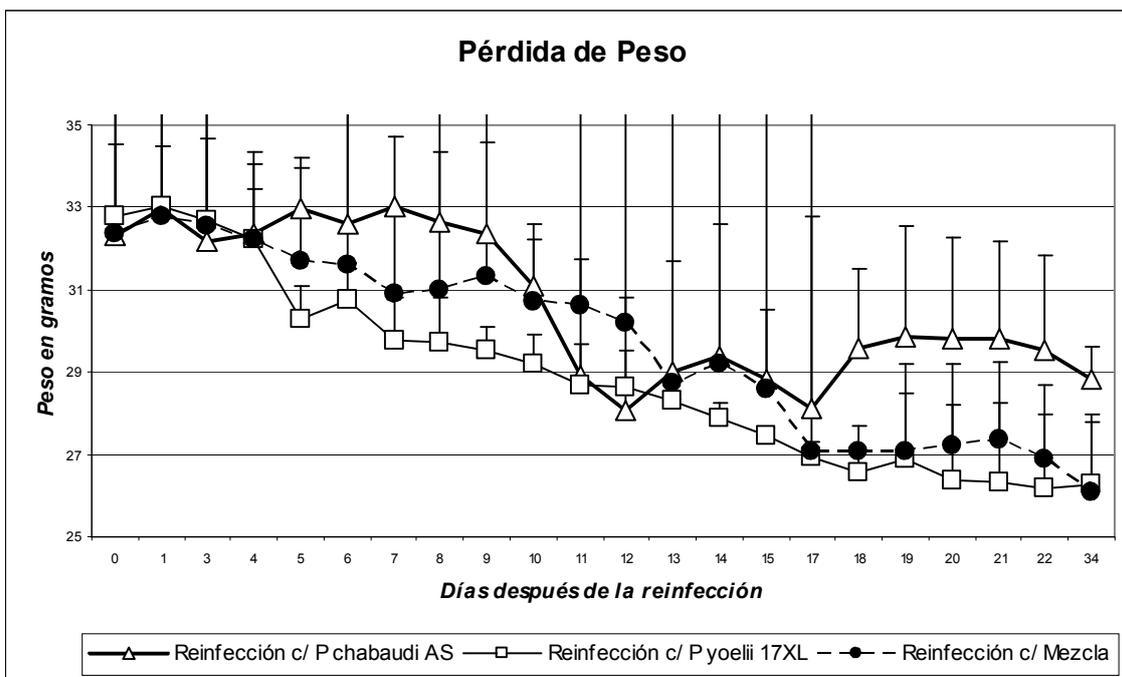


Gráfica 1. **Cinética de los niveles de hemoglobina durante la reinfección con *P. yoelii* 17XL, *P. chabaudi* AS o una mezcla de ambos parásitos.** Un lote de ratones CBA/Ca se infectó con *P. yoelii* 17XL a los 7 días post infección se trataron con pirimetamina y después de 8 semanas se re infectaron con: *P. yoelii* 17XL, *P. chabaudi* AS o una mezcla de ambos parásitos. Cada tercer día se analizó la concentración de Hb con el reactivo de Drabkin, los resultados se interpolaron en una curva estándar y se representan los promedios y las desviaciones estándar por día en cada grupo de ratones.

### 13.2. Pérdida de peso corporal

Un lote de 90 ratones CBA/Ca se infectaron con *P. yoelii* 17XL, se trataron con pirimetamina al día 7 postinfección y 8 semanas después se dividieron en 3 grupos que se re infectaron con: *P. yoelii* XL, *P. chabaudi* AS o una mezcla de

ambos plasmodios. Se evaluó el peso corporal de cada grupo de ratones y se analizó cada tercer día por 34 días, al final se determinó el promedio por día en cada grupo y se graficó contra el tiempo de reinfección.



Gráfica 2. Efecto de la reinfección sobre la pérdida de peso corporal por *P. yoelii* 17XL, *P. chabaudi* AS y una mezcla de ambos. Se evaluó el peso corporal de tres grupos de ratones CBA/Ca después de sufrir una infección con *P. yoelii* 17XL, se trataron con pirimetamina al día 7 postinfección y se re infectaron con: el parásito homólogo o con una cepa no letal (*P. chabaudi* AS) y la mezcla de ambos parásitos y se analizó cada grupo por 34 días, cada tercer día hubo un promedio del peso por cada grupo el cual se gráfico contra el tiempo de reinfección.

Los ratones de todos los grupos pierden peso a lo largo de la infección, e inclusive esta pérdida de peso se prolonga aún después que se ha eliminado completamente la parasitemia, es importante hacer notar como el grupo de ratones que se re infectó con el parásito homólogo fue el que perdió mayor peso, aun cuando ya habían eliminado al plasmodio como lo muestra la gráfica de parasitemia. Este hallazgo podría estar asociado con la letalidad de esta cepa de plasmodio.

