



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Biología Experimental

Efecto de la *Curcuma longa* y *Cymbopogon citratus* sobre el proceso
inflamatorio en un modelo experimental de malaria cerebral

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Omar Fernández Rivera

DIRECTORA DE TESIS: Dra. Martha Legorreta Herrera
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

COMITÉ TUTOR: Dra. Ana María Cevallos Gaos
Instituto de Investigación Biomédica

COMITÉ TUTOR: Dra. Miriam Rodríguez Sosa
Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Ciudad de México, Enero, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Biología Experimental

Efecto de la *Curcuma longa* y *Cymbopogon citratus* sobre el proceso inflamatorio en un modelo experimental de malaria cerebral

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Omar Fernández Rivera

DIRECTORA DE TESIS: Dra. Martha Legorreta Herrera
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

COMITÉ TUTOR: Dra. Ana María Cevallos Gaos
Instituto de Investigación Biomédica

COMITÉ TUTOR: Dra. Miriam Rodríguez Sosa
Facultad de Estudios Superiores Iztacala

MÉXICO, CD. MX.

Enero, 2020

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

OFICIO CPCB/041/2020

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

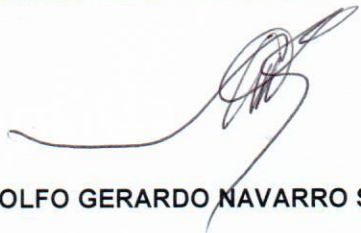
Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **07 de octubre de 2019** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **(Biología Experimental)** del estudiante FERNÁNDEZ RIVERA OMAR con número de cuenta **305042990** con la tesis titulada "**Efecto de *Curcuma longa* y *Cymbopogon citratus* sobre el proceso inflamatorio en un modelo experimental de malaria**", realizada bajo la dirección de la DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ
Vocal: DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA
Secretario: DRA. MIRIAM RODRÍGUEZ SOSA
Suplente: DRA. HELIA REYNA OSUNA FERNÁNDEZ
Suplente: DR. RICARDO LASCURAIN LEDESMA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 14 de enero de 2020

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



c. c. p. Expediente del alumno

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIDAD DE POSGRADO

Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX
Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

Agradecimientos institucionales

En primer lugar, al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca que me asignó durante mis estudios de posgrado, a la DGAPA que a través del programa PAPIIT IN216914 financió esta investigación. Finalmente quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a la Doctora Martha Legorreta Herrera quien como tutora principal siempre me dio su apoyo y consejo durante el desarrollo de este proyecto. También agradezco a las Doctoras Ana María Cevallos Gaos y Miriam Rodríguez Sosa, que como parte de mi comité tutorial hicieron crecer este trabajo de investigación con sus consejos y observaciones.

Agradecimientos a título personal

Deseo expresar mi gratitud a los médicos veterinarios zootecnistas. Adriana Altamirano Bautista, Dolores Elizabeth Guzmán Andrade, y Román Hernández Meza, que gracias a su excelente trabajo en el bioterio de la FES Zaragoza los ratones se mantuvieron en condiciones óptimas, al Doctor Eloy Solano Camacho por la identificación y recolección de *Cymbopogon citratus*, al doctor William Jarra por la donación del parásito y el pie de cría de ratones CBA/Ca, al doctor Luís Sauer por la donación del polvo de *Curcuma longa* y a la Doctora Lourdes Castillo Granada que con apoyo del programa PAPIME PE206115 obtuvo los espectros infrarrojos del estándar de curcumina y el polvo de *Curcuma longa*.

Quiero agradecer también a mis compañeros de laboratorio, especialmente a los maestros en ciencia Luis Antonio Cervantes Candelas, Jesús Aguilar Castro y Fidel Orlando Buendía González y a las químicas Sofía Monserrat López Padilla y Teresita de Jesús Nolasco Pérez por su apoyo durante los sacrificios y el trabajo de laboratorio.

Dedicatoria

A mis padres, hermanos y abuelos por todo el apoyo que me brindaron durante la realización de esta tesis, y especialmente a mi tía la Ingeniera Química Esther Rivera Romero por todas las historias que me contaba cuando era niño, ya que gracias a ella es que me enamoré de la ciencia.

Índice

1. Resumen.....	13
2. Abstract	14
3. Introducción	15
3.1. La inflamación y la respuesta inmune en la malaria	15
3.2. Tratamientos antimaláricos y el desarrollo de resistencia.....	18
<i>Curcuma longa</i>	20
3.3.	20
3.4. <i>Cymbopogon citratus</i>	21
3.5. Protocolo para el estudio de nuevos antimaláricos	22
4. Planteamiento del problema	23
5. Hipótesis.....	23
6. Objetivos	23
7. Diseño experimental	24
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
8.1. Material biológico.....	25
8.2. Metodología.....	25
8.2.1. Determinación del contenido de curcumina en el rizoma de <i>C. longa</i>	25
8.2.2. Curva dosis-respuesta de <i>Curcuma longa</i>	26
8.2.3. Variación del peso	26
8.2.4. Temperatura	26
8.2.5. Hemoglobina	26
8.2.6. Glucemia	26
8.2.7. Sobrevida	27
8.2.8. Curva dosis respuesta de la mezcla de <i>Curcuma longa</i> y <i>Cymbopogon citratus</i> 27	
8.2.9. Activación del parásito	27
8.2.10. Infección con <i>P. berghei</i> ANKA	28

8.2.11.	Parasitemia	28
8.2.12.	Supresión de la parasitemia.....	28
8.2.13.	Preparación de los grupos	28
8.2.14.	Evaluación del efecto de la administración de <i>C. longa</i> y <i>C. citratus</i> sobre el porcentaje de: linfocitos T CD4 ⁺ , linfocitos T CD8 ⁺ , linfocitos B, células NK ⁺ y macrófagos, y la concentración de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF e IFN- γ	29
8.2.15.	Índice esplénico	30
8.2.16.	Cuantificación de las poblaciones celulares	30
8.2.17.	Cuantificación de la concentración de citocinas	30
9.	Resultados	31
9.1.	Análisis infrarrojo del rizoma de <i>Curcuma longa</i>	31
9.2.	Contenido de curcumina en el rizoma de <i>Curcuma longa</i>	32
9.3.	Curva dosis respuesta antimalárica de <i>Curcuma longa</i>	33
9.3.1.	Parasitemia de los grupos de ratones tratados con diferentes dosis de <i>C. longa</i>	33
9.3.1.	Sobrevida en los grupos de ratones tratados con diferentes dosis de <i>C. longa</i>	35
9.3.1.	Pérdida de peso en los grupos de ratones tratados con diferentes dosis de <i>C. longa</i>	35
9.3.1.	Variación de la temperatura en los grupos de ratones tratados con diferentes dosis de <i>C. longa</i>	36
9.3.1.	Concentración de hemoglobina en los grupos de ratones tratados con diferentes dosis de <i>C. longa</i>	37
9.3.1.	Glucemia en los grupos de ratones tratados con diferentes dosis de <i>C. longa</i>	38
9.4.	Curva de dosis respuesta para las diferentes mezclas de <i>Curcuma longa</i> y <i>Cymbopogon citratus</i>	40
9.4.1.	Sobrevida de los grupos que recibieron diferentes combinaciones de <i>C. longa</i> y <i>C. citratus</i>	40
9.4.2.	Parasitemia de los grupos que recibieron diferentes combinaciones de <i>C. longa</i> y <i>C. citratus</i>	41

9.5.	Evaluación del efecto de <i>Curcuma longa</i> y <i>Cymbopogon citratus</i> sobre la respuesta inmune de ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.....	43
9.5.1.	Parasitemia de ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA tratados con las dosis óptimas de <i>C. longa</i> y <i>C. citratus</i> solas y en combinación	44
9.5.2.	Variación del peso de ratones tratados con las dosis óptimas de <i>C. longa</i> y <i>C. citratus</i> por separado y en combinación en ratones sanos e infectados con <i>P. berghei</i> ANKA	46
9.5.3.	Efecto de <i>C. longa</i> y <i>C. citratus</i> sobre el índice esplénico de ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.....	48
9.5.4.	Efecto de la administración de <i>C. longa</i> y/o <i>C. citratus</i> sobre las poblaciones celulares CD3 ⁺ , CD3 ⁺ CD4 ⁺ , CD3 ⁺ CD8 ⁺ , CD19 ⁺ , CD107b ⁺ y CD16 ⁺ /CD32 ⁺ en el bazo de ratones CBA/Ca infectados con <i>P. berghei</i> ANKA	49
9.5.5.	Efecto de la administración de <i>C. longa</i> y/o <i>C. citratus</i> en ratones infectados con <i>P.berghei</i> ANKA sobre la concentración sérica de citocinas	55
10.	Análisis de resultados	59
11.	Conclusiones.....	61
12.	Referencias	62

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo de replicación asexual de <i>Plasmodium</i> durante la fase eritrocítica.	17
Figura 2 Modelo de regulación de la respuesta inmune adaptativa en la fase eritrocítica de la malaria.	18
Figura 3 Distribución geográfica de <i>P. falciparum</i> resistente a los antimaláricos más usados.	19
Figura 4 Diseño experimental.	24
Figura 5 Identificación de curcumina por espectrofometría infrarrojo en las cápsulas de <i>Curcuma longa</i>	32
Figura 6 Parasitemia de ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA tratados con diferentes dosis de <i>Curcuma longa</i>	34
Figura 7 Efecto de la <i>Curcuma longa</i> sobre la supervivencia de ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA tratados con diferentes dosis de <i>Curcuma longa</i>	35
Figura 8 Efecto de administrar diferentes dosis de <i>Curcuma longa</i> sobre el peso corporal de ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.	36
Figura 9 Efecto de administrar diferentes dosis de <i>Curcuma longa</i> sobre la temperatura de ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.	37
Figura 10 Efecto de administrar diferentes dosis de <i>Curcuma longa</i> sobre la concentración de hemoglobina en sangre periférica de ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.	38
Figura 11 Efecto de administrar diferentes dosis de <i>Curcuma longa</i> sobre la concentración de glucosa en sangre periférica de ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.	39
Figura 12 Efecto de la administración de diferentes mezclas de <i>Curcuma longa</i> y <i>Cymbopogon citratus</i> sobre la supervivencia de ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.	41
Figura 13 Efecto de la administración de diferentes mezclas de <i>Curcuma longa</i> y <i>Cymbopogon citratus</i> sobre la parasitemia de ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.	42
Figura 14 Efecto de la administración de diferentes mezclas de <i>Curcuma longa</i> y <i>Cymbopogon citratus</i> sobre la supresión de la parasitemia de ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA tratados con diferentes mezclas <i>Curcuma longa</i> y <i>Cymbopogon citratus</i>	43
Figura 15 Efecto de la administración de <i>Curcuma longa</i> y/o <i>Cymbopogon citratus</i> solas o combinadas sobre la parasitemia de ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.	45
Figura 16 Efecto de la administración de <i>Curcuma longa</i> y/o <i>Cymbopogon citratus</i> solas o combinadas sobre la supresión de la parasitemia de ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA al octavo día postinfección.	46
Figura 17 Efecto de <i>Curcuma longa</i> y/o <i>Cymbopogon citratus</i> , administradas solas o en combinación, sobre el peso de ratones sin infección.	47
Figura 18 Efecto de <i>Curcuma longa</i> y/o <i>Cymbopogon citratus</i> , administradas solas o en combinación, sobre el peso corporal de ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.	48

Figura 19 Efecto de la administración de <i>Curcuma longa</i> y/o <i>Cymbopogon citratus</i> , solas o combinadas, sobre el índice esplénico de ratones sin infección o infectados con <i>P. berghei</i> ANKA en el octavo día postinfección.....	49
Figura 20 Efecto de la administración de <i>Curcuma longa</i> y/o <i>Cymbopogon citratus</i> sobre el porcentaje de células CD3+ en el bazo de ratones sin infección o infectados con <i>P. berghei</i> ANKA en el octavo día postinfección.....	50
Figura 21 Efecto de la administración de <i>Curcuma longa</i> y/o <i>Cymbopogon citratus</i> sobre el porcentaje de células CD3+ CD4+ en el bazo de ratones sin infección o infectados con <i>P. berghei</i> ANKA en el octavo día postinfección.	51
Figura 22 Efecto de la administración de <i>Curcuma longa</i> y/o <i>Cymbopogon citratus</i> sobre el porcentaje de células CD3+ CD8+ en el bazo de ratones sin infección o infectados con <i>P. berghei</i> ANKA en el octavo día postinfección.	52
Figura 23 Efecto de la administración de <i>Curcuma longa</i> y/o <i>Cymbopogon citratus</i> sobre el porcentaje de células CD19+ en el bazo de ratones sin infección o infectados con <i>P. berghei</i> ANKA en el octavo día postinfección.	53
Figura 24 Efecto de la administración de <i>Curcuma longa</i> y/o <i>Cymbopogon citratus</i> sobre el porcentaje de células CD107b+ en el bazo de ratones sin infección o infectados con <i>P. berghei</i> ANKA en el octavo día postinfección.	54
Figura 25 Efecto de la administración de <i>Curcuma longa</i> o <i>Cymbopogon citratus</i> , solas o en combinación, sobre el porcentaje de células CD16 ⁺ /CD32 ⁺ en el bazo de ratones sin infección o infectados con <i>P. berghei</i> ANKA en el octavo día postinfección.	55
Figura 26 Efecto de la administración de <i>Curcuma longa</i> o <i>Cymbopogon citratus</i> , solas o en combinación, sobre la concentración sérica de IL-10 en ratones sin infección o infectados con <i>P. berghei</i> ANKA en el octavo día postinfección.....	56
Figura 27 Efecto de la administración de <i>Curcuma longa</i> o <i>Cymbopogon citratus</i> , solas o en combinación, sobre la concentración sérica de IFN- γ en ratones sin infección o infectados con <i>P. berghei</i> ANKA en el octavo día postinfección.....	57
Figura 28 Efecto de la administración de <i>Curcuma longa</i> o <i>Cymbopogon citratus</i> , solas o en combinación, sobre la concentración sérica de TNF- α en ratones sin infección o infectados con <i>P. berghei</i> ANKA en el octavo día postinfección.....	58

1. Resumen

La malaria es la enfermedad parasitaria que causa más muertes en el mundo, este problema de salud es aún más grave debido a que el agente etiológico, *Plasmodium*, desarrolló resistencia a los tratamientos antimaláricos existentes, por lo que no se ha podido erradicar la enfermedad. Además, la sintomatología severa y su principal complicación, la malaria cerebral, se asocian a la respuesta inflamatoria exacerbada. Ante esta situación en este trabajo estudiamos *Cymbopogon citratus* y *Curcuma longa*, dos plantas medicinales con propiedades antimaláricas y antiinflamatorias en un modelo experimental de malaria, en un intento de generar nuevos tratamientos contra el parásito que también controlen la respuesta inmune exacerbada.

2. Abstract

Malaria is the parasitic disease that causes more deaths in the world, this health problem is even more serious because the etiologic agent, Plasmodium, developed resistance to existing antimalarial treatments, so it has not been possible to eradicate the disease. In addition, severe symptomatology and its main complication, cerebral malaria, are associated with the exacerbated inflammatory response. Given this situation in this work we study *Cymbopogon citratus* and *Curcuma longa*, two medicinal plants with antimalarial and anti-inflammatory properties in an experimental model of malaria, to generate new treatments against the parasite that also control the exacerbated immune response.

3. Introducción

La malaria o paludismo cuyo agente etiológico es el protozooario *Plasmodium* es la enfermedad parasitaria más importante en el mundo, en el 2018 la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó 219 millones de casos nuevos y 445 mil muertes, lo que constituye un problema de salud pública a nivel mundial (1). En el hospedero vertebrado *Plasmodium* adopta diversas formas, las que corresponden a la fase eritrocítica son las de mayor relevancia clínica (Figura 1), ya que causan la sintomatología: anemia grave, caquexia (pérdida de peso, atrofia muscular, fatiga y debilidad), esplenomegalia e hipoglucemia, además las infecciones con *P. falciparum* causan el mayor número de muertes y la sintomatología más grave, fallo orgánico y malaria cerebral (2-6).

