



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**PARÁMETROS ASOCIADOS AL
ESTABLECIMIENTO DE *Plasmodium yoelii* EN UN
MODELO EXPERIMENTAL MURINO**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A

NOEMI BELEN PEREZ NAVARRO

DIRECTOR

M en IBB JORGE LUIS DE LA ROSA ARANA

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉX.

2012



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.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
ASUNTO: VOTO APROBATORIO
SUPERIORES CUAUTITLÁN

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**



**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **TESIS**
Parámetros asociados al establecimiento de Plasmodium yoelii en un modelo experimental murino.

Que presenta la pasante: **Noemi Belen Perez Navarro**
Con número de cuenta: **40509726-1** para obtener el Título de: **Química Farmacéutica Bióloga**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”
Cuautitlán Izcalli, Méx. a de de 2012.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Juan Pablo Martínez Labat	
VOCAL	Dr. Andrés Romero Rojas	
SECRETARIO	MIBB. Jorge Luis de la Rosa Arana	
1er SUPLENTE	Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón	
2do SUPLENTE	QFB. Laura Gricelda Martínez Méndez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm

DEDICATORIAS

Este trabajo es dedicado a cuatro personas muy importantes en mi vida: Mis papás Silvia y Fernando por todo el apoyo incondicional que me han brindado, su comprensión, por aquellas veces que se desvelaron conmigo, los amo quisiera expresar lo agradecida que estoy con ustedes pero me faltarían hojas para decirles lo importante que son en mi vida... gracias papás.

Mis abuelitos Eustolia y Leonardo, que aunque ya no están conmigo siempre los considere como mis segundos padres, gracias por su apoyo donde quiera que estén, los amo y nunca los olvidare porque sé que siguen aquí conmigo.

AGRADECIMIENTOS

Gracias dios por permitirme llegar a este momento importante en mi vida. A mi hermana Araceli y mi sobrina Alejandra saben que las quiero mucho y que son un gran apoyo para mí.

Gracias a la UNAM porque después de tantos intentos para poder entrar a la Facultad hoy me siento muy orgullosa de pertenecer a esta gran Universidad.

Dr. Filiberto Malagón Gutiérrez por proporcionarme la cepa ya que sin esta no se hubiese realizado este proyecto, muchas gracias.

A mi asesor Jorge Luis de la Rosa Arana, muchas gracias por haberme permitido formar parte del laboratorio de Helmintos, estoy inmensamente agradecida por toda tu ayuda, paciencia, dedicación, fuiste una parte importante en este trabajo ya que juntos logramos llegar a este momento, sabes que te estimo y que aparte de ser mi asesor ahora eres un gran amigo. Al InDRE por permitirme realizar mi tesis en el laboratorio de helmintos en donde conocí a grandes personas, gracias: Teresa, Gely, Jesús, Alfredo, Hugo, Carmelita Ramírez, Mary Carmen, Seidy y Rita por su apoyo. A los veterinarios del InDRE Irma Valle, Martin Piñón y la señora Alicia Aguilar por su colaboración con el cuidado de los ratones, muchas gracias por toda su ayuda incondicional.

Finalmente a mis grandes amigos: Diego Mata, Domingo Medina, Pablo Serrano y todos aquellos que no nombre pero que me apoyaron desde el inicio de la carrera, muchas gracias por su apoyo incondicional.

Mi esfuerzo y dedicación me han llevado a sentir esta gran alegría por haber logrado llegar hasta este momento importante de mi vida.



Gracias UNAM

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Helmintos Tisulares del
Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos de la Secretaría de Salud.

BAJO LA DIRECCIÓN

M en IBB Jorge Luis de la Rosa Arana

INDICE GENERAL

ABREVIATURAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ÍNDICE DE TABLAS	iv
RESUMEN	v
1.INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades del paludismo	1
1.2 Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i>	6
1.3 Inmunobiología	7
1.4 Aspectos clínicos y patología del paludismo	15
1.5 Diagnóstico y Tratamiento	17
1.6 Epidemiología	21
1.7 Paludismo animal y modelo experimental	24
1.8 <i>Plasmodium berghei</i> y <i>Plasmodium yoelii</i>	27
2. JUSTIFICACIÓN.....	29
3. OBJETIVO GENERAL.....	31
4. OBJETIVOS PARTICULARES.....	31
5. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO.....	32
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
6.1 Propagación de la cepa.....	33
6.2 Infecciones experimentales en dos cepas de ratones	33
6.3 Determinación de signos en el curso de la infección	34
6.4 Determinación de la parasitemia.....	35
6.5 Preparación de antígeno.....	35
6.6 Determinación de anticuerpos	36
7. RESULTADOS.....	37
7.1 Propagación de la cepa.....	37
7.2 Infecciones experimentales.....	38
7.3 Determinación de signos en el curso de la infección	39
7.4 Determinación de la Parasitemia	48
7.4.1. Carga parasitaria en ratones exogámicos (cepa CD1).....	52
7.4.2. Carga parasitaria en ratones endogámicos (cepa Balb/c).....	55
7.5 Preparación de antígeno.....	57
7.6 Determinación de proteínas	58

7.7 Determinación de anticuerpos	60
8. DISCUSIÓN	64
9. CONCLUSIONES	69
10. PERSPECTIVAS.....	69
11. REFERENCIAS	70
12. ANEXO.....	77

ABREVIATURAS

ASB: Albúmina Sérica Bovina

EDTA: Ácido Etilendiaminotetracético

ELISA: Ensayo Inmunoenzimático

ℓ: Eritrocitos

ℓ INF : Eritrocitos infectados

InDRE: Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos

μL: Microlitros

N. ℓ INF: Número de eritrocitos infectados

nm: Nanómetros

PBS: Solución amortiguadora de Fosfatos

PBS-T: Solución amortiguadora de Fosfatos en Tween 20 al 5%

SDS: Dodecil Sulfato de Sodio

TEMED: n n, n'n'-Tetrametiletilenediamina

TLCK: N-α-p-tosil-L-lisina clorometil-cetona.

TPCK: N-Tosil-L-fenilamina clorometil cetona.

VIP: Vía intraperitoneal

IET: Inmunoelectrotransferencia

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Mosquito <i>Anopheles</i> .	2
2	Fases invasivas de <i>Plasmodium</i> .	5
3	Ciclo Biológico de <i>Plasmodium</i> .	7
4	Esquema general de la Respuesta Inmunológica durante la infección por <i>Plasmodium</i> .	10
5	Esquema general de la patogenia de <i>Plasmodium</i> .	11
6	Mapa del estado de control, pre control y eliminación del paludismo.	23
7	Distribución de casos confirmados de paludismo en América durante el año 2009.	23
8	Animales utilizados como modelos para el estudio del paludismo.	25
9	Evaluación de los 3 signos.	34
10	Tinción de frotis.	37
11	Eritrocitos infectados con <i>Plasmodium yoelii</i> .	38
12	Comparación del decoloramiento de orejas y cola entre ambos sexos de la cepa CD 1 y Balb/c con una carga parasitaria baja (85,000 eritrocitos infectados con <i>Plasmodium yoelii</i>).	40
13	Comparación del decoloramiento de orejas y cola entre ambos sexos de la cepa CD 1 y Balb/c con una carga parasitaria alta (850,000 eritrocitos infectados con <i>Plasmodium yoelii</i>).	41
14	Perdida de peso en el ratón infectado por <i>Plasmodium yoelii</i> .	43
15	Comparación de la pérdida de peso entre ambos sexos de la cepa CD 1 y Balb/c con una carga parasitaria baja (85,000 eritrocitos infectados con <i>Plasmodium yoelii</i>).	43
16	Comparación de la pérdida de peso entre ambos sexos de la cepa CD 1 y Balb/c con una carga parasitaria alta (850,000 eritrocitos infectados con <i>Plasmodium yoelii</i>).	44
17	Comparación de la presencia del letargo entre ambos sexos de la cepa CD 1 y Balb/c con una carga parasitaria baja (85,000 eritrocitos infectados con <i>Plasmodium yoelii</i>).	46
18	Comparación de la presencia del letargo entre ambos sexos de la cepa CD 1 y Balb/c con una carga parasitaria alta (850,000 eritrocitos infectados con <i>Plasmodium yoelii</i>).	47
19	Toma de sangre del seno retroorbital.	48
20	Conteo de eritrocitos infectados con <i>Plasmodium yoelii</i> con la cámara de Neubauer.	49
21	Medición de una gota de sangre.	50
22	Bazo de un ratón no infectado y de un ratón infectado con <i>Plasmodium yoelii</i> .	52

23	Parasitemia de las hembras cepa CD 1 infectadas con una carga parasitaria baja y alta con <i>Plasmodium yoelii</i> .	53
24	Tiempo de sobrevivencia con carga parasitaria baja (85,000 eritrocitos infectados con <i>Plasmodium yoelii</i>) en hembras cepa CD 1.	54
25	Parasitemia de los machos cepa CD 1 con una carga parasitaria baja (85,000 eritrocitos infectados con <i>Plasmodium yoelii</i>) y alta (850,000 eritrocitos infectados con <i>Plasmodium yoelii</i>).	54
26	Parasitemia de las hembras cepa Balb/c con una carga parasitaria baja (85,000 eritrocitos infectados con <i>Plasmodium yoelii</i>) y alta (850,000 eritrocitos infectados con <i>Plasmodium yoelii</i>).	55
27	Parasitemia de los machos cepa Balb/c con una carga parasitaria baja (85,000 eritrocitos infectados con <i>Plasmodium yoelii</i>) y alta (850,000 de eritrocitos infectados con <i>Plasmodium yoelii</i>).	56
28	Comparación de la carga parasitaria entre la cepa CD 1 y Balb/c contra los días postinfección con <i>Plasmodium yoelii</i> .	57
29	Obtención de eritrocitos de ratón infectados con <i>Plasmodium yoelii</i> .	58
30	Determinación de proteínas por el método colorimétrico de Bradford.	59
31	Titulación del suero y conjugado con peroxidasa.	60
32	Presencia de anticuerpos contra <i>Plasmodium yoelii</i> en hembras y machos de la cepa CD 1 y Balb/c.	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Fármacos utilizados en el tratamiento de la malaria.	4
2	Comparativo de las características de las cuatro especies de <i>Plasmodium</i> .	17
3	Comparativo entre las diferentes técnicas de diagnóstico.	19
4	Análisis de varianza de la decoloración de orejas y cola con una carga parasitaria baja (85,000 eritrocitos infectados con <i>Plasmodium yoelii</i>).	40
5	Análisis de varianza de la decoloración de orejas y cola con una carga parasitaria alta (850,000 eritrocitos infectados con <i>Plasmodium yoelii</i>).	41
6	Análisis de varianza de la pérdida de peso con una carga parasitaria baja (85,000 eritrocitos infectados con <i>Plasmodium yoelii</i>).	44
7	Análisis de varianza de la pérdida de peso con una carga parasitaria alta (850,000 eritrocitos infectados con <i>Plasmodium yoelii</i>).	45
8	Análisis de varianza del letargo con una carga parasitaria baja (85,000 eritrocitos infectados con <i>Plasmodium yoelii</i>).	46
9	Análisis de varianza del letargo con una carga parasitaria alta (850,000 eritrocitos infectados con <i>Plasmodium yoelii</i>).	47
10	Análisis de varianza del volumen de una gota en μL .	50
11	Comparativo de la parasitemia por <i>Plasmodium yoelii</i> entre ambas cepas.	51
12	Proteínas calculadas de sangre completa.	59
13	Proteínas calculadas con el antígeno de <i>Plasmodium yoelii</i> preparado.	59
14	Análisis de varianza de la determinación de anticuerpos contra <i>Plasmodium yoelii</i> en ambas cepas y sexos.	63

RESUMEN

Introducción. La malaria o paludismo es una protozoosis de distribución cosmopolita y con importancia en salud pública. En México se ha registrado la presencia de dos de las cuatro especies de *Plasmodium* que parasitan al ser humano, *P. falciparum* y *P. vivax*, las cuales son especie-específicas, lo cual limita su estudio en el laboratorio y por razones éticas, no se realizan experimentos con seres humanos. En cambio, se ha buscado especies de *Plasmodium* que puedan estudiarse como modelos experimentales, en particular *P. yoelii*, que ocasiona en ratones signos que se asemejan a la enfermedad que se presenta en el humano, su empleo como modelo habitual en el laboratorio de diagnóstico aún es controversial, por lo que este trabajo tuvo la finalidad de estudiar algunos parámetros asociados al establecimiento de *Plasmodium yoelii* en un modelo experimental murino.

Metodología. La cepa de *P. yoelii* se obtuvo por donación del laboratorio de Malariología de la Facultad de Medicina de la UNAM, donde se ha mantenido por más de 10 años en pases subsecuentes semanales de pronóstico letal, utilizando ratones CD1. Con la intención de identificar la carga parasitaria hacia la infección de ratones de cepa abierta y con respuesta inmune orientada a Th2 (CD1) en comparación con ratones de cepa singénica y con orientación hacia Th1 (Balb/c), se infectaron ratones de ambos sexos con una carga parasitaria baja (1%) 85,000 o con una alta (11%) 850,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*, se determinaron los períodos de patencia y sobrevida, así como la cinética de parasitemia y la presencia de anticuerpos específicos.

Resultados. Luego de la infección y sin importar la carga parasitaria administrada, las hembras CD1 presentaron como primer signo un decoloramiento de orejas y cola, el segundo signo que se presentó es la pérdida de peso de los animales y finalmente como tercer signo el letargo, estos se presentaron en promedio a partir del 3 día postinfección, a diferencia de los ratones macho CD1 y ratones Balb/c, que aparecen a los 2 días postinfección ($p < 0.05$; ANOVA un factor). En la cepa CD 1 las hembras tiene un promedio de sobrevida de 15 días, mientras que en los machos y la cepa Balb/c tardan en promedio 10 días en morir ($p < 0.05$; ANOVA un factor). La cinética de parasitemia es diferente entre hembras y machos cepa CD 1 así como también entre hembras y macho de la cepa Balb/c, pero en donde si se observa

diferencia es en la carga parasitaria ya que en los machos cepa CD 1 y Balb/c con alta (850,000) y baja (85,000) carga parasitaria ambos ratones murieron a los 10 días postinfección, mientras que en las hembras de la cepa CD 1 con una carga parasitaria baja (85,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*) murieron en promedio de 15 días mientras que las de carga parasitaria alta (850,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*) murieron a los 12 días postinfección, con respecto a la cepa Balb /c las hembras con carga parasitaria baja (85,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*) murieron a los 12 días, mientras que las que fueron inoculadas con carga parasitaria alta (850,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*) murieron a los 10 días postinfección y finalmente en los machos de la misma cepa con una carga parasitaria baja (85,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*) murieron a los 10 días, por otro lado los de alta carga parasitaria (850,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*) murieron a los 10 días postinfección. No se observó diferencia en la determinación de anticuerpos, ambas cepas fueron reactivas al antígeno preparado a partir de eritrocitos infectados a los 15 días postinfección.

Conclusión. Las hembras de la cepa CD1 son mejores para propagar y mantener la cepa de *P. yoelii* en el laboratorio debido a la mayor sobrevivencia de ellas en comparación con los ratones macho y la cepa Balb/c. Incluso, los signos asociados a la infección, aparecieron primero en los ratones de la cepa Balb/c y en los ratones macho CD1. Finalmente se determinó la presencia de anticuerpos contra *Plasmodium yoelii* en los ratones de ambas cepas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del Paludismo

El término malaria se origina del italiano de la edad media mala aria = mal aire también llamado paludismo, del latín palud = pantano. Estudios científicos sobre malaria hicieron su primer avance de importancia en 1880, cuando el médico militar francés Charles Louis Alphonse Laveran, trabajando en Argelia, observó parásitos dentro de los glóbulos rojos de personas con malaria (Malagón, 2005). Investigadores como Ettore Marchiafava, buscaba demostrar que la transmisión de la malaria se efectuaba a través de la sangre de los pacientes febriles, de tal forma que le dio el nombre de *Plasmodium* (Lederman y Valle., 2009). El primer tratamiento eficaz para la malaria fue la corteza del árbol de nombre común Cinchona, este contiene el alcaloide quinina el cual fue utilizado como tratamiento del paludismo. La malaria es una de las principales enfermedades que afecta la salud pública en países tropicales y subtropicales del mundo (Contreras y Ramsey, 2004).

En 1969, Whittaker propone el sistema de los cinco reinos que divide a todos los organismos vivientes en cinco grandes grupos: Mónica (Procariotas), Protista, Fungi, Plantae y Animalia. Reconocía así en esta clasificación el reino de los hongos (que tradicionalmente se habían asociado a las plantas) y un nuevo grupo de seres, los protoctistas, que anteriormente estaban repartidos entre plantas y animales, aunque se diferenciaban claramente de ellos, en particular, porque muchos son unicelulares, como *Plasmodium*, de esta manera, el protozoario queda clasificado dentro del Reino Protista, *Phylum Apicomplexa*, Clase *Aconoidasida*, Orden *Haemosporida*, Familia *Plasmodiidae*, Género *Plasmodium* (Chiodini *et al.*, 2001). Existen más de 100 especies de *Plasmodium* que infectan reptiles, aves y mamíferos como la especie *P. yoelii* que parasita a ratones (Castro y Rodríguez, 2009). Hay cuatro especies principales que infectan al humano *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. vivax* (Perkins *et al.*, 2011). La malaria se inicia con la inoculación del parásito por medio de la picadura del mosquito hembra del género *Anopheles* (figura 1; Betanzos, 2011). El género *Anopheles* agrupa cerca de 400 especies; actualmente, sólo tres especies de *Anopheles* se han confirmado como los principales vectores del paludismo humano en México: *Anopheles albimanus*, *Anopheles pseudopunctipennis* y *Anopheles vectitipennis* (Casas y Bonilla, 2006).



Figura 1. **Mosquito *Anopheles***. Se muestra el momento en el cual el mosquito hembra del género *Anopheles* está picando al humano (Tomado de <http://kerchak.com/salud/paludismo-el-doble-de-las-victimas-esperadas/attachment/mosquito-anopheles>).

Después de que el humano es picado por el mosquito vector, comienza el ciclo biológico del parásito, infectando las células del hígado y posteriormente los glóbulos rojos, cuando estas células se rompen liberan miles de merozoítos que al mismo tiempo liberan el pirógeno activador del síndrome febril patognomónico de la malaria, constituido por elevación de la temperatura hasta 40°C, escalofríos, sudoración y postración, además de otros signos y síntomas como dolor de cabeza, anorexia, náuseas, mialgias, artralgias y diarrea (Betanzos, 2011).

Plasmodium vivax es el parásito causante de la malaria terciaria benigna, esta es la especie más común y la mayormente distribuida en las regiones tropicales y subtropicales, así como en la zona templada. *P. falciparum* es el parásito de la fiebre subterciaria o terciaria maligna, este se encuentra ampliamente distribuido en los trópicos, mientras que *P. malaria* es el parásito de la malaria cuartana, está distribuido en los trópicos y en los subtropicos aunque es menos común que las otras tres especies, finalmente *P. ovale* es el causante de la fiebre terciaria suave (Malagón, 2005).

De las especies de *Plasmodium* que causan infección natural en el humano, *P. falciparum* ocupa el primer lugar en el mundo, tanto en la frecuencia de casos como en el número de complicaciones y muertes (Tobón *et al.*, 2006). Durante el siglo XX la malaria provocó entre 150 y 300 millones de muertes, lo que representa de 2 a 5% de las muertes alrededor del mundo (Contreras y Ramsey, 2004).

La detección microscópica y la identificación de las especies de *Plasmodium* se realiza mediante la técnica de gota gruesa teñido con Giemsa (para la detección del parásito de la malaria), y frotis extendidos de sangre (para confirmación de las especies), aunque existen muchas otras técnicas y metodologías de diagnóstico, la microscopía es el método utilizado de manera rutinaria para el diagnóstico en el laboratorio (Tangpukdee *et al.*, 2009).

El tratamiento para la malaria incluye el uso de la cloroquina, la cual fue utilizada inicialmente durante la segunda guerra mundial para combatirla, desde entonces ésta y los compuestos relacionados se conocen como antimaláricos (tabla 1; Restrepo *et al.*, 2002).

Los cambios en la absorción gastrointestinal producidos por la dieta, la participación de cepas de *P. falciparum* poseedoras de genes de resistencia, la presión farmacológica ejercida por el uso masivo de antimaláricos y las dosis subterapéuticas son algunas de las causas por la cual ocurre la resistencia a los antimaláricos (Blair *et al.*, 1998).

Según la fase del ciclo vital del parásito, los fármacos se pueden clasificar en:

- ✚ Fármacos esquizonticida tisular: Fármacos utilizado para la curación radical, dentro de estos se encuentra la 8-Amino-quinolinas: Primaquina.
- ✚ Fármacos esquizonticida sanguíneo: Fármacos para curación clínica y tratamiento en crisis agudas como son quinolinas-metanoles, 4-metanoles, 4-aminoquinolinas, halofantrenos sulfonas, artemisina: Quinina, mefloquina, cloroquina entre otros.
- ✚ Fármacos utilizados en la quimioprofilaxis.
- ✚ Fármacos para prevenir la transmisión.

Dentro de otro tipo de fármacos que se utilizan se encuentran los fármacos que afectan la síntesis del folato: Sulfamidas (sulfadoxina) y sulfonas (dapsona) las cuales compiten con el ácido p-aminobenzoico y los que afectan la utilización de folatos: Pirimetamina, proguanil los cuales: Inhiben la dihidrofolato reductasa y por último los antibiótico tetraciclina y doxiciclina (WHO, 2010).

Tabla 1. Fármacos utilizados en el tratamiento de malaria

FÁRMACO	MECANISMO DE ACCIÓN	SITIO DONDE ACTUA
CLOROQUINA	Reduce la digestión de la hemoglobina e inhibe la polimerasa del grupo hemo del parásito	Esquizonticida hemático
QUININA	Inhibe la hemo-polimerasa del parásito	Esquizonticida hemático
MEFLOQUINA	Inhibe la polimerasa hemo del parásito	Esquizonticida hemático
HALOFANTRINA	Desconocido	Esquizonticida hemático
PRIMAQUINA	Etaquina y Tafenoquina, el mecanismo es desconocido	Eficaz contra formas eritrocíticas, gametocitos e hipnozoitos hepáticos
ARTEMISINA	Desconocido	Esquizonticida hemático

Respecto a la morfología los plasmodios pertenecen al *Phylum Apicomplexa*, que incluye parásitos que presentan formas invasivas denominadas “zoítos”, que a su vez transcurren por tres fases invasivas: merozoítos, ooquinets y esporozoitos (figura2), en su extremo apical cuentan con organelos (roptrias, micronemas y gránulos densos) de secreciones esenciales en los procesos de motilidad, invasión, biogénesis de la membrana parasitófora y remodelamiento de la célula hospedadora. Dada su participación en procesos esenciales del parásito, las proteínas de estos organelos se consideran como moléculas blanco principal para la producción de vacunas antimaláricas. Como otros *Apicomplexa*, *Plasmodium* tiene proteosoma y apicoplasto. El proteosoma consiste en proteasas multiméricas autocompartimentalizadas cuya actividad principal es la traducción de señales y la regulación del ciclo celular. El apicoplasto es un organelo plastídico fotosintético que participa en la síntesis de ácidos grasos, isoprenoides y el grupo hemo (Castro y Rodríguez, 2009).

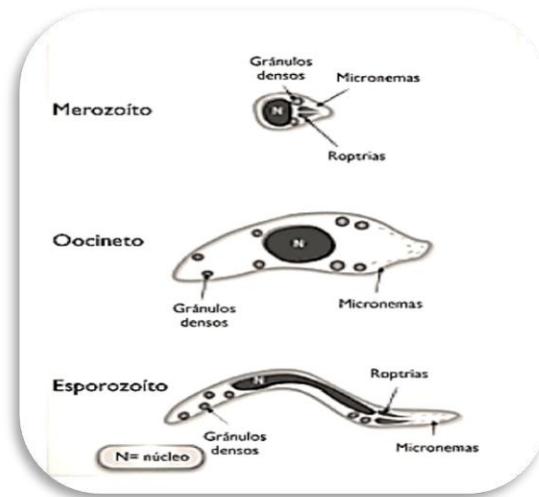


Figura 2. **Fases invasivas de *Plasmodium***. Se muestra la morfología de las fases invasivas de *Plasmodium*. Nótese los organelos apicales (roptrias, micronemas y gránulos densos), que constituyen el complejo apical del parásito (Tomado de Castro y Rodríguez, 2009).

En los esquizontes desarrollados, así como en los gametocitos del plasmodio, se encuentran, invariablemente, gránulos de pigmento de color amarillo-castaño a negro, los cuales varían en forma, tamaño y número entre las especies diferentes. A estos gránulos se les llama gránulos de hemozoína, son aparentemente el producto catabólico formado dentro de los parásitos. El pigmento posee importancia taxonómica, ya que estos pueden ayudar a la identificación de las especies de *Plasmodium*. Los puntos son pequeños y numerosos en los eritrocitos infectados con *P. vivax* y *P. ovale* y se conocen con el nombre de gránulos de Schüffner, mientras que los que se encuentran en las células del hospedador infectado con *P. falciparum* son pocos y toscos y se les llama gránulos de Maurer, en los eritrocitos infectados con *P. malarie* no se observan (Malagón, 2005).

1.2 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Plasmodium* incluye dos hospedadores, un vertebrado y un artrópodo. En el primero se llevan a cabo las etapas de desarrollo asexual, esporozoitos, etapas asexuales exo-eritocíticas e intraeritocíticas y gametocitos, mientras que el invertebrado se presentan gametos, cigoto, ooquiste y ooquinetos, además de esporozoitos (figura3).

El ciclo de vida inicia cuando el mosquito infectado con el parásito pica a un individuo humano, inoculando a los esporozoítos, éstos infectan a los hepatocitos para iniciar una intensa actividad mitótica y división celular. Después de día 9 al 16 se liberan miles de merozoítos al torrente sanguíneo, quienes infectaran a los glóbulos rojos. Los merozoítos intraeritocíticos se diferencian en trofozoitos y más tarde en esquizontes. Cuando los esquizontes se rompen liberan de 8 a 32 merozoítos maduros y de esta manera otra generación de parásitos infecta a otros glóbulos rojos (Ferreira *et al.*, 2004).