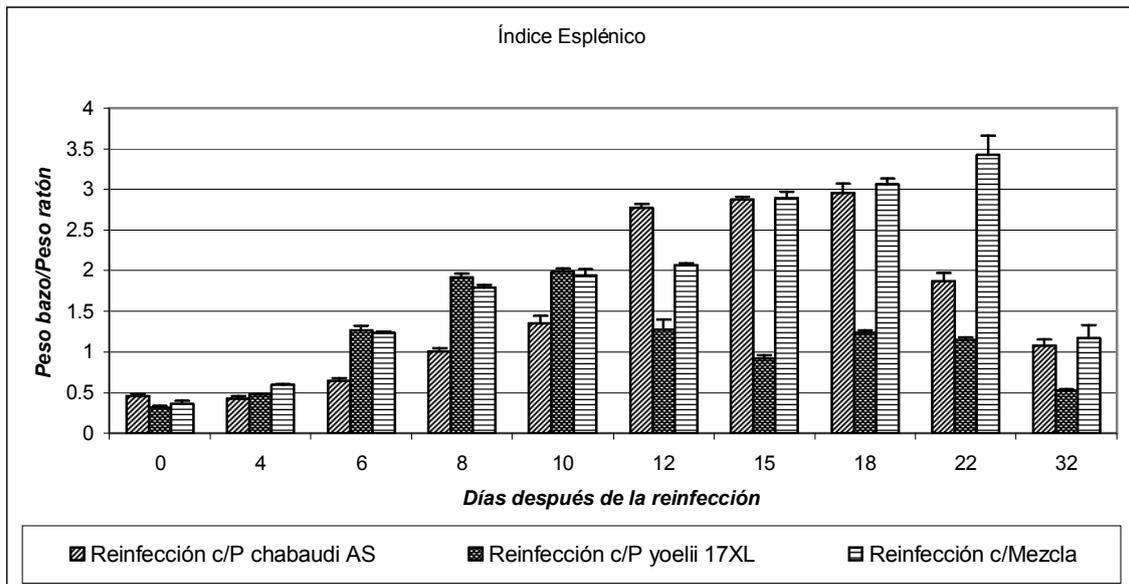
### **13.3. El índice esplénico.**

Grupos de ratones CBA/Ca se infectaron con *P. yoelii* 17XL, a los 7 días post-infección se trataron con pirimetamina y 8 semanas después se retaron con: *P. yoelii* 17XL, o con *P. chabaudi* AS o con la mezcla de *P. yoelii* 17XL / *P. chabaudi* AS

Diariamente los ratones se pesaron, el día en que se sacrificaron también se pesó el bazo para calcular el índice esplénico con la siguiente fórmula:

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

Con los resultados obtenidos se obtuvo el promedio de los cuatro ratones, se también la desviación estándar por día, los resultados se graficaron con relación al tiempo de la reinfección (Gráfica 3).



**Gráfica 3. Índice esplénico durante la reinfección.** Grupos de ratones CBA/Ca se infectaron con *P. yoelii* 17XL, se trataron con pirimetamina al día 7 postinfección y 8 semanas después se dividieron en 3 grupos que se re infectaron con: *P. yoelii* XL, *P. chabaudi* AS o una mezcla de ambos plasmodios. En los días señalados se sacrificaron 4 ratones de cada grupo y se les determinó el índice esplénico, las barras representan el promedio y la desviación estándar de los resultados de 4 ratones por grupo.

En los tres grupos de ratones el índice esplénico aumentó durante los 10 primeros días post reinfección, El grupo que manifestó el mayor incremento en el índice esplénico fue el infectado con el parásito heterólogo (*P. chabaudi* AS). En los ratones que se reataron con el *P. yoelii* 17XL se observó un incremento en el tamaño del bazo, pero después del día 10 el bazo ya no aumentó de tamaño y empezó a regresar a su tamaño original. En el grupo de los ratones re infectados con la mezcla se observó un incremento hasta el día 22 y posterior a este día empezó a disminuir de tamaño (Gráfica 3).