La malaria cerebral se manifiesta con pérdida de la conciencia, coma y muerte (2), aunque no existe un completo entendimiento de la patogénesis, esta complicación se asocia con la inflamación exacerbada, inducida por la sobreproducción de citocinas proinflamatorias como el interferón gamma (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (7).

El problema de la alta mortalidad de la malaria es aún más grave debido a que el *Plasmodium* ha desarrollado resistencia a todos los tratamientos antimaláricos existentes, por lo que no se ha podido erradicar la enfermedad. Ante esta situación la OMS alienta la investigación de nuevas fuentes y formulaciones de antimaláricos que permitan superar la resistencia. El uso de compuestos derivados de fuentes biológicas es una importante alternativa para el tratamiento de esta enfermedad (8, 9). Si bien, la inflamación se requiere para iniciar los mecanismos que conducen a la eliminación del *Plasmodium*; paradójicamente si la inflamación se torna crónica puede conducir a la muerte.

3.1. La inflamación y la respuesta inmune en la malaria

El proceso inflamatorio involucra diferentes células de la respuesta inmune (neutrófilos, macrófagos, basófilos, células cebadas, linfocitos T, linfocitos B, etc.) que interactúan entre sí y llegan al sitio de la lesión gracias a diversas moléculas: factores quimiotácticos, citocinas, factores de crecimiento, prostaglandinas, etc. La interacción de las diferentes células y los mediadores depende de factores como: el punto del proceso inflamatorio en el que se encuentren, lo que haya iniciado el proceso (patógeno, autoinmunidad, lesión física o química, etc), el tejido u órgano involucrado o si la inflamación es aguda o crónica (10).

La respuesta inflamatoria es un arma de doble filo ya que es el inicio del proceso de curación, pero si se vuelve crónica y generalizada, resulta en un proceso agresivo que puede ocasionar la muerte del paciente (10, 11). La inflamación generalizada se

caracteriza por la liberación de citocinas pro- y antiinflamatorias en la circulación, actualmente se piensa que la síntesis excesiva de estas citocinas es lo que genera la enfermedad que asociamos al agente patógeno (12), tal es el caso de la malaria.

En la infección con *Plasmodium*, el parásito inoculado en la piel del hospedero vertebrado migra e invade al hígado, posteriormente migra a torrente sanguíneo e infecta a los eritrocitos en donde los parásitos se multiplican de forma asexual provocan la lisis del eritrocito, al liberarse al torrente sanguíneo invaden a nuevos eritrocitos (Figura 1); la lisis de los eritrocitos produce anemia grave, además el *Plasmodium* induce cambios estructurales en la membrana del eritrocito volviéndolos rígidos lo que promueve la formación de rosetas. Cuando el diámetro de los capilares es menor al de estos eritrocitos y rosetas, se modula positivamente la liberación de citocinas que inducen la expresión de adhesinas en las células endoteliales, esto permite el secuestro de los eritrocitos parasitados en los vasos, lo que inicia una respuesta inflamatoria exacerbada, además como consecuencia de la anemia y el secuestro de eritrocitos se reduce la oxigenación de los tejidos, si esto sucede en el cerebro se desarrolla la malaria cerebral, esta complicación causa convulsiones, coma y muerte (5, 8, 13, 14).

Durante la fase sanguínea los anticuerpos y los linfocitos T cooperadores son componentes clave para la eliminación del parásito; los anticuerpos opsonizan a los eritrocitos parasitados lo que promueve su eliminación por los macrófagos (5); los anticuerpos también previenen la infección de los eritrocitos sanos al unirse a los merozoítos circulantes lo que origina su lisis vía complemento. Los linfocitos T cooperadores participan directamente en la respuesta contra *Plasmodium* al producir citocinas pro-inflamatorias (IFN- γ y TNF- α) que activan a los macrófagos y como consecuencia aumenta la fagocitosis del parásito. Además, la cooperación con los linfocitos B vía moléculas del complejo principal de histocompatibilidad y de las citocinas IL-4 e IL-6 promueve la maduración de clones de linfocitos B específicos contra *Plasmodium*. Otros componentes centrales en la respuesta inmune son los linfocitos NK, las células T $\gamma\delta$, la microbiota del hospedero y los anticuerpos naturales, finalmente citocinas como la IL-10 y el TGF- β regulan negativamente la respuesta inflamatoria (8, 15) (Figura 2).

Una respuesta inflamatoria excesiva, se caracteriza por concentraciones altas de las citocinas IL-1, IL-6, IFN- γ y TNF- α , que exacerbaban los efectos de la parasitemia. Paradójicamente, una respuesta inflamatoria insuficiente se relaciona con parasitemias más altas (5).

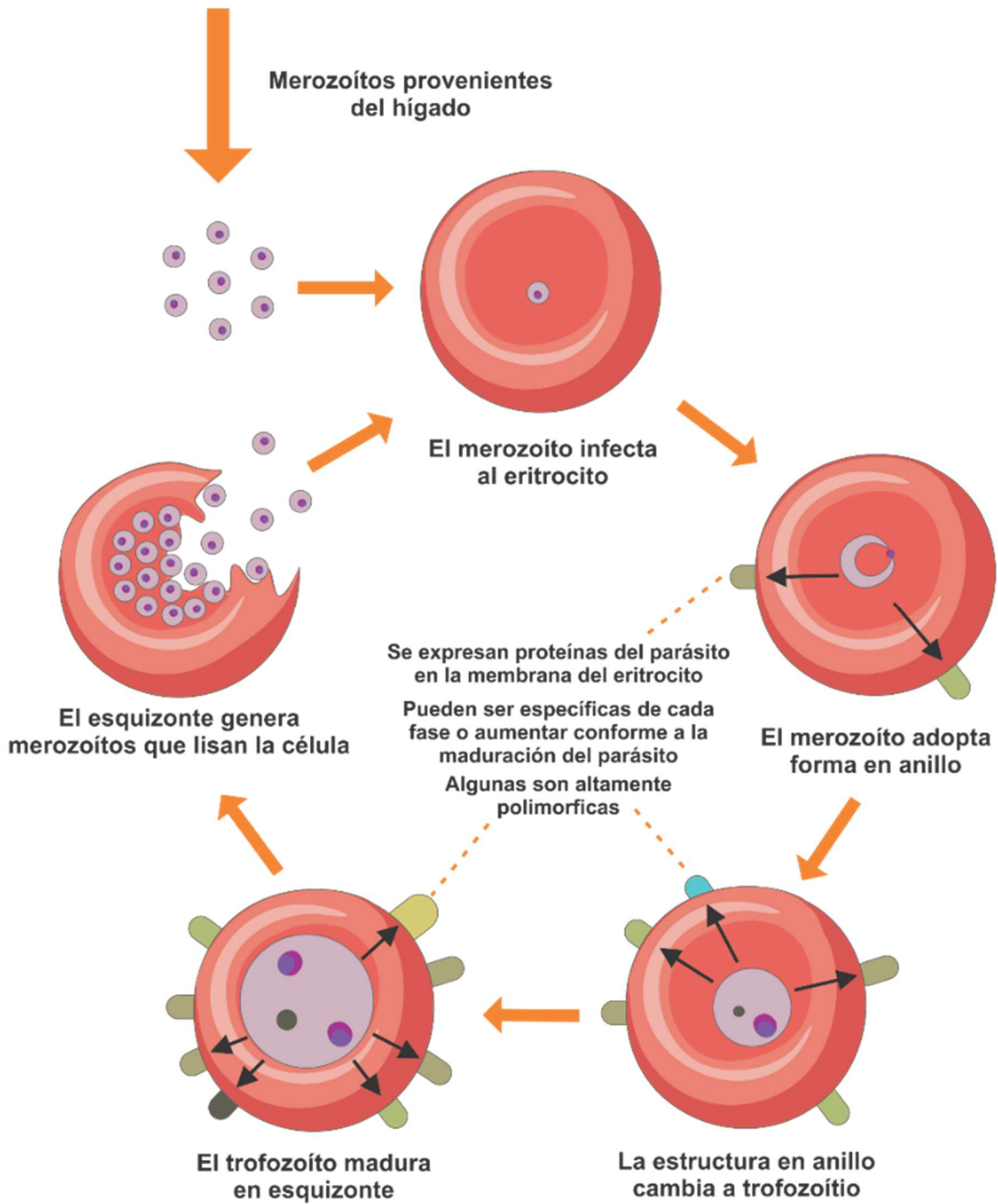


Figura 1. Ciclo de replicación asexual de *Plasmodium* durante la fase eritrocítica. Después de la infección inicial y la replicación en el hígado, los merozoítos liberados al torrente sanguíneo infectan a los eritrocitos, se modifica la membrana del eritrocito, se promueve la formación de rosetas y su secuestro en los capilares. Tomada y modificada de Wolf AS. *Frontiers in immunology*. 2017;8:212(5)

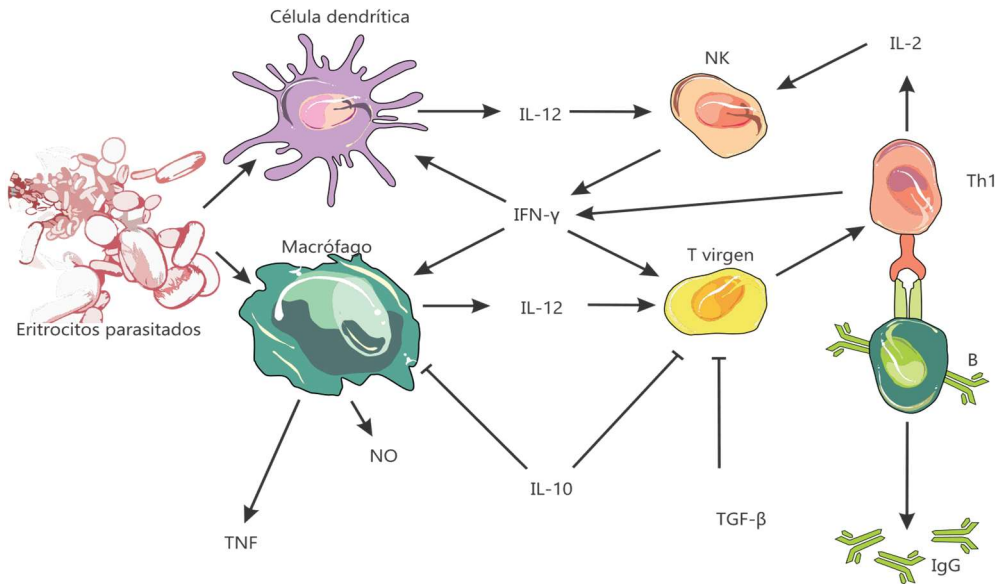


Figura 2 Modelo de regulación de la respuesta inmune adaptativa en la fase eritrocítica de la malaria. Después de reconocer a los eritrocitos parasitados, la célula dendrítica madura y migra al bazo, la maduración de estas células aumenta la síntesis de la citocina IL-12, que a su vez activa a las células NK las cuales sintetizan IFN- γ , para inducir la diferenciación de los linfocitos Th1 y la maduración de las células dendríticas; Los linfocitos Th1 sintetizan IL-2 lo que amplifica la síntesis de IFN- γ , así se promueve la maduración y activación de los macrófagos. Por otra parte, la IL-10 y el TGF- β regulan negativamente la respuesta inflamatoria. Esquema modificado de Stevenson MM, Riley EM. *Nature reviews Immunology*. 2004;4(3):169-80

3.2. Tratamientos antimaláricos y el desarrollo de resistencia

Debido a que la respuesta inmune con frecuencia no es suficiente para eliminar al parásito y que no existe una vacuna que elimine a esta patología, se utilizan fármacos antimaláricos para hacer frente a esta enfermedad. La mayoría de los antimaláricos derivan de fuentes naturales, especialmente plantas, por ejemplo: son derivados de *Chinchona sp.* la quinina y la cloroquina, derivados de *Artemisa annua* son la artemisinina y el artesunato, derivan de la *Tabebuia impetiginosa* la atovaquona. Los principios activos de las plantas se extraen y caracterizan con base en el paradigma farmacéutico para el descubrimiento de nuevos medicamentos (16, 17).

Para producir fármacos antimaláricos los principios activos se aíslan de plantas o se sintetizan químicamente. En general, las infusiones de las plantas o la planta completa poseen mayor actividad que el principio activo, en dosis equivalentes del extracto crudo. Es probable que se deba a la sinergia de los múltiples compuestos presentes en las plantas. Además, los medicamentos derivados de plantas interactúan con receptores biológicos y no generan resistencia, esta justificación farmacológica sienta la base para el desarrollo de tratamientos a base de plantas completas en lugar de compuestos únicos aislados de ellas (16).

En las últimas décadas tres de las cinco especies de *Plasmodium* que infectan a los humanos (*P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*) desarrollaron resistencia a los principales fármacos antimaláricos (Figura 3) (18). El problema es que cuando se desarrolla resistencia a un fármaco, también ocurre para otros fármacos de la misma familia o para fármacos que tengan un modo de acción similar (19).

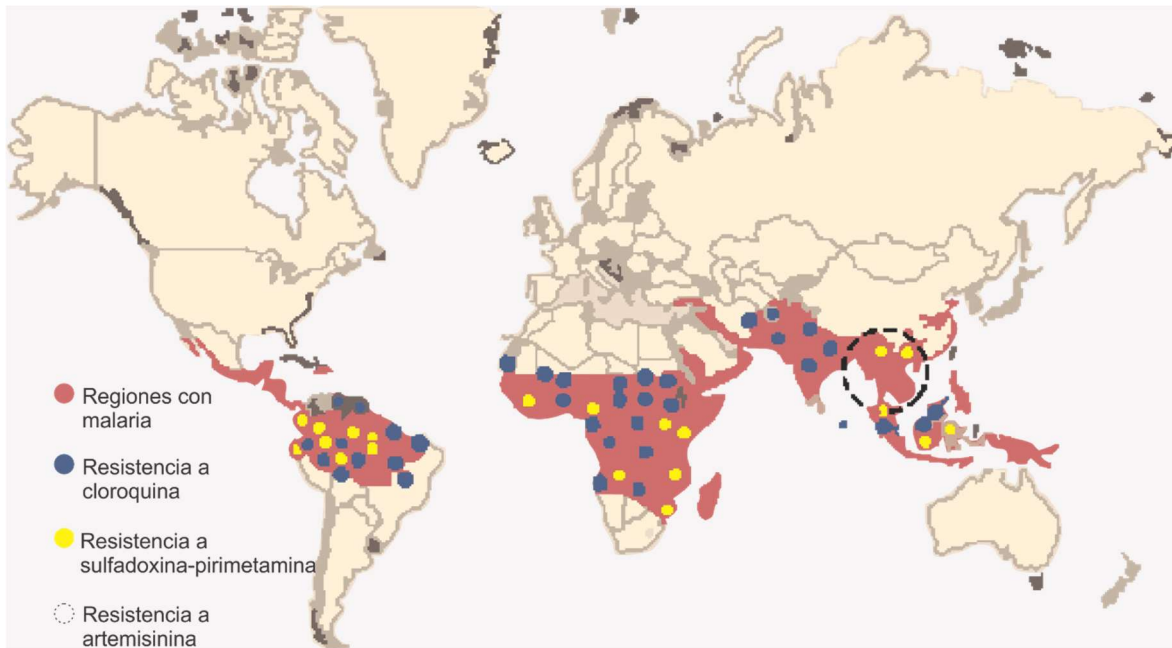


Figura 3 Distribución geográfica de *P. falciparum* resistente a los antimaláricos más usados. En rojo se muestran las zonas endémicas de malaria, en azul la resistencia a cloroquina, en amarillo la resistencia a sulfadoxina-pirimetamina y en líneas punteadas la resistencia a artemisinina. Imagen tomada y modificada de Krungkrai SR. 2016 (18).