Después de varias generaciones eritocíticas se desarrollan las formas sexuales, es decir, los macrogametocitos y microgametocitos, las cuales son las formas infectantes para el mosquito. En el glóbulo rojo el parásito satisface sus requerimientos de aminoácidos al degradar la hemoglobina, se obtiene como resultado hemozoína, así como material pirogénico causante en parte de los episodios febriles y calosfríos en el hospedador infectado (Ferreira *et al.*, 2004).

De esta manera cuando el mosquito se alimenta con la sangre de un individuo infectado e ingiere eritrocitos con las fases sexuales, los gametocitos maduran, se transforman en gametos y se lleva a cabo la fecundación. El cigoto sufre mitosis y se diferencia a ooquinetos, que es la forma móvil del cigoto. El ooquinetos crece y atraviesa la pared estomacal, donde se cubre con una fina pared para dar lugar al ooquiste y más tarde a miles de esporozoitos móviles que migran a las glándulas salivales del mosquito y nuevamente continuar con el ciclo al infectar a otro individuo humano sano (Ferreira *et al.*, 2004).

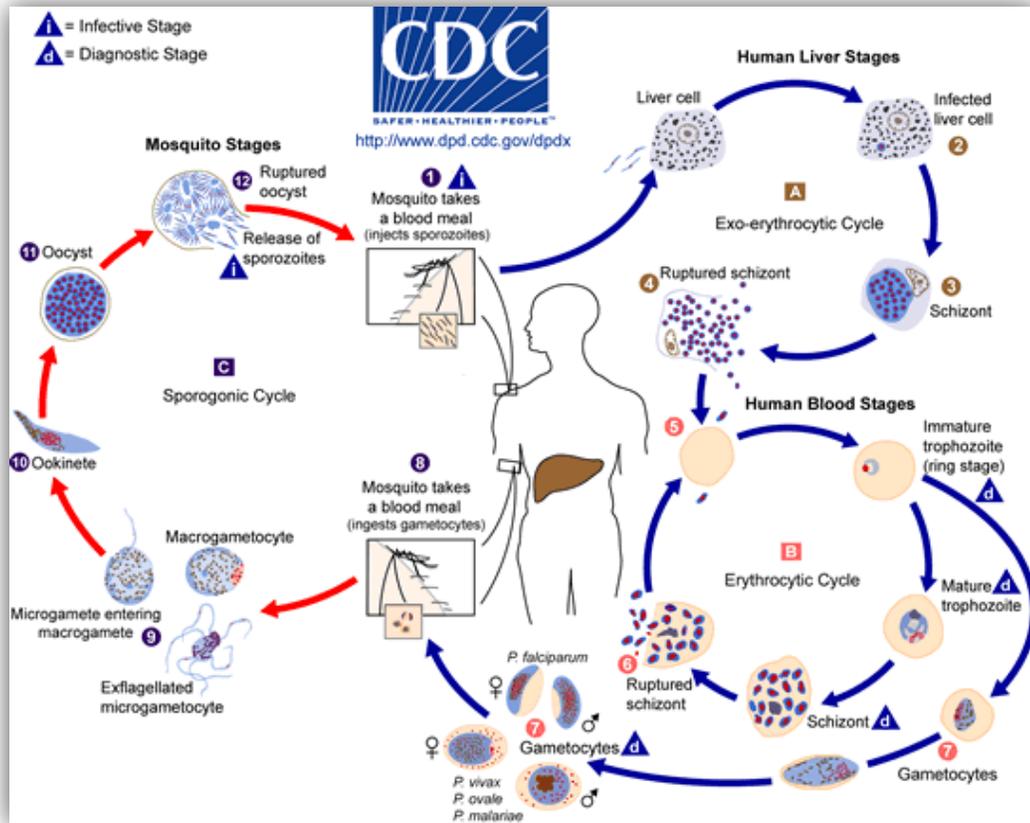


Figura 3. **Ciclo Biológico de *Plasmodium***. Se observan las diferentes etapas en las cuales se lleva a cabo el ciclo de vida del parásito en el humano y en el mosquito (Tomado de http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/PDF_Files/Parasitemia_and_LifeCycle.pdf).

1.3 Inmunobiología

Los factores de virulencia son los componentes del microorganismo que les permiten colonizar, proliferar, invadir y destruir los tejidos del hospedador y determinan su capacidad de causar enfermedad. Existen factores que estimulan el crecimiento de los microorganismos y favorecen la colonización e invasión tisular, como moléculas de superficie (adhesinas). En modelos murinos se ha observado que para tener un mejor control de la enfermedad, los mecanismos de la respuesta inmunitaria innata funcionan para limitar al máximo la densidad del parásito y los mecanismos de la respuesta inmunitaria adaptativa son requeridos para eliminar completamente al parásito (figura 4; Stevenson y Riley, 2004).

Se ha observado que en el inicio de la infección la respuesta inmunitaria innata juega un papel muy importante en el reconocimiento del parásito por medio de los receptores PRR (del inglés Pattern-Recognition Receptors), como los tipos Toll-like receptores (TLR) que se encuentran en el macrófago y en la célula dendrítica. El TLR-9 se une a la hemozoína que es un pigmento insoluble que se obtiene de la degradación de la hemoglobina; el TLR-2 que dirige el reconocimiento del glicosilfosfatidilinositol (Ndam y Deleron, 2007), molécula que induce un aumento en la expresión de los receptores del endotelio como son ICAM-1 y VCAM-1, así como el aumento en la producción de IFN- α (Paessens *et al.*, 2008). El parásito no solo puede ser reconocido por los TLR, sino también es identificado a través del receptor CD36 que es una molécula transmembranal que reconoce a la proteína PfEMP1. Una vez que los macrófagos han reconocido al parásito, se activan y producen especies reactivas del oxígeno, óxido nítrico, IFN- γ y IFN- α (Stevenson y Riley, 2004). El resultado de la interacción parásito-célula dendrítica varía de acuerdo a la fase del parásito, ya que cuando la célula dendrítica está en contacto con un gran número de merozoítos altera sus funciones induciendo la producción de IFN- α y de IL-6, disminuyendo la expresión de moléculas co-estimuladoras como HLA-DR, CD40, CD80 y CD83, aumentando los niveles de IL-10 (Long *et al.*, 2007).

La interleucina (IL12) que se libera juega un papel importante, ya que los niveles bajos de esta citocinas se encuentran asociados con la severidad en la patología de la enfermedad. Además de que promueve la activación de las células NK quienes contribuyen en la inmunidad anti-malaria dificultando el desarrollo del parásito en su fase eritrocítica y evitando de esta manera que se lleve a cabo la infección de otros glóbulos rojos, también se produce altos niveles de IFN- γ después de la activación con IL-12 e IL-18 para inducir la diferenciación de las células Th1 y la expansión policlonal de las células T γ δ que a pesar de que no se ha investigado mucho acerca de la participación de estas células en la inmunidad contra el parásito se sabe que produce grandes cantidades de IFN- γ y actúan en la lisis de los esquizontes (Stevenson y Riley, 2004). Otro tipo de población celular que inhibe el desarrollo de los parásitos en el hígado son las células NK provocando la lisis del hepatocito infectado de una forma dependiente de interferón IFN- γ con la finalidad de evitar la infección de los eritrocitos (Artavanis y Riley, 2002). La respuesta inmunitaria adaptativa es de gran

importancia ya que permite el control de la infección actuando en diferentes fases del ciclo del parásito. Después de que ha sido reconocido el parásito por las células presentadoras de antígeno (APC), se promueve la activación de las células T-CD4 quienes a su vez son productora de IFN- γ y modulan el cambio de las inmunoglobulinas que inicia cuando las células Th2 secreta IL-4 originando el cambio del fenotipo de la respuesta inmunológica hacia Th2. Esto promueve la producción de anticuerpos del tipo: IgG2a e IgG2b en ratón, e IgG1 e IgG3 en humano (Stevenson y Riley, 2004). Los gametocitos son capaces de estimular una respuesta humoral específica, durante la etapa aguda de la infección con *P. vivax* se han detectado niveles elevados de factor necrosante tumoral alfa (TNF α) y de interferón gamma (IFN γ) en el suero de pacientes, fenómeno que coincide con la ruptura de parásitos asexuales en etapa de esquizontes. Se ha demostrado que los gametocitos de *P. falciparum* activan a linfocitos CD4+ (Contreras y Ramsey, 2004). También se ha observado que durante la infección con *P. yoelii*, el plasmodio que causa la malaria en ratones, no muestra regulación de la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II y CD80 y la continua expresión de CD86 en el desarrollo del bazo, macrófagos y células B (Stevenson y Riley, 2004).

Los antígenos de *Plasmodium* residen en proteínas grandes (220-350 kDa) denominadas colectivamente como PfEMP1 (del inglés, *P. falciparum*-infected erythrocyte membrane protein 1), que son codificadas por genes denominados var. Estas proteasas son secretadas por el parásito y encuentran su camino hacia la membrana del eritrocito, donde se concentran en estructuras que se conocen como botones (knobs). Estos botones se adhieren al endotelio vascular y evitan que los eritrocitos infectados sean destruidos en el bazo. Aunque este artificio evita su eliminación en dicho órgano (Rosales y Ortiz, 2008).

La citoadherencia alterada causa la formación de rosetas (un eritrocito parasitado, formado por botones (knobs)), en donde se pega a tres eritrocitos normales, que lo rodean, formando los llamados clumps (acumulación de eritrocitos con knobs), y una mayor adherencia al endotelio, debido a los propios cambios en la adherencia de los eritrocitos y también a la expresión de moléculas de adhesión por parte del endotelio, debido al estado proinflamatorio. Por tal motivo esto favorece la trombosis.

Varias de las complicaciones de la malaria son el resultado de los niveles de complejos antígeno-anticuerpos circulantes. Los complejos inmunitarios circulantes aparecen pronto después de la eliminación de los eritrocitos parasitados de la circulación, el máximo nivel coincide con una disminución de los niveles de C3 y C4 y la aparición de Cd3. A través de la activación del complemento se iniciará un proceso de coagulación intravascular diseminada (CID) y lesión en los bazos cerebrales (figura 5; Merino, 1987).

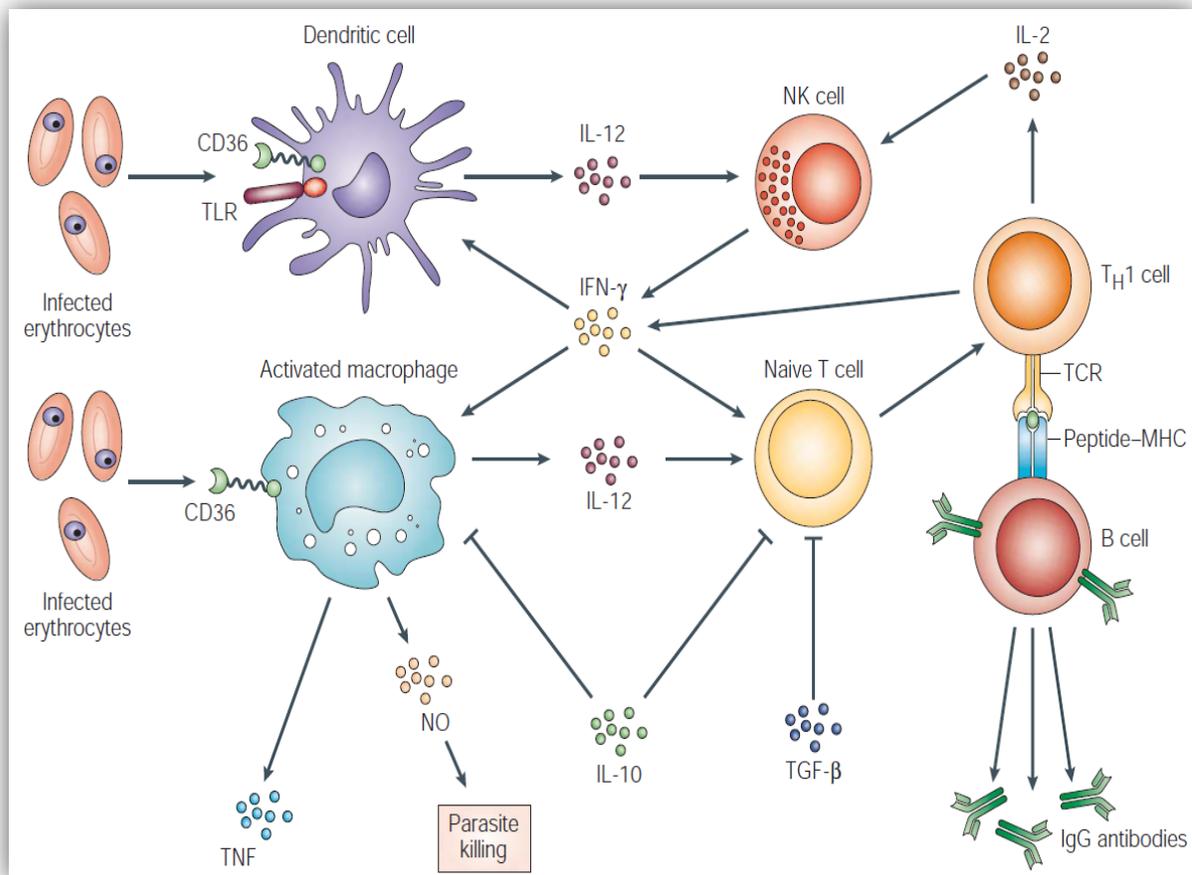


Figura 4. **Esquema general de la respuesta inmunológica durante la infección por *Plasmodium*.** La figura nos muestra la vinculación entre la inmunidad adaptativa al estadio de la malaria en la sangre, debido a la producción de citocinas por las células de la respuesta inmunológica innata (Tomado de Stevenson y Riley, 2004).

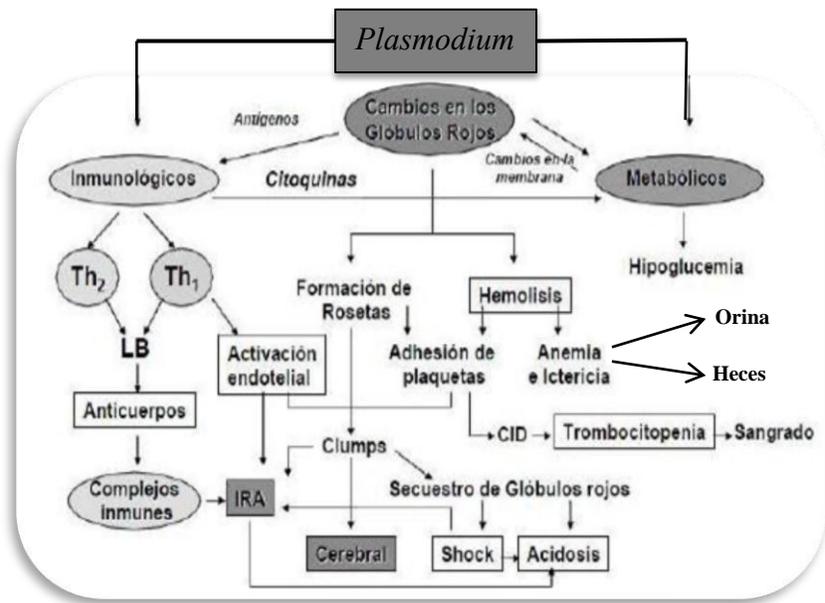


Figura 5. **Esquema general de la patogénesis de *Plasmodium* spp.** Se muestra la patogénesis general de *Plasmodium* spp. Con respecto a la inmunología, al cambio en los glóbulos rojos y metabólicos (adaptado de <http://es.scribd.com/doc/44668538/Parasito-Malaria>).

Se ha observado en infecciones causadas por *Plasmodium* que las citocinas pro-inflamatorias son esenciales para el control de la fase intraeritrocítica tanto en infecciones humanas como en modelos experimentales (Couper, 2007). Una de las causas por las que la cito adherencia diferencial inducida por *P. falciparum* causa patología es la activación excesiva de receptores específicos que estimulan la producción de estos y que varían según el efecto producido:

Formación de rosetas: Se hallan involucrados los receptores de antígenos de grupos sanguíneos CD36, CR1 y heparán sulfato, el CR1 es muy importante ya que son los receptores que intervienen en la depuración de eritrocitos con complejos inmunes depositados, por parte del SRE (Sistema retículo endotelial), de esta manera aumenta la degradación de eritrocitos por el SRE, incluso de los no parasitados.

Adherencia al endotelio: Se hallan involucrados los receptores CD31, CD36, condritín sulfato A, E-selectina, ICAM-1, VCAM-1, y trombospondina. Las rosetas pueden formarse en el torrente sanguíneo, hasta impactar en un capilar, o pueden formarse in situ por adhesión de los eritrocitos parasitados y no parasitados al endotelio, la formación de rosetas se adhiere al endotelio, generando oclusión vascular.

Receptores de PfEMP-1: Responsables de causar malaria grave por *P. falciparum*.

*Placenta: Conditín sulfato A, ácido hialurónico

*Cerebro: E-selectina, trombospondina, ICAM-1

*Microvasculatura: VCAM-1, CD36, CD31

Malaria cerebral: Es una encefalopatía aguda difusa, producida por microtrombosis capilar, existen mecanismos inmunopatogénicos que causan malaria cerebral: Los eritrocitos infectados expresando PfEMP-1 se unen a las células endoteliales cerebrales (BEC) que expresan ICAM-1, esto produce activación endotelial con producción de TNF y mayor expresión de moléculas de adhesión tipo ICAM-1, TNF también es producido por macrófagos ante la liberación de merozoítos que ocurre al lisarse los eritrocitos. El TNF lleva a vasodilatación y aumento de la permeabilidad capilar, lo que redundará en isquemia cerebral por hipotensión. Además al haber cada vez mayor expresión de ICAM-1 se unen cada vez más a eritrocitos parasitados (expresando PfEMP-1) a las BEC y cuando estos eritrocitos se lisan liberan miles de merozoítos que estimulan a la microglía (células del sistema nervioso que tienen la capacidad de fagocitar) a producir una mayor cantidad de citocinas inflamatorias como TNF, IL-1, IRO y el ON (Oxido nítrico). El ON contribuye enormemente a la vasodilatación, por lo que se exagera la hipotensión y por ende la isquemia, el ON es neurotóxico y altera las sinapsis con todo esto lleva al cuadro de malaria cerebral.

Alteraciones renales: Insuficiencia Renal Aguda (IRA), glomerulopatías en infecciones por *P. falciparum* y *P. malariae*.

P. falciparum: Produce glomerulopatías debido a:

* Hemólisis.

* Hipoperfusión (por la citoadherencia que ocluye los vasos)

* Hipersensibilidad tipo III (depósito de complejos inmunes)

P. malariae: Produce glomerulonefritis membranoproliferativa y mesangioproliferativa, debido a un mecanismo de hipersensibilidad tipo III.

Esto se produce por la activación mono o policlonal de linfocitos B, que causa hipergammaglobulinemia por gran producción de Anticuerpos (Ac). Estos Ac se unen a antígenos liberados por eritrocitos lisados, y se depositan en los glomérulos, causando la glomerulonefritis, la activación endotelial por las citocinas proinflamatorias y la adherencia de eritrocitos parasitados activa al endotelio y favorece la coagulación, lo que a su vez favorece la acción del sistema del complemento (<http://es.scribd.com/doc/44668538/Parasito-Malaria>). La SPf66 fue formulada por primera vez y probado en Colombia por Patarroyo 1988, esta vacuna multiestadío es un péptido sintético cuyo monómero consiste en la secuencia de aminoácidos de tres proteínas del estadío asexual del parásito (83, 55 y 35 kDa) de *P. falciparum*. Estas secuencias están unidas por la secuencia PNANP derivada de la proteína del circumsporozoito del parásito (estadío infectivo). La SPf66 es una vacuna diseñada esencialmente para disminuir la morbi-mortalidad ocasionada por la invasión de los merozoítos a los glóbulos rojos (Graves y Gelband, 2009).

Las variaciones genéticas del hospedero pueden modificar la susceptibilidad al parásito al influir sobre alguna de las fases del desarrollo del mismo:

- Supervivencia del esporozoito en la sangre eh invasión del hígado
- Desarrollo exoeritrocítico
- Invasión de los eritrocitos por los merozoítos
- Desarrollo intraeritrocítico
- Gametogénesis

Las vacunas contra los principales parásitos productores de la malaria, *Plasmodium falciparum* y *P. vivax*, tendrían aplicación directa en programas de salud pública diseñados para reducir la morbilidad y mortalidad en las regiones afectadas. Hoy en día no existen

vacunas efectivas contra enfermedades producidas por protozoarios y metazoarios para uso en humanos (Rodríguez, 2008). Debido a la diversidad de etapas y a la complejidad del ciclo de vida del *Plasmodium*, la estrategia a seguir para el desarrollo de vacunas antipalúdicas ha sido atacar el problema empleando diversos enfoques.

Se han diseñado vacunas contra *P. falciparum* y *P. vivax* destinadas a:

1) Prevenir la infección en el ser humano y ser dirigidas contra los esporozoitos y las etapas hepáticas.

2) Encaminadas a detener la propagación del parásito en la sangre del hospedador y van enfocadas contra las etapas asexuales intraeritrocíticas.

3) Destinadas a reducir o interrumpir la transmisión del parásito del hospedador humano al mosquito y van dirigidas contra las etapas sexuales del parásito (gametocitos, gametos, cigoto y etapas esporogónicas en el vector), y vacunas para el bloqueo de la transmisión (VBT).

4) Las vacunas anti-enfermedad, también conocidas como antitóxicas, destinadas a disminuir o inhibir algunas de las manifestaciones clínicas de la enfermedad, como la fiebre, que se originan como consecuencia de la respuesta inflamatoria del hospedador (mediada por citocinas como el TNF alfa e IL-1, IL-4, IL-6) en contra de los exoantígenos y moléculas tóxicas derivadas del metabolismo del parásito (Contreras y Ramsey, 2004).

Las nuevas tecnologías y la explotación del genoma de los plasmodios han dado como resultado que hoy en día existan al menos 58 vacunas en diferentes etapas de desarrollo de las cuales 17 han iniciado pruebas clínicas, de las que más de la mitad corresponden a antígenos de esporozoitos, proteína circumsporozoítica y merozoítos (Rodríguez, 2008).

1.4 Aspectos clínicos y Patología del Paludismo

El cuadro clínico del paludismo (paroxismo) se caracteriza por escalofríos repentinos, que duran de 10 a 15 minutos. La etapa febril seguida de escalofríos y se acompaña de algunos síntomas como: cefalea frontal intensa, dolores del tronco y miembros, dura de 2 a 6 horas seguida de una etapa de sudoración intensa, al final, el paciente suele sentirse débil y agotado, con lo que se queda dormido, al despertar, la temperatura es normal y suele sentirse bien hasta el comienzo de la siguiente crisis. El paroxismo o ataque palúdico corresponde al momento en el cual ocurre la liberación de las toxinas, esas toxinas corresponderían a productos metabólicos residuales del parásito que quedan como desechos del proceso de multiplicación y diferenciación de la nueva generación de parásitos y que son liberados al momento en que el eritrocito que los contiene es destruido, dicha toxina no ha sido identificada (Malagón, 2005). La expresión habitual del paludismo no complicado se caracteriza por escalofríos, fiebre y sudoración acompañados de cefalea, náuseas, y con menor frecuencia, dolor abdominal, vómito y diarrea. En los casos graves se puede encontrar anemia, hepato-esplenomegalia, compromiso cerebral, falla renal y choque, las complicaciones pueden deteriorar gravemente el estado de salud del individuo y conducir a la muerte (Knudson *et al.*, 2007).

El paroxismo que se observa entre las diferentes especies de *Plasmodium* varía debido a la cepa, vitalidad y número de los esporozoitos inoculados por el mosquito y la variación en la susceptibilidad por parte del hospedero. El período de incubación de *P. vivax* y *P. ovale* es de 8 a 21 días (la mayoría de 11 a 14), en *P. malarie*, de 4 a 5 semanas con el primer acceso de fiebre de los 3 a 12 días posteriores al período de incubación, *P. falciparum* de 9 a 13 días (Malagón, 2005). Según la especie de plasmodio que produzca la infección, el cuadro clínico presentará los aspectos característicos de la infección por dicha especie. *P. falciparum* es la especie que causa la infección malárica de forma más grave al poder producir un paludismo cerebral que se acompaña de una mortalidad aproximada del 20% de los casos infectados y un cuadro clínico conocido como fiebre intermitente biliosa hemoglobinúrica, *P. malariae* produce una forma más crónica de paludismo, al igual que *P. vivax*, y por último, *P. ovale* produce un cuadro clínico de poca intensidad con frecuentes recuperaciones espontáneas

(Alcaraz *et al.*, 2005). Algunas de las complicaciones incluyen compromiso cerebral, renal, pulmonar, anemia normocítica aguda, hipoglucemia, choque, acidosis, coagulación intravascular diseminada, ictericia, hemoglobinuria y crisis convulsivas (Durlach *et al.*, 2009).

En algunas especies de *Plasmodium*, el esquizonte hepático puede permanecer en estado latente, en forma de hipnozoito. La reactividad de los hipnozoitos puede ocurrir hasta un máximo de 30 años después de la infección inicial en el ser humano, aunque aún no se sabe cómo se vuelve a manifestar. Entre las especies que forman hipnozoitos están *P. malarie*, *P. vivax* y *P. ovale*. La transición desde la etapa hepática a la eritrocítica no ha sido bien definida, en el año 2006 se demostró que el parásito sale de los hepatocitos en merosomas que contienen en su interior cientos o miles de merozoítos. Se ha demostrado que estos merosomas se dirigen a los capilares pulmonares y lentamente se desintegran entre 48 a 72 horas liberando los merozoítos, por lo que la invasión de los eritrocitos es mayor cuando el flujo sanguíneo es lento y las células están perfectamente empaquetadas, estas condiciones se llevan a cabo en los capilares alveolares.