#### **13.4. Evaluación de la parasitemia**

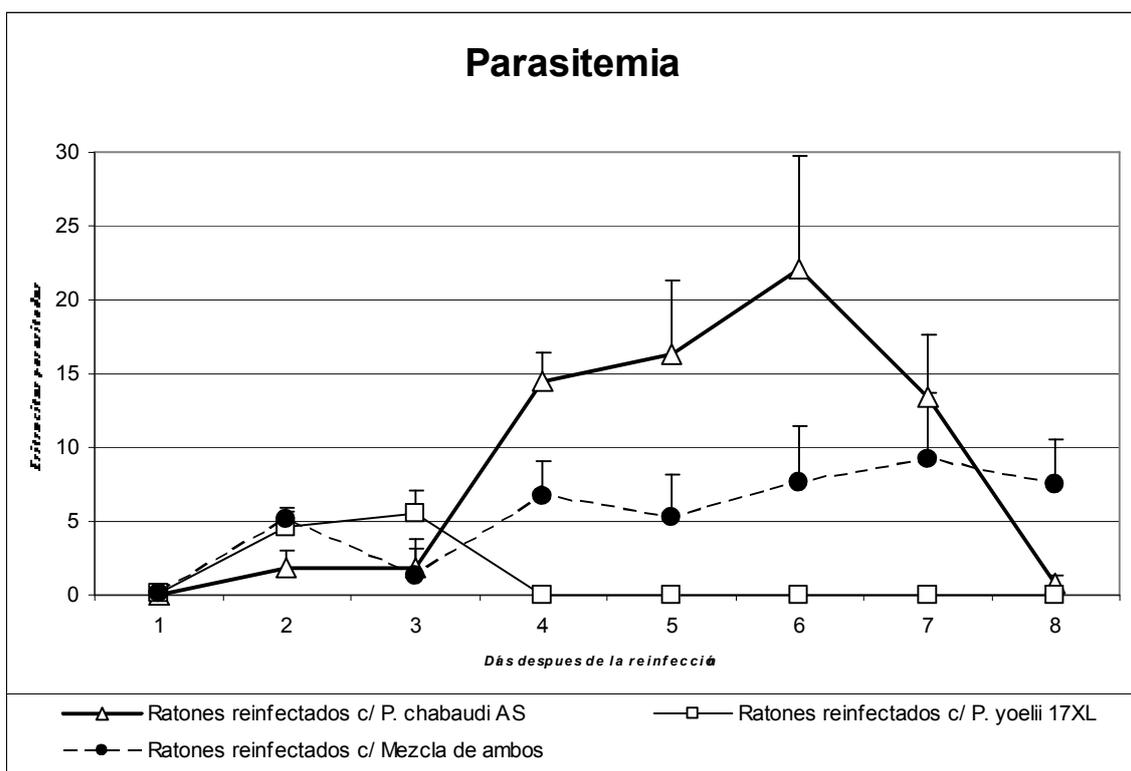
La parasitemia se evaluó cada tercer día durante 16 días en los 3 grupos de ratones, se realizaron frotis sanguíneos que se fijaron con metanol y se tiñeron con Giemsa. Los resultados se analizaron en un microscopio óptico a un aumento de 100X. El conteo de eritrocitos parasitados (EP) se realizó según los siguientes criterios:

- Cuando existían menos de 2EP por campo, se leyeron 50 campos
- Cuando existían 2 o más EP por campo se contaron 200 eritrocitos normales y parasitados

Finalmente se calculó la media geométrica de los resultados obtenidos para cada día en los diferentes grupos de ratones y se graficaron en relación al tiempo de la reinfección (Gráfica 4).

Los ratones re infectados con el parásito homólogo (*P. yoelii* 17XL) mostraron la menor parasitemia, el pico más alto se alcanzó el día 8 post reinfección con una parasitemia cercana al 5%. El grupo de ratones re infectados con la mezcla de plasmodios (*P. yoelii* 17XL y *P. chabaudi* AS) desarrollo parasitemias ligeramente mayores que los ratones re infectados únicamente con *P. yoelii* 17XL, sin embargo, en el día 16 post infección todavía no lograban controlar

completamente la reinfección. Finalmente el grupo que desarrolló la mayor parasitemia fue el reinfestado con el parásito heterólogo (*P. chabaudi* AS), el nivel máximo se detectó el día 12 post infección, después de ese día la parasitemia disminuyó súbitamente y en el día 16 post infección los ratones prácticamente ya habían eliminado la infección (Gráfica 4).



**Gráfica 4. Evaluación de la parasitemia en una segunda infección con el parásito homólogo, heterólogo y una mezcla de ambos.** Grupos de ratones CBA/Ca se infectaron con *P. yoelii* 17XL, a los 7 días post-infección se trataron con pirimetamina y 8 semanas después se retaron con: *P. yoelii* 17XL, o con *P. chabaudi* AS o con la mezcla de *P. yoelii* 17XL y *P. chabaudi* AS.