Ante este problema la estrategia de la OMS consiste en el monitoreo de la eficacia terapéutica de los antimaláricos (al menos una vez cada 24 meses), en caso de encontrar resistencia ante un fármaco, se procede a la administración de tratamientos combinados; esta estrategia funciona debido a que la resistencia se origina por las mutaciones en el parásito, la probabilidad de que surja una mutación que genere resistencia a dos antimaláricos diferentes es igual al producto de las tasas de mutación que genera resistencia a cada fármaco de forma individual. En comparación con la administración de un solo fármaco, los tratamientos combinados pueden retrasar el desarrollo de resistencia (18-21).

En la década de 1930 comenzó el uso de la cloroquina como terapia antimalárica, a finales de la década de 1950 se convirtió en el tratamiento utilizado por la OMS en su Programa Global de Erradicación de la Malaria, pero a finales de la década de 1960 se descartó su uso por el desarrollo y distribución de la resistencia de *Plasmodium*, esto dejó a millones de pacientes sin tratamiento (22).

En la década de 1970 mediante ensayos clínicos a gran escala se demostró que a pesar de su baja biodisponibilidad la artemisinina posee una actividad antimalárica potente, así que se modificó químicamente (artesunato y artemeter) para aumentar la biodisponibilidad y la potencia antimalárica al combinarse con otros fármacos, principalmente mefloquina. Se esperaba que esta combinación superara la resistencia, sin embargo, en 2005 se documentó la resistencia de *P. falciparum* ante ese tratamiento. Es importante resaltar que las infusiones de *Artemisa annua* se utilizaron en la medicina tradicional china por más de 2000 mil años sin que se generara resistencia, pero cuando se administró la artemisinina purificada el *Plasmodium* desarrollo resistencia. Mostafa *et al*, demostraron que las hojas secas de *Artemisa annua* tenían un efecto antimalárico más potente que la artemisinina en una dosis equivalente, de manera interesante, al administrar la planta completa se superó la resistencia (22).

Las moléculas de las que se derivaron los principios activos de las plantas evolucionaron conjuntamente para interactuar entre sí, lo que otorgó un beneficio ecológico al organismo productor, ya sea en la competencia de recursos o en la lucha contra depredadores y patógenos, esta coevolución produce una sinergia o potenciación que aumenta la eficiencia al mismo tiempo que reduce la aparición de resistencia y los efectos tóxicos, con base en este paradigma se adoptó la combinación de fármacos como estrategia para controlar y prevenir la resistencia (23). Otra planta que se ha usado por cientos de años en la medicina tradicional asiática es la *Curcuma longa*, la cual posee actividad inmunoreguladora y parasiticida contra diversos parásitos incluido el *Plasmodium* (24).

3.3. *Curcuma longa*

Curcuma longa (*C. longa*) es una hierba perenne de la familia *Zingiberaceae*, sus hojas son oblongas y puntiagudas, su flor es amarilla y en forma de embudo, su rizoma, la porción de la planta utilizada en los sistemas de medicina tradicional china y ayurvédica, generalmente se hierve, seca y muele para obtener un polvo amarillo que se utiliza como tratamiento contra la inflamación, flatulencias, dificultades menstruales, hematuria, hemorragias y cólicos (25, 26). Los compuestos responsables de la actividad biológica de *C. longa* son: el flavonoide curcumina (diferuloilmetano) y varios aceites volátiles, tales como: tumerona, atlantona y zingiberona. El componente más estudiado es la curcumina, la cual está presente entre 0.3 y 5.4% (25). Se ha demostrado que *C. longa* tiene diversas propiedades farmacológicas: antimicrobiana, antioxidante, hepato-protectora, antiinflamatoria y potenciadora de la respuesta inmune, como se describe a continuación.

En relación a su actividad antimicrobiana, el extracto y el aceite esencial de *C. longa* inhiben el crecimiento de bacterias, parásitos y hongos (25). En un modelo murino de

malaria Reddy *et al.*, demostraron que la administración oral de curcumina, el extracto y el aceite esencial de *C. longa* inhiben el crecimiento de bacterias, parásitos y hongos (25). Además, en un modelo murino de malaria demostraron que la administración oral de curcumina (100 mg/Kg) disminuye la parasitemia entre un 80 y 90% e incrementa la supervivencia con respecto a los ratones tratados con vehículo (27). Se ha demostrado la eficacia de la curcumina en el tratamiento de la malaria cerebral, aunque no se ha descrito su mecanismo de acción, una hipótesis es la supresión de citocinas Th1 y la inducción de una respuesta tipo Th2 (9, 28). La capacidad antioxidante de curcumina y los extractos de *C. longa* son comparables al poder antioxidante de las vitaminas C y E (25). El efecto hepatoprotector de la *C. longa* se debe en gran parte a sus propiedades antioxidantes y a su actividad antiinflamatoria; Park *et al.* demostraron que administrarla *in vivo* protegía a ratas con daño hepático agudo y subagudo inducido con tetracloruro de carbono (29). Además, el tratamiento con el extracto de *C. longa* redujo en un 90% la producción de aflatoxina en patos infectados con *Aspergillus parasiticus* (25). Dattani *et al.* demostraron que la administración de curcumina (80 mg/Kg) disminuye el daño hepático causado por cloroquina (300 mg/Kg) en ratones (26). Es importante indicar que cuando se administra curcumina vía oral su actividad antiinflamatoria se compara con la de la cortisona y la finilbutazona, su efecto antiinflamatorio se puede atribuir a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas y la función neutrofílica (25). Finalmente, la ingesta de curcumina modula la respuesta inmune, incrementa el número de linfocitos CD4⁺ y de linfocitos B presentes en el intestino; también incrementa la síntesis de anticuerpos en ratones; además inhibe la activación de NF-κB (25).

En la mayoría de los estudios realizados en humanos la administración de cúrcuma es segura; sin embargo, los principales problemas para su uso como tratamiento antimalárico son: la limitada absorción, la baja biodisponibilidad y la inestabilidad química de sus componentes (28, 30).

3.4. *Cymbopogon citratus*

El *Cymbopogon citratus* es otra planta con propiedades antimicrobianas, antioxidantes y antiinflamatorias, antiespasmódicas y analgésicas, crece principalmente en climas tropicales y subtropicales, pertenece a la familia de las poáceas, se utiliza ampliamente en la medicina asiática, resulta eficaz en el tratamiento de infecciones, desordenes digestivos y nerviosos, así como dolores de cabeza y reumáticos (31, 32).

C. citratus se utiliza globalmente como remedio herbal para tratar diversos padecimientos, como: diabetes, dislipidemia, molestias gastrointestinales, ansiedad, fiebre, gripa, neumonía, malaria y la prevención de la formación de agregados plaquetarios (33), reduce la pirexia de ratones inducida por D-anfetamina o con levadura de Brewer en un 95 y 97%

respectivamente, su efecto antipirético es comparable al efecto antipirético del paracetamol (34), también tiene actividad anti-inflamatoria en ratones tratados con carragenina en el cojinete plantar (34). En añadidura, Viana *et al*, demostraron el efecto analgésico del aceite esencial de *C. citratus* en ratones propusieron que su efecto es tanto central como periférico y puede deberse a la interacción con los receptores opioides (35).

Tchoumboungnang *et al* demostraron su actividad antimalárica, mediante la prueba de supresión de 4 días, en ratones infectados con *Plasmodium berghei* suprimieron la parasitemia (62.1-86.6%) con la administración del aceite esencial (200, 300 y 500mg/Kg) (36), mientras que en nuestro grupo de investigación demostramos que la administración de la planta completa suprimió la parasitemia (99.46-99.89%) (37).

Los compuestos activos de *Cymbopogon citratus* responsables de sus diversas actividades biológicas son: polifenoles, flavonoides principalmente derivados de la luteolina, terpenos como el citral, el geraniol, el citronelol y el mirceno, taninos y el ácido clorogénico (38, 39), el citral es el componente más abundante en el aceite esencial (65%-85%) y el más importante a nivel fisiológico y farmacológico (33). Leite *et al* demostraron que la infusión de *C. citratus* no es tóxica (40). Los flavonoides y taninos presentes en el extracto etanólico de las hojas tienen actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (41). *In vitro* el aceite esencial tiene actividad contra *Candida spp* (42) y el tripanozomátido *Crithidia deanei* (43). Adicionalmente, Ekpeyoung *et al* reportan que el aceite esencial tiene actividad contra diversas bacterias y hongos (33).

3.5. Protocolo para el estudio de nuevos antimaláricos

Para determinar la respuesta terapéutica, al igual que los umbrales terapéuticos y de resistencia de los fármacos, se utilizan ensayos *in vivo*, esto ha permitido ajustar las políticas que rigen a los antimaláricos. Las especies de *Plasmodium* que infectan a los humanos no infectan modelos no primates, por lo tanto para evaluar la actividad antimalárica *in vivo* se utilizan modelos murinos infectados con: *P. berghei*, *P. yoelii*, *P. chabaudi* o *P. vinkei* (16), de estos modelos, los ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA desarrollan signos y síntomas similares a la malaria cerebral humana, como hemorragias y secuestro de eritrocitos en la microvasculatura cerebral (7), por lo que esta última combinación constituye un modelo experimental de malaria cerebral.

El protocolo más utilizado para la búsqueda de nuevos antimaláricos es la prueba de supresión de 4 días, consiste en administrar el tratamiento con la sustancia en estudio el día cero tres horas posteriores a la infección y después cada 24 horas en los días 1 a 3 post infección, como control positivo se administra cloroquina o artemisinina. A partir del día 4 y hasta el día 6 se cuantifica la parasitemia y se determina la actividad antimalárica del compuesto (16).

Los estudios de dosis-respuesta requieren un mínimo de 4 dosis diferentes, la dosis efectiva DE50 y la dosis DE90 se calculan al graficar el logaritmo de las dosis contra la función probit de la actividad antimalárica, esta prueba permite comparar la potencia relativa del compuesto estudiado contra un fármaco estándar (16).

4. Planteamiento del problema

La malaria es la enfermedad parasitaria que ocasiona el mayor número de muertes en el mundo, la sintomatología severa, la malaria cerebral y la mortandad son consecuencia de la respuesta inmune inflamatoria exacerbada. Además, el parásito ha desarrollado resistencia a todos los fármacos antimaláricos disponibles, por lo que la OMS promueve la investigación de estrategias terapéuticas distintas que incluyan la combinación de compuestos que además de eliminar al parásito contribuyan a regular la respuesta inflamatoria exacerbada y retrasen la aparición de resistencia. Dado que ambas plantas *C. longa* y *C. citratus* poseen actividad antimalárica y antiinflamatoria, en este trabajo se estudió el efecto de ambas plantas sobre la respuesta inmune de ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA.

5. Hipótesis

La administración de *Curcuma longa* y de *Cymbopogon citratus* regulará el proceso inflamatorio mediante la disminución de la concentración de citocinas proinflamatorias, y el incremento de citocinas antiinflamatorias, en consecuencia, disminuirá la parasitemia y aumentará la supervivencia en ratones CBA/Ca infectados con *Plasmodium berghei* ANKA.

6. Objetivos

Objetivo General. Evaluar el efecto del tratamiento con *C. longa* y *C. citratus* sobre el proceso inflamatorio en un modelo experimental de malaria.

Objetivos específicos:

1. Determinar el contenido de curcumina en el rizoma de *C. longa*.
2. Determinar la dosis óptima de *C. longa* como antimalárico en ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA.
3. Determinar si al administrar la combinación de *C. longa* y *C. citratus* existe efecto antimalárico sinérgico.

4. Evaluar el efecto de la administración individual y en diferentes combinaciones de ambas plantas sobre la respuesta inmune a través de:
 - a. Determinar el porcentaje de células de la respuesta inmune (linfocitos, macrófagos, células NK) en el bazo de ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA mediante citometría de flujo.
 - b. Determinar la concentración de citocinas pro- y antiinflamatorias (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17) en el suero de ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA mediante citometría de flujo.

7. Diseño experimental

Para determinar el efecto de *C. longa* y *C. citratus* sobre la respuesta inmune contra *Plasmodium* se requirieron una serie de experimentos previos, primero se identificó que el preparado comercial de rizoma de *C. longa* contenía curcumina mediante espectrometría infrarroja y se cuantificó la concentración espectrofotométricamente por comparación con un estándar comercial. Se determinó la dosis óptima de *C. longa* con base en la concentración de curcumina utilizada como antimalárico previamente reportada (100mg/Kg) (27). Posteriormente, se analizó si utilizar la dosis óptima de ambas plantas combinadas tenía actividad agonista o antagonista y finalmente se analizó el efecto de cada planta sobre la respuesta inmune (Figura 4).

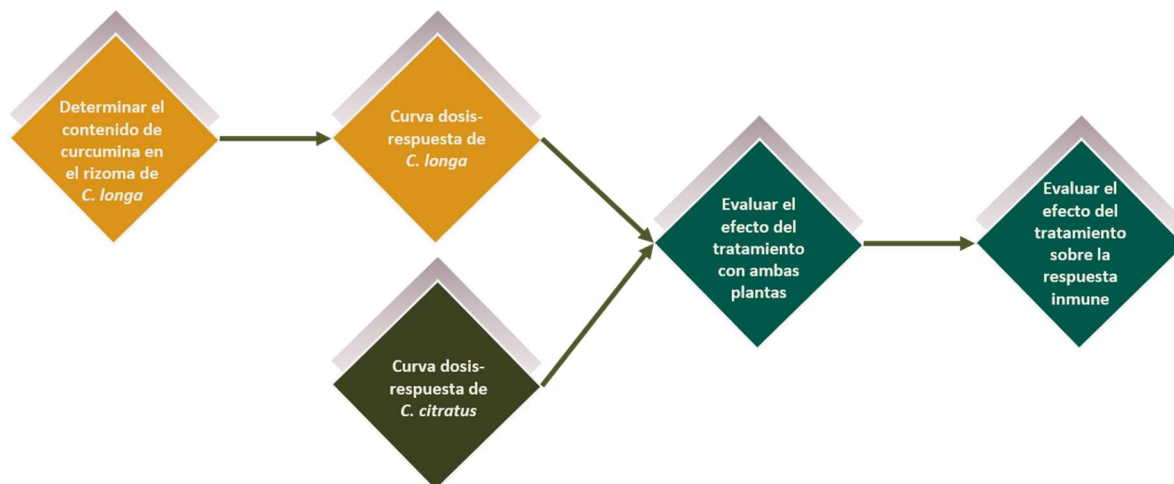


Figura 4 Diseño experimental. La estrategia experimental consistió en analizar si la muestra comercial de *Curcuma longa* contenía curcumina y cuantificar su concentración. Se realizó una curva dosis-respuesta de *C. longa* para determinar la dosis óptima de la actividad antimalárica en la muestra de *C. longa*, la curva dosis-respuesta de *Cymbopogon citratus* se realizó en un trabajo publicado por nuestro grupo (37). Posteriormente, se determinó si la combinación de ambas plantas a diferentes concentraciones generaba sinergia. Finalmente, se analizó el efecto de administrar las dosis óptimas de cada planta sobre la respuesta inmune de ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Material biológico

Ratones y parásito. Los ratones CBA/Ca pie de cría fueron una donación del Doctor William Jarra (National Institute for Medical Research, Londres, Inglaterra). Los ratones se criaron, alimentaron y mantuvieron en un ambiente libre de patógenos en el bioterio de investigación de la FES Zaragoza, UNAM. Las instalaciones del bioterio y los procedimientos con animales cumplen con la norma oficial (NOM-062-ZOO-1999) para el uso y cuidado de animales de laboratorio. El comité de ética e investigación de la FES Zaragoza aprobó los protocolos utilizados oficio 28/04/SO/3.4.1.

El parásito *P. berghei* ANKA también fue una donación del Doctor William Jarra, el parásito se conservó congelado en nitrógeno líquido.