Los hipnozoitos pueden reactivarse después de varias semanas, meses o incluso años después de la infección primaria y son los responsables de las recaídas (Ferreira *et al.*, 2004). Una Característica importante que se da durante la infección por *Plasmodium* y que se ha observado tanto en humanos como en modelos murinos es el aumento en el tamaño del bazo así como modificaciones en su organización debido a la gran activación que induce el parásito. Las principales características de las cuatro especies de *Plasmodium* nos ayudan a poder identificar la especie de *Plasmodium* y así combatir la infección causada por el protozoario (tabla 2).

Tabla 2. Comparativo de las características de las cuatro especies de *Plasmodium*

CARACTERÍSTICAS	<i>P. Falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. malarie</i>	<i>P. ovale</i>
Período de incubación (Días)	9-13	11-14	30-38	11-14
Signos y síntomas	Cefalea , palidez, esplenomegali a congestiva, hepatomegalia ictericia	Cefalea, algias, vomito y fiebre sin escalofríos	Cefalea, algias, vomito y fiebre sin escalofríos	Escalofrió intenso que dura de 30 a 60 min. fiebre de 40 a 41 °C, acompañado de nauseas y vómitos
Fiebre	Terciaria maligna	Terciaria benigna	Terciaria cuartana	Terciaria suave
Tratamiento	Clorhidrato de amodiaquina, sulfato de quinina	Cloroquina difosfato	Cloroquina difosfato	Cloroquina difosfato

1.5 Diagnóstico y Tratamiento

El diagnóstico de la malaria implica la identificación del parásito o antígenos y productos de este en la sangre del paciente. La población humana expuesta a la transmisión de la malaria debe tener acceso a métodos de diagnóstico prácticos, con el fin de que se identifiquen oportunamente todos los casos de la infección y se clasifiquen con precisión, se ha tenido especial preocupación por disponer y asegurar la calidad de métodos de diagnóstico para que estos sean sensibles, específicos, económicos y operacionalmente factibles de aplicar en el campo (López, 2001). En algunas áreas, la transmisión de la malaria es tan intensa que una gran proporción de la población está infectada, pero permanece asintomática por lo que se tiene que recurrir a otras técnicas de diagnóstico (Tangpukdee *et al.*, 2009).

El diagnóstico de la especie de *Plasmodium* debe ser el detonador que inicie las acciones derivadas de la firme decisión para:

- a) Administrar de inmediato el tratamiento
- b) Organizar al grupo social afectado y a los servicios de salud responsables de interrumpir la transmisión
- c) Identificar los factores de riesgo de enfermar o morir de malaria con el fin de diseñar las acciones de prevención y vigilancia epidemiológica pertinentes (López, 2001). El diagnóstico de la malaria es necesario para prevenir la morbilidad y mortalidad evitando el uso innecesario de agentes antimaláricos. Las características requeridas de una prueba de diagnóstico rápido para la malaria, varían en función de la epidemiología regional y de los objetivos de un programa de control contra este protozoario (Murray *et al.*, 2008).

El diagnóstico parasitológico se efectúa mediante la identificación del parásito en un frotis y una gota gruesa de sangre, obtenida de los pacientes poco antes del paroxismo, momento en que estará parasitada la mayor cantidad de eritrocitos. Para hacer el frotis, se tomarán del lóbulo de la oreja o del pulpejo de algún dedo una gota de sangre, con la cual se hará un extendido uniforme. En un extremo del porta objetos se pondrá una gota gruesa, la cual se extenderá un poco con el borde de otro porta objetos. La parte del frotis se fija con alcohol metílico, pero no la de la gota gruesa. El extendido de sangre se tiñe con colorante de Giemsa o Wright. Primero se observa la gota gruesa, para identificar la presencia de parásitos y luego el frotis, para ver las características morfológicas del parásito. La prueba se reporta como negativa o positiva y en este caso, se indica la especie encontrada. De esta manera, la gota gruesa y el frotis de sangre son el instrumento disponible más útil para el diagnóstico inmediato.

Otro tipo de diagnóstico que se puede realizar es mediante métodos alternativos, detección de antígenos de plasmodios, fluidos biológicos, detección de anticuerpos entre otros tipos de diagnósticos (tabla 3).

Tabla 3. Comparativo entre las diferentes técnicas de Diagnóstico.

Técnica	
Microscopia fluorescente	
Microscopia de campo oscuro	
Sondas de ácido nucleico	MÉTODOS ALTERNATIVOS
Inmunofluorescencia con luz UV	
Cuantificación de la capa leucocitaria (QBC)	
Radioinmunoensayo	DETECCIÓN DE ANTÍGENOS Y FLUIDOS BIOLÓGICOS
Inmunoensayos enzimático (ELISA)	
Inmunofluorescencia indirecta	DETECCIÓN DE ANTICUERPOS
Inmunoensayos enzimático	
Western blot	
Coloración con naranja de acridina	
Amplificación de isotérmica de ácido nucleico tipo (LAMP)	OTRAS TÉCNICAS
Prueba rápida de diagnóstico (RDT)	
Anticuerpos anti-malaria	

La realización de un análisis de la estabilidad de los anticuerpos anti-malaria en la sangre, esta basada en una toma de sangre en papel para posteriormente determinar la presencia de anticuerpos (Corran *et al.*, 2008), la técnica rápida de diagnóstico (RDT) se basa principalmente en detectar proteínas ricas en histidina proteína 2, lactato deshidrogenasa y aldolasa, que se producen en el ciclo eritrocítico (Moyano *et al.*, 2009). La coloración con naranja de acridina consume menor tiempo para prepararla y es más sensible que la coloración de Giemsa cuando se observan las muestras de sangre con un aumento microscópico menor, con lo cual se diseñó un dispositivo de inmersión estandarizado (dipstick) con lactato deshidrogenasa para identificar infecciones separadamente de *P. falciparum* y *P. vivax* en un área endémica para ambas especies (López, 2001), la técnica (LAMP) detecta el ribosoma N.18S del ARN de *P. falciparum*. Se necesitan nuevas técnicas de diagnóstico de laboratorio que muestren una alta especificidad y sensibilidad, sin variación subjetiva, como podrían ser las técnicas de biología molecular como PCR (Tangpukdee *et al.*, 2009).

El tratamiento de elección es la cloroquina excepto en los casos de resistencia donde se utiliza cloruro/sulfato de quinina, clorhidrato de tetraciclina, doxiciclina, mefloquina o pirimetamina. El mecanismo de resistencia radica en las mutaciones espontáneas en la composición genética de la población parasitaria. La frecuencia de estas mutaciones varía según la cepa y según el grado de presión medicamentosa sobre la población (Alcaraz *et al.*, 2005). La cloroquina (CQ) es una 4 aminoquinolina y su derivado la hidroxicloroquina (HCQ) fueron inicialmente usadas en el tratamiento y profilaxis de la malaria (Ferrerias *et al.*, 2007). Estos fármacos se derivan de la corteza del árbol peruano de nombre común Cinchona o Quina. Los agentes activos: cinconina y quinina, fueron aislados por Pelletier y Caventau en 1820. Posteriormente se desarrollaron la cloroquina y la hidroxicloroquina con el ánimo de minimizar la toxicidad por antimaláricos (Restrepo *et al.*, 2002). La cloroquina es un esquizonticida sanguíneo (destruye los esquizontes) de acción rápida que se concentra en los lisosomas donde inhibe la polimerasa del grupo HEM, por lo que impide la digestión de la hemoglobina, acumulándose niveles tóxicos de hemina que finalmente producen la lisis intracelular. También inhibe las proteasas que intervienen en la degradación del grupo HEM e interfiere con la replicación del DNA

El mecanismo de acción de estos fármacos es desconocido. Se ha propuesto que tanto la cloroquina como la hidroxicloroquina incrementan el pH en las vacuolas intracelulares y alteran el proceso de degradación de proteínas por las hidrolasas ácidas en los lisosomas, el ensamblaje de macromoléculas en los endosomas y las modificaciones *post* traslacionales de proteínas en el aparato de Golgi, todo lo cual conduce a una interferencia con el procesamiento antigénico en los macrófagos y otras células presentadoras de antígeno. Como resultado los antimaláricos disminuyen la formación de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II y los péptidos antigénicos que se requieren para estimular a los linfocitos TCD4+ y producir una disminución en la respuesta inmunológica contra péptidos autoantigénicos (Restrepo *et al.*, 2002). A partir del año 2000, el ministerio de Salud de Colombia modificó el esquema de tratamiento de primera línea del paludismo no complicado causado por *P. falciparum*, ya que desde 1998 los protocolos estandarizados por la Organización Mundial de Salud y la Organización Panamericana de Salud se han informado niveles de falla entre el 44-97% de la combinación de la cloroquina sola o con la combinación

de sulfadoxina-pirimetamina, de tal motivo la modificación que se realizó fue la combinación de amodiaquina mas sulfadoxina-pirimetamina. A pesar de ello en muchas áreas endémicas del país se continuo utilizando cloroquina, sola o en combinación con sulfadoxina-pirimetamina, situación que se presentó hasta finales del 2003 debido a dificultades por la obtención de amodiaquina en cantidades suficientes para suplir la demanda nacional (Knudson *et al.*, 2007). La búsqueda de nuevos fármacos o alternativas terapéuticas para el tratamiento de la malaria es una prioridad en la lucha por el control de esta enfermedad debido a la mortalidad que causa en niños principalmente por lo que se han estado investigando el uso de plantas como posibles propiedades medicinales data de épocas muy remotas, entre los compuestos antimaláricos aislados de plantas, la artemisinina ocupa un importante lugar en la actualidad. Las potencialidades antimaláricas de las plantas medicinales utilizadas para el tratamiento de esta enfermedad en nuestro país, no han sido evaluadas con anterioridad por lo que se están realizando estudios con otros tipo de plantas para evaluar si tienen actividad contra el paludismo (Rodríguez *et al.*, 2006).

1.6 Epidemiología

El paludismo afecta a 21 países de América Latina, entre ellos, Argentina, Belice, Bolivia, Brasil, Guayana Francesa, Haití, Honduras, México, Nicaragua, Panamá y Paraguay. Del total de 835 millones de habitantes de esta región, 293 millones viven en áreas con riesgo de transmisión de la enfermedad y 203 millones viven en zonas donde ésta es frecuente. En México, se registró hasta la mitad del siglo pasado, un rango tan amplio de 24,000 y 2.4 millones de casos (Castro y Rodríguez, 2009). El paludismo es un problema de salud pública a escala mundial que cada año genera de 250 a 500 millones de casos y un millón de muertes; de éstas 90% ocurren en menores de 5 años de edad, la mayoría en África (89%) donde también se concentran 59% de los casos clínicos y 74% de los casos por *P. falciparum*. Durante el siglo XX la malaria provocó entre 150 y 300 millones de muertes, lo que representa de 2 a 5% de las muertes alrededor del mundo, es la quinta causa de muerte debida a enfermedades infecciosas después de las respiratorias, del VIH, de las enfermedades diarreicas y de la tuberculosis (Betanzos, 2011).

De esta manera el paludismo, no solo causa alrededor de 500 millones de casos cada año y entre 1 y 3 millones de muertes, sino también conlleva una enorme carga que impide el desarrollo económico y social en amplias áreas (Moyano *et al.*, 2009).

En México, el principal agente etiológico es *P. vivax*. Algunos casos aislados de *P. falciparum* se notifican en Estados de la frontera sur, los cuales se asocian a movimientos migratorios provenientes de Centroamérica y otros con resistencia a medicamentos antimaláricos (Olguín, 2008) *P. vivax* es responsable de 98% del paludismo de los casos en México, el 20% de los cuales son reportados por el estado de Chiapas. La mitad de las infecciones en Chiapas se producen en la Selva Lacandona y en la frontera con Guatemala (Lozano *et al.*, 1999). En contraste con otras regiones del mundo, la tendencia en América es hacia la disminución que va de 1.14 millones de casos en el 2000 a 572,000 en el 2008. Este comportamiento se acompaña de una reducción del mapa endémico, sobresaliendo con más de 50% en la reducción de la carga en Argentina, Bolivia, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Guyana, Honduras, México, Nicaragua, Paraguay y Surinam. Cuatro de estos países (Argentina, El Salvador, México y Paraguay) se encuentran en fase de pre-eliminación con un seguimiento activo de casos (figura 6).

Otros cinco países (Belice, Guyana, Guatemala, Nicaragua y Surinam) tienen actividades de control focalizadas en poblaciones de mayor riesgo; tres de ellos (Guyana, Nicaragua y Surinam) con fortalecimiento de la cobertura de vigilancia con mayor acceso y búsqueda de febriles, con un aumento en la cobertura de vigilancia y en el índice anual de exámenes de sangre. Cinco países (Brasil, Colombia, Costa Rica, Panamá y Perú) reportan fluctuaciones en el número de casos. Durante el 2009 se acumularon 571,308 casos de malaria en los 21 países endémicos de América destacando Brasil (55.04%), Colombia (13.87%), Haití (8.67%), Perú (6.46%), Venezuela (6.40%), Guyana (2.32%) y Bolivia (1.71%), que concentraron 94.46% de los casos. En Centroamérica y México el mayor porcentaje se concentró en Honduras (1.61%) y Guatemala (1.24%); la mayoría de los casos (77%) son ocasionados por *P. vivax* (figura 7; Betanzos, 2011).

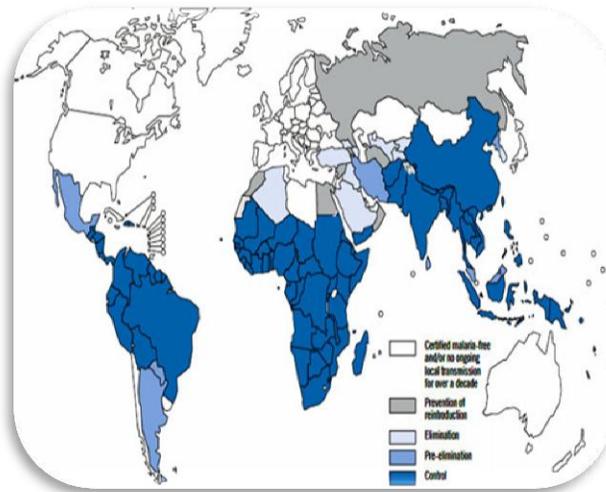
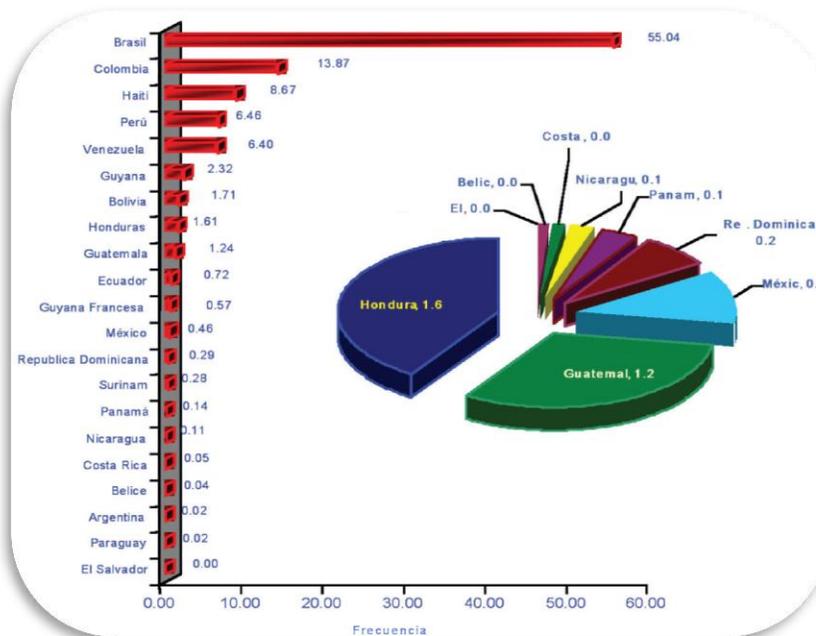


Figura 6. **Mapa del Estado de control, pre control y eliminación del paludismo.** Se muestra como se está controlando el paludismo en todo el mundo, en color azul marino se observan los países en donde ya existe un control de la infección, en azul turquesa las áreas de pre-eliminación y el azul cielo la eliminación de la infección (Tomado de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/paludismo.html>)

América



México,
Centroamérica
y el Caribe

Figura 7. **Distribución de casos confirmados de paludismo en América durante el año 2009.** Del lado izquierdo se observa la frecuencia de paludismo en América, mientras que del lado derecho se observa la frecuencia en México, Centroamérica y el Caribe. (Tomado de Betanzos, 2011).

1.7 Paludismo animal y modelo experimental

La especificidad por su hospedador de las especies de *Plasmodium* asociadas al paludismo humano y la ausencia de sistemas de cultivo *in vitro* para la mayor parte de los estadios del desarrollo de *P. falciparum*, así como las consideraciones éticas necesarias para el uso de chimpancés y otros primates ponen de relieve las ventajas de los sistemas basados en modelos experimentales; por ejemplo, es posible identificar los genes y las proteínas que actúan en determinadas etapas del ciclo de vida del parásito, verificando su función mediante técnicas de modificación genética y utilizar candidatos prometedores en la producción de vacunas (Horrocks *et al.*, 2001).

El uso de la transfección o introducción de ADN exógeno en organismos vivos puede ser uno de los instrumentos más poderosos para el análisis del genoma del parásito en modelos de paludismo animal ha abierto todo el ciclo vital del parásito, incluidas las etapas que transcurren en el mosquito, a un análisis crítico imposible de realizar con los parásitos humanos. Los modelos de paludismo animal comparten muchas características con sus equivalentes humanos, como los ciclos vitales, las restricciones en las células del hospedador y las reacciones inmunitarias, incluso, *Toxoplasma gondii* ofrece un modelo para el estudio de muchos aspectos biológicos de *Plasmodium* (Horrocks *et al.*, 2001).

La infección por *Plasmodium* es especie específica y afortunadamente se cuenta con algunos modelos animales para estudiar el paludismo *in vivo* (figura 8). En simios han sido empleados *P. knowlesi*, *P. fragyle*, *P. cynomolgi*, *P. reichenowi*, *P. brazilianium*, *P. inut*, *P. schewetzi* y *P. simium*, mientras que en roedores han sido de gran utilidad: *P. berghei*, *P. chabaudi*, *P. yoelii* y *P. vinckei* (Ferreira *et al.*, 2004). Los modelos murinos tienen la ventaja de ser animales de bajo costo, fácil cuidado y reproducción; presentan un tiempo generacional muy corto, son muy prolíficos y se adaptan fácilmente a la vida en los bioterios, lo que permite controlar las variables ambientales en las experimentaciones (Sáenz *et al.*, 2008).

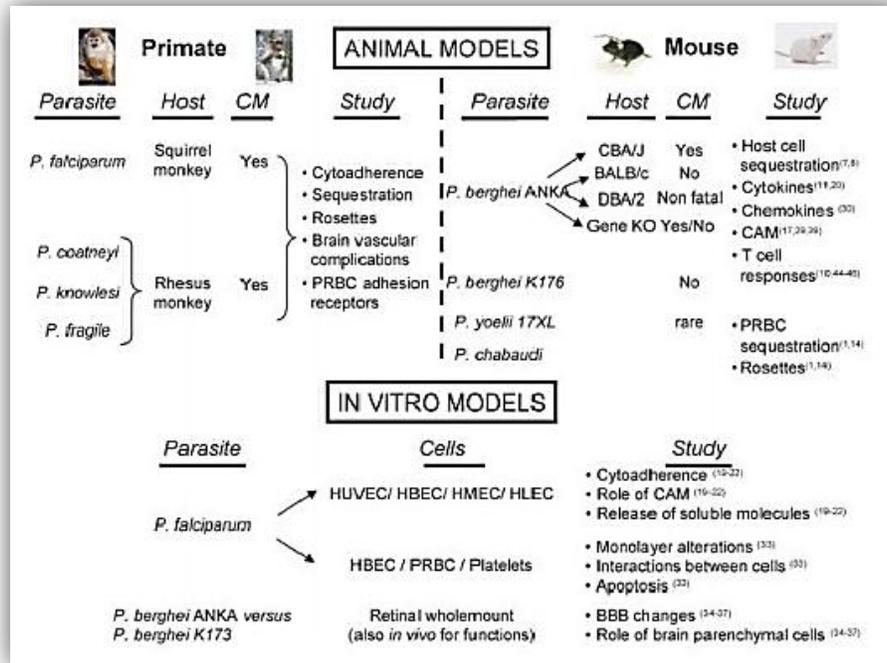


Figura 8. **Animales utilizados como modelos para el estudio del paludismo.** Se muestra la clasificación de modelos animales y modelos *in vitro* para el estudio del paludismo de acuerdo a lo que se pretenda estudiar (Tomado de Gallardo, 2011).

La mayoría de los modelos disponibles de pequeños primates, representan los sistemas disponibles para probar vacunas contra la malaria, componentes antimaláricos y para entender las interacciones parásito-hospedador y consecuentemente para proporcionar una visión acerca de los mecanismos involucrados en la fisiopatogénesis (Gallardo, 2011). Taxonómicamente, los roedores están comprendidos dentro del orden *Rodentia*, el cual es el más numeroso dentro de los Mamíferos, contando con aproximadamente 200 especies. El género *Rattus* (Rata) y el género *Mus* (ratón), pertenecen a la familia *Muridae* donde el ratón es la especie más utilizada para la investigación, esto se debe a las características que presentan: buena adaptación para vivir en bioterios, mantenimiento sencillo y económico, son de talla pequeña, con corto tiempo generacional, son animales prolíficos, buena reproductividad a lo largo del año, soportan bien la consanguinidad; de hecho, se disponen gran cantidad de líneas: consanguíneas (Inbred Strains), congénicas, mutantes y transgénicas, así como también de colonias de animales no consanguíneos (Outbred Stocks) y de híbridos F1 (Perez, 2007). Las poblaciones exogámicas de ratón (CD1) se utilizan en la investigación

biomédica, en la toxicidad y en estudio del cáncer (Aldinger *et al.*, 2009). Cuando un animal es consanguíneo es porque sus progenitores tienen parentesco familiar entre sí, compartiendo uno o varios antecesores comunes, las líneas consanguíneas genéticamente definidas deben denominarse por un código de una a cuatro letras mayúsculas como son: BALB, A, DBA, RF. Existen también líneas de animales no consanguíneos, para las cuales se establecen sistemas de cruces que tienden a mantener el coeficiente de consanguinidad en los niveles más bajos posibles, estableciendo acoplamientos entre animales no emparentados por lazos familiares. Existen varias líneas no consanguíneas de uso general, entre ellas se pueden citar las siguientes: NMRI, SWISS-WEBSTER, CD1 (Sáenz *et al.*, 2008).

Las hormonas tienen la capacidad de afectar la respuesta inmunitaria y en la literatura se ha descrito ampliamente la existencia de un dimorfismo inmunológico, los machos generalmente exhiben menor respuesta inmunológica que las hembras, principalmente en lo referente a la respuesta inmunitaria humoral. Así, las células B de las hembras producen mayor cantidad de anticuerpos (IgM, IgG e IgA) y tienen mayor capacidad para montar respuestas de anticuerpos específicos cuando son retadas con antígenos. En roedores se han reportado diferencias en la respuesta inmunitaria mediada por células que involucran principalmente a las células T, en donde la respuesta linfoproliferativa a mitógenos, así como la intolerancia inmunológica a sustancias externas es mayor en hembras (Verthelyi, 2001). De la misma forma, la capacidad de los subtipos de células T (Th1 o Th2) para superar una infección es diferente en ambos sexos; las hembras exhiben una mayor producción de citocinas tipo Th2, como (IL)-4, IL- 5, IL-6 y IL-10, que los machos. Incluso, se ha propuesto que esta mayor capacidad de respuesta inmunológica puede ser la responsable de que en hembras de diferentes especies sea más fácil inducir una respuesta inmunitaria contra antígenos propios que los machos (Klein, 2000). Las hormonas son un factor determinante en la adquisición, desarrollo y desenlace de las infecciones parasitarias, hasta ahora, se ha observado que las hembras y los estrógenos sobresalen sobre los machos y la testosterona, en su capacidad de controlar la mayoría de dichas infecciones. Sin embargo, factores como la edad, el fondo genético, el grado de exposición y las emociones, no pueden ser dejados de lado y deben de tomarse en cuenta para definir el grado de susceptibilidad de cada caso en particular (Cervantes y Carrero, 2008).

1.8 *Plasmodium berghei* y *Plasmodium yoelii*

Plasmodium berghei es similar al parásito del paludismo humano, en los aspectos de la estructura, el ciclo, la organización del genoma y la fisiología, por lo que, *P. berghei* representa un modelo práctico y relevante para los estudios experimentales del paludismo (Woong *et al.*, 2011). *Plasmodium berghei* es un parásito de África, que fue aislado por Vincke y Bafort en Katanga en el año de 1948, este parásito tiene preferencia por glóbulos rojos inmaduros, la infección de ratones con *Plasmodium berghei* y *Plasmodium yoelii* establecieron los primeros modelos murinos para probar la eficacia del medicamento. La selección de cepas de ratón con diversos grados de sensibilidad para el parásito, allano el camino para el análisis de la fisiopatología de la malaria cerebral, el uso de estos métodos de parásitos fluorescentes GFP desarrollo nuevas áreas de aplicación, el mantenimiento de parásitos *in vitro* durante un largo período, permitir la selección de transfectantes *in vitro*, esto podría allanar el camino para los estudios y facilitar la infección de ratones (Jambou *et al.*, 2011). *Plasmodium berghei* (*P. berghei* ANKA y *P. berghei* K173) es utilizado para estudiar patogénesis. *P. berghei* ANKA se utiliza como modelo experimental del paludismo cerebral (Stevenson y Riley, 2004).