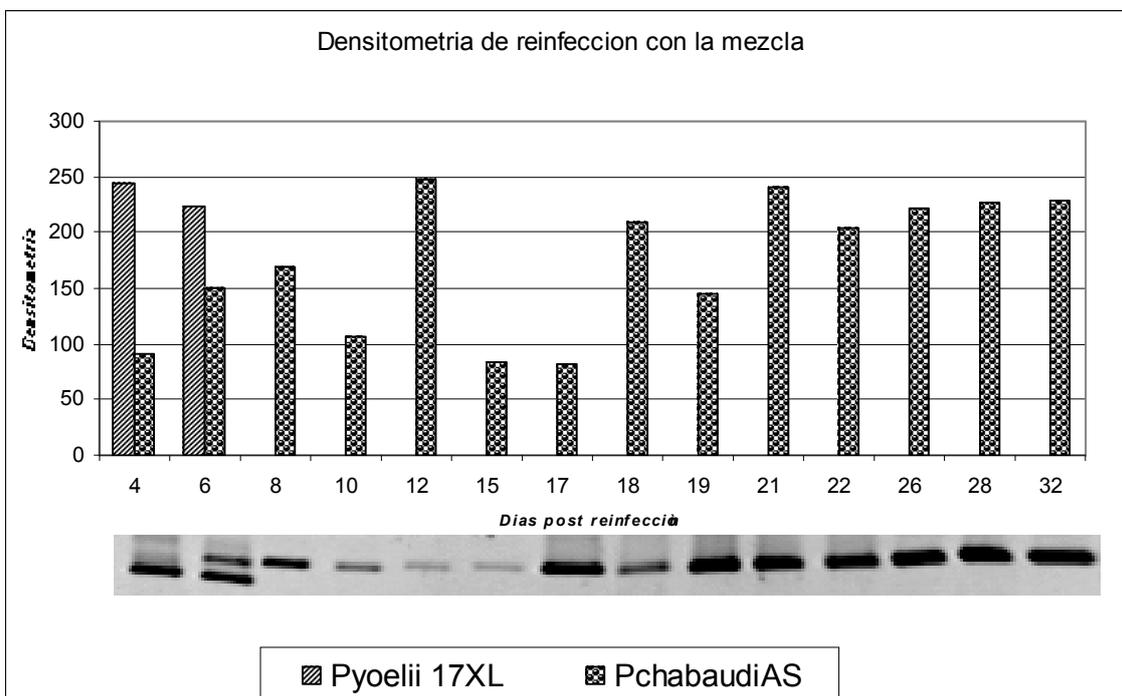
### **13.5. Análisis por PCR en nido**

El análisis microscópico para la identificación de las diferentes especies de *Plasmodium* que se encuentran en la misma laminilla es extremadamente complejo dado que con frecuencia es difícil la identificación morfológica de especies y además porque la especie en mayor número puede enmascarar a la que esta presente en menor cantidad, por lo que se decidió realizar el análisis de las especies utilizando la técnica de PCR en nido, esta técnica se diseñó por este grupo de investigación [26]. En esta técnica se realizan dos reacciones de PCR una con un par de primers denominados ML1 y ML2 y la segunda amplificación con primers internos a los primeros denominados Mck4 y Mck5 que amplifican una región más pequeña que corresponde a la primer región variable de la proteína MSPI y donde se generan amplificaciones polimórficas que son distintas en peso molecular para *P. chabaudi* y para *P. yoelii* 17XL. Para este ensayo se consideró únicamente el grupo de ratones que después de haber sufrido una infección con *P. yoelii* 17XL se re infectó con la mezcla de *P. chabaudi* AS y *P. yoelii* 17XL. A diferentes tiempos durante la re infección se tomaron muestras de sangre, de las que se extrajo el DNA, mismo que se utilizó para realizar las dos amplificaciones del PCR en nido, tal y como se describe en materiales y métodos.

Los productos de PCR se separaron en geles de acrilamida al 3%, los geles se tiñeron con bromuro de etidio, las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta acoplado a una cámara de video que envió la imagen a una

computadora y se utilizó un software analizador de geles. Las bandas se evaluaron por densitometría y los resultados se representan en barras que corresponden a los valores de densidad obtenidos para cada banda en los días analizados, se muestra un gel que es resultado representativo del grupo en cada día de la reinfección (Gráfica 5).

Los resultados muestran que al inicio de la reinfección con la mezcla se encuentran ambos parásitos, a medida que el tiempo avanza, los ratones eliminaron rápidamente al plasmodio homólogo, esta eliminación fue específica, dado que la banda correspondiente a *P. chabaudi* mostró mayor densidad lo que indica un mayor número de parásitos, es decir que la parasitemia después del día 10 corresponde a *P. chabaudi* AS únicamente (Gráfica 5).



Gráfica 5. **Análisis de la técnica de PCR por densitometría de la mezcla de *P. yoelii* 17XL y *P. chabaudi* AS** Se analizó por la técnica de PCR en nido 1µg de DNA purificado de aquellos ratones infectados con una mezcla de ambos parásitos los productos de la PCR fueron separados en un gel de acrilamida al 3% y analizados por densitometría

#### 14. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

Dado que en las regiones donde la malaria o paludismo es endémico, el desarrollo de inmunidad contra esta enfermedad es muy lento, se requiere de años para obtenerla y no es completa, es frecuente que los individuos que se infectan y curan con una especie son susceptibles tanto a la misma especie como a otras especies de *Plasmodium* diferentes y además, es común que los individuos se infecten con más de una especie del parásito que produce malaria, por lo que el estudio del desarrollo de una inmunidad protectora y la especificidad de la respuesta inmune en malaria son de singular importancia para el desarrollo de vacunas efectivas y mejores medidas de tratamiento y prevención de esta enfermedad. En este trabajo se trato de emular lo que ocurre en las regiones endémicas en un modelo experimental de malaria de ratones, se estudiaron algunos parámetros que permiten conocer si se desarrollo una protección cruzada (inespecífica) cuando los ratones que sufrieron una infección primaria con un parásito letal como lo es *P. yoelii* 17XL se reinfectan ya sea con el parásito homólogo (*P. yoelii* 17XL), un parásito diferente o heterólogo (*P. chabaudi* AS) o bien una mezcla de ambos plasmodios dado que en las regiones donde la malaria es endémica los individuos frecuentemente se infectan con más de una especie de plasmodios. Los parámetros que evaluamos son: los niveles de hemoglobina, la pérdida de peso, el índice esplénico, los niveles de parasitemia. Finalmente para detectar la especie de parásito que predominaba en los ratones infectados con la

mezcla de plasmodios se utilizó la técnica de PCR en nido, que permite detectar de forma diferencial el tipo de plasmodio presente en la sangre de los ratones infectados con ambos plasmodios.