Plantas. La porción aérea de una muestra de *C. citratus* se recolectó en Zafra, Putla Villa de Guerrero, México (latitud: N16°58'52", longitud W97°53'34"), y se identificó por el doctor Eloy Solano Camacho, el número del espécimen (FEZA: 1607) se almacenó en el acervo de la FES Zaragoza, UNAM. El polvo del rizoma de *C. longa* fue una donación del Dr. José Luis Sauer.

Anticuerpos. Para la determinación de poblaciones celulares se utilizaron anticuerpos monoclonales marca Biolegend anti-ratón dirigidos contra los siguientes marcadores de diferenciación: CD8a-PE, CD19-APC, CD16/32-PE, CD3-FITC, CD4-APC, CD107b-PE

8.2. Metodología

8.2.1. Determinación del contenido de curcumina en el rizoma de *C. longa*

Para cuantificar el contenido de curcumina en el rizoma de *C. longa* y determinar la dosis equivalente a 100 mg de curcumina/Kg de peso (dosis reportada en la literatura) (27), se cuantificó espectrofotométricamente la concentración de la muestra problema por comparación con la absorbancia y concentración de un estándar de curcumina (Sigma Aldrich). Para determinar el máximo pico de absorción primero se realizó un barrido espectrofotométrico con una dilución de 10 µg del estándar en 1mL de metanol, posteriormente se prepararon dos diluciones en 10mL de metanol, para la muestra se pesaron 15.3 mg de *C. longa* y para el estándar se pesaron 15 mg, ambas diluciones se diluyeron (1:10), se determinó la absorbancia a 424 nm y para el cálculo se compararon las absorbancias de la muestra con el estándar para cuantificar el contenido de curcumina en la muestra.

8.2.2. Curva dosis-respuesta de *Curcuma longa*

Para determinar la dosis óptima de de *C. longa* se estudiaron 7 grupos de cinco ratones CBA/Ca machos de dos meses de edad. Para generar la curva dosis respuesta se utilizaron 4 concentraciones de *C. longa*: 312 mg/Kg, 625 mg/Kg, 1250 mg/Kg y 2500 mg/Kg equivalentes a 25 mg, 50 mg, 100 mg y 200 mg de curcumina respectivamente. A cada grupo de ratones se le administraron 4 dosis de *Curcuma longa*, o de cloroquina (25 mg/Kg de peso) para el grupo control positivo, o de estándar de curcumina (100 mg/Kg). La primera dosis se administró 3 horas después de la infección, posteriormente 1 dosis cada 24 horas durante 3 días; vía oral. Diariamente se evaluó: la sobrevivencia, la parasitemia, la variación del peso y la temperatura, la concentración de hemoglobina y cada tercer día se evaluó la glucemia.

8.2.3. Variación del peso

Los ratones se pesaron un día antes de la infección y a ese peso se le asignó el 100% para cada ratón, después de la infección, los ratones se pesaron diariamente a la misma hora con una balanza semianalítica, para evaluar el cambio en el porcentaje de peso corporal se utilizó la siguiente ecuación.

$$\%Peso = 100 * \frac{Peso\ medido}{Peso\ en\ el\ día\ cero}$$

8.2.4. Temperatura

Diariamente y a la misma hora se midió la temperatura corporal de los ratones con un termómetro infrarrojo marca Thermofocus, se apuntó la señal infrarroja a una distancia de 5 cm entre el termómetro y el vientre del ratón.

8.2.5. Hemoglobina

Diariamente y a la misma hora se tomó una muestra de sangre se la cola del ratón, se adicionaron 2µL de sangre de cada ratón en 498 µL de reactivo de Drabkin, se mezcló y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos, la concentración de hemoglobina se evaluó espectrofotométricamente a 540 nm, para calcular la concentración de hemoglobina se comparó la absorbancia de la muestra contra una curva estándar de hemoglobina de rata comercial.

8.2.6. Glucemia

Cada tercer día y a la misma hora se tomó una gota de sangre de la cola del ratón, se colocó en la tira reactiva y se cuantificó la concentración de glucosa con un glucómetro Accu-Check® Performa.

8.2.7. Sobrevida

Diariamente se registró la sobrevida en cada grupo, se consideró como 100% el número total de ratones por grupo al inicio del experimento, el tratamiento estadístico se realizó con el programa Graphpad Prism 5 y el método de Kaplan-Meier.

8.2.8. Curva dosis respuesta de la mezcla de *Curcuma longa* y *Cymbopogon citratus*

Para determinar si la combinación de ambas plantas generaba sinergia, se probaron diferentes cantidades de *C. longa* y *C.n citratus* en la mezcla. Se estudiaron 8 grupos, cada uno con cinco ratones CBA/Ca machos de dos meses de edad. A cada grupo se le administró una combinación con proporciones diferentes de *C. longa* y *C. citratus* se tomó como base la concentración que generó la mayor actividad antimalárica, como control positivo se utilizó un grupo tratado únicamente con cloroquina. Además, se analizó un grupo infectado tratado únicamente con vehículo como control negativo como se muestra en la **Tabla ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..** La primera dosis se administró 3 horas después de la infección, posteriormente se administró una dosis cada 24 horas durante 3 días; diariamente se evaluó: la sobrevida, la parasitemia, la variación del peso y la temperatura, la concentración de hemoglobina y cada tercer día se evaluó la glucemia.

Tabla 1 Diseño de los grupos de ratones para el análisis de sinergia de *Curcuma longa* y *Cymbopogon citratus*

Grupo	Tratamiento
1. Control negativo	Vehículo (PBS-aceite de maíz)
2. Control positivo	Cloroquina 25 mg/Kg
3. <i>Curcuma longa</i>	<i>C. longa</i> 312 mg/Kg
4. <i>Cymbopogon citratus</i>	<i>C. citratus</i> 1600 mg/Kg
5. Mezcla 1 (1:4)	<i>C. longa</i> 62.4 mg/Kg, <i>C. citratus</i> 1280 mg/Kg
6. Mezcla 2 (2:3)	<i>C. longa</i> 124.8 mg/Kg, <i>C. citratus</i> 960 mg/Kg
7. Mezcla 3 (3:2)	<i>C. longa</i> 187.2 mg/Kg, <i>C. citratus</i> 640 mg/Kg
8. Mezcla 4 (4:1)	<i>C. longa</i> 249.6 mg/Kg, <i>C. citratus</i> 320 mg/Kg

8.2.9. Activación del parásito

Se descongeló un vial que contenía 300µL de sangre parasitada con *Plasmodium berghei* ANKA e inmediatamente se inyectó vía intraperitoneal en dos ratones (100 y 200µL respectivamente), a partir del tercer día post infección se cuantificó el porcentaje de eritrocitos parasitados; cuando la parasitemia alcanzó el 23% se preparó una suspensión con 1×10^4 eritrocitos parasitados/mL.

8.2.10. Infección con *P. berghei* ANKA

Los ratones se infectaron vía intravenosa con 1×10^3 eritrocitos parasitados con *Plasmodium berghei* ANKA.

8.2.11. Parasitemia

A partir del tercer día postinfección, diariamente, se extrajo una gota de sangre de la cola de cada ratón y se realizó un frotis sanguíneo el cual se dejó secar al aire y se fijó con metanol absoluto, se tiñó durante 30 minutos con el colorante Giemsa (Merck) que se diluyó con amortiguador de fosfatos pH 7.23 (1:10), se lavó con agua corriente, se permitió que se secase y se observó al microscopio óptico con el objetivo 100X, el porcentaje de eritrocitos parasitados se cuantificó en 200 eritrocitos (cuando la parasitemia excedía a 2 eritrocitos parasitados por campo) o en 50 campos (cuando la parasitemia era menor a 2 eritrocitos parasitados por campo).

8.2.12. Supresión de la parasitemia

El porcentaje de supresión de la parasitemia se calculó mediante la siguiente ecuación, en donde PCN es la parasitemia del control negativo y PGE la parasitemia del grupo experimental. Se consideró como día cero el día que se infectó a los ratones.

$$\% \text{Supresión} = 100 * \frac{PCN - PGE}{PCN}$$

8.2.13. Preparación de los grupos

6.2.3.1 Grupos control

El grupo control negativo. Un grupo de ratones CBA/Ca machos de 4 a 6 semanas de edad se le administraron 400 µL de vehículo (PBS) por vía oral diariamente durante 4 días

Grupo control positivo. Igual que en el grupo anterior describe el número de ratones, la cepa, el sexo, la edad. A cada ratón se le administraron 400 µL de una preparación de cloroquina que contenía 25 mg/Kg de peso corporal disuelta en vehículo, se calculó la cantidad de cloroquina con base en el peso corporal de los ratones.

6.2.3.2 *Curcuma longa*

El polvo de *C. longa* se obtuvo de cápsulas comerciales, cuyo contenido de curcumina se cuantificó espectrofotométricamente, el polvo se almacenó en frascos dentro de un desecador. Se administró vía oral 4 veces (3 horas después de la infección con *P. berghei* ANKA y 24, 48 y 72 horas posteriores a la primera administración).

6.2.3.3 *Cymbopogon citratus*

La porción aérea de la planta *Cymbopogon citratus* se lavó, secó y pulverizó, para obtener un tamaño de partícula menor a 75 micras, el polvo se hizo pasar a través de un tamiz con número de malla 200 y se almacenó en frascos dentro de un desecador hasta su uso. Se administró vía oral 4 veces (3 horas después de la infección con *P. berghei* ANKA y 24, 48 y 72 horas posteriores a la primera administración) por medio de una cánula y una jeringa para insulina.

8.2.14. Evaluación del efecto de la administración de *C. longa* y *C. citratus* sobre el porcentaje de: linfocitos T CD4⁺, linfocitos T CD8⁺, linfocitos B, células NK⁺ y macrófagos, y la concentración de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF e IFN- γ

Para evaluar el efecto de la administración de *C. longa* y *C. citratus* sobre las poblaciones celulares CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, NK⁺, CD19⁺, macrófagos, y la concentración de citocinas pro-inflamatorias (IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α , IFN- γ) y anti inflamatorias (IL-10, IL-17A), se utilizaron 5 grupos de ratones CBA/Ca machos de 6 semanas de edad con diez ratones cada uno, de los cuales cinco ratones no se infectaron. A cada grupo de ratones se le administró uno de los siguientes componentes: grupo 1) vehículo para el control negativo, grupo 2) cloroquina para el grupo control positivo, grupo 3) *C. longa*, grupo 4) *C. citratus*, o grupo 5) la mezcla de ambas plantas en las dosis antimaláricas establecidas en experimentos anteriores, como se muestra en la tabla 2 **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** La primera dosis se administró 3 horas después de la infección, posteriormente se suministró 1 dosis cada 24 horas durante 3 días; los otros 5 grupos de ratones se trataron de la forma ya descrita pero no se infectaron para utilizarse como controles. Diariamente, se evaluó: la parasitemia, la variación del peso, la temperatura, la concentración de hemoglobina y cada tercer día se evaluó la glucemia, los ratones se sacrificaron al octavo día postinfección, se les extrajeron muestras de sangre y bazo para analizar las poblaciones celulares en bazo y cuantificar la concentración de citocinas en el plasma.

Tabla 2 Diseño de los grupos de ratones para analizar el efecto sobre la respuesta inmune de *Curcuma longa* y *Cymbopogon citratus*

Grupo	Tratamiento	Infección
1. Control negativo	Vehículo (PBS)	Sin infección
		<i>P. berghei</i> ANKA
2. Control positivo	Cloroquina 25 mg/Kg	Sin infección
		<i>P. berghei</i> ANKA
3. <i>Curcuma longa</i>	<i>C. longa</i> 312 mg/Kg	Sin infección
		<i>P. berghei</i> ANKA
4. <i>Cymbopogon citratus</i>	<i>C. citratus</i> 1600 mg/Kg	Sin infección
		<i>P. berghei</i> ANKA
5. Mezcla	<i>C. longa</i> 312 mg/Kg, <i>C. citratus</i> 1600 mg/Kg	Sin infección
		<i>P. berghei</i> ANKA

8.2.15. Índice esplénico

El octavo día postinfección los ratones se pesaron, se sacrificaron, se extrajo el bazo y se pesó en una balanza analítica, el índice esplénico se calculó para cada ratón como el cociente del peso del bazo dividido por el peso corporal del ratón (44). Los datos se presentan como la media \pm SEM.

8.2.16. Cuantificación de las poblaciones celulares

El octavo día postinfección los ratones se sacrificaron, se extrajo el bazo, el tejido se disgregó haciéndolo pasar por una malla de Nylon estéril. Las células se fijaron con la solución comercial FACS lysing solution Beckton and Dickinson (diluida al 10% con agua destilada estéril), las células se lavaron y se tiñeron con una dilución previamente calibrada de anticuerpos monoclonales BioLegend (antiCD8a dilución 1:600, antiCD19 dilución 1:1600, antiCD16/32 dilución 1:150, antiCD3 dilución 1:250, antiCD4 dilución 1:1000, antiCD107b dilución 1:250), durante 30 minutos en hielo y protegidos de la luz, se realizó un lavado para eliminar los anticuerpos que no reaccionaron. La cuantificación de las poblaciones celulares se llevó a cabo en el citómetro de flujo FACSAriaII, el análisis se realizó con el software FACSDiva.

8.2.17. Cuantificación de la concentración de citocinas

Al octavo día postinfección se sacrificaron los ratones, se extrajo sangre en tubos con heparina y se separó el plasma por centrifugación, se preparó una curva estándar con los estándares de las citocinas provistos en el kit comercial TH1/TH2/TH17 CBA de Becton and Dickinson, posteriormente se preparó la mezcla de las perlas de captura también provistas en el kit, las muestras de suero y la curva estándar se hicieron reaccionar con la mezcla de perlas de captura durante dos horas a temperatura ambiente protegidas de la luz, pasado

el tiempo de incubación se agregó solución de lavado y se centrifugaron las muestras y la curva, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón en solución FACSFlow, la cuantificación se realizó en el citómetro de flujo FACSaria II.

9. Resultados

Para cumplir con el primer objetivo, “*Determinar el contenido de curcumina en el rizoma de Curcuma longa*”, una muestra del rizoma de la planta se analizó por espectrofotometría infrarrojo y el resultado se comparó con un estándar de curcumina. Posteriormente se cuantificó espectrofotométricamente la concentración de curcumina en la muestra por comparación con el estándar.

9.1. Análisis infrarrojo del rizoma de *Curcuma longa*

Se identificó en el rizoma de *C. longa* la presencia del principio activo curcumina mediante espectrometría de infrarrojo y se comparó con el espectro infrarrojo de un estándar de curcumina (Figura 5)

En ambos espectros coinciden varios picos: los de 3504 y 3285 indican la presencia de grupos hidroxilo unidos a anillos aromáticos (color guinda), los picos 3015 y 2924 indican la presencia de alquenos (color rosa), los picos 1626 y 1627 corresponden a cetonas conjugadas (color verde), finalmente los picos 807 y 815 confirman la presencia de anillos aromáticos (color azul) (Figura 5). Todos los grupos anteriores constituyen la molécula de curcumina, por lo tanto, al estar presentes tanto en el estándar como en la muestra del rizoma se puede afirmar que el principio activo está presente en la muestra.