Plasmodium yoelii yoelii, (PYY) es una cepa obtenida de la Escuela de Higiene y Medicina Tropical de Londres, por la cortesía del fallecido profesor Garnham y el Dr. Davidson en 1969 este se mantuvo en pases de ratón a ratón desde entonces, los ratones que se utilizaron fueron machos con un peso de 20 a 25gr de la cepa CD1 (Malagón y Castillo, 2000). *Plasmodium yoelii* (*P. yoelii*17XL, *P. yoelii*17XNly *P. yoelii* YM) son utilizados para estudiar los mecanismos de inmunidad y patogénesis, incluyendo el modelo experimental de la malaria cerebral, estudio de la proteína de superficie recombinante del merozoito (MSP1).

*P. yoelii*17XL es ampliamente usado para estudiar la respuesta inmunológica inducida por vacunación (Stevenson y Riley, 2004), además de la comprensión de la genética, la inmunobiología y el efecto de fármacos. Se ha observado que principalmente en los modelos murinos de *Plasmodium yoelii* 17 X no letal se producen muy bajos niveles de TGF- β (factor de crecimiento tumoral β) y de IL-10 durante la etapa temprana de la infección aguda, también se ha observado que después de esta etapa eventualmente los ratones infectados controlan la

parasitemia, lo que se atribuye a la infección temprana de IFN- γ y IFN- α , mientras que en modelos murinos en *Plasmodium yoelii* 17XL en su variante letal se ha visto que al bloquear el receptor de IL 10 y administrar anti-TGF- β se restaura la respuesta Th 1 lo que ocasiona que algunos animales puedan sobrevivir y controlar la enfermedad. En estudios recientes se ha observado que ratones infectados con *Plasmodium yoelii* 17 XL deficientes de IL-10 pueden controlar la enfermedad (100% de sobrevivida) cuando se infectan con 10^3 glóbulos rojos parasitados (Couper, 2008)

Otros estudio que se han realizado muestran que los ratones de la cepa DBA/2 (resistentes a infección por *Plasmodium yoelii* 17 XL) producen niveles altos de IFN- γ como de NO en bazo, los primeros días postinfección a comparación de los ratones Balb/c (susceptibles a la infección por *Plasmodium yoelii* 17 XL) que produce pequeñas cantidades. Se cree que el IFN- γ es el responsable de los altos niveles de NO, además de que puede inducir una respuesta inmunológica tipo Th 1 la cual limita la fase eritrocítica en la infección por malaria (Wang, 2009). Las similitudes de los genomas de los humanos y roedores *Plasmodium* spp con sus 14 cromosomas que van del 23 al 27 Mb codifican para las proteínas de más de 5000 de los que alrededor del 80% de los genes que se encuentran en estos genomas son similares, resalte la importancia de malarias en modelos murinos para entender las enfermedades humanas. Estas similitudes genéticas han conducido al desarrollo de específicas de genes que contribuyen a la desarrollo de vacunas fiables contra la enfermedad (Gallegos *et al.*, 2012).

2. JUSTIFICACIÓN

En México, la demanda diagnóstica del paludismo se puede ejemplificar con la labor que se hace en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) de la Secretaría de Salud, donde se reciben anualmente 60,000 frotis extendidos de sangre procedentes de los Laboratorios Estatales de Salud Pública de todo el país para verificar la capacidad diagnóstica de cada uno. La revisión de cada uno de estos portaobjetos es una labor intensa para los microscopistas del InDRE y, en general de los encargados de revisar la muestra diagnóstica ya que la normatividad indica que una persona debe revisar diariamente hasta 60 muestras (Galindo, 2011). Además, como es conocido que los valores de sensibilidad y especificidad diagnóstica dependen de la experiencia del microscopista, se han propuesto diferentes métodos para mejorar el diagnóstico como el microhematocrito fluorescente o QBC, los inmunoensayos, las pruebas moleculares, las cuentas automatizadas de células e incluso la espectrometría de masas; estas alternativas tienen la ventaja de poseer una alta sensibilidad y especificidad analítica, además de que algunas de ellas son de ejecución rápida, pero tienen la desventaja de que requieren equipamiento y personal especializado (Tangpukdee *et al.*, 2009), incluso la valoración diagnóstica de esos métodos alternativos es difícil porque la obtención de muestras de pacientes humanos es difícil, sobre todo si se considera que el paciente recurre al servicio de salud para buscar alivio y no para donar muestras.

La importancia de trabajar con un modelo experimental es que simulan las condiciones de la enfermedad en animales de laboratorio, principalmente en ratones (*Mus musculus*); sin embargo, hay diferentes cepas de ratones que se usan con diferentes propósitos en investigación, debido a que se les han caracterizado diferencias genotípicas que impactan el fenotipo inmunológico y bioquímico, haciéndolos resistentes o susceptibles a diferentes patógenos. De ahí la importancia de caracterizar los parámetros asociados al establecimiento de infecciones experimentales. Entre los ratones de mayor uso en investigación se encuentra la cepa CD1 también conocida como ICR o NIH, que se ha usado en toxicología, estudios generales, vacunas, teratología, hematología, química clínica y la cepa Balb/c que se ha usado en experimentos alérgicos, estudios de cáncer, cardiovascular, producción de anticuerpos monoclonales, toxicología, farmacología, teratología, hematología, Química clínica (Aldinger

et al., 2009). Las especies más comúnmente estudiadas son *Plasmodium berghei* y *Plasmodium yoelii*. Considerando que en los seres humanos no se pueden realizar estudios de investigación de la enfermedad por razones de ética, se tiene que recurrir a modelos experimentales. Este trabajo tiene la finalidad de estudiar los parámetros (sexo, cepa, carga parasitaria y tiempo de sobrevida) asociados al establecimiento de *Plasmodium yoelii* en el ratón.

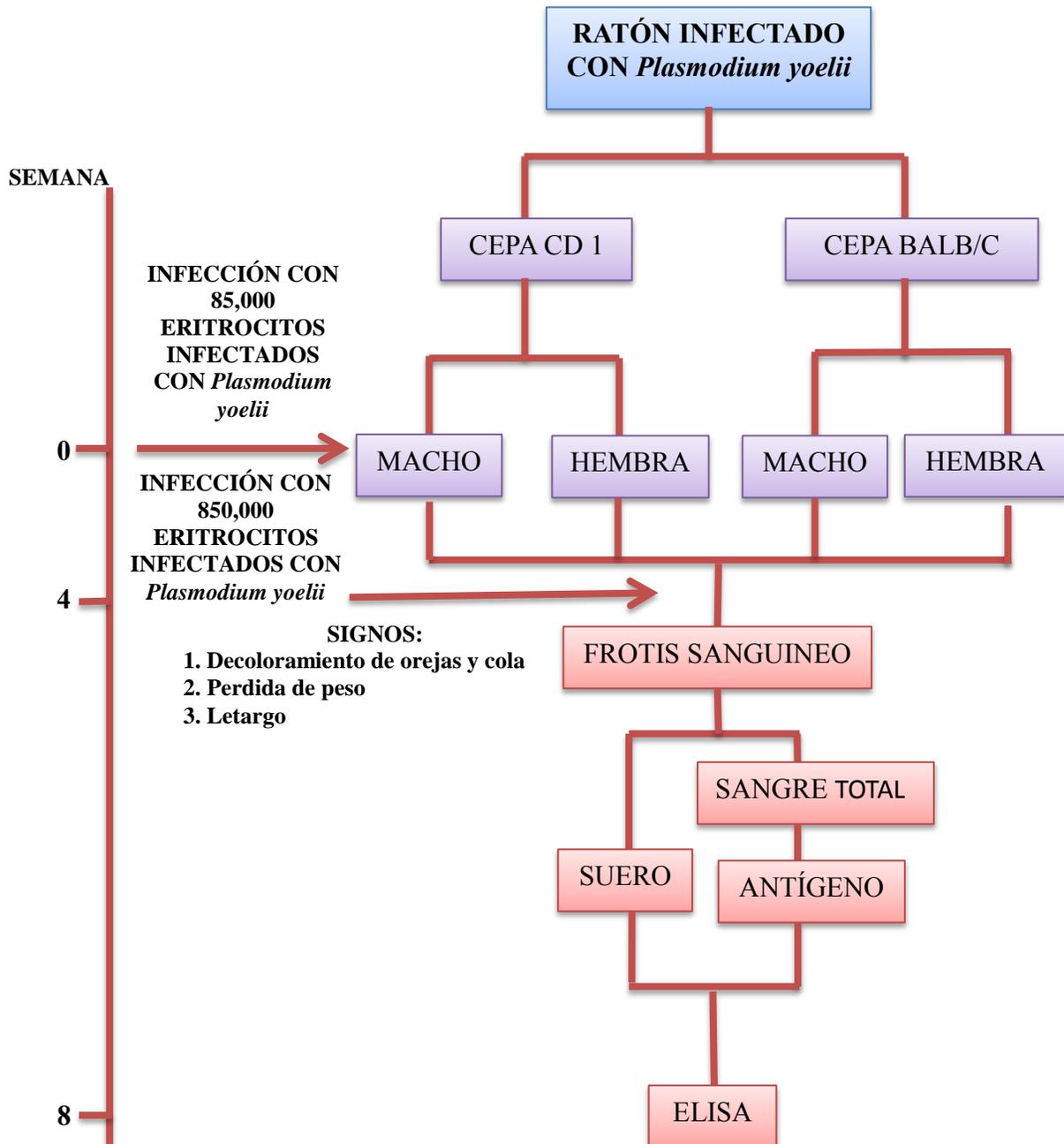
3. OBJETIVO GENERAL

Determinar los parámetros (sexo, cepa, carga parasitaria y tiempo de sobrevivencia) asociados al establecimiento de *Plasmodium yoelii* en un modelo experimental murino.

4. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Determinar la aparición de signos y tiempo de sobrevivencia que ocasiona *Plasmodium yoelii* en dos cepas de ratones infectados experimentalmente.
- 2.- Determinar la carga parasitaria ligada a sexo a la infección por *Plasmodium yoelii* en dos cepas de ratones infectados experimentalmente.
- 3.- Determinar la presencia de anticuerpos contra *Plasmodium yoelii* en el modelo experimental murino.

5. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Propagación de la cepa

La cepa de *Plasmodium yoelii* fue proporcionada por el Dr. Filiberto Malagón Gutiérrez, investigador del laboratorio de Malariología de la Facultad de Medicina de la UNAM, donde la cepa se ha conservado por más de una década mediante la transferencia semanal de un inóculo de un ratón infectado a uno sano, sin considerar la carga parasitaria transferida. Para ello se han empleado ratones CD1 hembra de 24 a 28 gr y de 6 a 8 semanas de edad, los cuales se han alojado en jaulas de plástico con aserrín estéril y alimentados con croquetas para murino, adicionada con los nutrimentos necesarios para tener un crecimiento óptimo (Harlan®, México) y agua *ad libitum*, estos ratones permanecieron alojados en el bioterio del InDRE.

6.2 Infecciones experimentales en dos cepas de ratones

La infección experimental se realizó utilizando 30 ratones hembra, 30 ratones macho de la cepa CD 1 así como 30 ratones macho y 30 ratones hembra de la cepa Balb/c con un peso de 24-28gr y de 6-8 semanas de edad, posteriormente se separaron en dos grupos de 15 ratones por cada uno de cada cepa, un grupo de 15 machos y 15 hembras de la misma cepa se inocularon con una carga parasitaria baja (1%) con (85,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*) y una carga parasitaria alta (11)% con (850,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*) en el caso de CD1, con respecto a la cepa Balb/c se inóculo una carga parasitaria baja (1%) con (85,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*) y una (11%) con (850,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*) con la finalidad de evaluar los parámetros como son, el tiempo de sobrevivencia, sexo, cepa y carga parasitaria. Los cálculos para la inoculación de las cargas parasitaria se realizaron a partir de la cantidad medida en microlitros (μL) de una gota de sangre, tomado de la vena caudal de las hembras ($8\mu\text{L}$) y de los machos ($6\mu\text{L}$) cepa CD 1 así como de las hembras ($6\mu\text{L}$) y machos ($5\mu\text{L}$) cepa Balb/c.

6.3 Determinación de signos en el curso de la infección

Se midieron tres signos principalmente: la decoloración de orejas y cola, la baja de peso y el letargo, estos signos se evaluaron a partir del día 1 postinfección hasta observar cada uno de ellos y determinar a los cuantos días postinfección se presentaba cada uno de ellos. Los signos se midieron en los dos grupos de animales, tanto el grupo de carga parasitaria alta y el de carga parasitaria baja. Estos se evaluaron hasta el día en el cual se presentó el letargo debido a que después de aparecer este signo los ratones permanecían así hasta que morían. El decoloramiento, la baja de peso y el letargo se midieron visualmente (figura 9).

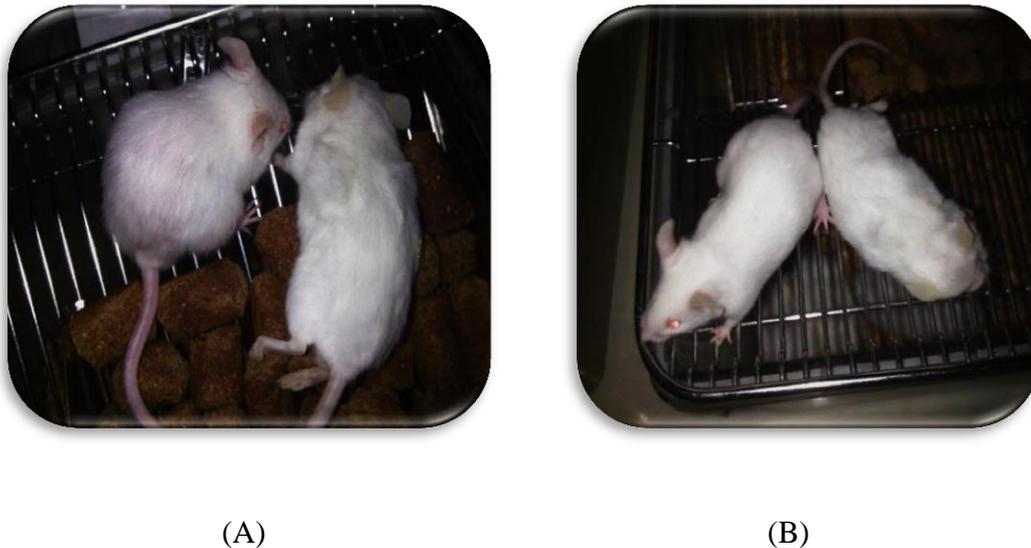


Figura 9. **Evaluación de los 3 signos.** En el panel (A) se muestra el 1° y 2° signo los cuales fueron evaluados visualmente, del lado izquierdo se observa un ratón no infectado con las orejas y cola de color rosado y con un peso de 24 gr mientras que del lado derecho se observa el ratón infectado con *Plasmodium yoelii* donde el color de sus orejas y su cola es pálido y con un peso de 18.5 gr. El panel (B) muestra la presencia del letargo, del lado derecho se observa el ratón no infectado con la movilidad y el ratón del lado izquierdo no presenta ningún movimiento.

6.4 Determinación de la parasitemia

Para la determinación de parasitemia se realizó mediante el sangrado de los ratones de la vena caudal, posteriormente se procedió a realizar un frotis extendido con 5 μ L de sangre, enseguida se tiñó con el colorante de Giemsa y finalmente se realizó el conteo de 100 células (eritrocitos) para ver cuantas de estas estaban infectadas con el parásito. Para determinar la parasitemia en los ratones y el tiempo de sobrevida, los frotis se realizaron cada dos días para observar la parasitemia al transcurso de la infección por *Plasmodium yoelii*.

6.5 Preparación de antígeno

Para preparar una solución antigénica de merozoítos eritrocíticos, se extrajo sangre a partir del seno retroorbital de un ratón infectado con (850,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*). Luego se colocó en un tubo con anticoagulante EDTA y para separar las células blancas se utilizó 1 mL del Ficoll® y metrizoato sódico (Lymphoprep®; AKIS-SHIELD. Oslo, NO), se centrifugó a 3500 rpm durante 30 minutos pasado el tiempo se observaron 3 fases la primera consistía en el lisado de eritrocitos, la segunda el Lymphoprep® y la última fase contenía los eritrocitos, los cuales se recuperaron para posteriormente realizarles tres lavados con PBS a 2500 rpm durante 5 minutos con la finalidad de eliminar el Lymphoprep®. Después se colocó 1 ml de agua destilada, se homogeneizó rápidamente sin formar espuma, con la finalidad de lisar los eritrocitos. Se determinaron proteínas totales por el método colorimétrico de Bradford, utilizando el equipo comercial de Bio Rad (Hércules, Cal., USA). Una vez determinada la cantidad de proteínas de la muestra, se procedió a agregar inhibidores para bloquear la acción de las enzimas, los inhibidores que se agregaron fueron por cada 850mL, 0.05mL de N-Tosil-L-fenilamina clorometil cetona (TPCK, 1mg/mL) y N-a-p-tosilo-L-lisina clorometil-cetona (TLCK, 1mg/mL), 0.04mL de Sal sódica de p-hidroximercuribenzoato (PHMB ,0.04%), 0.006 mL de fenilmetil sulfonil fluoruro (PMSF, 0.06%) y 0.004mL de Acido-etilendiamino-tetra-acético (EDTA,1%).

6.6 Determinación de anticuerpos

Se utilizaron placas para ELISA (Corning-Costar, Estados Unidos) de 96 pozos, los cuales se sensibilizaron 18 horas a 4⁰C con 50 µL por pozo con el antígeno diluido a 10µg/mL en un amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 9.6. Al término se tiró el antígeno y los pozos se lavaron cuatro veces en un lavador de placas de microtitulación con 200 µL de PBS adicionado con tween del 20 al 0.05% (PBST). Los sitios libres de los pozos, se bloquearon con una solución de leche semidescremada diluida al 5% en PBS-T durante 1 hora a 37⁰C. Al término se lavaron. En los pozos se colocaron 50 µL de una dilución de suero 1:10,1:50,1:500 en PBS-T y se incubaron durante 30 minutos a 37⁰C. Se repitieron los lavados 2 veces.

Para revelar la reacción antígeno-anticuerpo se empleó un conjugado de anticuerpos de cabra contra IgG de ratón acoplados a peroxidasa, posterior a su titulación para determinar la dilución óptima de trabajo, se colocaron 50 µL por pozo y se incubaron durante 30 minutos a 37⁰C. Luego de los lavados, la reacción se evidenció con 50 µL/pozo de una solución de cromógeno preparada con 10 mL de una solución amortiguadora de citratos 0.1M pH 5, 5 mg de orto-fenilendiamina (Sigma) que contuvo 10 µL de H₂O₂ (Merck) al 30%. Se incubó durante 10 minutos (cuando los controles negativos comenzaron a virar) a temperatura ambiente en oscuridad, la reacción se detuvo agregando 50 µL/pozo de H₂SO₄ 2N. La absorbancia se leyó a 490 nm utilizando un lector automático para placas de ELISA.

7. RESULTADOS

7.1 Propagación de la cepa

Para el mantenimiento de la cepa de *Plasmodium yoelii* en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) de la Secretaría de Salud, se utilizó un modelo murino cepa CD 1 hembra, a cada ratón se le extrajeron semanalmente 5 μ L de sangre de la vena caudal, la cual se colocó en la esquina del portaobjetos y se procedió a realizar un frotis permitiendo que se secase al aire por unos minutos para fijarlo con metanol y dejándose secar a temperatura ambiente; posteriormente se tiñó durante 15 minutos con colorante de Giemsa diluido 1:2 en una solución amortiguadora de fosfatos 0.01N con NaCl 0.85% (PBS) pH 7.2 (figura 10). Pasado el tiempo, se lavó con PBS hasta quitar el exceso y nuevamente se dejó secar al aire libre para hacer la observación al microscopio óptico con los objetivos de 10x, 40x y 100x (figura 11). Una vez que se observaron los frotis se determinó qué ratón contenía mayor número de parásitos basándose en la cantidad de eritrocitos infectados de un total de 100 células contadas que se observaron por frotis. De ese ratón se extrajo una gota de sangre equivalente a 8 μ L y se diluyó en 5 mL de solución salina (NaCl 0.85%) posteriormente se procedió a inocular a 5 ratones con 0.5 ml de esa solución por vía intraperitoneal.



Figura 10. **Tinción del frotis.** Los portaobjetos se colocaron con el extendido de sangre hacia abajo para que posteriormente se le adicionara el colorante de Giemsa con una pipeta Pasteur hasta cubrirlo todo por capilaridad. Cada portaobjeto se tiñó durante 15 minutos e inmediatamente se enjuagó con PBS.

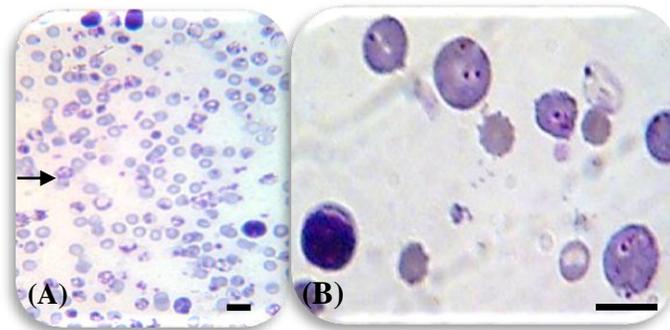


Figura 11. **Eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii***. En el panel (A) se muestra una fotomicrografía tomada a 10x, la flecha señala los eritrocitos infectados. La barra mide 5 μ m. En (B) se muestra un aumento a 100x se observa el parásito dentro de los eritrocitos. La barra mide 9 μ m.

7.2 Infecciones experimentales

Se inóculo a los 30 ratones hembra, 30 ratones macho cepa CD 1 y los 30 ratones macho, 30 ratones hembra cepa Balb/c, la cepa CD 1 se inóculo con un porcentaje de parasitemia del 6.84% mientras que la cepa Balb/c con el 4.5% de parasitemia, las diferentes cargas parasitarias (alta y baja) se realizaron con la finalidad de determinar el tiempo de sobrevivida, aparición de signos y carga parasitaria del sexo contra la infección por *Plasmodium yoelii* dividiendo el número de animales en dos lotes de 15 ratones respectivamente para así tener un lote con carga parasitaria alta y un lote con una carga parasitaria baja para ambas cepas.

La preparación de eritrocitos infectados que se realizó para la infección fue 1, 275, 000 eritrocitos infectados suspendidos en 3000 ml de solución salina, de esta suspensión se inocularon por vía intraperitoneal 200 μ L a cada uno de los ratones cepa Balb/c para la carga parasitaria baja y para la carga alta se suspendieron 12,750,000 eritrocitos infectados en 3000 ml de solución salina y de igual manera se inocularon 200 μ L de la suspensión a cada uno de los ratones de carga parasitaria alta, de igual manera se realizó la misma suspensión con la cepa CD 1 lo que hace la diferencia entre estas es el porcentaje de parasitemia que se indicó anteriormente para la carga parasitaria.

7.3 Determinación de signos en el curso de la infección

Los signos fueron evaluados en 15 ratones macho, 15 ratones hembra de cepa CD 1 y Balb/c a las diferentes cargas parasitarias. Dentro de los cuatro parámetros que se evaluaron, la aparición de los signos en los ratones nos ayudo a evaluar la carga parasitaria, este parámetro se realizó para poder determinar en cual de las cepas y del sexo se presentaban con mayor rapidez los signos, se decidió evaluar 3 parámetros principalmente, los cuales eran presentados por el ratón después de la postinfección. El primer signo que se evaluó fue el decoloramiento de orejas y cola, se hizo una comparación entre los sexos y la cepas para poder determinar en cual de estos se presentaba más rápidamente el signo.

El primer signo fue evaluado con la carga parasitaria baja (85,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*), así como también con una carga parasitaria alta (850,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*). Lo que observamos con una carga parasitaria baja (figura 12) es que el signo de decoloración de orejas y cola se presenta mas rápido en la cepa Balb/c no importando si es macho o hembra, a diferencia de la cepa CD 1 que en esta el signo se presenta en los machos y en las hembras más tarde. Por otro lado la nos muestra la presencia de los signos de la carga parasitaria alta (figura 13), las hembras de ambos sexos son las que presentan los signos después de los machos ya que en los machos de ambas cepas no hay una gran diferencia, las hembras de la cepa CD 1 es la que presenta el signo 1 hasta el día 3 lo que indica que nuevamente las hembras cepas CD1 presentan el signo de decoloración de orejas y cola después de los machos y de la cepa Balb/c. Para verificar la diferencia en la presencia de este signo en ambas cepas, ambos sexos y en carga parasitaria se realizó el análisis de varianza (ANOVA) para determinar la diferencia estadísticamente significativa entre los grupos infectados. La diferencia se observa en los valores que están en color rojo ya que así es más fácil distinguirla. Para el signo de decoloramiento de orejas y cola con carga parasitaria baja nos muestra que existe una diferencia entre los sexos y las cepas (tabla 4), mientras que en la carga parasitaria alta se muestra solo diferencia entre la cepa CD 1 macho y hembra a diferentes cargas parasitarias inoculadas (tabla 5).