**La anemia** en los pacientes que sufren de malaria es muy común, aún cuando se han propuesto diversos mecanismos que explican la generación de esta alteración todavía no se conocen con precisión. La anemia se ha atribuido a la participación de citocinas como IL-10, pero principalmente a la actividad de anticuerpos citofílicos que reaccionan con antígenos solubles del parásito y se fijan a la superficie de eritrocitos sanos y a su paso por el bazo se eliminan en el sistema reticuloendotelial [28]. Asimismo, los propios eritrocitos parasitados también pueden eliminarse debido a que al estar infectados modifican su estructura y exponen proteínas tanto propias como del parásito que los etiquetan como “extraños”, se tornan blanco de la respuesta inmune y de esta forma se eliminan [1,3]. En nuestros resultados se puede observar que tanto los ratones re infectados con la cepa homóloga como con la heteróloga de plasmodio y aún con la mezcla de ambos parásitos, se desarrolla una disminución marcada de la concentración de hemoglobina, que inclusive perdura después de la eliminación del plasmodio, lo que denota un sistema inmune activado que elimina una gran cantidad de eritrocitos parasitados estén o no parasitados, esto se deduce dado que la enorme destrucción de eritrocitos no se puede explicar únicamente por la eliminación de eritrocitos parasitados (Gráfica 1 y Gráfica 4).

**La pérdida de peso.** Los individuos infectados con *Plasmodium* tienden a perder peso, situación que se ha atribuido a la producción de TNF una citocina asociada con caquexia o pérdida de peso. Esta citocina está involucrada en el sistema inmune activado por la presencia del parásito junto con otras citocinas proinflamatorias tales como la IL-1, IL-6 e interferón gamma que también contribuyen a la pérdida de peso. Por ejemplo, la IL-6 pone en marcha el sistema proteosoma-ubiquitina de la proteólisis muscular dando lugar a la pérdida irreversible de la masa magra, a pesar de que todas ellas tienen la función de proteger al haber gran secreción de las mismas provocan procesos metabólicos ineficientes con una gran disminución del gasto energético [29, 30]. Es común que las personas que sobreviven a una infección por *Plasmodium* resistan con menor sintomatología una reinfección con el mismo parásito, por lo que analizar la pérdida de peso durante la reinfección ayudaría a evaluar que tan protegido quedo el individuo durante la primera infección. De hecho, se ha descrito que la exagerada respuesta inmune que se desarrolla contra este parásito puede resultar más dañina que el mismo *Plasmodium* por lo que la pérdida de peso y anorexia son las causas más frecuentes de la muerte por malaria. Nuestros resultados indican que durante la reinfección ya sea con el parásito homólogo, heterólogo o la mezcla de ambos plasmodios, los ratones tienden a perder peso aún cuando la reinfección sea con el *P. yoelii* 17XL con el que ya habían tenido contacto con anterioridad (Gráfica 2). Es probable que este hallazgo este relacionado con la letalidad de esta cepa particular de plasmodio.

**Índice esplénico.** Este parámetro es una medida del incremento en el peso del bazo en relación al peso del ratón. Dado que la estimulación del sistema inmune por la infección por *Plasmodium* induce proliferación de las subpoblaciones de células en el bazo y puesto que ese es el principal órgano donde se lleva a cabo la eliminación del parásito, las observaciones histológicas han evidenciado una hiperplasia linfoide de la pulpa blanca y una proliferación de la serie hematopoyética (CFU-S, CFU-GM y CFU-E) como resultado de la anemia, estas modificaciones varían dependiendo de la especie infectante [9] lo que podría explicar nuestros resultados, ya que el bazo resultara más afectado en la reinfección con *P. chabaudi* AS aún cuando es una cepa no letal.

En este trabajo evaluamos el índice esplénico, dado que nos permite saber el grado de activación de las células de bazo frente a la estimulación de antígenos del *Plasmodium*. En todos los grupos de ratones se incrementó su índice esplénico, sin embargo, el grupo de ratones re infectados con la mezcla de *P. chabaudi* y *P. yoelii* 17XL fue el que alcanzó el mayor índice esplénico en el día 22 post reinfección, esto podría deberse a que la carga antigénica en este grupo de ratones fue mayor puesto que se infectó con el doble de plasmodios, sin embargo, el grupo que se re infectó únicamente con *P. chabaudi* también incrementó el índice esplénico sobre todo durante los días 12, 15 y 18 post reinfección. En el caso del grupo re infectado con *P. yoelii* 17XL se observó que el pico en el índice esplénico se presentó en el día 10 post reinfección y después la tendencia fue de disminuir el tamaño del bazo, probablemente porque ya se había controlado la infección con ese plasmodio como lo muestra la gráfica de

parasitemia (Gráfica 4) y ya no se requería que siguiese activado el sistema inmune. Estos resultados muestran que aún en un reto homólogo se vuelve a disparar la activación del sistema inmune de forma importante puesto que se incrementó el tamaño del bazo y que durante la reinfección ya sea con el parásito heterólogo o con la mezcla en donde se activa todavía más el sistema inmune, probablemente porque se reconocen antígenos diferentes que no se comparten entre las especies de plasmodios utilizados.