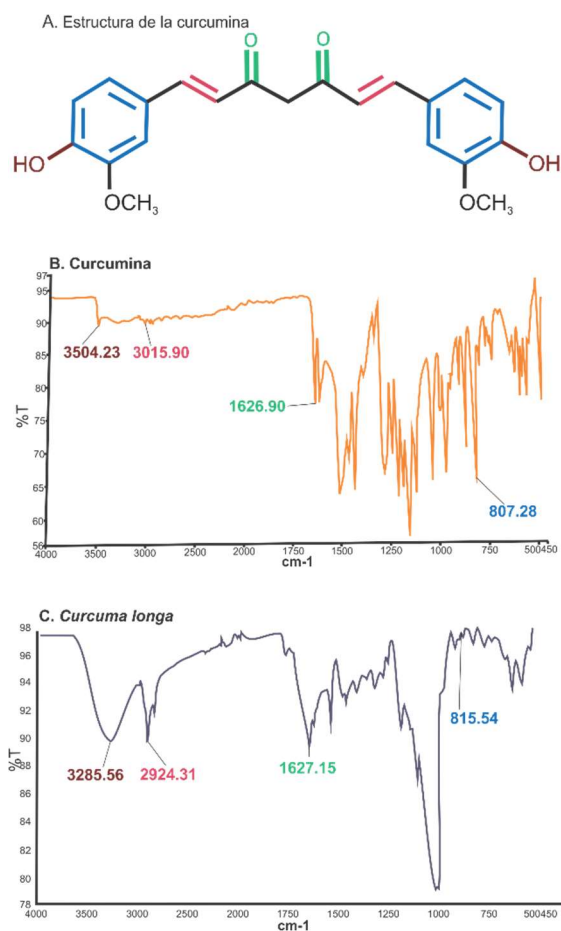


Figura 5 Identificación de curcumina por espectrofotometría infrarrojo en las cápsulas de *Curcuma longa*. A) Estructura de la molécula de curcumina, B) espectro infrarrojo del estándar de curcumina y C) Espectro infrarrojo del rizoma de *C. longa*. Ambos espectros se obtuvieron en el Laboratorio de Espectroscopía de la FES Zaragoza por la Dra. A. Lourdes Castillo Granada.

9.2. Contenido de curcumina en el rizoma de *Curcuma longa*

Para determinar la concentración de curcumina en el polvo del rizoma de *C. longa* se utilizó el protocolo modificado de Sharma *et al.* (45). Para preparar la muestra se disolvieron 15.3 mg de polvo del rizoma de *Curcuma longa* en 5 mL de metanol y se realizó una dilución 1:10. Se pesaron 15 μ g de un estándar de curcumina (Sigma Aldrich) y se disolvieron en 1.0 mL de metanol a esta solución se le realizó un barrido espectrofotométrico para determinar el pico máximo de absorción (424nm). Posteriormente, se cuantificó la absorbancia a 424 nm de las diluciones del estándar (0.294) y de la muestra (0.507), la concentración de curcumina en la muestra (8.45%) se determinó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de curcumina en la muestra} = \frac{\frac{Am}{As} * S * D * V * 0.1}{W}$$

En donde Am es la absorbancia a 240 nm de la dilución de la muestra, As es la absorbancia a 240 nm de la dilución del estándar, S es la concentración del estándar (µg/mL), D es el factor de dilución, V es el volumen de extracción (mL), W es el peso de la muestra (mg).

Para cubrir el segundo objetivo, “Determinar la dosis óptima de *Curcuma longa* como antimalárico en ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA”, se realizó una curva dosis respuesta de *C. longa* como se describe a continuación.

9.3. Curva dosis respuesta antimalárica de *Curcuma longa*

Se ha reportado que ambos el aceite esencial de *C. longa* (9) y la curcumina (100mg/Kg) (27) tienen actividad antimalárica. Sin embargo, no se ha estudiado la actividad antimalárica del rizoma total. Para determinar la dosis antimalárica óptima se realizó una curva de dosis respuesta en la que se evaluó la parasitemia, la sobrevida, el peso, la temperatura, la concentración de hemoglobina y la concentración de glucosa a grupos de ratones que recibieron diferentes concentraciones de *C. longa* (312, 625, 1250, 2500 mg/Kg), las dosis de *C. longa* se calcularon a partir de la dosis de curcumina reportada en la literatura con actividad antimalárica (100 mg/Kg) (27) y la concentración de curcumina en el polvo de *C. longa* (8.45%). Como grupos control se utilizaron ratones que recibieron curcumina (100 mg/Kg), cloroquina (25 mg/Kg) o vehículo.

9.3.1. Parasitemia de los grupos de ratones tratados con diferentes dosis de *Curcuma longa*

En el sexto día postinfección la parasitemia de los grupos tratados con *C. longa* o curcumina fue significativamente menor en comparación con el control negativo, mientras que el décimo día postinfección el grupo tratado con vehículo presentó un pico en la parasitemia (32.99% ± 0.71) (Figura 6), ese mismo día los grupos tratados con *C. longa* 320 y 2500 mg/Kg (Figura 7) fueron los que desarrollaron la menor y mayor parasitemia respectivamente (Figura 6). Entre los grupos tratados con *C. longa*, la dosis de 312 mg/Kg de *C. longa* (equivalente a 25 mg/Kg de curcumina) tuvo la mayor actividad antimalárica con una supresión de la parasitemia del 99.73 % y 43.46% con respecto al control negativo los días 6 y 10 respectivamente (Tabla 3).

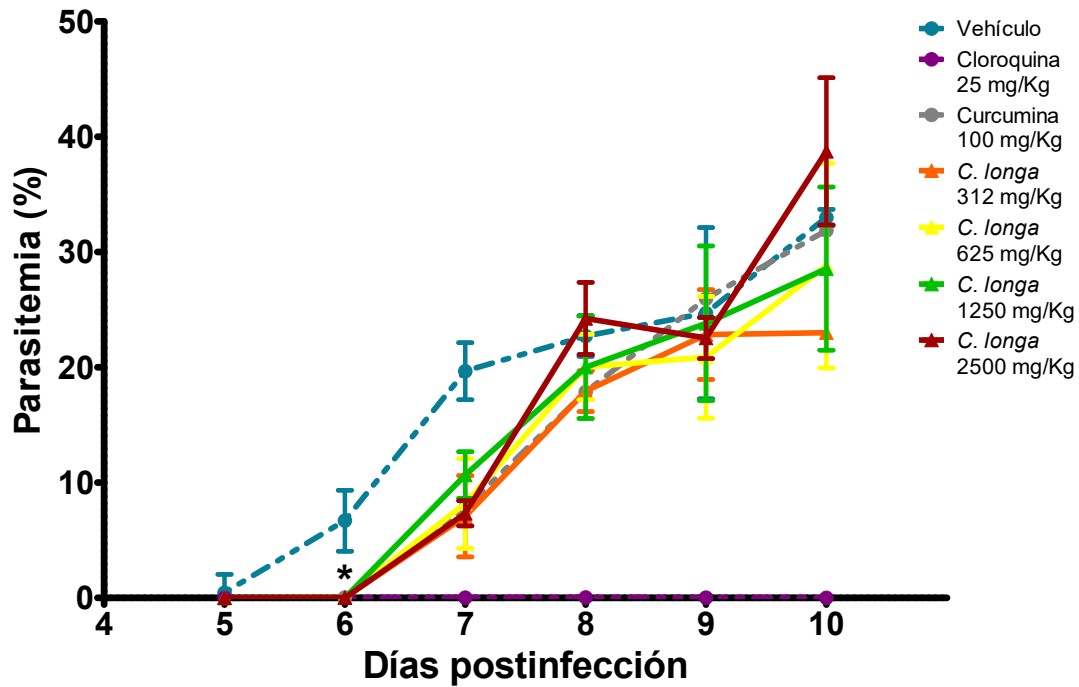


Figura 6 Parasitemia de ratones infectados con *P. berghei* ANKA tratados con diferentes dosis de *Curcuma longa*. Siete grupos de ratones CBA/Ca machos (n=5) se trataron 4 veces (días 0-3), cada grupo recibió una de las siguientes dosis: 312, 625, 1250 ó 2500 mg/Kg, otro grupo se trató con el estándar de curcumina (100 mg/Kg), el grupo control positivo se trató con cloroquina (25mg/Kg) y el grupo control negativo recibió vehículo. Todos los grupos se infectaron con *P. berghei* ANKA. La parasitemia se evaluó diariamente a partir del día 4 postinfección, cada punto representa la media geométrica \pm la desviación estándar de la parasitemia en cada grupo. * representa diferencia estadística significativa, para realizar el análisis estadístico se utilizó ANOVA de dos vías y la prueba Bonferroni, el cálculo se realizó con el programa GraphPadPrism 5.

Tabla 3 Actividad antimalárica de *Curcuma longa* al sexto y décimo día post infección.

Grupo	Dosis (mg/Kg)	Parasitemia (% promedio)		Supresión de la parasitemia (% promedio)	
		Día 6 (n=5)	Día 10	Día 6	Día 10
1. <i>C. longa</i> equivalente a 25mg de curcumina	312	0.018	23.000	99.725	43.461
2. <i>C. longa</i> equivalente a 50mg de curcumina	625	0.019	28.818	99.671	12.662
3. <i>C. longa</i> equivalente a 100mg de curcumina	1250	0.016	28.565	99.750	13.422
4. <i>C. longa</i> equivalente a 200mg de curcumina	2500	0.009	38.741	99.8626	-0.1741
5. Estándar de curcumina	100	0.021	31.8587	99.677	3.4467
6. Cloroquina (Control +)	25	0.014	0.013	99.785	99.959
7. Vehículo (Control -)	-	6.694	32.996	-	-

9.3.1. Sobrevida en los grupos de ratones tratados con diferentes dosis de *Curcuma longa*

Diariamente se registró la sobrevida en todos los grupos de ratones. El grupo que recibió cloroquina presentó el 100% de sobrevida. En los grupos que recibieron *C. longa* a las dosis de 312 y 2500 mg/Kg la sobrevida fue significativamente mayor respecto a los grupos que recibieron las dosis de 625 ó 1250 mg/Kg y en comparación con el grupo control que recibió únicamente el vehículo (Figura 7).

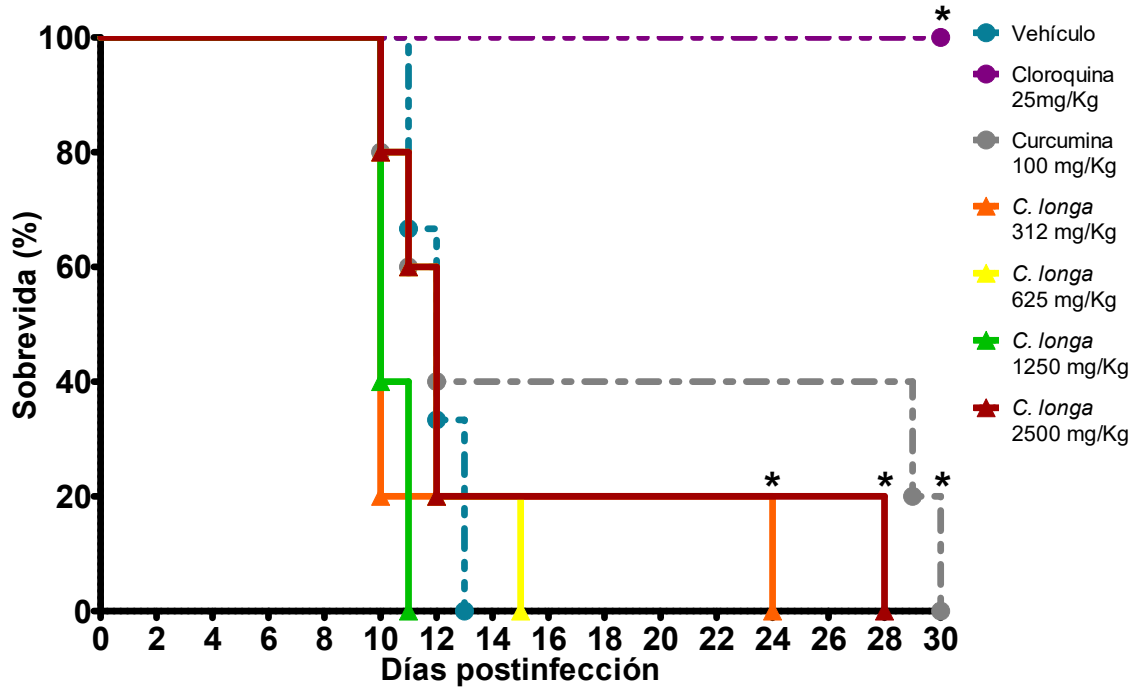


Figura 7 Efecto de la *Curcuma longa* sobre la sobrevida de ratones infectados con *P. berghei* ANKA tratados con diferentes dosis de *Curcuma longa*. Siete grupos de ratones CBA/Ca machos (n=5) se trataron 4 veces (día 0-3). Cuatro grupos recibieron *C. longa* cada grupo con una de las siguientes dosis: (312, 625, 1250 ó 2500 mg/Kg), al grupo control positivo se le administró cloroquina (25mg/Kg); otro grupo se trató con el estándar de curcumina (100 mg/Kg) otro grupo se trató con vehículo como control negativo. La sobrevida se evaluó diariamente. * representa diferencia estadísticamente significativa con relación al control negativo, Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de Kaplan Meier que se calculó con el programa GraphPadPrism 5.

9.3.1. Pérdida de peso en los grupos de ratones tratados con diferentes dosis de *Curcuma longa*

Se ha documentado que la infección con *Plasmodium* genera pérdida de peso, lo que conduce a caquexia (3). La pérdida de peso es un indicador de la gravedad de la enfermedad. La infección generó disminución del peso corporal, a partir del séptimo día postinfección, en todos los grupos de ratones a excepción del grupo control positivo. No se detectó diferencia estadísticamente significativa entre los grupos que recibieron las

diferentes concentraciones de *C. longa* en comparación con el grupo que recibió únicamente vehículo (Figura 8).

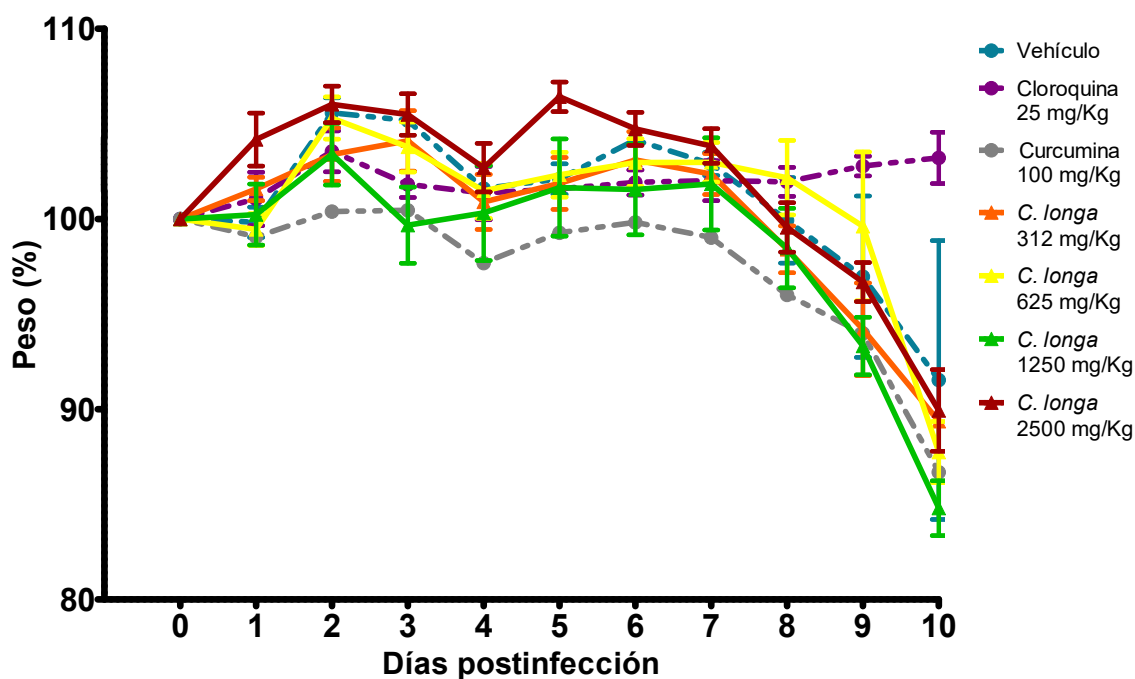


Figura 8 Efecto de administrar diferentes dosis de *Curcuma longa* sobre el peso corporal de ratones infectados con *P. berghei* ANKA. Siete grupos de ratones CBA/Ca machos (n=5) se trataron 4 veces (día 0-3) de la siguiente forma: Cuatro grupos recibieron *C. longa* cada grupo con una de las siguientes dosis: (312, 625, 1250 ó 2500 mg/Kg), al grupo control positivo se le administró cloroquina (25mg/Kg); otro grupo se trató con el estándar de curcumina (100 mg/Kg) otro grupo se trató con vehículo como control negativo. El peso corporal registrado en el día cero se consideró como el 100%, diariamente se calculó el porcentaje de variación en el peso con respecto al día cero para cada ratón. Cada punto representa la media del porcentaje de cada grupo y las barras representan el error estándar medio. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA de dos vías y Bonferroni que se calcularon con el programa GraphPadPrism 5.