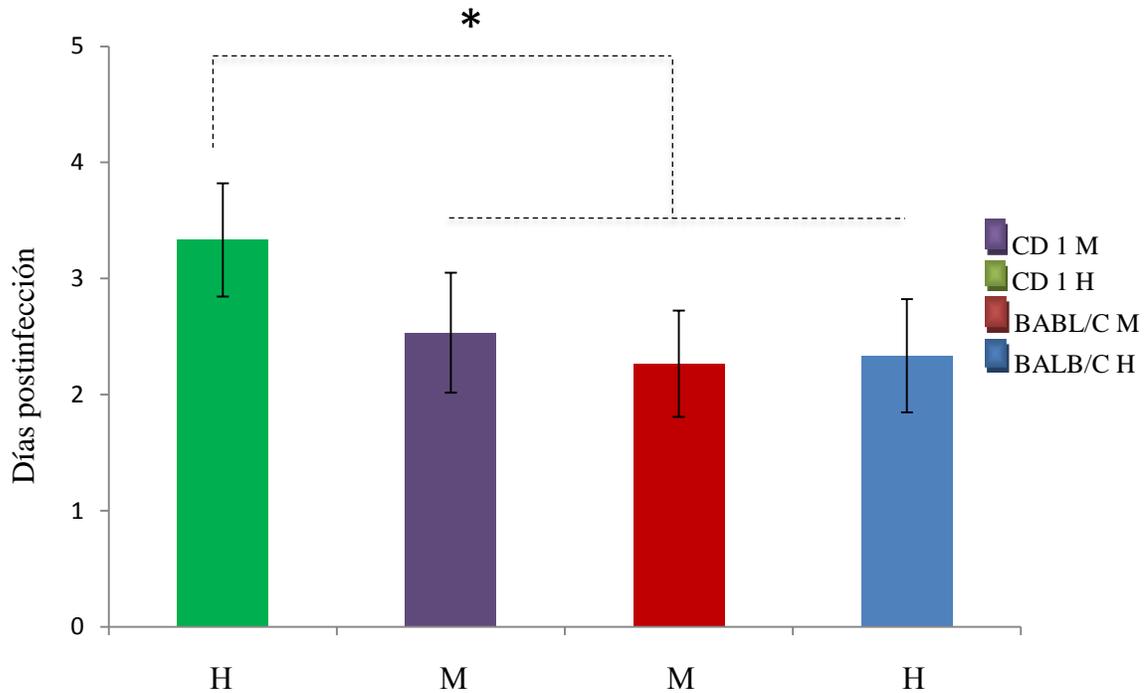


Figura 12. Comparación del decoloramiento de orejas y cola entre ambos sexos de las cepas CD1 y Balb/c con una carga parasitaria baja (85,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*). Se muestra ambos sexos y cepas contra los días postinfección el decoloramiento de orejas y cola con respecto a los días postinfección, este signo se midió físicamente a la hora de tomar las muestras de sangre, se observó si había una decoloración en sus orejas y en cola para tomar este como primer signo postinfección. Se muestra la diferencia estadística por ANOVA y la prueba de contraste de Tukey HD (*; $p < 0.05$).

Tabla 4. Análisis de varianza de la decoloración de orejas y cola con carga parasitaria baja (85,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*).

EFEECTO	GRADOS DE LIBERTAD DEL EFECTO	PROMEDIO DE LOS CUADROS DEL EFECTO	GRADOS DE LIBERTAD DEL ERROR	PROMEDIO DE LOS CUADROS DEL ERROR	F CALCULADA	PROBABILIDAD
1	3	3.616667	56	0.238095	15.19	0
VAR 1	1	2.5333333	2	3.333333	2.266667	2.33333
CD1M 1%	1	0.000345	0.446376	0.677384		
CD1H 1%	2	0.000345	0.000158	0.00016		
BALM 1%	3	0.446376	0.000158	0.982018		
BALH 1%	4	0.677384	0.00016	0.982018		

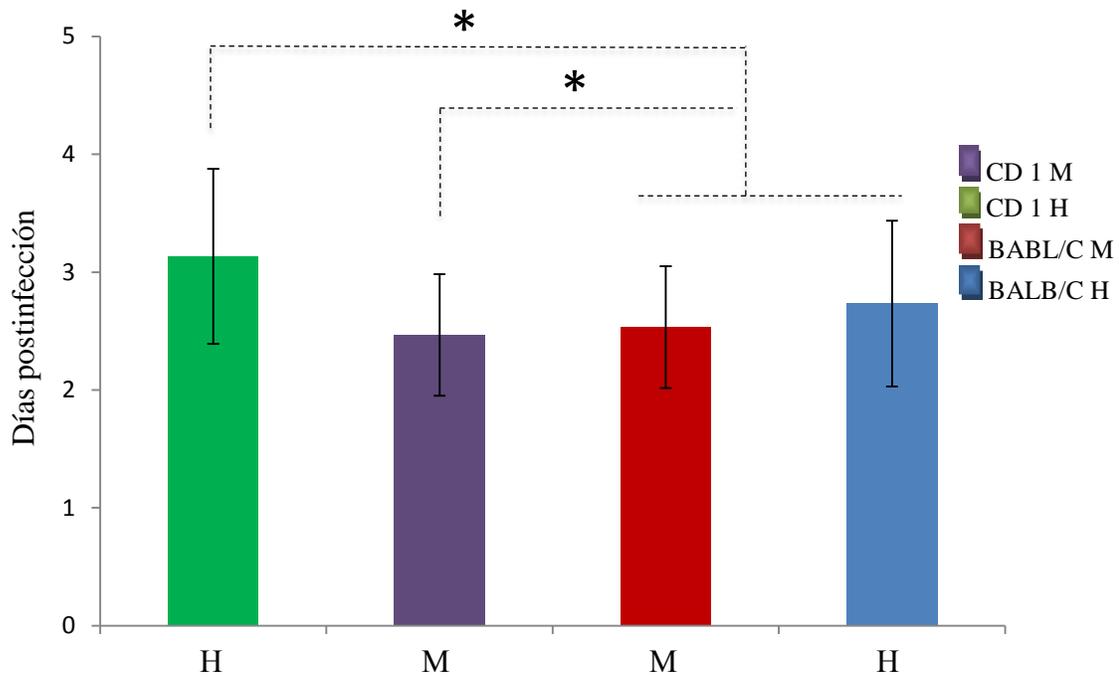


Figura 13. Comparación del decoloramiento de orejas y cola entre ambos sexos de las cepas CD1 y Balb/c con una carga parasitaria alta (850,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*). Se muestra la presencia de ambos sexos y cepas contra los días postinfección a los cuales aparece el primer signo, este se midió físicamente a la hora de tomar las muestras de sangre, observando si había decoloración en orejas y en cola. Se muestra la diferencia estadística por ANOVA y la prueba de contraste de Tukey HD (*; $p < 0.05$).

Tabla 5. Análisis de varianza de la decoloración de orejas y cola con carga parasitaria alta (850,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*).

EFEECTO	GRADOS DE LIBERTAD DEL EFECTO	PROMEDIO DE LOS CUADRADOS DEL EFECTO	GRADOS DE LIBERTAD DEL ERROR	PROMEDIO DE LOS CUADRADOS DEL ERROR	F CALCULADA	PROBABILIDAD
1	3	1.35	56	0.395238	3.415663	0.023413
VAR 1	1	2.466667	3	2.733333		
CD1M 11%	1	0.026363	3	0.65332		
CD1H 11%	2	0.026363	3	0.311985		
BALM 11%	3	0.991454	3	0.519711		
BALH 11%	4	0.65332	3	0.819711		

El segundo signo que se evaluó fue la pérdida de peso de los ratones que se utilizaron, estos pesaban entre 24-28 gr algunos de ellos, llegaron a reducir el peso hasta 18 gr (figura 14), este parámetro se midió de igual forma en cepa CD 1 y Balb/c, utilizando 15 ratones macho y 15 ratones hembra para cada cepa, la carga parasitaria también fue diferente ya que se inocularon con carga parasitaria baja (85,000) y alta (850,000) eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*, en los ratones que fueron inoculados con carga parasitaria baja (85,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*), el signo se presentó al principio en los machos, seguido de las hembras cepa Balb/c, en el caso de la cepa CD1 se presentó en primer lugar en los machos y posteriormente en las hembras, por lo que estos nos indica que el signo 2 se presenta en ambos sexos y cepas a diferentes días postinfección (figura 15). Con respecto a la carga parasitaria alta (850,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*) podemos decir que se presenta más rápido el signo 2 en los machos cepa Balb/c y CD 1, posteriormente en las hembras de la cepa Balb/c, y finalmente las hembras de la cepa CD 1, lo que entonces nos indica que el segundo signo se presenta en diferentes días en las hembras porque en los machos gráficamente no se observa diferencia en la presencia del signo 2 (figura 16). Para verificar la diferencia en la presencia del signo 2 en ambas cepas, en ambos sexos y en las diferentes cargas parasitarias, se realizó el análisis de varianza (ANOVA) determinando la diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de ratones infectados con carga parasitaria baja (85,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*), el signo número 2 se presenta a diferente tiempo en las cepas y en los sexos por lo que es notable la diferencia (tabla 6), con respecto a la carga parasitaria alta (850,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*) solo se observa diferencia entre la cepa CD 1 en ambos sexos y en los machos de la cepa Balb/c como se observa el valor en color rojo ya que en las hembras cepa Balb/c no se observa diferencia significativa (tabla 7).

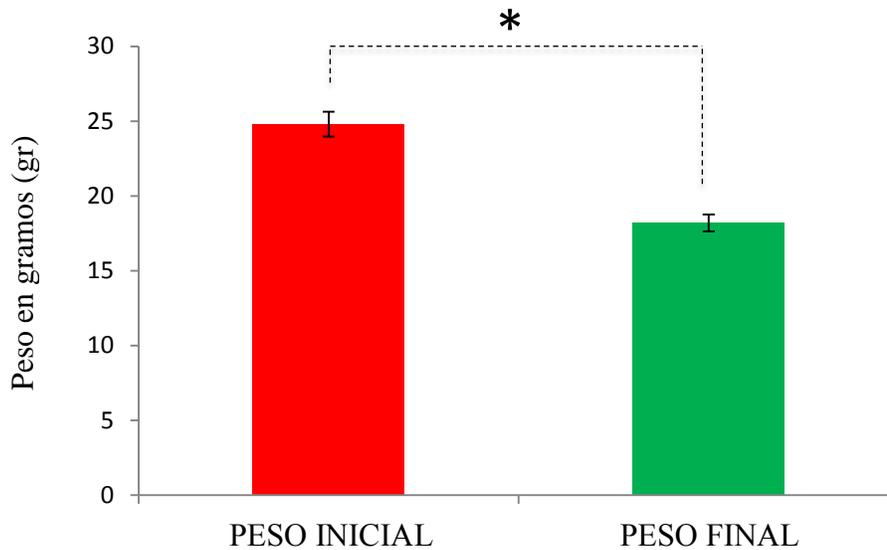


Figura 14. **Perdida de Peso en el ratón infectado por *Plasmodium yoelii***. La pérdida de peso se realizó mediante la observación física de los ratones, solo se pesaron 5 ratones de la cepa CD 1 y cepa Balb/c para corroborar la pérdida de peso por la infección con *Plasmodium yoelii*. La estadística se realizó mediante la prueba estadística t de Student (*; $p < 0.05$)

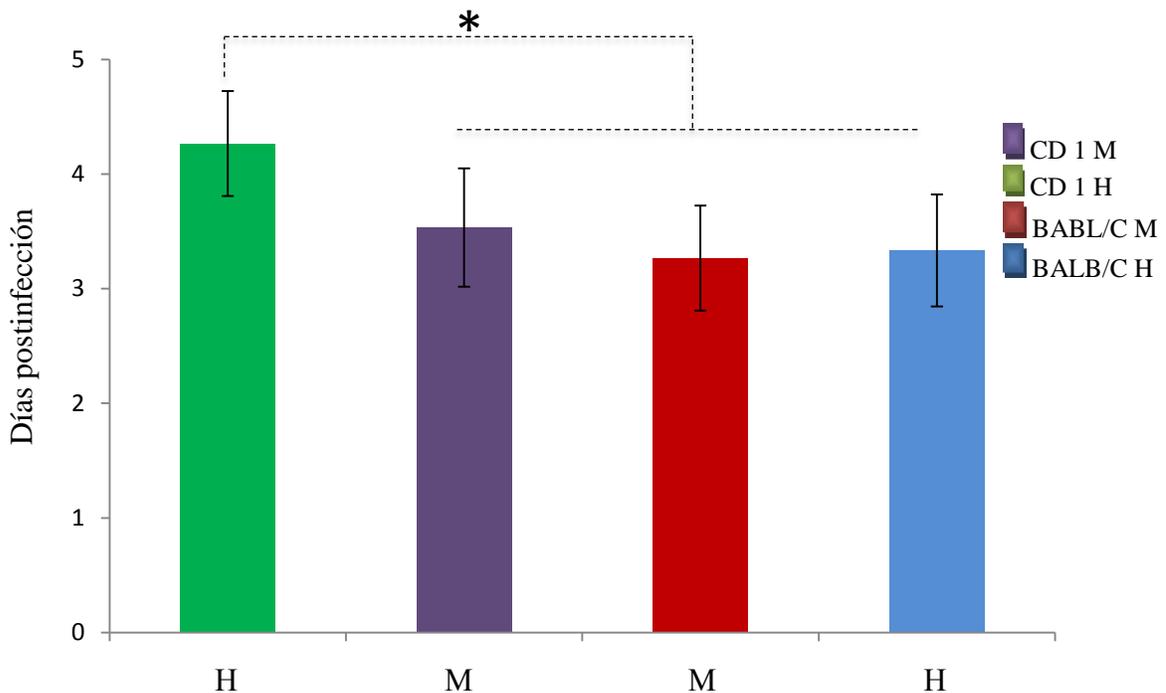


Figura 15. **Comparación de la pérdida de peso entre ambos sexos de las cepas CD1 y Balb/c con una carga parasitaria baja (85,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*)**. Las muestras se tomaron de 15 ratones hembra, 15 ratones macho de cepas CD1 y Balb/c. Este signo se midió observando como perdieron peso los ratones durante el período postinfección, se muestra la diferencia de la presencia del signo 2 entre las cepas y los sexos, la estadística se realizó mediante una tabla de ANOVA y la prueba de contraste Tukey HD (*; $p < 0.05$).

Tabla 6. Análisis de varianza de la pérdida de peso con carga parasitaria baja (85,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*).

EFEECTO	GRADO DE LIBERTAD DEL EFECTO	PROMEDIO DE LOS CUADRADOS DEL EFECTO	GRADOS DE LIBERTAD DEL ERROR	PROMEDIO DE LOS CUADRADOS DEL ERROR	F CALCULADA	PROBABILIDAD
1	3	3.155555	56	0.230952	13.66323	0.000001
VAR 1	1	2	3	4		
CD1M 1% 1		0.000712	0.432879	0.666829		
CD1H 1% 2		0.000712	0.000159	0.000166		
BALM 1% 3		0.432879	0.000159	0.981209		
BALH 1% 4		0.666829	0.0001666	0.981209		

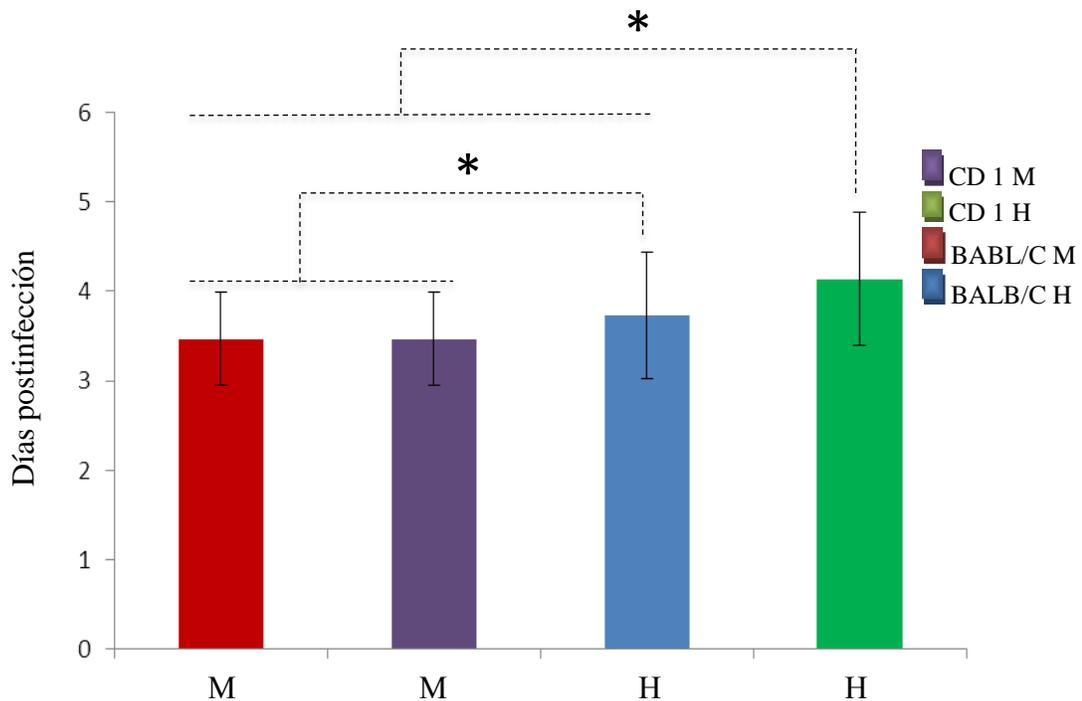


Figura 16. Comparación de la pérdida de peso entre ambos sexos de las cepas CD1 y Balb/c con una carga parasitaria alta (850,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*). La figura nos muestra la diferencia que hay entre la cepa CD 1y la Balb/c, así como ambos sexos a la aparición del signo 2 que es la pérdida de peso en los ratones, este signo se observó físicamente a la hora que se le tomaba la muestra a los ratones, cabe mencionar que se utilizaron 15 ratones para cada cepa y cada sexo. Se muestra la diferencia estadística por ANOVA y la prueba de contraste de Tukey HD (*; $p < 0.05$).

Tabla 7. Análisis de varianza de la pérdida de peso con una carga parasitaria alta (850,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*).

EECTO	GRADOS DE LIBERTAD DEL EFECTO	PROMEDIO DE LOS CUADRADOS DEL EFECTO	GRADOS DE LIBERTAD DEL ERROR	PROMEDIO DE LOS CUADRADO DEL ERROR	F CALCULADA	PROBABILIDAD
1	3	1.488889	56	0.395238	3.767068	0.015568
	1	2	3	4		
VAR 1		3.466667	4.133333	3.466667	3.733333	
CD1M 11% 1		0.026363	1.000000	0.65332		
CD1H 11% 2		0.026363	0.026363	0.311985		
BALM 11% 3		1.000000	0.026363	0.65332		
BALH 11% 4		0.65332	0.311985	0.65332		

El tercer y último signo que se evaluó fue el letargo, este signo al igual que los demás se midió físicamente observando el cambio que le ocurría al ratón a su comportamiento, este signo se manifestó observando a los ratones que permanecieron sin movimientos, tranquilos, indefensos, este signo fue el último que se pudo observar antes de que murieran. Se evaluó de igual manera que los dos anteriores en 15 ratones hembra y 15 ratones macho de las cepas CD 1 y Balb/c. Estos ratones fueron inoculados con una carga parasitaria alta y baja.

Con respecto a la carga parasitaria baja se puede decir que se observó que existe diferencia tanto en los sexos como en la cepa, pero cabe señalar que en las hembras cepa CD 1 tardaron más en presentar este último signo (figura 17), los ratones machos que fueron inoculados con una carga parasitaria alta presentaron diferencia en la presencia del signo en ambas cepas, pero en las hembras si hay una diferencia en la presencia del signo solo que en la cepa CD1 las hembras son las últimas en presentar el signo (figura 18). Al igual que los signos anteriores se realizó el análisis de varianza (ANOVA) para determinar la diferencia estadísticamente significativa entre los grupos infectados. Para observar en base a los resultados obtenidos si existía diferencia mínima en la presencia de los signos en las cepas y en los sexos, los ratones que fueron inoculados con carga parasitaria baja (85,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*), los valores que se obtuvieron se muestra en color rojo indicándonos que el valor es significativo por lo que en las cepas y en los sexos hay diferencia (tabla 8).

En ratones que fueron inoculados con carga parasitaria alta (850,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*), en la cepa CD 1 ambos sexos y las hembras cepa Balb/c si se observa diferencia, solo en los machos cepa Balb/c no hay diferencia con respecto a los demás (tabla 9).

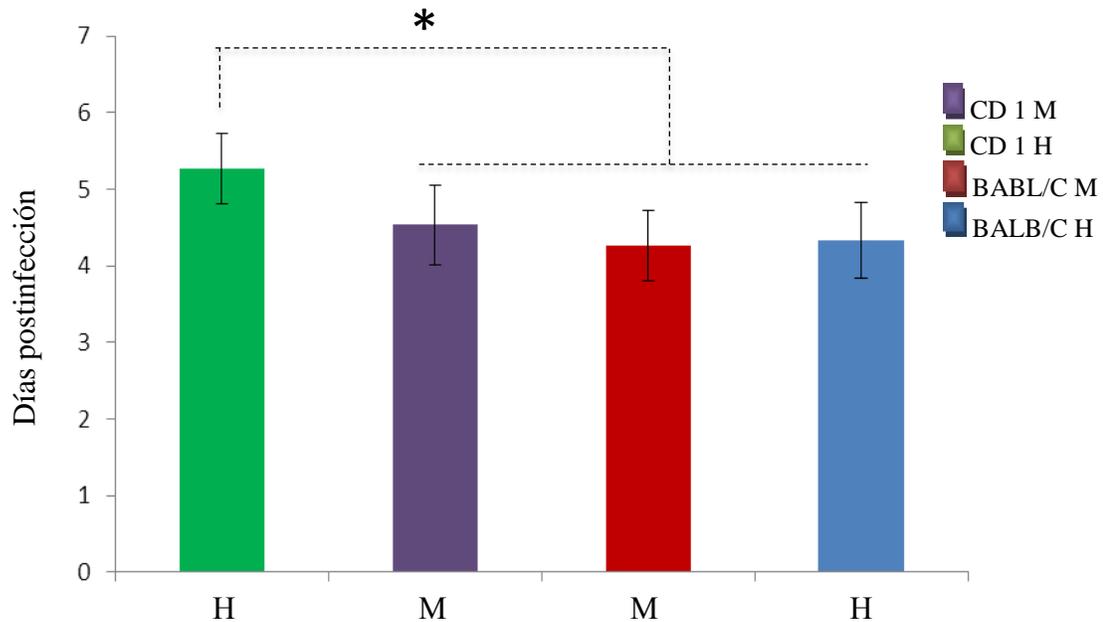


Figura 17. Comparación de la presencia del letargo entre ambos sexos de las cepas CD1 y Balb/c con una carga parasitaria baja (85,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*). Se muestra la diferencia que hay entre la cepa CD 1 y la Balb/ c, así como para ambos sexos a la aparición del signo 3 el cual se evaluó como letargo al transcurso de los días postinfección. El signo se midió en el momento en el cual se tomaban las muestras de sangre, observando el comportamiento de los animales. Se muestra la diferencia estadística por ANOVA y la prueba de contraste de Tukey HD (*: $p < 0.05$).

Tabla 8. Análisis de varianza del letargo con una carga parasitaria baja (85,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*).

EFEECTO	GRADOS DE LIBERTAD DEL EFECTO	PROMEDIO DE LOS CUADRADOS DEL EFECTO	GRADOS DE LIBERTAD DEL ERROR	PROMEDIO DE LOS CUADRADOS DEL ERROR	F CALCULADA	PROBABILIDAD
1	3	3.1555555	56	0.230952	13.66323	0.000001
VAR 1	1	4.533333	2	5.266667	4.266667	4.333333
CD1M 1%	1	0.000712	3	0.432879	0.666829	
CD1H 1%	2	0.000712	3	0.000159	0.000166	
BALM 1%	3	0.432879	3	0.000159	0.981209	
BALH 1%	4	0.666829	3	0.0001666	0.981209	

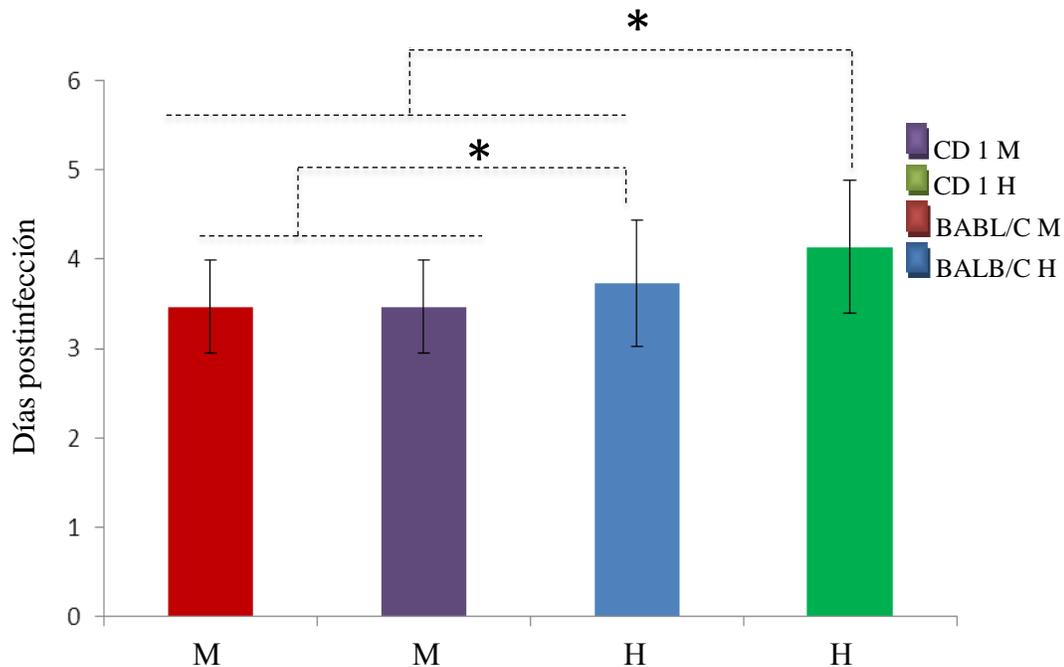


Figura 18. Comparación de la presencia del letargo entre ambos sexos de las cepas CD1 y Balb/c con una carga parasitaria alta (850,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*). Se muestra la diferencia que hay entre la cepa CD 1y Balb/c, así como también ambos sexos a la aparición del signo 3 que es el letargo al transcurso de la postinfección. El signo se midió en el momento en el cual se tomaban las muestras de sangre, observando el comportamiento de los animales. Este signo se midió en los 15 ratones hembra y 15 ratones macho de cada cepa. Se muestra la diferencia estadística por ANOVA y la prueba de contraste de Tukey HD (*; $p < 0.05$).

Tabla 9. Análisis de varianza del letargo con una carga parasitaria alta (850,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*).