**Parasitemia.** En relación a la parasitemia los resultados indican que existe un fuerte componente específico en la respuesta inmune, dado que durante la infección con el parásito homólogo, el parásito se eliminó de forma más rápida y los ratones desarrollaron niveles menores de parásitos en sangre. La cinética de la parasitemia en los ratones re infectados con el parásito heterólogo (*P. chabaudi* AS) mostró los niveles más elevados de eritrocitos parasitados, con un pico el día 12, sin embargo, este parásito se eliminó el día 16 mientras que en el grupo de ratones re infectados con la mezcla se observó una cinética diferente en la parasitemia, se alcanzaron niveles más bajos de eritrocitos parasitados, sin embargo, en el día 16 el parásito todavía persistía aún cuando eran niveles menores al 10%. Los resultados muestran una vez mas que en la infección con este parásito se desarrollan mecanismos tanto específicos de especie de plasmodio como inespecíficos, probablemente esto se deba a que entre especies se comparten algunos antígenos (mimetismo molecular) pero otros no, por lo que al enfrentarse a un reto con el parásito diferente al que ya había tenido contacto el

sistema inmune tiene que volver a montar una respuesta lo que va acompañado de sintomatología.

Cuando se comparó la parasitemia del grupo de ratones re infectados con *P. chabaudi* AS con la de los ratones que se infectaron por primera vez con *P. chabaudi* AS [32], se observó que existe un componente importante de eliminación inespecífica dado que los ratones con una infección primaria con *P. chabaudi* desarrollaron parasitemias de alrededor del 40% y tardaron más tiempo en eliminarla [32] (Gráfica 4).

**PCR en Nido.** Los análisis basados en la técnica de PCR en nido tienen la capacidad de detectar de 1 a 5 parásitos por microlitro de sangre [27], con la sensibilidad suficiente como para detectar dos especies diferentes en este microlitro de sangre. Se observa en la Gráfica 5 que en los ratones que sufrieron una infección con *P. yoelii* 17XL y se re infectaron con la mezcla de *P. chabaudi* y *P. yoelii* 17XL, el parásito que se elimina selectiva y específicamente es el *P. yoelii* 17XL, por lo que las parasitemias de estos ratones en los días posteriores al día 10 corresponden exclusivamente a *P. chabaudi*. Este hallazgo pone de manifiesto la especificidad de la respuesta inmune durante la reinfección con la mezcla de plasmodios, pero también muestra que aún con el parásito homólogo se desarrolla parasitemia y ciertos factores de patogenia como son: la pérdida de peso, el aumento en el índice esplénico (esplenomegalia) y anemia; este modelo experimental puede emular lo que sucede en las regiones endémicas y permite incrementar el conocimiento sobre los mecanismos de respuesta inmune en malaria.

## 15. CONCLUSIONES

La reinfección de una cepa letal de *Plasmodium* como lo es *P. yoelii* 17XL confiere sólo cierta protección cruzada a otra especie de *Plasmodium* no letal como es *P. chabaudi* AS.

La reinfección con una cepa letal disminuye los efectos de la enfermedad en gran medida, pues se mantiene activo el sistema inmune ante este parásito.

La protección generada por *P. yoelii* 17XL da como resultado una disminución de la parasitemia durante la reinfección con *P. chabaudi* AS (heterólogo), esto aunado a una respuesta inmune provocada por la reinfección con el parásito homólogo, lo que confiere protección cruzada y protección específica, esto podría deberse a las similitudes antigénicas que puedan existir entre las dos especies de plasmodios.

La protección para una nueva infección por la misma especie, es casi completa, pues la parasitemia al octavo día, ya no existe según la técnica de PCR en nido, pero sus lesiones anatómicas siguen siendo el problema principal de la infección aún a pesar de ser la segunda infección con el mismo parásito.

En el caso de los ratones re infectados con la mezcla de ambos parásitos, el incremento en el índice esplénico refleja que desde los primeros días hubo una

respuesta intensa contra el parásito y como consecuencia se controló mejor la parasitemia en menor tiempo que la observada por la reinfección con *P chabaudi* AS,

El crecimiento del bazo nos da un indicio de la recuperación parcial del huesped, sin embargo, también nos indica que la respuesta inmune se activa fuertemente cuando el estímulo antigénico lo constituyen as dos especies de *Plasmodium*.

## 16. ANEXO

### 16.1. Preparación de reactivos

#### 16.1.1. Acrilamida/bis-Acrilamida al 30%

Acrilamida	29 g
Bis-Acrilamida	1 g
Agua bidestilada	100 mL

NOTA: La acrilamida es neurotóxica, por lo que es necesario usar guantes y cubrebocas para su manipulación.

#### 16.1.2. Amortiguador de Carga 5X

Ficoll	10% p/v
Sacarosa	30% p/v
SDS	0.5% p/v
TRIS pH 8	50 mM
EDTA pH 8	75 mM
Anaranjado G	0.12%

Azul de bromofenol 0.12%

Xilen Cianol 0.12%

### **16.1.3. Amortiguador de PCR 10X**

Cloruro de Potasio 500 mM

TRIS pH 8.3 100 mM

Gelatina 1 mg/mL

Agua Millipore

### **16.1.4. Buffer de Lisis**

TRIS pH 8 40 mM

EDTA pH 8 80 mM

SDS 2%

### **16.1.5. Gel de Acrilamida al 3%**

Agua bidestilada 39.44 mL

TBE 10X 5 mL

Acrilamida/bisAcrilamida al 30% 5.04 mL

APS 10% 475  $\mu$ L

TEMED

50  $\mu$ L

NOTA: Formula para preparar un solo gel de 16x16 cm.