9.3.1. Variación de la temperatura en los grupos de ratones tratados con diferentes dosis de *Curcuma longa*

La fiebre es uno de los principales síntomas de los pacientes con malaria (46). Por el contrario, en los modelos murinos se presenta hipotermia (47). En el cuarto día postinfección en el grupo tratado con *C. longa* a una dosis de 625 mg/Kg la temperatura fue significativamente menor con respecto a los grupos controles y los grupos tratados con 312 o 1250 mg/Kg de *C. longa*. En el quinto día post infección el grupo tratado con 1250 mg/Kg presentó mayor temperatura que el control positivo, finalmente, el noveno día el grupo tratado con 312 mg/Kg presentó menor temperatura que el grupo control tratado con cloroquina (Figura 9).

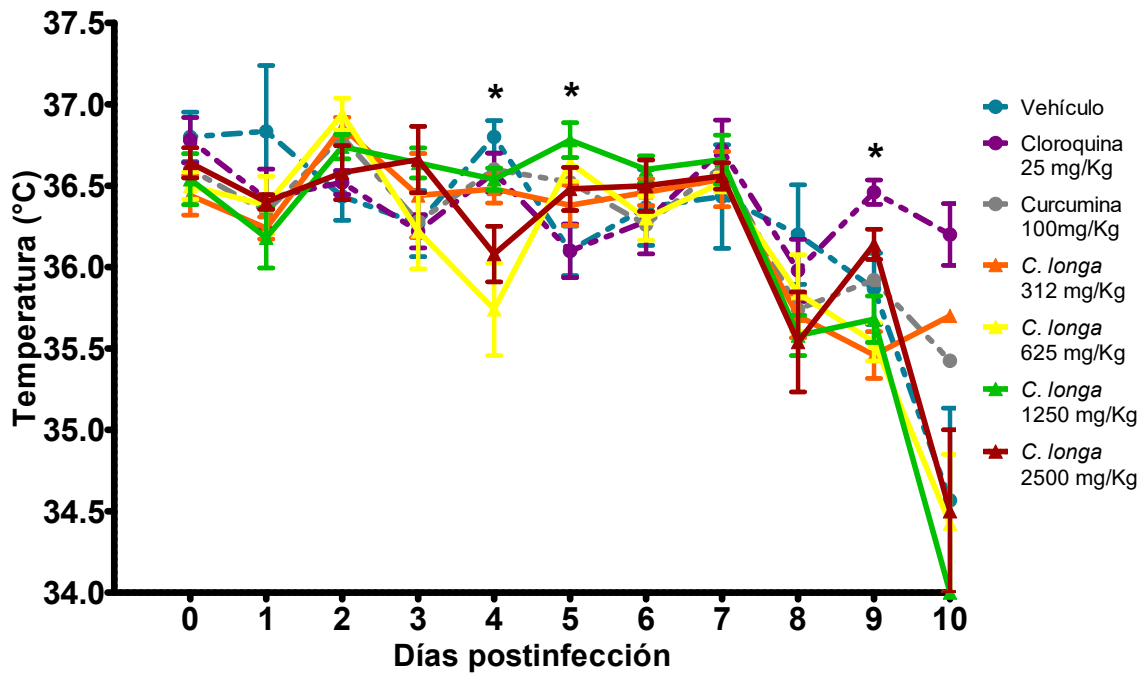


Figura 9 Efecto de administrar diferentes dosis de *Curcuma longa* sobre la temperatura de ratones infectados con *P. berghei* ANKA. Siete grupos de ratones CBA/Ca machos (n=5) se trataron 4 veces (día 0-3) con: diferentes dosis de *C. longa*: (312, 625 1250 o 2500 mg/Kg), cloroquina (25mg/Kg), estándar de curcumina (100mg/Kg) o vehículo. Cada punto representa la media de la temperatura de cada grupo y las barras representan el error estándar medio. * indica diferencia estadísticamente significativa Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA de dos vías y Bonferroni que se calcularon con el programa GraphPadPrism 5.

9.3.1. Concentración de hemoglobina en los grupos de ratones tratados con diferentes dosis de *Curcuma longa*

Las infecciones con *Plasmodium* producen anemia (48), a medida que disminuye la concentración de hemoglobina aumenta la anemia y la gravedad de la enfermedad, por lo tanto, analizar la concentración de hemoglobina en sangre periférica permite evaluar indirectamente la anemia y la gravedad de la infección.

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de hemoglobina en ninguno de los grupos tratados con *C. longa* en comparación con los grupos control. De manera interesante, el grupo tratado con el estándar de curcumina incrementó significativamente la concentración de hemoglobina con respecto a los grupos tratados con vehículo o cloroquina, e inclusive en comparación con todos los grupos que recibieron *C. longa* (Figura 10), este resultado es opuesto a lo esperado.

El decremento en la concentración de hemoglobina que se presentó en todos los grupos tratados con *C. longa* a partir del día 11 postinfección (Figura 10) indica que administrar la planta completa no evita la anemia que se genera por la infección con *Plasmodium*.

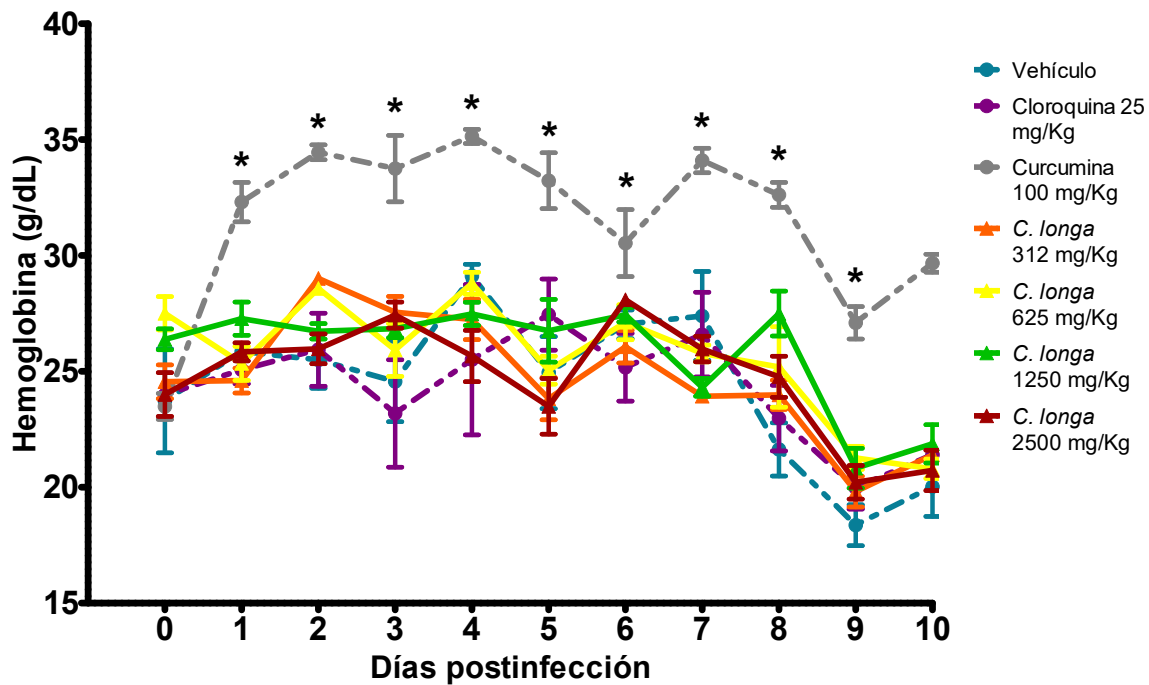


Figura 10 Efecto de administrar diferentes dosis de *Curcuma longa* sobre la concentración de hemoglobina en sangre periférica de ratones infectados con *P. berghei* ANKA. Siete grupos de ratones CBA/Ca machos (n=5) se trataron 4 veces (día 0-3) con: diferentes dosis de *C. longa*: (312, 625 1250 o 2500 mg/Kg), o con cloroquina (25mg/Kg), o con el estándar de curcumina (100mg/Kg) o con vehículo. Cada punto representa la media de la concentración de hemoglobina de cada grupo en el día indicado en la gráfica y las barras representan el error estándar medio. * indica diferencia estadísticamente significativa. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA de dos vías y Bonferroni que se calcularon con el programa GraphPadPrism 5

9.3.1. Glucemia en los grupos de ratones tratados con diferentes dosis de *C. longa*

Durante el curso de la infección con *Plasmodium* la concentración de glucosa en sangre tiende a disminuir debido a que el parásito la utiliza como principal fuente de energía (4), Shengule *et al* demostraron que la administraron de metformina en conjunto con curcuminoides reduce significativamente la glucemia en comparación con ratas tratadas únicamente con metformina (49). Además, la ingesta de *C. longa* incrementa la concentración de insulina postprandial en suero, pero no modifica el índice glicémico (50), sin embargo, no se ha documentado el efecto de *C. longa* en la concentración de glucosa en individuos infectados con *Plasmodium*, debido a su posible efecto hipoglucemiante analizamos el efecto del tratamiento con *C. longa* en ratones infectados con *Plasmodium*.

En este trabajo, en el cuarto día postinfección la concentración de glucosa fue significativamente mayor en el grupo de ratones tratados con 2500 mg/Kg de *C. longa* con respecto a los grupos tratados con 625 mg/Kg y 1250 mg/Kg, en el octavo día postinfección la concentración de glucosa fue significativamente menor en los ratones tratados con *C. longa* (312, 625 y 1250 mg/Kg) en comparación con el control negativo y el

grupo tratado con el estándar de curcumina (100 mg/Kg) (Figura 11), este resultado sugiere que el tratamiento con *C. longa* durante la infección con *Plasmodium* puede agravar la hipoglucemia producida por el parásito, pero que este efecto no es atribuible a su principal componente, la curcumina.

Un hallazgo interesante fue que antes de morir, por parasitemia, los grupos de ratones que recibieron vehículo y *C. longa* a las concentraciones de 625, 1250, y 2500 mg/Kg desarrollaron hiperglicemia, mientras que en los grupos tratados con cloroquina, curcumina y *C. longa* (312 mg/Kg), la concentración de glucosa en sangre se mantuvo prácticamente constante (Figura 11). Este hallazgo sugiere que el efecto en el control de la glicemia depende de la concentración de algún componente en la planta o bien de la interacción con receptores dado que depende de la dosis.

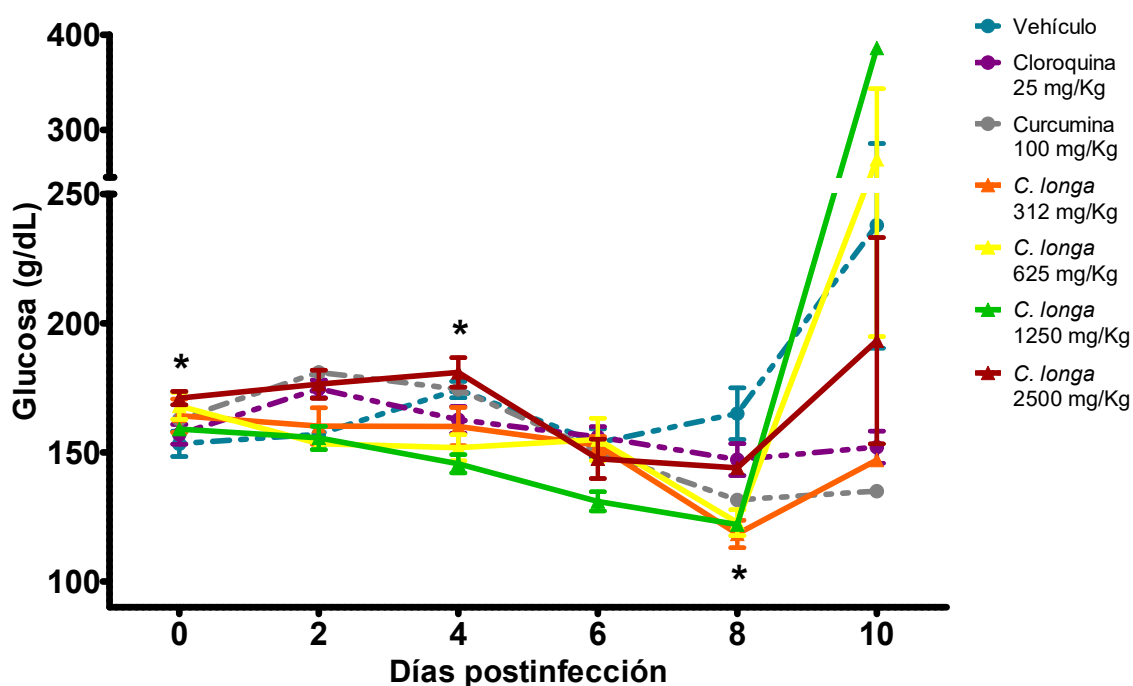


Figura 11 Efecto de administrar diferentes dosis de *Curcuma longa* sobre la concentración de glucosa en sangre periférica de ratones infectados con *P. berghei* ANKA. Siete grupos de ratones CBA/Ca machos (n=5) se trataron 4 veces (día 0-3) con: diferentes dosis de *C. longa*: (312, 625 1250 o 2500 mg/Kg), o con cloroquina (25mg/Kg), o con estándar de curcumina (100mg/Kg) o con vehículo. Cada punto representa la media de la concentración de glucosa de cada grupo y las barras representan el error estándar medio. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA de dos vías y Bonferroni que se calcularon con el programa GraphPadPrism 5.

Para cubrir el tercer objetivo “Determinar si existe efecto antimalárico sinérgico al combinar la administración de *Curcuma longa* y *Cymbopogon citratus* a partir de las dosis óptimas previamente establecidas”, se realizó una curva dosis respuesta que incluyó diferentes combinaciones de dosis de ambas plantas.

9.4. Curva de dosis respuesta para las diferentes mezclas de *Curcuma longa* y *Cymbopogon citratus*

Después de determinar la concentración óptima con actividad antimalárica de *C. longa* se realizó un experimento en el que se analizó el efecto de administrar mezclas de *C. longa* y *C. citratus* en diferentes proporciones, para determinar si el tratamiento con ambas plantas potencializaba el efecto antimalárico y de ser así, reducir la cantidad de planta requerida para el tratamiento.

Se evaluó el efecto antimalárico de *C. longa* y *C. citratus* a la dosis óptima de forma individual y el efecto antimalárico de cuatro mezclas en diferentes porcentajes de la dosis óptima de cada planta (80:20, 60:40, 40:60, 20:80 *C. longa*: *C. citratus* respectivamente) se utilizó el esquema propuesto por Tallarida (51), además se utilizaron como grupos control para el efecto antimalárico a ratones que recibieron únicamente vehículo (control negativo) o cloroquina (control positivo).

Se cuantificó la parasitemia para evaluar el efecto antimalárico; para evaluar la gravedad de la infección se evaluó: la sobrevida, la variación de peso, la variación de la temperatura, la concentración de hemoglobina y la concentración de glucosa.

9.4.1. Sobrevida de los grupos que recibieron diferentes combinaciones de *C. longa* y *C. citratus*

Diariamente se registró la sobrevida en todos los grupos de ratones. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la sobrevida entre los grupos tratados con las mezclas de plantas en comparación con el control negativo que recibió vehículo (Figura 12), este resultado sugiere que los componentes de las plantas podrían neutralizarse o ser antagonistas.