EFEECTO	GRADOS DE LIBERTAD DEL EFECTO	PROMEDIO DE LOS CUADRADOS DEL EFECTO	GRADOS DE LIBERTAD DEL ERROR	PROMEDIO DE LOS CUADRADOS DEL ERROR	F CALCULADA	PROBABILIDAD
1	3	1.488889	56	0.395238	3.767068	0.015568
VAR 1	1	2	3	4		
CD1M 11%	1	0.026363	1.000000	0.65332		
CD1H 11%	2	0.026363	0.026363	0.311985		
BALM 11%	3	1.000000	0.026363	0.65332		
BALH 11%	4	0.65332	0.311985	0.65332		

7.4 Determinación de la parasitemia

La determinación de la parasitemia se hizo mediante el conteo de eritrocitos infectados en 1 μ L de sangre, para ello se obtuvo sangre del seno retroorbital (figura 19) y se realizó posteriormente una cuenta en la cámara de Neubauer, esta cuenta se realizó tomando 1 μ L de la sangre suspendiéndola en 499 μ L de colorante de Wright diluido previamente en una proporción 1:2 con PBS, la dilución que se hizo fue 1:500; una vez hecha esta dilución, se procedió a colocar 10 μ L de la suspensión en la cámara y se realizó el conteo de eritrocitos infectados en los 25 cuadros centrales de la cámara (figura 20), el cálculo de eritrocitos infectados se realizó mediante la fórmula:

$$N. \text{ de células contadas} \times \text{el factor de dilución} \times 10 \times 400 / 80$$

Donde N= N. de eritrocitos contados

10= Corrección X altura de la cámara

Se considera que el retículo central tiene 400 cuadros

Conociendo la cantidad de eritrocitos infectados, el volumen de sangre tomada, la dilución 1:500 se determinó la cantidad de eritrocitos infectados que hay en 1 μ L de muestra, así como también se calculó el porcentaje de parasitemia a los 15 días postinfección, obteniendo 500,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*.



Figura 19. **Toma de sangre del seno retroorbital.** La sangre se extrajo por capilaridad con una pipeta Pasteur, la cual se introdujo a un lado del ojo del ratón llegando a tocar en seno retroorbital girándola hasta observar como la sangre comienza a subir por capilaridad una vez que se llena la punta de la pipeta se procedió a pasarla a un tubo tipo Eppendorf® (Hamburg Germany) para obtener el suero.

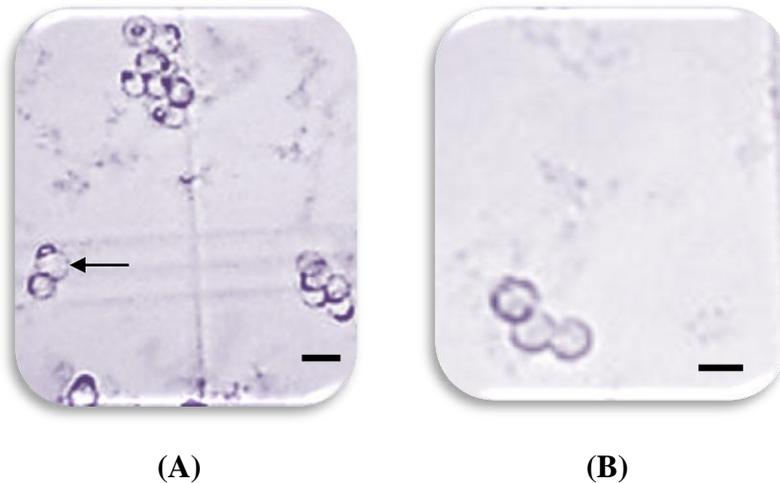


Figura 20. **Conteo de eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii* en la cámara de Neubauer.** En el panel (A) Se observa la presencia del eritrocito infectado, en su interior presenta un punto oscuro como lo indica la flecha, que hace notar la diferencia de un eritrocito no infectado. El aumento es de 40x y la barra es de 9 μ m. En el panel (B) se observa el eritrocito no infectado, el aumento es de 40x y la barra es de 9 μ m.

Para determinar la parasitemia se realizó un muestreo de 5 ratones hembra y 5 ratones macho cepa CD1 así como también 5 ratones macho y 5 hembra cepa Balb/c. Lo primero que se hizo fue medir la cantidad de microlitros que contiene una gota de sangre tomada de la vena caudal del ratón, esto se realizó en los 20 ratones para así observar si hay diferencia en la cantidad de sangre tanto en el sexo como en la cepa (figura 21).

Para determinar si hay diferencia entre los microlitros de sangre entre ambos sexos y cepas, se realizó el análisis de varianza (ANOVA) para determinar la diferencia estadísticamente significativa entre la cantidad de microlitros que contiene una gota de sangre en ambas cepas y sexos, lo que se observó es que las hembras cepa CD1 tienen mayor cantidad de microlitros de sangre que los machos de la misma cepa al igual que las hembras de la cepa Balb/c tienen mayor cantidad de microlitros de sangre que los machos de la misma cepa (tabla 10).

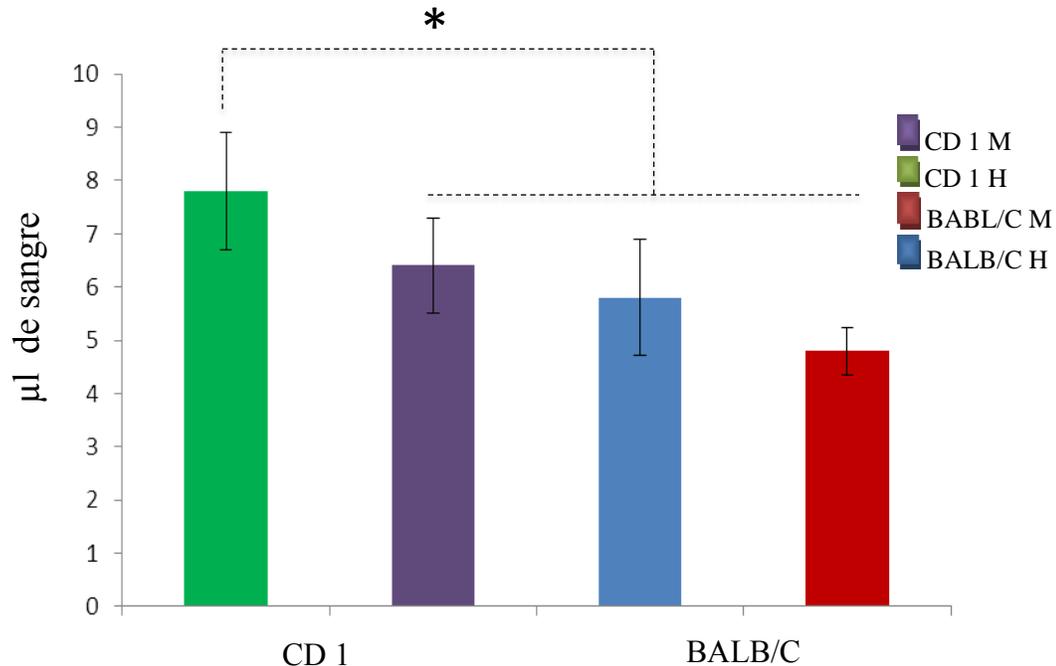


Figura 21. **Medición de una gota de sangre.** Se muestra los microlitros de sangre equivalentes a una gota. Se tomó una muestra de sangre de la vena caudal a un ratón, posteriormente se colocó en un portaobjetos y se procedió a medir la cantidad de sangre que contenía la gota con una micropipeta hasta obtener el valor de los microlitros que conforman la gota. Esto se realizó con 5 ratones hembra y 5 ratones macho cepa CD1 y 5 ratones hembra y 5 ratones macho Balb/c. Se muestra la diferencia estadística por ANOVA y la prueba de contraste de Tukey HD (*; $p < 0.05$).

Tabla 10. Análisis de varianza del volumen de una gota en μL

EFEECTO	GRADOS DE LIBERTAD DEL EFECTO	PROMEDIO DE LOS CUADRADOS DEL EFECTO	GRADOS DE LIBERTAD DEL ERROR	PROMEDIO DE LOS CUADRADOS DEL ERROR	F CALCULADA	PROBABILIDAD
1	3	7.866667	16	0.85	9.254902	0.000875
VAR 1	1	2	3	4		
CD 1 H	1	0.117125	0.016375	0.000663		
CD 1 M	2	0.117125	0.735425	0.062562		
BAL H	3	0.016375	0.735425	0.348531		
BAL M	4	0.000663	0.062562	0.348531		

Una vez que se conoció la cantidad en microlitros equivalentes a una gota de sangre se procedió a realizar el cálculo del porcentaje de parasitemia, para posteriormente inocular con una carga parasitaria baja y alta 15 ratones macho, 15 ratones hembra cepa CD1 y 15 ratones macho, 15 ratones hembra cepa Balb/c, con la finalidad de determinar si la carga parasitaria influye en la propagación de la cepa en el ratón (tabla 11). Todos los ratones se inocularon con 0.2 mL de la suspensión por vía intraperitoneal.

Tabla 11. Comparativo de la parasitemia por *Plasmodium yoelii* entre ambas cepas.

SEXO	% DE PARASITEMIA	CEPA	N. ERITROCITOS INF INOCULADOS
HEMBRA	11%	CD1	850,000
HEMBRA	1%	CD1	85,000
MACHO	11%	CD1	850,000
MACHO	1%	CD1	85,000
HEMBRA	11%	BALB/C	850,000
HEMBRA	1%	BALB/C	85,000
MACHO	11%	BALB/C	850,000
MACHO	1%	BALB/C	85,000

El bazo juega un papel crucial en el desarrollo de la inmunidad a la malaria, pero el papel de los receptores de reconocimiento de patrones (RRP) en las células efectoras del bazo durante la infección de la malaria es difícil de entender (Rosanas *et al.*, 2012). Los estudios clínicos y modelos experimentales de roedores han demostrado la importancia del bazo en el desarrollo de la inmunidad a la malaria. De hecho, el bazo elimina los glóbulos rojos infectados (iRBC) de la circulación, funciona como un sitio importante eritropoyético y hematopoyético durante la embriogénesis y genera la respuesta inmune a patógenos. De esta manera, las células efectoras del bazo, que tienen la capacidad de activarse rápidamente con la finalidad de producir grandes cantidades de citocinas pro-inflamatorias. Además, las células del bazo fagocitan los eritrocitos infectados y contribuyen positivamente a la respuesta inmune adaptativa (Rosanas *et al.*, 2012).

Uno de los signos que se presenta tanto en seres humanos como en el modelo murino es la presencia de esplenomegalia, en los ratones infectados por *Plasmodium yoelii* no se evaluó este signo, pero se realizó la necropsia de un ratón infectado con el 90% de parasitemia y uno no infectado para comparar el bazo y observar la presencia de esplenomegalia en el ratón infectado (figura 22).

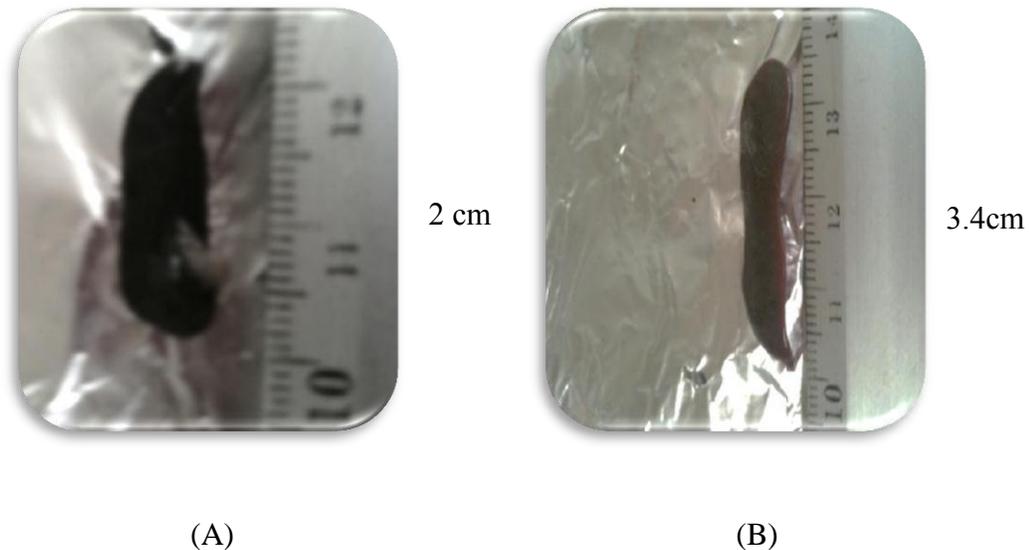


Figura 22. **Bazo de un ratón no infectado y de un ratón infectado con *Plasmodium yoelii*.** En el panel (A) se muestra el bazo de un ratón no infectado el cual mide 2 cm de largo , en el panel (B) se muestra la esplenomegalia de un ratón infectado con *Plasmodium yoelii* con un porcentaje de parasitemia del 90%, este mide 3.4 cm de largo.

7.4.1. Carga parasitaria en ratones exogámicos (cepa CD1)

Para determinar la carga parasitaria de los ratones exogámicos (cepa CD1), se evaluaron 15 ratones macho y 15 ratones hembra, estos fueron inoculados con un porcentaje de parasitemia bajo (1%) inoculado con (85,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*) y con un porcentaje de parasitemia alto (11%) inoculando con (850, 000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*), como se observa en la (figura 23), la acotación que se muestra en la figura es referida a que estadísticamente se observa la diferencia significativa entre ambas cargas parasitarias a los días postinfección utilizando el análisis estadístico ANOVA Factorial, de Bonferroni post-test. Las hembras CD 1 con una carga parasitaria baja (1%) inoculado con (85,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*) tardaron más tiempo en morir que las

que fueron inoculadas con una carga parasitaria alta (11%) inoculado con (850,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*), ya que el tiempo de sobrevivencia en promedio es de 15 días, solo en 2 de las 15 hembras presentan un tiempo de sobrevida más largo de 30 días (figura 24), con referente al tiempo de vida de los machos es más corto que en las hebras ellos solo llegaron a sobrevivir en promedio 12 días, como se observa en la (figura 25), la acotación que se muestra en la figura es referida a que estadísticamente se observa la diferencia significativa entre ambas cargas parasitarias a los días postinfección utilizando el método ANOVA Factorial , Bonferroni post-test los machos con carga parasitaria alta murieron en promedio igual que los que fueron inoculados con carga parasitaria baja por lo que la diferencia que se puede notar en esta figura es que los que fueron inoculados con una carga parasitaria alta murieron con un porcentaje menor de parasitemia a diferencia de los de carga parasitaria baja que murieron con un porcentaje de parasitemia mayor.

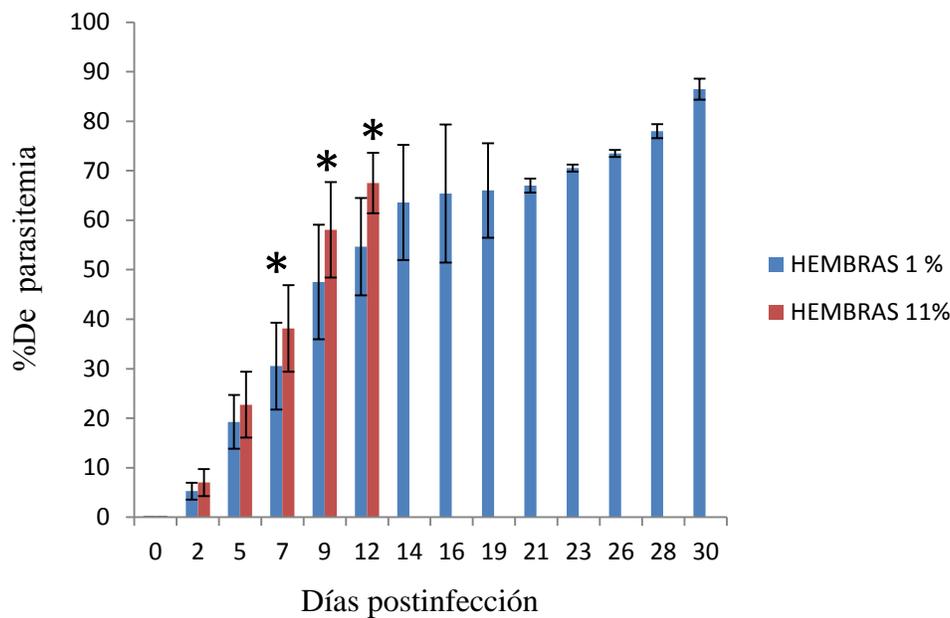


Figura 23. **Parasitemia de las hembras cepa CD 1 infectadas con una carga parasitaria baja y alta con *Plasmodium yoelii*.** Se observa el tiempo de sobrevivencia de las hembras infectadas con una carga parasitaria baja (85,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*) y una carga parasitaria alta (850,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*), para esto se fueron tomando muestras de sangre, a partir del día 0 hasta el día 30, posteriormente se realizó el conteo de 100 células para observar cuantas de estas estaban infectadas con *Plasmodium yoelii*. La acotación muestra la diferencia entre los días postinfección y la diferencia de carga parasitaria por un ANOVA factorial, Bonferroni post-test (*, $p < 0.05$).

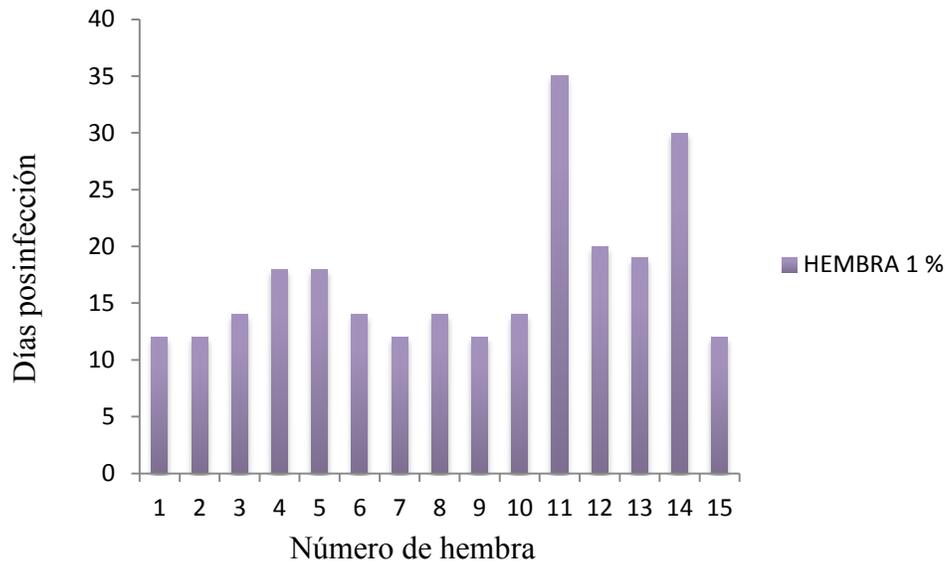


Figura 24. **Tiempo de sobrevivencia con carga parasitaria baja (85,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*) en hembras cepa CD1.** Las muestras se fueron tomando desde el día 0 hasta el día 35, cabe mencionar que solo con la carga parasitaria baja el tiempo de vida del parásito en el ratón fue mayor que las hembras inoculadas con una carga parasitaria alta (850,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*).

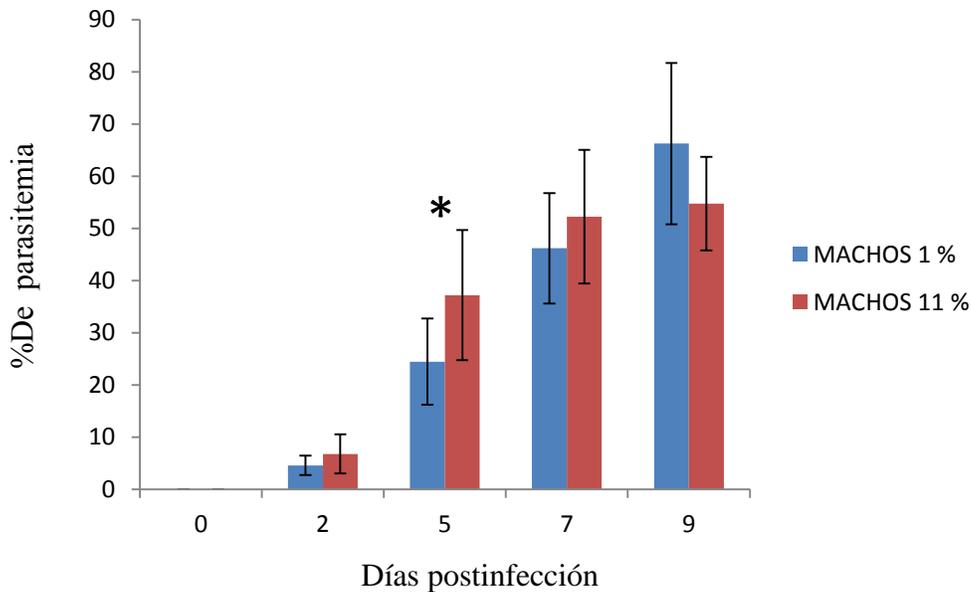


Figura 25. **Parasitemia de los machos cepa CD 1 infectados con carga parasitaria baja (85,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*) y alta (850,000 de eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*).** Las muestras se obtuvieron de la vena caudal y se realizó un extendido para realizar el conteo de 100 células y observar cuantas de estas estaban infectadas. La acotación que se muestra es referida a que estadísticamente se observa la diferencia significativa entre ambas cargas parasitarias ANOVA factorial, Bonferroni post-test (*, $p < 0.05$).

7.4.2 Carga parasitaria en ratones endogámicos (cepa Balb/c)

La carga parasitaria de la cepa endogámica (cepa Balb/c) se determinó mediante la inoculación de 15 ratones macho y 15 ratones hembra cepa Balb/c con una carga parasitaria baja (1%) y alta (11%), como se observa en la (figura 26), la acotación que se muestra en la gráfica es referida a que estadísticamente se observa la diferencia significativa entre ambas cargas parasitarias a los días postinfección. Las hembras con una carga parasitaria baja tardan en morir 14 días con un porcentaje de parasitemia del 80 % mientras que las hembras que fueron inoculadas con una carga parasitaria alta mueren en promedio a los 9 días con una carga parasitaria del 70 %, en el caso de los machos (figura 27), estos fueron inoculados con una carga parasitaria baja en donde murieron a los 9 días con un porcentaje de parasitemia del 60%, y los machos que fueron inoculados con una carga parasitaria alta los machos murieron a los 7 días postinfección con una carga parasitaria del 55%, estadísticamente no se observa diferencia significativa por el método de ANOVA Factorial, Bonferroni post-test.

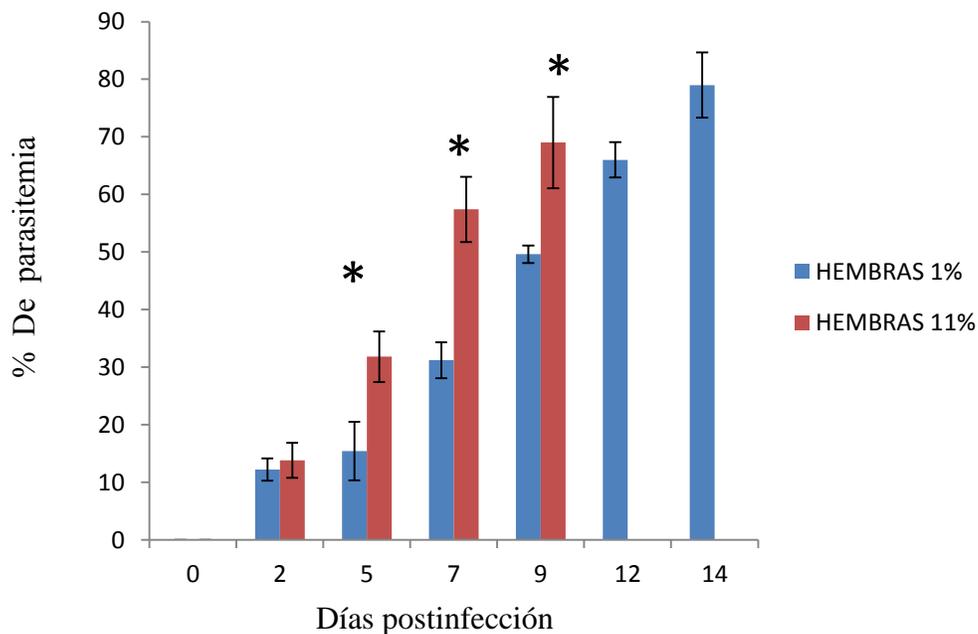


Figura 26. **Parasitemia de las hembras cepa Balb /c con una carga parasitaria baja (85,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*) y alta (850,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*).** Las muestras se tomaron desde el día 0 hasta el día 14, posteriormente se realizó el frotis extendido para contar los eritrocitos infectados de un conteo de 100 células. La diferencia estadísticamente significativa se obtuvo mediante un ANOVA factorial, Bonferroni post-test (*, $p < 0.05$).