#### **16.1.6. TBE 10X**

TRIS                    1 M

Ácido bórico        1 M

EDTA                    50 mM

Agua bidest cbp    1000 mL

NOTA: Calentar la solución para disolver completamente los reactivos

#### **16.1.7. Saponina 10%**

Saponina            10% p/v

Azida de sodio     0.01%

NOTA: La azida previene el crecimiento de levaduras, pero debido a que es altamente tóxica se debe tomar especial cuidado al manipularla, Hacer alícuotas en tubo ependorff de 1.5 mL y almacenar en refrigeración a -20° C

#### **16.1.8. Pronasa E**

Pronasa E            25 mg

Agua estéril cbp    1 mL

NOTA: Una vez obtenida la solución incubar 1 h a 37° C, para asegurar que cualquier actividad residual de nucleasa sea removida. Hacer alícuotas en tubos ependorff de 1.5 mL y almacenar a -20° C

#### **16.1.9. Bromuro de Etidio**

Bromuro de etidio   10mg

Agua cbp            1 mL

NOTA: Manejar con guantes y cubrebocas para evitar contaminarse, ya que, es carcinógeno

#### **16.1.10. Persulfato de amonio**

APS            10% p/v

NOTA: Preparar alícuotas de 500  $\mu\text{L}$  y guardar en el congelador a  $-20^\circ\text{C}$

## 16.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa

### 16.2.1. Pasos de la Amplificación en el termociclador. Programa ML1

PASO	TEMPERATURA	TIEMPO	ACCIÓN
1	$94^\circ\text{C}$	5 min	Desnaturalización inicial
2	$58^\circ\text{C}$	2 min	Alineamiento
3	$72^\circ\text{C}$	2 min	Extensión
4	$94^\circ\text{C}$	1 min	Desnaturalización
5	Repetición de los pasos 2 al 4 un total de 25 veces		
6	$58^\circ\text{C}$	2 min	Alineamiento final
7	$72^\circ\text{C}$	5 min	Extensión final
8	La reacción esta completa por la reducción de la temperatura a $20^\circ\text{C}$		

### 16.2.2. 1ª Reacción de Amplificación especie específica manejando el juego de primers ML1 + ML2

Concentración del Stock	Reactivo	Concentración para 1 reacción	$\mu\text{L}$ para 1 reacción
10X	Amortiguador de PCR	1X	$2\mu\text{L}$
25 mM	$\text{MgCl}_2$	1.9 mM	$1.6\mu\text{L}$
5 mM	dNTP's	$200\mu\text{M}$	$0.8\mu\text{L}$
$10\mu\text{M}$	ML1+ML2	250nM	$0.5\mu\text{L}$
5 U/ $\mu\text{L}$	AmpliAq	1U/ $\mu\text{L}$	$0.2\mu\text{L}$
	Agua		$13.9\mu\text{L}$

### 16.2.3. Pasos de la Amplificación en el termociclador. Programa SEGR

PASO	TEMPERATURA	TIEMPO	ACCIÓN
1	94° C	5 min	Desnaturalización inicial
2	60° C	2 min	Alineamiento
3	72° C	2 min	Extensión
4	94° C	1 min	Desnaturalización
5	Repetición de los pasos 2 al 4 un total de 25 veces		
6	60° C	2 min	Alineamiento final
7	72° C	5 min	Extensión final
8	La reacción esta completa por la reducción de la temperatura a 20° C		

### 16.2.4. 2ª Reacción de Amplificación especie específica manejando el juego de primers McK 4 + McK 5

Concentración del Stock	Reactivo	Concentración para 1 reacción	µL para 1 reacción
10X	Amortiguador de PCR	1X	2µL
25 mM	MgCl <sub>2</sub>	1.9 mM	1.5 µL
5 mM	dNTP's	200µM	0.8 µL
2.5 mM	McK 4 +McK 5	100µM	0.8 µL
5 U/µL	AmpliTaq	0.5 U/µL	0.1 µL
	Agua		13.8 µL



## 17. REFERENCIAS

1. Armstrong D, Cohen J. *Infectious diseases*, Barcelona: Mosby Harcourt Publisher, 1999; vol.2: 6.26.1-6.26.10
2. Tay ZJ, Lara AR, Velasco CO Gutiérrez QM. *Parasitología médica*. 5ª ed. México: Méndez Editores, 1993: 157-169
3. Shore G. *Diagnostic medical parasitology*. 4ª ed. USA: ASM Press, 2001: 159-192
4. Secretaría de Salud, *Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, EPIDEMIOLOGÍA. Sistema único de Información*.2007; vol.24:15
5. Taylor-Robinson AW, Phillips RS, Severn A, Moncada S, Liew FY. *The role of Th1 an Th2 cells in a rodent malaria infection*. Science 1993; 260: 1931-1934
6. Legorreta-Herrera M, Sánchez-Cruz P. *La respuesta inmune celular contra el Plasmodium: agente etiológico de la malaria*. Vertientes 2000; 2(1):3-8
7. Gutierrez Y. *Diagnostic pathology of parasitic infections with clinical correlations*. 2a ed. Nueva York: Oxford University Press, 2000: 235-259
8. OMS. *Tratamiento del paludismo grave, guía práctica*. 2ª ed. Malta: Servicios Gráficos OMS, 2000: 46-48
9. Landau I, Gautret P. *Animal model: rodents*. En: Sherman IW, comp. *Malaria parasite biology, pathogenesis, and protection*. USA: American Society for Microbiology, 1998: 401-417
10. Favila CL. *Modelos murinos para el estudio de la respuesta inmune en paludismo*. En: Kumate J, Martínez PA, comp. *A cien años del descubrimiento*