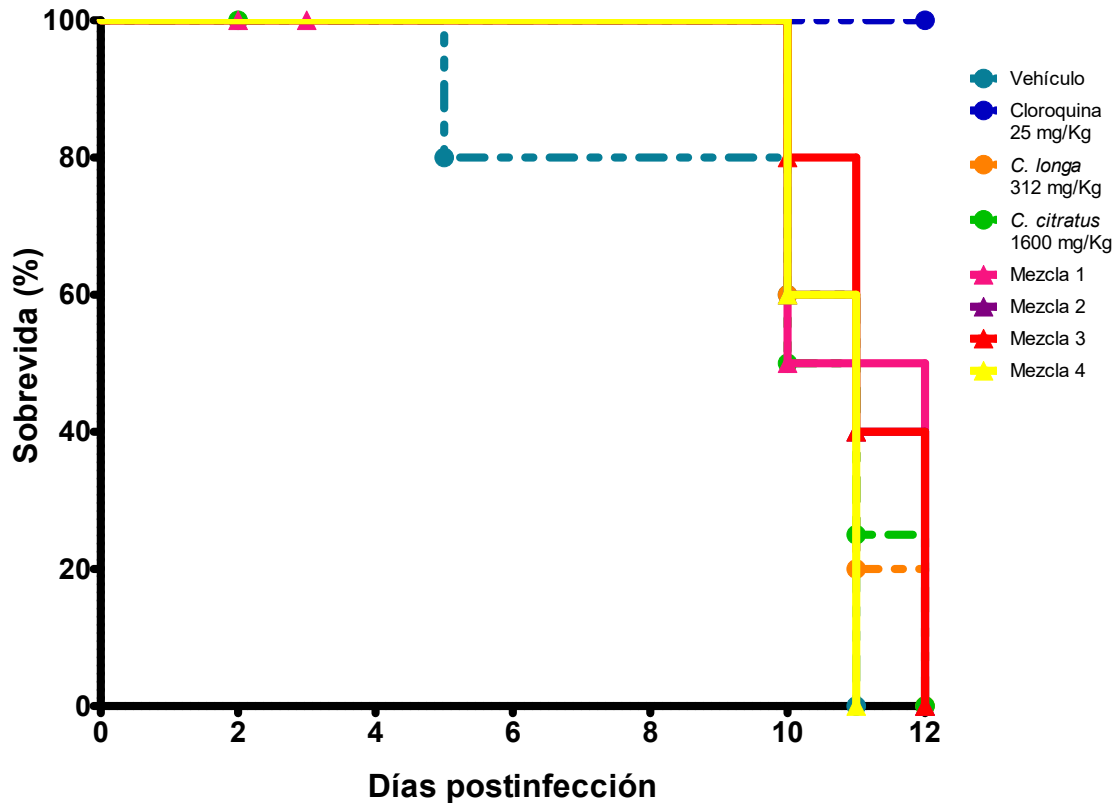


Figura 12 Efecto de la administración de diferentes mezclas de *Curcuma longa* y *Cymbopogon citratus* sobre la sobrevivida de ratones infectados con *P. berghei* ANAKA. Ocho grupos de ratones CBA/Ca machos (n=5) se trataron 4 veces (día 0-3) con: vehículo, o cloroquina (25mg/Kg), o *C. longa* (312 mg/Kg), o *Cymbopogon citratus* (1600mg/Kg) o diferentes mezclas de ambas plantas: mezcla 1 (62 mg/Kg *C. longa* + 1280 mg/Kg *C. citratus*), mezcla 2 (124.8 mg/Kg *C. longa* + 960 mg/Kg *C. citratus*), mezcla 3 (187.2 mg/Kg *C. longa* + 640 mg/Kg *C. citratus*) y mezcla 4 (249.6 mg/Kg *C. longa* + 320 mg/Kg *C. citratus*), para el análisis estadístico se utilizó la prueba de Kaplan Meier que se calculó con el programa GraphPadPrism 5

9.4.2. Parasitemia de los grupos que recibieron diferentes combinaciones de *C. longa* y *C. citratus*

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en las parasitemias de los grupos tratados con las diferentes mezclas (Figura 13), al realizar el cálculo de la supresión de la parasitemia se determinó que al noveno día postinfección, que corresponde al día en que el control negativo presentó un pico en la parasitemia y aún tenía una “n” representativa, el grupo tratado con la mezcla 3 (*C. longa* 187mg/Kg y *C. citratus* 640 mg/Kg) tuvo la mayor supresión de la parasitemia en comparación con las otras mezclas. Sin embargo, no detectamos diferencia significativa con respecto al grupo que únicamente recibió *C. citratus*, y fue significativamente mayor con respecto al grupo que recibió *C. longa* (Figura 14). Este resultado confirma que los metabolitos de ambas plantas administradas juntas antagonizan la actividad antimalárica de las plantas por separado.

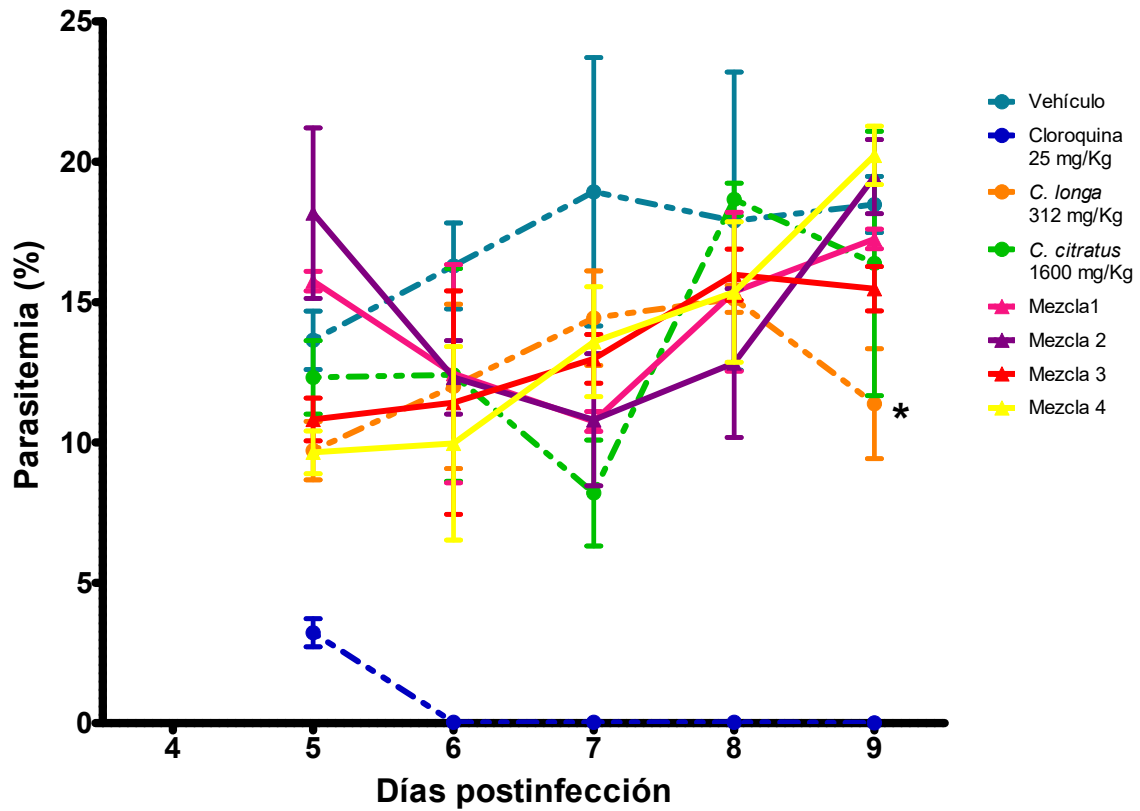


Figura 13 Efecto de la administración de diferentes mezclas de *Curcuma longa* y *Cymbopogon citratus* sobre la parasitemia de ratones infectados con *P. berghei* ANKA. Ocho grupos de ratones CBA/Ca machos (n=5) se trataron 4 veces (día 0-3) con: vehículo, cloroquina (25mg/Kg), *C. longa* (312 mg/Kg), *Cymbopogon citratus* (1600mg/Kg) o diferentes mezclas de ambas plantas, mezcla 1 (62 mg/Kg *C. longa* + 1280 mg/Kg *C. citratus*), mezcla 2 (124.8 mg/Kg *C. longa* + 960 mg/Kg *C. citratus*), mezcla 3 (187.2 mg/Kg *C. longa* + 640 mg/Kg *C. citratus*) y mezcla 4 (249.6 mg/Kg *C. longa* + 320 mg/Kg *C. citratus*), * indica diferencia estadísticamente significativa, para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de dos vías y la prueba Bonferroni, y realizó con el programa GraphPadPrism 5

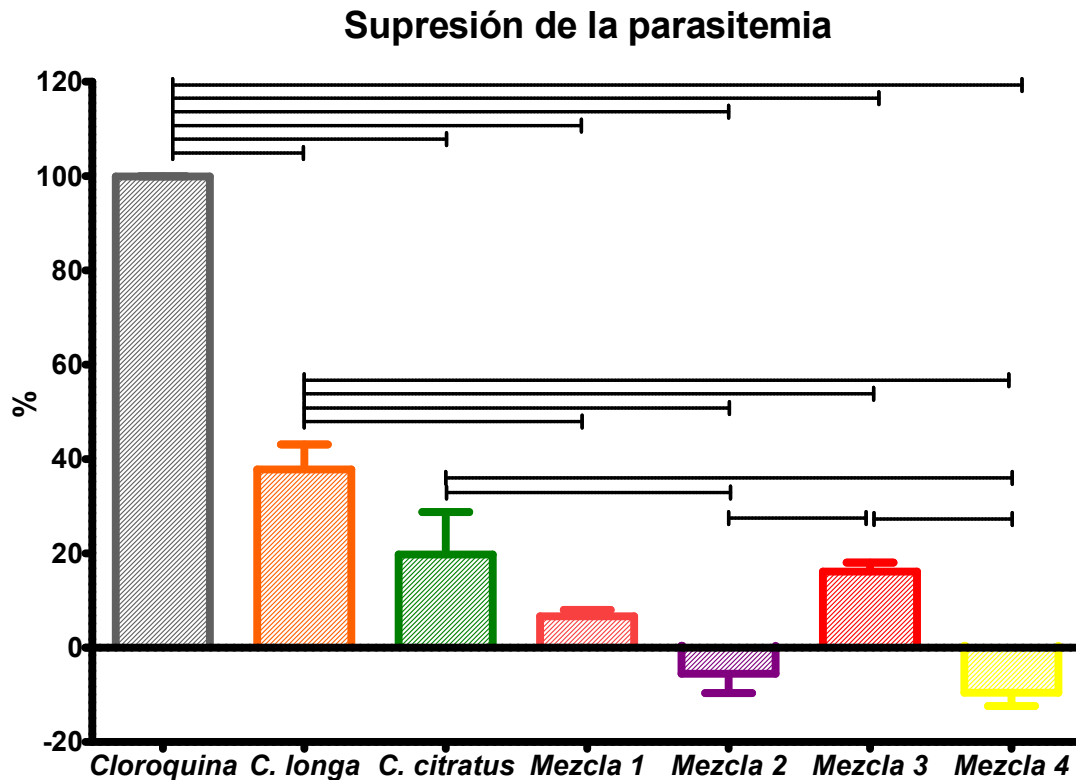


Figura 14 Efecto de la administración de diferentes mezclas de *Curcuma longa* y *Cymbopogon citratus* sobre la supresión de la parasitemia de ratones infectados con *P. berghei* ANKA tratados con diferentes mezclas *Curcuma longa* y *Cymbopogon citratus*. Ocho grupos de ratones CBA/Ca machos (n=5) se trataron 4 veces (día 0-3) con: vehículo, o cloroquina (25mg/Kg), o *C. longa* (312 mg/Kg), o *Cymbopogon citratus* (1600mg/Kg) o diferentes mezclas de ambas plantas, mezcla 1 (62 mg/Kg *C. longa* + 1280 mg/Kg *C. citratus*), mezcla 2 (124.8 mg/Kg *C. longa* + 960 mg/Kg *C. citratus*), mezcla 3 (187.2 mg/Kg *C. longa* + 640 mg/Kg *C. citratus*) y mezcla 4 (249.6 mg/Kg *C. longa* + 320 mg/Kg *C. citratus*), las barras horizontales indican diferencia estadísticamente significativa, para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de dos vías y la prueba Bonferroni, el cálculo se realizó con el programa GraphPadPrism 5.

Para cubrir el objetivo 5, “*Evaluar el efecto de C. longa y C. citratus administradas solas o en combinación sobre la respuesta inmune de ratones infectados con P. berghei ANKA*”, se procedió a administrar únicamente las dosis óptimas antimaláricas por separado y una combinación de ambas, se evaluó su efecto sobre: las poblaciones de la respuesta inmune en el bazo y sobre la concentración de citocinas pro y anti-inflamatorias como se describe a continuación.

9.5. Evaluación del efecto de *Curcuma longa* y *Cymbopogon citratus* sobre la respuesta inmune de ratones infectados con *P. berghei* ANKA

En el experimento anterior se determinó que el tratamiento con la combinación de *C. longa* y *C. citratus* no generó sinergia. Sin embargo, faltó determinar si el efecto antimalárico de ambas plantas se debía a que modificaban la respuesta inmune del hospedero. Para responder a esta pregunta se infectaron cinco grupos de ratones CBA/Ca

machos (n = 7) de seis semanas de edad con *Plasmodium berghei* ANKA, cada grupo recibió uno de los siguientes tratamientos: vehículo, cloroquina (25 mg/Kg), *Curcuma longa* (312 mg/Kg), *Cymbopogon citratus* (1600 mg/Kg) o una mezcla de ambas plantas (*C. longa* 312 mg/Kg + *C. citratus* 1600 mg/Kg), lo que correspondió a las dosis antimaláricas óptimas de cada una de las plantas determinadas en los experimentos anteriores; además se trabajó con cinco grupos de ratones que recibieron el mismo tratamiento pero no se infectaron con *P. berghei* ANKA, para determinar el efecto sobre la respuesta inmune en ratones no infectados. Los ratones se sacrificaron al octavo día postinfección o su equivalente y se extrajeron el bazo y la sangre; en el bazo se evaluó el índice esplénico y el porcentaje de linfocitos T y B, macrófagos y células NK mientras que en la sangre se cuantificó la concentración plasmática de TNF- α , INF- γ y de las interleucinas 2, 4, 6, 10 y 17 mediante citometría de flujo.

9.5.1. Parasitemia de ratones infectados con *P. berghei* ANKA tratados con las dosis óptimas de *C. longa* y *C. citratus* solas y en combinación

La administración de *C. longa* y *C. citratus* solas o en combinación retrasó la aparición de la parasitemia, misma que se hizo evidente hasta el día 7 post infección. En los días 7 y 8 post infección la parasitemia de los grupos que recibieron *C. longa* y *C. citratus* por separado fue significativamente menor en comparación con el grupo control negativo (que únicamente recibió vehículo). El octavo día postinfección la parasitemia del grupo tratado con la mezcla de ambas plantas (312 mg/Kg de *C. longa* + 1600 mg/Kg de *C. citratus*) fue significativamente mayor en comparación con el control positivo (cloroquina 25 mg/Kg) y con los grupos que recibieron las plantas por separado (Figura 15). Como consecuencia, la supresión de la parasitemia fue menor al administrar ambas plantas en comparación con la administración de cada planta por separado (Figura 16).