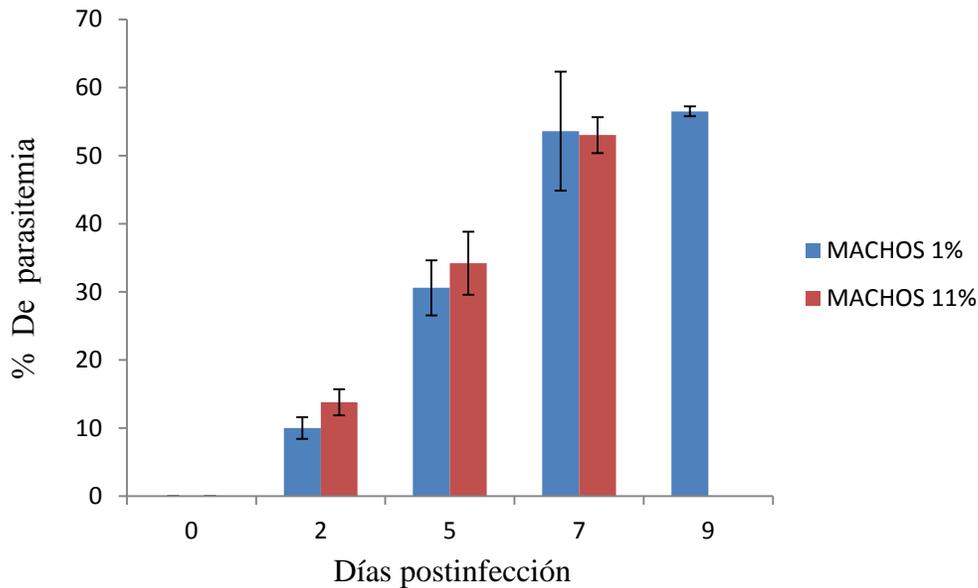


Figura 27. Parasitemia de los machos cepa Balb/c con una carga parasitaria baja (85,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*) y alta (850,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*). En la figura se presenta el numero de días postinfección contra el porcentaje de parasitemia de los machos con diferente carga parasitaria, las muestras se tomaron de la vena caudal desde el día 0 hasta el día 9, posteriormente se realizó el frotis extendido para contar 100 células y observar cuantas de estas están infectadas con *Plasmodium yoelii*. Estadísticamente no se encuentra diferencia entre carga parasitaria $p > 0.05$ y días postinfección $p < 0.05$, la prueba se realizó mediante un ANOVA factorial, Bonferroni post-test (*, $p < 0.05$).

Como se describió previamente 2 de los 4 parámetros que se evaluaron fue, la carga parasitaria del sexo hacia la infección y el porcentaje de parasitemia, se realizó una comparación entre las cepas y el sexo de ambas (figura 28), las hembras cepa CD 1 presentaron una diferencia significativa con respecto a los machos debido a que estas murieron en promedio a los 15 días en comparación con los machos que murieron a los 12 días, solo dos de las 15 hembras presentaron un tiempo de vida mayor a 30 días, por lo que realizando el promedio en tiempo de sobrevivencia de las 15 hembras es de 17 días, se realizó estadística para compara si hay una diferencia con respecto a las hembras que se tuvieron un tiempo de sobrevivencia de 30 días postinfección, indicándonos que no hay diferencia entre estas hembras, la carga parasitaria si afecta debido a que en la cepa CD 1 los de baja carga tardaron más en morir que los de la alta con respecto de la cepa Balb/c que en ambas cargas parasitarias y en sexos no existe una diferencia, comparada con la cepa CD 1 ya que en la cepa Balb/c murieron a los 10 días los de alta y baja carga parasitaria.

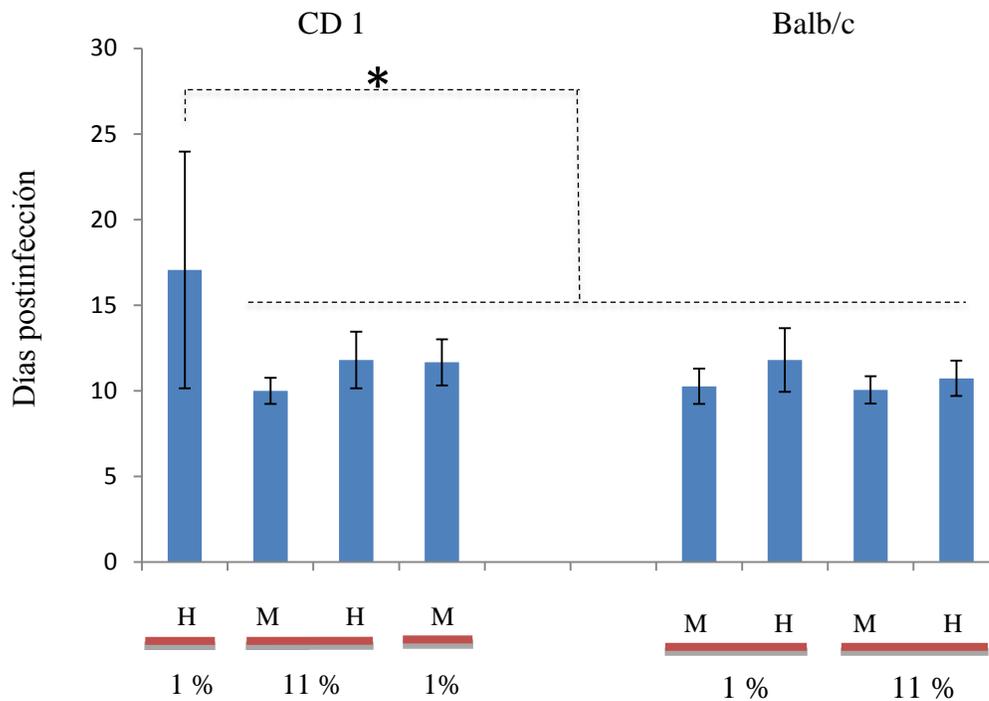


Figura 28. **Comparación de la carga parasitaria entre la cepa CD1 y Balb/c contra los días postinfección con *Plasmodium yoelii*.** Se muestra la comparación que se hizo con ambas cepas, 15 ratones hembra y 15 ratones macho de la cepa CD 1 se inocularon con una carga parasitaria baja, lo mismo se realizó con una carga parasitaria alta, posteriormente se fueron tomando las muestras partiendo del día 0 hasta el día 30 para cada uno de los ratones de las diferentes cepas. La prueba de estadística que se realizó para saber si había diferencia entre las 2 hembras que duraron 30 días con respecto a las que en promedio duraron 15 días postinfección, se pudo determinar que no existe diferencia entre estas hembras, el método estadístico que se utilizó fue ANOVA y la prueba de contraste de Tukey HD (*; $p < 0.05$) lo comprueba.

7.5 Preparación de antígeno

La preparación del antígeno se realizó mediante la obtención de sangre del ratón infectado y del seno retroorbital posteriormente se colocó en un tubo con un anticoagulante EDTA, para separar las células blancas se colocó 1 ml del ficoll y metrizoato sódico (Lymphoprep), se centrifugó a 3500 rpm durante 30 minutos para obtener 3 fases (figura 29). La primera fase consistía en el lisado de eritrocitos, la segunda el Lymphoprep y la última los eritrocitos, los cuales se recuperaron y se realizaron tres lavados con PBS a 2500 rpm durante 5 minutos con la finalidad de eliminar el Lymphoprep®. Después de los lavados y separación de los eritrocitos, se colocó 1 ml de agua destilada, se homogenizó rápidamente sin formar espuma, ya que esta puede interferir en la determinación de proteínas.

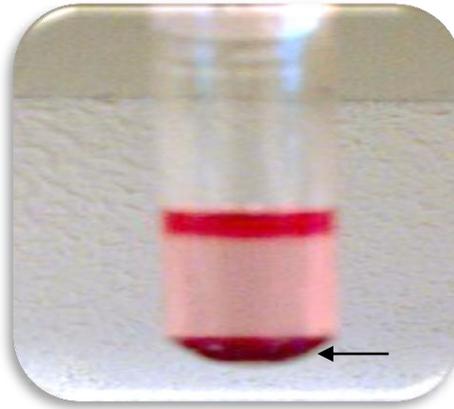


Figura 29. **Obtención de eritrocitos de ratón infectado con *Plasmodium yoelii*.** Se obtuvieron 0.5 ml de sangre de ratón infectado con *Plasmodium yoelii* y cada una se sometió al gradiente de ficoll y metrizoato sódico (Lymphoprep). Una vez que la muestra se centrifugó, se observaron tres fases en el tubo de ensaye, en la primera fase se observan eritrocitos lisados, en la segunda fase se observa el reactivo y en la última fase las células rojas.

7.6 Determinación de proteínas

Una vez lisados los eritrocitos se procedió a realizar una curva de calibración para determinar la cantidad de proteínas en cada una de las muestras, anteriormente se había realizado una determinación de proteínas de sangre completa, pero la cantidad de proteínas calculada era muy alta ya que esta pertenecía a todas las células encontradas en la sangre (tabla 12) por lo que se decidió lisar las células blancas para poder disminuir la cantidad de proteínas presentes en la muestra ya que el principal interés era solo tener las células rojas (tabla 13). La curva se realizó desde una concentración de 0 hasta 150 $\mu\text{g/ml}$ de albúmina. El reactivo comercial utilizado fue Bradford, que utiliza azul de Coomasie y es comercializado por Bio Rad® en una proporción 1:5 con agua destilada, para poder decir que nuestra curva era confiable y que la cantidad de proteína obtenida de igual forma era confiable se utilizó como referencia la albúmina con una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ (figura 30). Una vez determinada la cantidad de proteínas de las muestras, posteriormente se procedió a agregar los inhibidores (TPCK, TLCK, PHMB, PMSF y EDTA) para conservar el antígeno y posteriormente para su utilización.

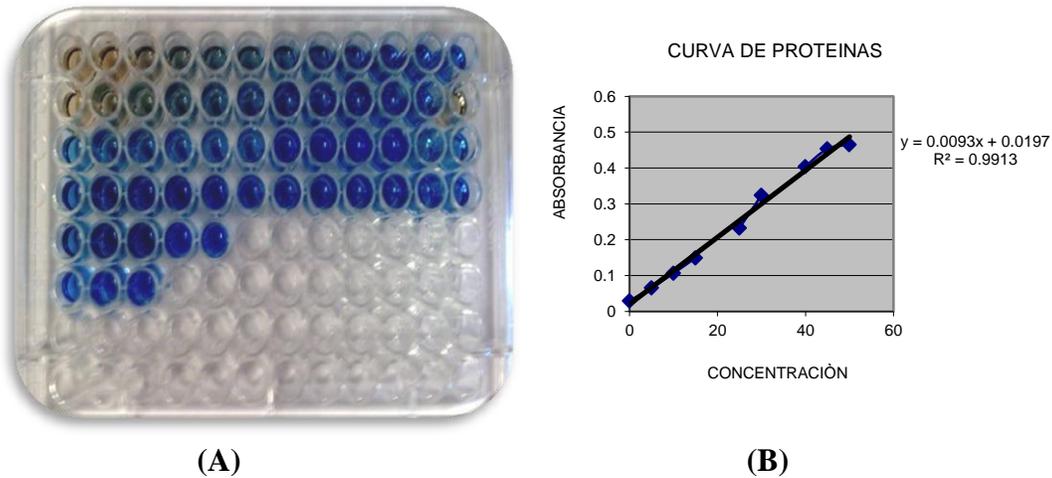


Figura 30. **Determinación de proteínas por el método colorimétrico de Bradford.** En el panel (A) se observa una placa de microtitulación se coloraron diferentes concentraciones de albúmina para construir la curva de calibración, desde 0 hasta 150 $\mu\text{g/ml}$ (pozos A y B 1 a 12). Las muestras se agregaron en los pozos restantes. En el panel B se observa la gráfica que se obtuvo de la lectura de las absorbancias para la realización de la curva.

Tabla 12. Proteínas calculadas en sangre completa.

RATÓN	PROTEÍNAS $\mu\text{g/ml}$
INFECTADO	5847
NO INFECTADO	7860
ALBÚMINA	1233

Tabla 13. Proteínas calculadas con el antígeno de *Plasmodium yoelii* preparado.

RATÓN	PROTEÍNAS $\mu\text{g/ml}$
INFECTADO 1	1533
INFECTADO 2	3198
NO INFECTADO	2519
ALBÚMINA	1056

7.7 Determinación de anticuerpos

La determinación de la presencia de anticuerpos se hizo mediante la técnica de ELISA, utilizando sueros positivos y negativos de 15 ratones macho y 15 ratones hembra de la cepa CD 1 y Balb/c, lo primero que se hizo fue la inoculación de los ratones con *Plasmodium yoelii*, posteriormente se procedió a sangrar a los ratones del seno retroorbital para así obtener los suero positivos de los ratones infectados y los sueros negativos de los ratones no infectados, esto se realizó en los ratones que fueron inoculados con una carga parasitaria alta, enseguida se procedió a titular el suero con el conjugado (figura 31), para así poder determinar por medio de la reacción colorida la determinación de anticuerpos por la técnica de ELISA.

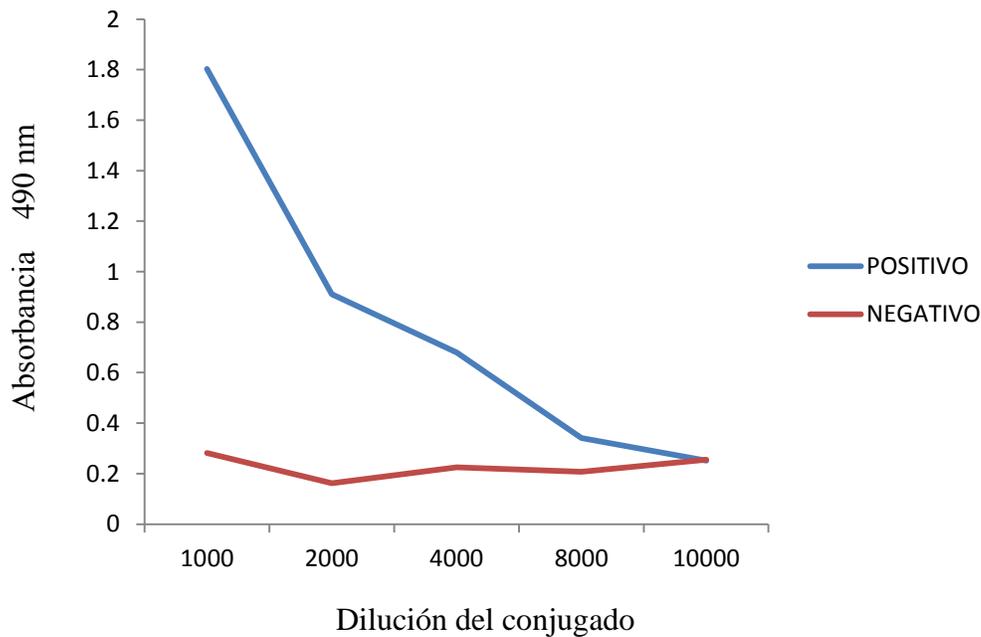


Figura 31. **Titulación del suero y conjugado con peroxidasa.** El título del conjugado se determinó realizando diferentes diluciones dobles hasta llegar a 1:10,000 y el suero se utilizó 1:50 debido a que al reaccionar con el antígeno nos daba una buena diferencia entre el positivo y el negativo.

Entre el suero y el conjugado hubo una buena reacción a una dilución 1:3000 por lo que para la determinación de anticuerpos en ambas cepas y sexos se utilizó el suero a una dilución 1:50 y posteriormente el conjugado a una dilución 1:3000. Una vez que logramos determinar la dilución del suero, del conjugado anti-ratón se procedió a realizar la determinación de anticuerpos contra *Plasmodium yoelii*. Para obtener el suero de los ratones, se realizó mediante el sangrado del seno retrorbital de los 15 ratones macho y 15 ratones hembra de la cepa CD 1 y Blab/c, tanto de ratones infectados como no infectados, posteriormente se procedió a determinar los anticuerpos de ambas cepas y ambos sexo por la técnica de ELISA (figura 32).

A simple vista se observa diferencia en las absorbancias lo cual distingue el grupo entre infectados y no infectados para la determinación de anticuerpos, así este valor nos indica que ambas cepas positivas presentan anticuerpos contra *Plasmodium*, aunque las absorbancias son muy parecidas entre ambas cepas y grupos para poder demostrar si hay diferencia significativa se realizó el análisis de varianza (ANOVA) para determinar la diferencia estadísticamente significativa entre los grupos (tabla 14). Se muestra que en los machos y hembras de la cepa CD1 si presentan una diferencia entre ellos para la presencia de anticuerpos, al igual que también se muestra la diferencia entre infectados y no infectados con respecto a la presencia de anticuerpos.

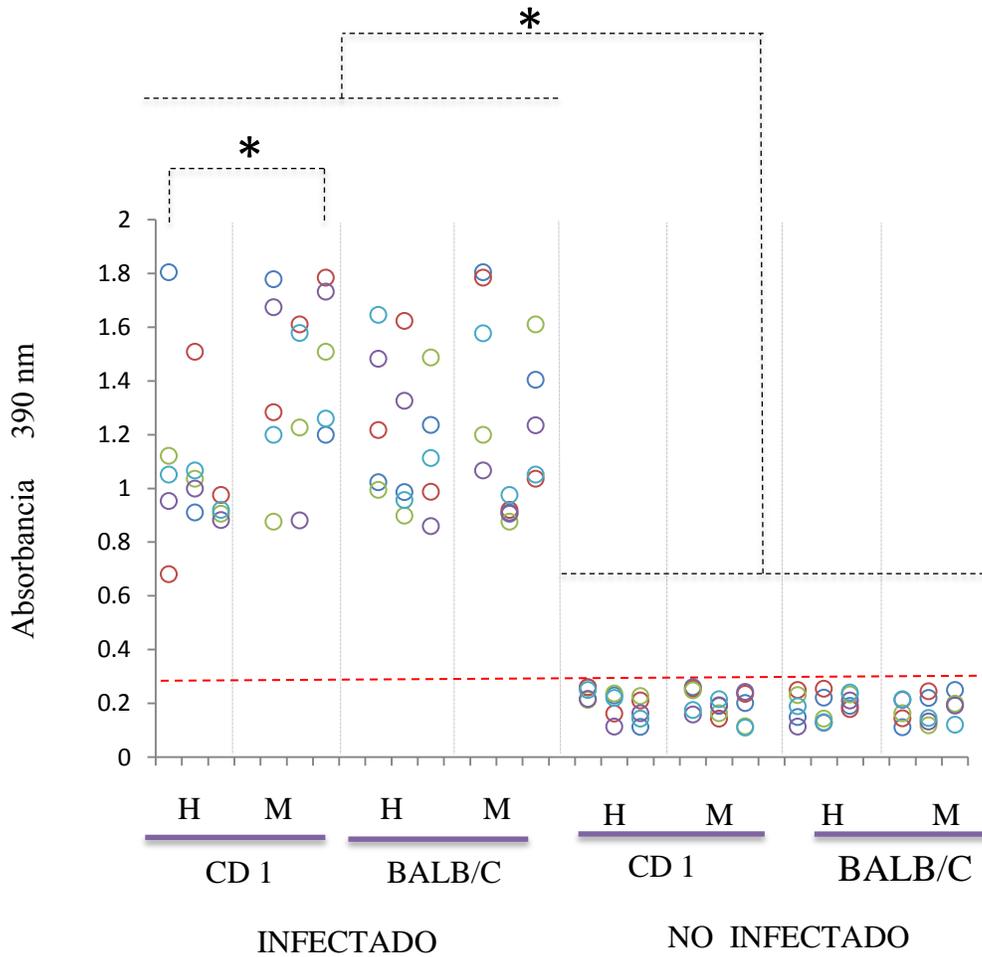


Figura 32. **Presencia de anticuerpos contra *Plasmodium yoelii* en hembras y machos de la cepa CD 1 y BALB/C.** Se muestra la presencia de anticuerpos contra *Plasmodium yoelii*, se sangraron a todos los animales para la obtención del suero y su posterior utilización para la determinación de anticuerpos por la técnica de ELISA. Se muestra la diferencia estadística por ANOVA y la prueba de contraste de Tukey HD (*; $p < 0.05$), el punto de corte se observa con la línea punteada roja.

Tabla 14. Análisis de varianza de la determinación de anticuerpos contra *Plasmodium yoelii* en ambas cepas y sexos.

EFECTO	GRADOS DE LIBERTAD DEL EFECTO	PROMEDIO DE LOS CUADRADOS DEL EFECTO	GRADOS DE LIBERTAD DEL ERROR	PROMEDIO DE LOS CUADRADOS DEL ERROR	F CALCULADA	PROBABILIDAD		
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	7	4.628464	112	0.66916	69.16785	0.00000		
VAR 1	1.149067	1.446733	0.2308667	0.2354	1.1886	1.223067	0.214133	0.222133
HCD1+ 1		0.04214	0.000117	0.000117	0.9999	0.993714	0.000117	0.000117
MCD1+ 2	0.4214		0.000117	0.000117	0.123757	0.267539	0.000117	0.000117
HCD1- 3	0.000117	0.000117		1.000000	0.000117	0.000117	1.000000	1.000000
MCD1- 4	0.000117	0.000117	1.000000		0.000117	0.000117	0.999999	1.000000
HBAL + 5	0.9999	0.123757	0.000117	0.000117		0.999961	0.000117	0.000117
MBAL+ 6	0.993714	0.267539	0.000117	0.000117	0.999961		0.000117	0.000117
HBAL - 7	0.000117	0.000117	1.000000	0.999999	0.000117	0.000117		1.000000
MBAL- 8	0.000117	0.000117	1.000000	1.000000	0.000117	0.000117	1.000000	

8. DISCUSIÓN

Porcentaje de parasitemia

Los estudios que se han realizado para la investigación del paludismo han reportado en su metodología una inoculación de eritrocitos infectados con *Plasmodium* como los siguientes artículos, en el caso de la vía intravenosa se inocularon 10^3 eritrocitos parasitados (Murphy, 1980), en inoculaciones por vía intraperitoneal se ha reportado 1×10^6 en donde para la preparación de su antígeno lo realizaban entre un porcentaje de parasitemia 35-45% (Bagai *et al*, 2010), otro artículo describe como mantiene a la cepa de *Plasmodium yoelii* en pases de ratón a ratón haciendo una suspensión de 10 μ L de sangre infectada en 5 ml de solución salina y de esta suspensión se tomaron 0.5 ml para la inoculación vía intraperitoneal en los ratones (Malagón *et al*, 2011). Finalmente el último artículo describe que para su estudio se realizó utilizando una inoculación por vía intraperitoneal de eritrocitos infectados con *Plasmodium* de 1×10^6 (Jambou *et al.*, 2011), por lo que podemos decir que la mayoría de los artículos reporta que la infección con eritrocitos infectados con *Plasmodium* es de 1,000,000, por lo que en nuestro caso a diferencia de estos utilizamos una carga parasitaria baja (85,000) y alta (850,000) con la finalidad de determinar la carga parasitaria por sexo ya que este es un importante parámetro para conocer que cepa y que sexo es mejor para mantener al parásito vivo y que existe un lapso prolongado de supervivencia en el ratón, evaluando ambos sexos de la cepa CD 1 y Balb/c, se detectó que la carga parasitaria si influye en el desarrollo de la infección en el ratón ya que a dosis baja (85,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*) el ratón dura más tiempo que a dosis altas (850,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*), solo que la cepa y el sexo que tiene un tiempo de sobrevivencia mas prolongado es el que presenta una carga parasitaria baja (85,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*) de la cepa letal son las hembras de la cepa CD 1. Estudios posteriores se pueden realizar para la investigación relacionada con la carga parasitaria de *Plasmodium* en otro tipo de cepas como son las consanguíneas y no consanguíneas, utilizando otras vías de inoculación y finalmente la carga y porcentaje de parasitemia en los ratones.

Unos de los síntomas que se presenta de igual manera tanto en humanos como en ratones es la esplenomegalia, este signo es importante ya que nos indica que tan dañado esta el bazo por la infección, estudios posteriores han reportado que la esplenomegalia malarica

híper reactiva (EMH), antiguamente conocida como síndrome de esplenomegalia tropical, es una enfermedad frecuente en zonas endémicas de malaria y se produce dentro de una respuesta inmunológica anómala frente a una infección por *Plasmodium (falciparum, vivax u ovale)*, debido a una exagerada producción de IgM policlonal no específica por parte de los linfocitos B , lo que provoca una exagerada formación de inmuno complejos. Como resultado de esta activación inmunológica se produce anemia, depósito de inmunocomplejos en las células de Kupffer del hígado y del bazo, hiperplasia de las células retículo endoteliales y hepatoesplenomegalia (Tobeña RM, 2011) por tal motivo es de gran importancia realizar estudios en modelos murinos para la evaluación de la esplenomegalia. De tal manera se puede decir que los ratones con una carga parasitaria alta (850,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*), el bazo trabaja muchísimo más rápido en tratar de destruir a los eritrocitos infectados que con una carga parasitemia baja, por lo que la destrucción de los eritrocitos en la carga parasitaria alta y baja se lleva de igual manera, entre más carga parasitaria el bazo trabaja muchísimo mas rápido en la destrucción de eritrocitos infectados hasta llegar a un punto en el cual ya no pueden de tal manera que se presente el signo de esplenomegalia. Incluso en un trabajo posterior a este se observó que el tamaño del bazo es directamente proporcional a la carga parasitaria, esto es, cargas parasitarias bajas son igual a bazo pequeños y cargas parasitarias altas son igual a bazo grande, pero la cinética de parasitemia es similar en ambos ratones (Datos del laboratorio no publicados).

Aparición de signos y tiempo de sobrevida que ocasiona *Plasmodium yoelii* en dos cepas de ratones infectados experimentalmente.

La aparición de signos se determinó mediante la valoración de los ratones a los días postinfección, se evaluaron 3 signos los cuales fueron, el decoloramiento de orejas y cola (signo 1) seguido de la pérdida de peso (signo 2) y por último el letargo (signo 3); se observó que las hembras cepa CD 1 presentaron el primer signo a partir del día 3 postinfección, en la cepa Balb/c los machos y las hembras presentaron al día 2 postinfección el primer signo y de los machos CD 1 de igual manera al día 2 postinfección ya que en los tres signos evaluados, las hembras mostraron que cada uno de los signos se presentaban en las hembras CD 1 después de ambos sexos de la cepa Balb/c y los machos CD 1.

El tiempo de sobrevivencia por la infección causada por *Plasmodium yoelii* respecto a la carga parasitaria baja (85,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*) ocurre al día 12 postinfección en los machos de la cepa CD 1 y al día 10 postinfección en los machos Balb/c; sin embargo las hembras de la cepa CD1 murieron al día 15 postinfección y las hembras cepa Balb/c a los 12. En la carga parasitaria alta (850,000 eritrocitos infectados por *Plasmodium yoelii*) ocurre al día 10 postinfección tanto en los machos de la cepa CD 1 y Balb/c; mientras que en las hembras CD 1 ocurre al día 12 postinfección y en las hembras Balb/c a los 10.