- de Ross. *El paludismo en México*. México: Editorial El Colegio Nacional, 1998:145-148
11. Sánchez PM, comp. *Inmunología aplicada y técnicas inmunológicas*. España: Editorial Síntesis, 1998: 57-74
  12. Weidanz GM, Long CA. *The role of T cells in immunity to malaria*, Prog Allergy 1998; 41: 215-252
  13. Taylor-Robinson AW. *Regulation of immunity to malaria: valuable learned from murine models*. Parasitology Today 1995; 11: 334-342
  14. Scharon-Kersten, TM, Sher A, *Role of natural killer cells in innate resistance to protozoan infections*. Curr Opin Immunol 1997; 9: 44-51
  15. Scott P, Trinchieri G. *The role of natural killer cells in host-parasite interactions*. Curr Opin Immunol 1995; 97: 1387-1392
  16. Mohan K, Stevenson MM. *Acquires immunity to asexual blood stages*. En: Sherman IW, comp. *Malaria parasite biology, pathogenesis, and protection*. USA: American Society for Microbiology, 1998: 467-493
  17. Langhorne SJ, Gillard S, Simon B, Slade S, Eichmann K. *Frequencies of T cells reactive with Plasmodium chabaudi chabaudi: distinct response kinetics for cells with Th1 and Th2 characteristics during infection*. Int Immunol 1989; 1: 416-424
  18. Mohan K, Stevenson MM. *Interleukin 12 corrects severe anemia during blood-stage Plasmodium chabaudi AS in susceptible A/J mice*. 1998; 26: 45-52
  19. Constant, SL, Bottomly K. *Induction of Th1 and Th2 CD4<sup>+</sup>T cell responses: alternative approaches*. Annu. Rev. Immunol. USA;1997:15:297-322

20. Druilhe LP, Rénia L, Fidock AD. *Immunity to liver stage*. En: Sherman IW, comp. *Malaria parasite biology, pathogenesis, and protection*. USA: American Society for Microbiology, 1998: 513-539
21. Baird JK, Purnomo, Basri H, Bangs MJ, Andersen EM, Jones TR, Masbar S, Harjosuwarno S, Arbani PR. *Age specific prevalence of Plasmodium falciparum among six populations with limited histories of exposure to endemic malaria*. Am J Trop Med Hyg 1993; 49: 707-719.
22. Jarra W, Brown KN. *Protective immunity to malaria: studies with cloned lines of Plasmodium chabaudi and P. berghei in CBA/Ca mice. I. The effectiveness and inter- and intra-species specificity of immunity induced by infection*. Parasite Immunol. 1985; 7: 595-606.
23. Jeffery GM. *Epidemiological significance of repeated infections with homologous and heterologous strains and species of Plasmodium*. Bull WHO 1966; 35: 873-882.
24. Pazzaglia G, Woodward WE. *An analysis of the relationship of host factors to clinical falciparum malaria by multiple regression techniques*. Am J Trop Med Hyg 1982; 31: 202-210.
25. Snounou G, Jarra W, Viriyakosol S, Wood JC, Brown KN. *Use of a DNA probe to analyse the dynamics of infection with rodent malaria parasites confirms that parasite clearance during crisis is predominantly strain- and species-specific*. Mol Bioch Parasitol 1989; 37: 37-43.
26. Legorreta-Herrera M, Ventura-Ayala ML, Licona-Chávez RN, Soto-Cruz I, Hernández-Clemente FF. *Early treatment during a primary malaria infection modifies the development of cross immunity*. Parasite Immunol 2004; 26: 7-

27. Labbé AC, Pillai D, Kain KC. Molecular approaches for diagnosis of malaria and characterization of genetic markers of drug resistance. En: Persing DH, editor. *Molecular microbiology diagnostic principle and practice*. USA: ASM Press, 2004: 603-616.
28. Mota MM, Brown KN, D Rosario V, Holder AA, Jarra W. *Antibody recognition of rodent malaria parasite antigens exposed at the infected erythrocyte surface: Specificity of immunity generated in hyperimmune mice*. *Inf and Immun*, 2001 69: 2535-2541
29. Sanz J, Rivera F, López-Vega JM, López C, López A, Vega ME. *El síndrome anorexia caquexia*. *Psicooncología*, 2004 1:2-3:101-106
30. McNamara MJ, Alexander HR, Norton JA. *Cytokines and their role in the pathophysiology of cancer cachexia*. *J. Parenter. Enter. Nutr.* 1992 16(6suppl):50S-55S.
31. Ventura-Ayala ML, *Correlacion entre la producción de óxido nítrico y la expresión de citocinas durante la reinfección con Plasmodium*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. UNAM, 2006