La importancia de trabajar con un modelo experimental es simular las condiciones de la enfermedad en animales de laboratorio, principalmente ratones (*Mus musculus*); sin embargo, hay diferentes cepas que se usan con diferentes propósitos en investigación, debido a que se les han identificado diferencias genotípicas que impactan el fenotipo inmunológico y bioquímico, haciéndolos resistentes o susceptibles a diferentes patógenos. Algunos de los estudios en donde se ha utilizado la cepa CD 1 son los estudios de la patogenicidad del linfoma de Burkitt (Malagón *et al.*, 2011), los ratones exogámicos son utilizados en investigaciones biomédicas, en caso de la cepa Balb/c se han hecho estudios como son las respuestas de anticuerpos a los antígenos de 43 y 48 Kd del estadio en sangre (Bagai *et al.*, 2010), otros de los estudios es la inmunización de protección con una proteína de membrana de *Plasmodium yoelii* con eritrocitos infectados con el parásito (Burns *et al.*, 1999). El paludismo es una enfermedad cosmopolita que sigue siendo importante debido a la morbilidad y mortalidad que ocasionan, los parámetros que se evaluaron en el presente trabajo nos muestran que el tiempo de sobrevivencia es más largo en las hembras cepa CD 1 de igual manera que el tiempo en el que se presentan los signos, ya que en la cepa Balb/c y machos CD 1 es más corto mientras que la presencia de los signos postinfección se presenta primero. Lo que queda por hacer es utilizar la cepa no letal de *Plasmodium yoelii* o en su caso utilizar la cepa de *Plasmodium berghei* para evaluar la aparición de signos y el tiempo de sobrevivencia ya que en este caso nosotros evaluamos estos parámetros en la cepa letal de *Plasmodium yoelii*, por lo que así el parámetro de carga parasitaria podrían ser evaluada con la cepa no letal o con otra cepa utilizada para la investigación con la finalidad de tener un tiempo de vida del ratón más prolongado, ya que con la cepa letal el tiempo es muy corto y no nos permite realizar investigación por un período corto de sobrevivencia del ratón.

Carga parasitaria ligada al sexo a la infección por *Plasmodium yoelii* en dos cepas de ratones infectados experimentalmente.

Para poder determinar la carga parasitaria ligada al sexo a la infección por *Plasmodium yoelii*, se realizó mediante la infección en ratones cepa CD 1 y Balb/c utilizando ambos sexos, así como también utilizando una carga parasitaria alta (11 %) con (850,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*) y baja (1%) con (85,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*) en la cepa CD 1, para la cepa Balb/c con un porcentaje de parasitemia alto (11%) con (850,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*) y bajo (1%) con (85,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*) con la finalidad de poder determinar que cepa y que sexo presenta los signos postinfección por *Plasmodium yoelii*. La carga parasitaria si influye en la presencia de los signos postinfección, ya que con una infección alta (850,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*) los machos de la cepa CD 1 murieron al día 9 postinfección con un porcentaje de parasitemia del 55%, mientras que los de la cepa Balb/c murieron al día 7 postinfección con un porcentaje de parasitemia del 52%, con respecto al porcentaje de parasitemia bajo (85,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*) los machos de la cepa CD 1 murieron al día 9 postinfección con una carga parasitaria del 65% y los machos cepa Balb/c murieron al día 9 postinfección con un porcentaje de parasitemia del 58%.

Las hembras cepa CD 1 con una carga parasitaria alta (850,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*) murieron al día 12 postinfección con un porcentaje de parasitemia del 69%, las hembras cepa Balb/c murieron al día 9 postinfección con un porcentaje de parasitemia del 69%, con respecto a la carga parasitaria baja (85,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*) las hembras cepa CD 1 murieron al día 15 postinfección con un porcentaje de parasitemia 90%, las hembras cepa Balb/c murieron al día 14 postinfección con un porcentaje de parasitemia del 79%.

El tiempo de sobrevivencia del ratón si se ve afectado por la carga parasitaria ya que los machos murieron el día 9 postinfección con un porcentaje de parasitemia similar entre ambas cepas, por otro lado las hembras murieron entre el día 14-15 postinfección con un porcentaje de diferencia del 10% entre estas.

Anticuerpos contra *Plasmodium yoelii* en el modelo experimental murino.

Para determinar la presencia de anticuerpos contra *Plasmodium* se realizó un ELISA, utilizando muestras de suero. Se comparó la presencia de anticuerpos a las dos semanas postinfección, en ambas cepas y en ambos sexos (figura 32). En términos generales, se determinaron anticuerpos en todos los animales infectados, aunque se observó una diferencia estadísticamente significativa con los ratones hembra de la cepa CD1. Esta diferencia podría explicarse considerando que las hormonas influyen la respuesta inmune. Se ha documentado que los estrógenos estimulan la inmunidad del hospedador, mientras que la testosterona la abate; en general se ha descrito que los machos exhiben menor respuesta inmunitaria con respecto a las hembras, principalmente en lo referente a la respuesta inmunológica humoral (Verthelyi, 2001), por lo que debería esperarse que las células B de las hembras produzcan mayor cantidad de anticuerpos (IgM, IgG e IgA).

En estudios con roedores infectados con *Plasmodium*, el índice de mortalidad es mayor en machos que en hembras y se sugiere que, tal vez las diferencias inmunológicas entre sexos podrían estar involucradas. En ratones hembras adultas la exposición a testosterona reduce la producción de anticuerpos y disminuye la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II en células de bazo, así como la expresión de genes de la respuesta a malaria en hígado, sugiriendo que los efectos inmunomoduladores de la testosterona favorecen el aumento en la susceptibilidad a la infección en machos (Krücken *et al.*, 2005).

Esto explica que las hembras cepa CD 1 son más resistentes a la infección por *Plasmodium*, debido a que la presencia de signos se presenta después de las demás cepas, el tiempo de sobrevivencia es más largo a diferencia de la cepa Balb/c y machos de la cepa CD 1 y en la presencia de anticuerpos no hay diferencia entre las cepas y los sexos. La investigación de la infección por paludismo sigue siendo muy amplia lo que se podría realizar para nuevos proyectos sería una cinética de anticuerpos con una carga parasitaria baja y alta, para observar si la carga parasitaria influye en la cantidad de anticuerpos contra *Plasmodium yoelii* o en cualquier otra cepa de *Plasmodium*, así como conocer a los cuantos días postinfección se presentan los primeros anticuerpos en el ratón y cuando llegan a su máxima producción.

9. CONCLUSIONES

- ✚ Se observó que la aparición de los signos se presentó en promedio a partir del 3 día postinfección en las hembras cepa CD1, mientras que en el caso de los otros grupos de ratones aparecieron los signos hasta el día 2 postinfección.
- ✚ Las hembras cepa CD 1 tienen un mayor tiempo de sobrevida a diferencia de los machos de la misma cepa y ambos sexos de la cepa Balb/c, las hembras CD 1 murieron al día 15 postinfección con una parasitemia del 90%, la cepa Balb/c y machos CD 1 murieron entre el día 9-12 postinfección con una parasitemia entre el 52-80%.
- ✚ Las hembras de la cepa CD 1 son las apropiadas para la propagación de la cepa de *Plasmodium yoelii* ya que el tiempo de sobrevida se presenta hasta el día 15 postinfección y la aparición del primer signo hasta el día 3.

10. PERSPECTIVAS

- 1.- Como perspectiva queda realizar una cinética de anticuerpos en ratones infectados con carga parasitaria baja y alta de eritrocitos infectados para determinar a los cuantos días postinfección son detectables los primeros anticuerpos.
- 2.- Determinar si la esplenomegalia esta relacionada con la carga parasitaria.
- 3.- La determinación de estudios de Proteómica de *Plasmodium yoelii* para determinar la utilidad de sus proteínas en estudios de protección y de diagnóstico.

11.- REFERENCIAS

- 1) Alcaraz AA, García S, Castillo P (2005) Diagnóstico rápido de paludismo (Malaria) basado en una técnica inmunocromatográfica. Asociación Española de Farmacéuticos Analistas. Actualidades 2005 65-69.
- 2) Aldinger KA, Sokoloff G, Rosenberg DM, Palmer AA, Millen KJ (2009). Genetic Variation and Population Substructure in Outbred CD-1 Mice: Implications for Genome-Wide Association Studies. PLoS ONE 4(3): 1-10.
- 3) Artavanis TK, Riley ME (2002) Innate Immune Response to Malaria: Rapid Induction of IFN- γ from Human NK Cells by Live *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes. The Journal of Immunology 169:2956-2963.
- 4) Bagai U, Pawar A, Kumar V (2010) Antibody responses to 43 and 48 kDa antigens of blood-stage *Plasmodium berghei* in Balb/c mice. Journal of Parasitic Diseases. 34(2):68–74.
- 5) Betanzos AF (2011) La malaria en México. Progresos y desafíos hacia su eliminación. Boletín Medico del Hospital Infantil de México 68(2):159-168.
- 6) Blair S, Lacharme L, Fonseca J, Tobón A (2001) Resistencia de *Plasmodium falciparum* a tres fármacos antimaláricos en Turbo (Antioquia, Colombia), 1998. Revista Panamericana de Salud Publica. 9(21): 23-29.
- 7) Burns MJ, Adeeku E, Dunn P (1999) Protective Immunization with a Novel Membrane Protein of *Plasmodium yoelii*-Infected Erythrocytes. Infection and Immunity 67(2): 675–680.
- 8) Casas M, Bonilla OA (2006) Diversidad y distribución geográfica del género *Anopheles* en el sur de México. Conabio Biodiversitas 67:12-15.

- 9) Castro I, Rodríguez MC (2009) Análisis Proteómico de *Plasmodium*, el agente causal de la malaria. *Salud Pública de México*. 51 (suplemento 3): 5395-5402.
- 10) Cervantes C, Carrero SC (2008) Hormonas y la susceptibilidad a las infecciones parasitarias. *Revista Médica de la Extensión Portuguesa* 2(2):77-88.
- 11) Chiodini LP, Moody HA, Manser WD (2001) Atlas of Medical Hematology and Protozoology. ED Churchill Livingstone 4 Ed London Pp.: 1 -82.
- 12) Contreras C, Ramsey JM. (2004) Gametocitos de *P. vivax* y *P. falciparum*: etapas relegadas en el desarrollo de vacunas. *Salud Pública de México* 46 (1): 64-70.
- 13) Corran HP, Cook J, Lynch C, Leendertse H, Manjurbo A, Griffin J, Cox J, Abeku T, Bousema T, Ghani A, Drakeley C, Riley E (2008) Dried blood spots as a source of anti-malarial antibodies for epidemiological studies. *Malaria Journal* 30(7): 1-12.
- 14) Couper KN, Blount DG, Hafalla JC, Røijien N, Souza B, Riley E (2007) Macrophage-Mediated but Gamma Interferon–Independent Innate Immune Responses Control the Primary Wave of *Plasmodium yoelii* Parasitemia. *Infection and immunity* 75(12):5806. doi: 10.1128/IAI.01005-07.
- 15) Couper KN, Blount DG, Wilson M, Hafalla JC, Belkaid Y, Kamanaka M, Flavell R, Souza J, Riley E (2008) IL-10 from CD4⁺CD25⁻ Foxp3⁺CD127⁻ Adaptive Regulatory T Cells Modulates Parasite Clearance and Pathology during Malaria Infection. *PLoS Pathogens* 4(2):1-13.
- 16) Durlach R, Rodríguez EV, Escurra C, Freuler C (2009) Paludismo Por *Plasmodium falciparum* Adquirido En África Subsahariana, *Medicina* 69: 163-166.
- 17) Ferreira MU, Da Silva NM, Wunderlich Gerhard (2004) Antigenic Diversity and Immune Evasion by Malaria Parasites. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 11(6):987–995.

- 18) Ferreras A, Pinilla I, Abecia E, Pajarín AB, Honrubia FM (2007) Retinal Toxicity Following Chloroquine Therapy. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología* 82: 103-108.
- 19) Galindo S. (2011) Comunicación personal. Jefa de Laboratorio de Paludismo. Instituto de Diagnostico y Referencia Epidemiológica. Secretaria de Salud Pública.
- 20) Gallardo (2011) Contribución de los modelos animales a la comprensión de la histiopatogénesis de la malaria. Trabajo de métodos y técnicas experimentales en biología animal. Pp. 11.
- 21) Gallegos JR, Shi J, McIntosh R, Pleass R (2012) The generation and evaluation of two panels of epitope-matched mouse IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG3 antibodies specific for *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium yoelii* merozoite surface protein 1–19 (MSP119). *Experimental Parasitology* 130 (2012):384–393.
- 22) Graves PM, Gelband H (2009) Vaccines for preventing malaria (SPf66) Review. JohnWiley & Sons (Ed.). Georgia, USA. Pp.: 30.
- 23) Horrocks P, Bowman S, Kyes S, Waters PA, Craig A (2001) La investigación del paludismo en la era posgenómica. *Boletín de la Organización Mundial de la Salud* 78(12): 1424–1437.
- 24) Jambou R, El-Assaad F, Combes V, E Grau G (2011) In vitro culture of *Plasmodium berghei*-ANKA maintains infectivity of mouse erythrocytes inducing cerebral malaria. *Malaria Journal* 10:346. doi: 10.1186/1475-2875-10-346.
- 25) Klein LS (2000) Hormones and mating system affect sex and species differences in immune function among vertebrates. *Behavioural Processes* 51: 149-166.
- 26) Knudson A, Nicholls SR, Guerra PA, Sánchez R (2007) Perfiles clínicos del paludismo no complicado por *Plasmodium falciparum* en Córdoba Colombia. *Biomédica* 27(004):581-593.

- 27) Krücken J, Dkhil MA, Braun JV, Schroetel RM, El-Khadragy M, Carmeliet P, Mossmann H, Wunderlich F (2005) Testosterone Suppresses Protective Responses of the Liver to Blood-Stage Malaria. *Infection and Immunity* 73(1): 436–443.
- 28) Ledermann W, Valle D (2009) Ética e investigación en la historia de la malaria. *Revista Chilena de Infectología* 26 (5): 466-471.
- 29) Long HG, Chan KH, Allen JE, Read FA, Graham LA (2007) Blockade of TNF receptor 1 reduces disease severity but increases parasite transmission during *Plasmodium chabadui chabadui* infection. *International Journal Parasitology* 38(8-9):1073-1081.
- 30) López FJ (2001) La malaria y su sombra: III. Diagnostico y tratamiento. *Salud Pública de México* 44 (3):118-122.
- 31) Lozano DR, Rodriguez MH, Ceron GL, Avila HM (1999) Risk factors for *Plasmodium vivax* infection in the Lacandon forest southern Mexico. *Epidemiology and Infection* 122:461-469.
- 32) Malagón F, Castillo GO (2000) On the Labeling of Malaria Parasites *in Vivo* with 3H hypoxanthine While Developing an Infection in the Mouse. *Acta Protozoológica* 39: 281 – 288.
- 33) Malagón F, Gonzales AJ, Carrasco E, Robert L (2011) Etiopathogenesis of Burkitt's lymphoma: a lesson from a BL-like in CD1 mouse immune to *Plasmodium yoelii yoelii*. *Infectious Agents and Cancer* 6(10):1-8.
- 34) Malagón Filiberto (2005) El origen del Paroxismo malárico. *Revista Medica del IMSS* 43 (1):83-88.
- 35) Merino F (1987) Respuesta inmunológica en la malaria. *Inmunología* 6(1):1-13.

- 36) Moyano ME, González ML, Montero E, Cuevas L, Pastrana PE, Santa-María I, Benito A (2009) Initial characterization of Pf62, a novel protein of *Plasmodium falciparum* identified by immunoscreening. *Parasitology Research* 104:1389–1397.
- 37) Murphy RJ (1980) Host Defenses in Murine Malaria: Immunological Characteristics of a Protracted State of Immunity to *Plasmodium yoelii*. *Infection and Immunity* 27(1):68-74.
- 38) Murray CK, Gasser RA, Magill RS (2008) Update on Rapid Diagnostic Testing for Malaria *Clinical Microbiology Review* 21(1):98-102.
- 39) Ndam TN, Deleron P (2007) Molecular Aspects of *Plasmodium falciparum* Infection during Pregnancy Review. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (5):1-13.
- 40) Olguín BH., (2008) Programa De Acción Específico 2007-2012 Paludismo. Ed Secretaria de Salud, 1ª Ed Pp. 1-52.
- 41) Paessens CL, Singh KS, Fernandez JR, Kooyk I (2008) vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) provide co-stimulation in positive selection along with survival of selected thymocytes. *Molecular Immunology* 45:42-48.
- 42) Pérez G (2007) Fundamentos del Trabajo con Animales de Laboratorio en Proyectos de Investigación, *Revista del Hospital J.M. Ramos Mejía* 12(3):1-10.
- 43) Perkins DJ, Were T, Davenport GC, Kempaiah P, Hinttner JB, Ongecha JM (2011) Severe Malarial Anemia: Innate Immunity and Pathogenesis *7:1428-1430*.
- 44) Restrepo SJ, Guzmán MR, Iglesias GA (2002) Antimaláricos como drogas inductoras de remisión en la artritis reumatoidea. *Revista Colombiana de Reumatología* 9(1): 62-68.

- 45) Rodríguez HM (2008) Avances en el desarrollo de vacunas contra la malaria. *Revista Biomédica* 19(1):61-79.
- 46) Rodríguez P, Martínez JM, Rivero RL, Álvarez HM, Valdez AF, Rodríguez DA, Lizama RS, Payrol JA (2006) Evaluación de la actividad antimalárica de algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional cubana. *Revista de Ciencias Farmacéuticas Básica Aplicada* 27(3):197-205.
- 47) Rosales DB, Ortiz LB (2008) Infecciones parasitarias: Mecanismos de evasión de la respuesta inmune. *Revista Médica de la Extensión Portuguesa*. 2(2):89-98.
- 48) Rosanas A, Martin L, Ricarte J, Ferrer M, Kalko S, Kimura E, Portillo H (2012) Expression of non-TLR pattern recognition receptors in the spleen of BALB/c mice infected with *Plasmodium yoelii* and *Plasmodium chabadii chabadii* AS. *Memorias Del Instituto Oswaldo Cruz*. 107(3): 410-415.
- 49) Sáenz MJ, Asuero de Lis MS, Correa GC, Cuevas B, Gómez DS, Linares QA, Páez BA, Castellón VI, Marcén LR, Pascual SJ, Burgos RF (2008) Modelos experimentales para la investigación y el entrenamiento en trasplante renal. *Actas Urológicas Españolas*. 32(1):83-90.
- 50) Stevenson MM, Riley ME (2004) Innate Immunity to malaria. *Nature Reviews* 4:169 - 180.
- 51) Tangpukdee N, Duangdee C, Wilairatana P, Krudsood S (2009) Malaria Diagnosis: A Brief Review. *Korean Journal of Parasitology* 47 (2) 93-102.
- 52) Tobeña R M (2011) Esplenomegalia malárica hiperreactiva en un niño de 9 años procedente de Guinea Ecuatorial. *Anales de Pediatría*.doi:10.1016.

- 53) Tobón CA, Giraldo SCA, Pineros JGG, Arboleda NM, Blair TS, Carmona FJ (2006) The epidemiology of complicated *falciparum* malaria: case and controls study in Tumaco and Turbo, Colombia 2003 Revista Brasileña de Epidemiologia 9(3): 283-296.
- 54) Verthelyi D (2001) Sex hormones as immunomodulators in health and disease. International Immunopharmacology 1: 983-993.
- 55) Wang Q, Liu Y, Liu J, Chen G, Zheng W, Wang J, Cao Y (2009) *Plasmodium yoelii*: Assessment of production and role of nitric oxide during the early stages of infection in susceptible and resistant mice. Experimental Parasitology 121(3):268-273.
- 56) Woong SJ, Seok LY, Kyung ME, Yub LJ, Kumar JB, Hee KH, Chung D, Hong T (2011) Expressed Sequence Tag Analysis of the Erythrocytic Stage of *Plasmodium berghei*. Korean Journal of Parasitology 49(3): 221-228.
- 57) World Health Organization (2010) Guidelines for the treatment of malaria, 6^a ed, Ed WHO Press. Geneva Switzerland Pp.: 194.

ANEXO

Cálculo para el porcentaje de parasitemia con una carga parasitaria alta de 850,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii* en la hembra cepa CD1

	7, 300,000 ℓ-----100% de células
HEMBRAS: CD 1	500,000 ℓ----- X
1μL DE SANGRE: 7, 300,000	X=6.8% de células
1 GOTTA: 8 μL	1μL-----500,000 de ℓ INF
N. ℓ INF: 500,000 ℓ INF	25.5 μL ----- X
	X=12,750,000 ℓ INF
	12,750,000 ℓ INF ----- 3000 μL
	X----- 200 μL
	X: 850,000 ℓ INF
	500,000 ℓ INF ----- 6.8%
	850,000 ℓ INF ----- X
	X: 11 % de parasitemia

Cálculo para el porcentaje de parasitemia con una carga parasitaria baja de 85,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii* en la hembra cepa CD 1.

	7, 300,000 ℓ-----100% de células
HEMBRAS: CD 1	500,000 ℓ----- X
1μL DE SANGRE: 7, 300,000	X=6.8% de células
1 GOTTA: 8 μL	1μL-----500,000 de ℓ INF
N. ℓ INF: 500,000 ℓ INF	2.55 μL ----- X
	X=1,275,000 ℓ INF
	1,275,000 ℓ INF ----- 3000 μL
	X----- 200 μL
	X: 85,000 ℓ INF
	500,000 ℓ INF ----- 6.8%
	85,000 ℓ INF ----- X
	X: 1% de parasitemia

Cálculo para el porcentaje de parasitemia con una carga parasitaria alta de 850,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii* en los machos cepa CD 1.

MACHOS: CD 1	7, 300,000 ℓ-----100% de células
1μL DE SANGRE: 7, 300,000	500,000 ℓ----- X
1 GOTTA: 6 μL	X=6.8% de células
N. ℓ INF: 500,000 ℓ INF	1μL-----500,000 de ℓ INF
	25.5 μL ----- X
	X=12,750,000 ℓ INF
	12,750,000 ℓ INF ----- 3000 μL
	X----- 200 μL
	X: 850,000 ℓ INF
	500,000 ℓ INF ----- 6.8%
	850,000 ℓ INF ----- X
	X: 11 % de parasitemia

Cálculo para el porcentaje de parasitemia con una carga parasitaria baja de 85,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii* en el macho cepa CD 1.

MACHOS: CD 1	7, 300,000 ℓ-----100% de células
1μL DE SANGRE: 7, 300,000	500,000 ℓ----- X
1 GOTTA: 6 μL	X=6.8% de células
N. ℓ INF: 500,000 ℓ INF	1μL-----500,000 de ℓ INF
	2.55 μL ----- X
	X=1,275,000 ℓ INF
	1,275,000 ℓ INF ----- 3000 μL
	X----- 200 μL
	X: 85,000 ℓ INF
	500,000 ℓ INF ----- 6.8%
	85,000 ℓ INF ----- X
	X: 1% de parasitemia

Cálculo para el porcentaje de parasitemia con una carga parasitaria alta de 850,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii* en la hembra cepa Balb/c.

HEMBRAS: BALB/C	10, 975, 000 ℓ-----100% de células
1μL DE SANGRE: 10, 975,000	500,000 ℓ INF ----- X
1 GOTTA: 6 μL	X=4.5% de células
N. ℓ INF: 500,000 ℓ INF	1μL-----500,000 de ℓ INF
	25.5 μL ----- X
	X=12,750,000 ℓ INF
	12,750,000 ℓ INF ----- 3000 μL
	X----- 200 μL
	X: 850,000 ℓ INF
	500,000 ℓ INF ----- 4.5%
	850,000 ℓ INF ----- X
	X: 11 % de parasitemia

Cálculo para el porcentaje de parasitemia con una carga parasitaria baja de 85,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii* en la hembra cepa Balb/c.

HEMBRAS: BALB/C	10, 975,000 ℓ-----100% de células
1μL DE SANGRE: 10, 975,000	500,000 ℓ INF ----- X
1 GOTTA: 6 μL	X=4.5% de células
N. ℓ INF: 500,000 ℓ INF	1μL-----500,000 de ℓ INF
	2.55 μL ----- X
	X=1,275,000 ℓ INF
	1,275,000 ℓ INF ----- 3000 μL
	X----- 200 μL
	X: 85,000 ℓ INF
	500,000 ℓ INF ----- 4.5%
	85,000 ℓ INF ----- X
	X: 1 % de parasitemia

Cálculo para el porcentaje de parasitemia con una carga parasitaria alta de 850,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii* en el macho Balb/c.

MACHOS: BALB/C	10, 975, 000 ℓ-----100% de células
1μL DE SANGRE: 10, 975,000	500,000 ℓ INF ----- X
1 GOTTA: 5 μL	X=4.5% de células
N. ℓ INF: 500,000 ℓ INF	1μL-----500,000 de ℓ INF
	25.5 μL ----- X
	X=12,750,000 ℓ INF
	12,750,000 ℓ INF ----- 3000 μL
	X----- 200 μL
	X: 850,000 ℓ INF
	500,000 ℓ INF ----- 4.5%
	850,000 ℓ INF ----- X
	X: 11 % de parasitemia

Cálculo para el porcentaje de parasitemia con una carga parasitaria baja con 85,000 eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii* en el macho Balb/c.

MACHOS: BALB/C	10, 975,000 ℓ-----100% de células
1μL DE SANGRE: 10, 975,000	500,000 ℓ INF ----- X
1 GOTTA: 5 μL	X=4.5% de células
N. ℓ INF: 500,000 ℓ INF	1μL-----500,000 de ℓ INF
	2.55 μL ----- X
	X=1,275,000 ℓ INF
	1,275,000 ℓ INF ----- 3000 μL
	X----- 200 μL
	X: 85,000 ℓ INF
	500,000 ℓ INF ----- 4.5%
	85,000 ℓ INF ----- X
	X: 1 % de parasitemia