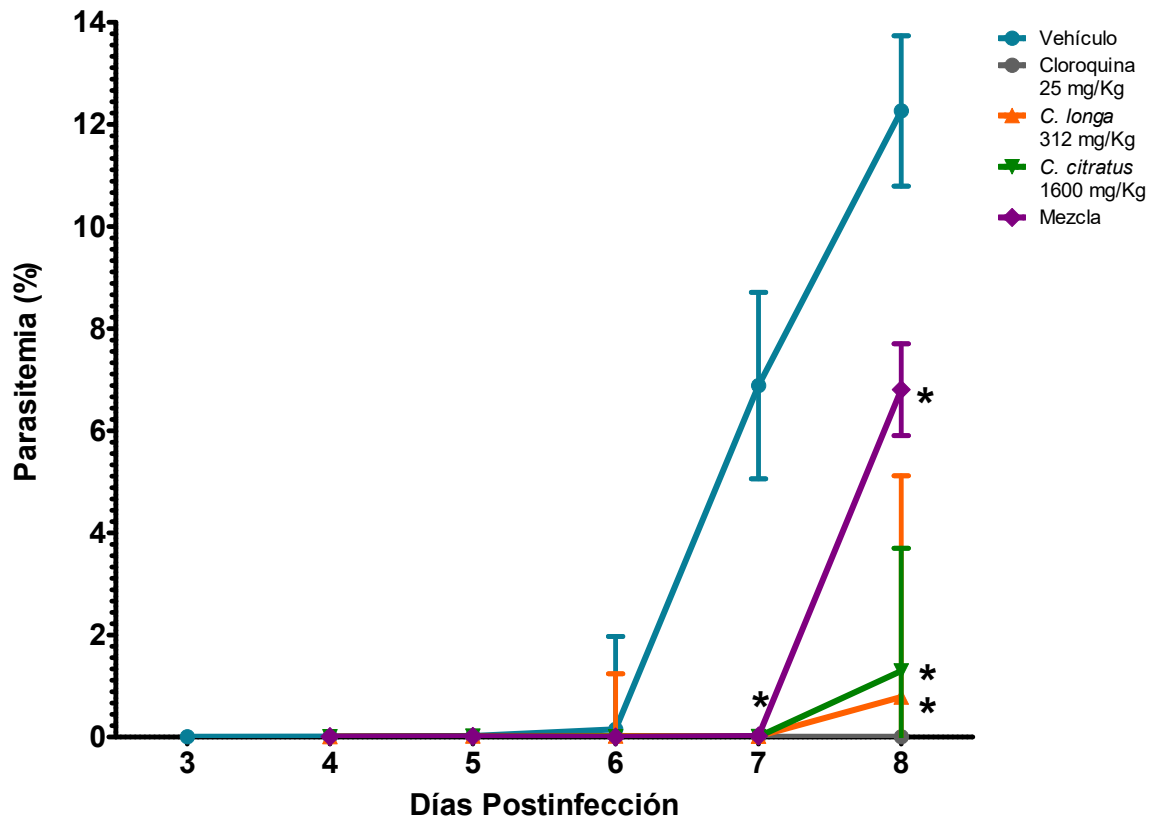


Figura 15 Efecto de la administración de *Curcuma longa* y/o *Cymbopogon citratus* solas o combinadas sobre la parasitemia de ratones infectados con *P. berghei* ANKA. Cinco grupos de ratones CBA/Ca machos (n=7) se trataron 4 veces (día 0-3) con: vehículo, o con cloroquina (25mg/Kg), o con *C. longa* (312 mg/Kg), o con *Cymbopogon citratus* (1600mg/Kg) o con una mezcla de cada planta (312 mg/Kg *C. longa* + 1600 mg/Kg *C. citratus*), cada punto representa la media geométrica de la parasitemia para cada grupo, las barras denotan la desviación estándar, * indica diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo control negativo. Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de dos vías y la prueba Bonferroni, y realizó con el programa GraphPadPrism 5.

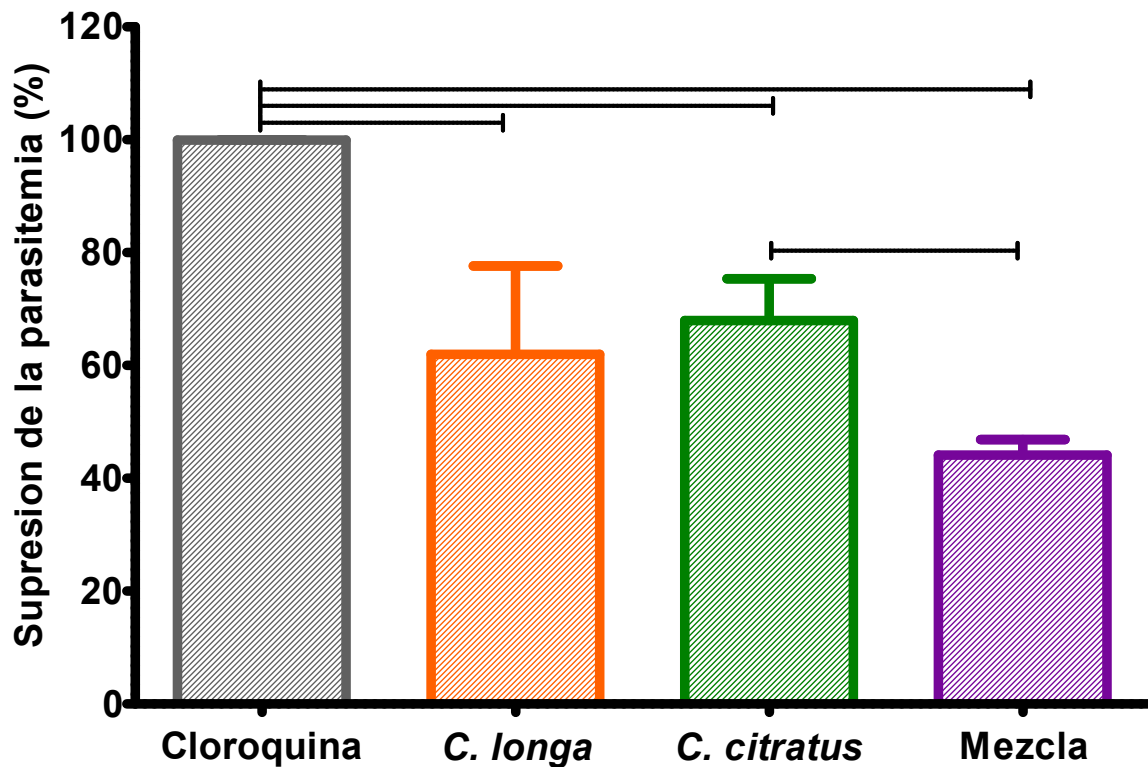


Figura 16 Efecto de la administración de *Curcuma longa* y/o *Cymbopogon citratus* solas o combinadas sobre la supresión de la parasitemia de ratones infectados con *P. berghei* ANKA al octavo día postinfección. Cinco grupos de ratones CBA/Ca machos (n=7) se trataron 4 veces (día 0-3) con vehículo, cloroquina (25mg/Kg), *C. longa* (312 mg/Kg), *Cymbopogon citratus* (1600mg/Kg) o la mezcla de la dosis antimalárica óptima de cada planta (312 mg/Kg *C. longa* + 1600 mg/Kg *C. citratus*). Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de dos vías y la prueba Bonferroni, el cálculo se realizó con el programa GraphPadPrism 5.

9.5.2. Variación del peso de ratones tratados con las dosis óptimas de *C. longa* y *C. citratus* por separado y en combinación en ratones sanos e infectados con *P. berghei* ANKA

Se evaluó el efecto de *C. longa* y *C. citratus* administradas por separado y combinadas sobre el peso corporal. Este análisis se realizó en grupos de ratones sin infección para determinar el efecto de las plantas sobre el peso corporal ya que se utilizan para bajar de peso. También se analizó el efecto de las plantas por separado y combinadas en ratones infectados con *P. berghei* ANKA. Los ratones sin infección incrementaron importantemente su peso corporal a medida que transcurrieron los días. Sin embargo, el peso promedio de los ratones tratados con *C. longa* o *C. citratus* por separado fue significativamente menor en comparación con los ratones sanos del grupo control negativo (tratado con vehículo) y los ratones tratados con la mezcla de ambas las plantas (Figura 17)

Cuando se analizó el efecto de ambas plantas administradas por separado o combinadas sobre el peso corporal de los ratones infectados con *P. berghei* ANKA detectamos que los ratones infectados y tratados con *C. longa* incrementaron significativamente el peso corporal en comparación con el grupo de ratones infectados tratados con *C. citratus* y con los grupos control infectados tratados con cloroquina o con vehículo. La variación en el peso corporal del grupo infectado tratado con la mezcla de ambas plantas no difirió del grupo infectado tratado únicamente con *C. citratus* (Figura 18).

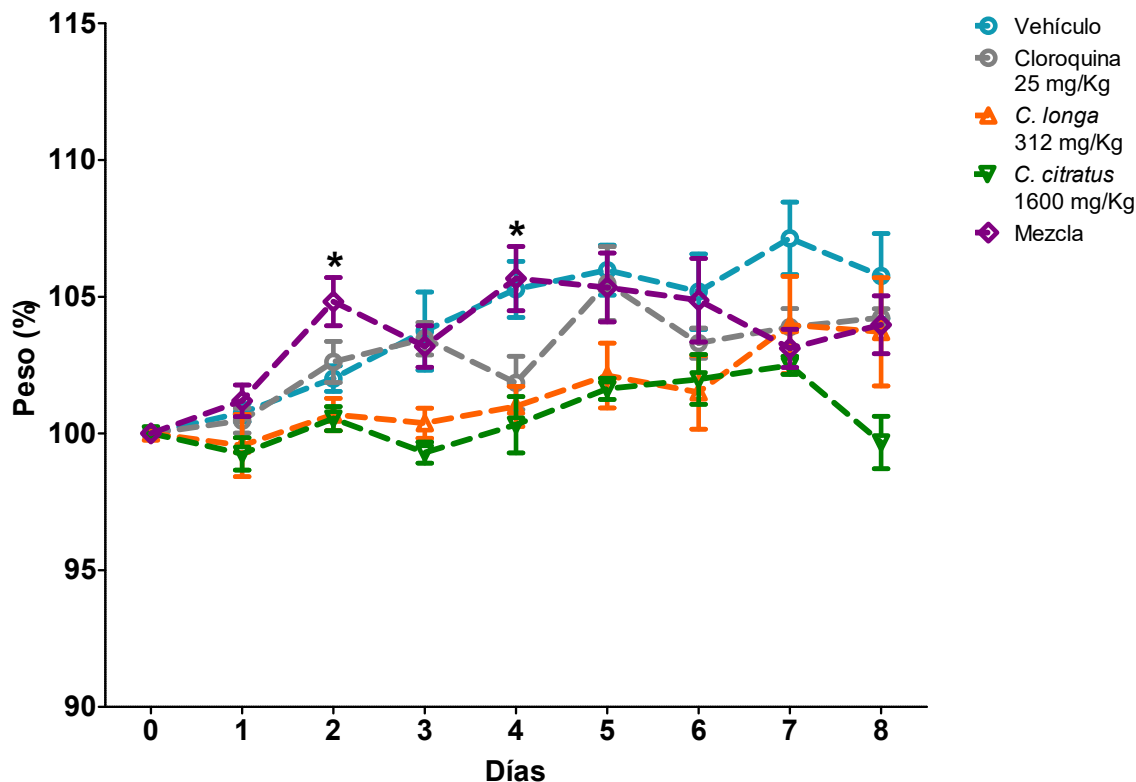


Figura 17 Efecto de *Curcuma longa* y/o *Cymbopogon citratus*, administradas solas o en combinación, sobre el peso de ratones sin infección. Cinco grupos de ratones CBA/Ca machos (n=7) se trataron 4 veces (día 0-3) con: vehículo, *C. longa* (312 mg/Kg), o *Cymbopogon citratus* (1600mg/Kg) o la combinación de ambas plantas (312 mg/Kg *C. longa* + 1600 mg/Kg *C. citratus*). El peso registrado en el día que inició el experimento se consideró como el 100% (día cero), diariamente se calculó el porcentaje de pérdida o ganancia con respecto al día cero. Cada punto representa la media y el error estándar medio de cada grupo, * indica diferencia estadísticamente significativa. Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de dos vías y la prueba Bonferroni, el cálculo se realizó con el programa GraphPadPrism 5.

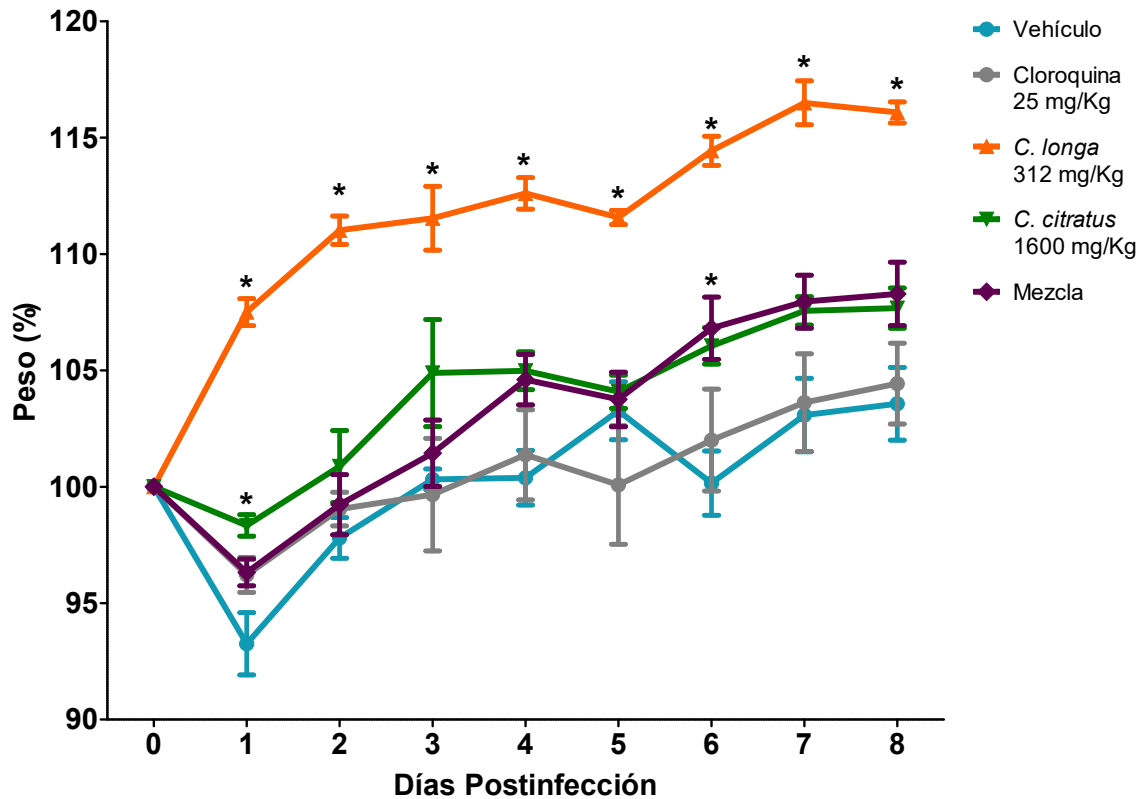


Figura 18 Efecto de *Curcuma longa* y/o *Cymbopogon citratus*, administradas solas o en combinación, sobre el peso corporal de ratones infectados con *P. berghei* ANKA. Cinco grupos de ratones CBA/Ca machos (n=7) se trataron 4 veces (día 0-3) con vehículo, cloroquina (25mg/Kg), *C. longa* (312 mg/Kg), *Cymbopogon citratus* (1600mg/Kg) o una mezcla de ambas plantas (312 mg/Kg *C. longa* + 1600 mg/Kg *C. citratus*). El peso registrado en el día de la infección se consideró como el 100% (día cero). Diariamente, se calculó el porcentaje de pérdida o ganancia con respecto al día cero. Cada punto representa la media y el error estándar medio de cada grupo, * indica diferencia estadísticamente significativa. Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de dos vías y la prueba Bonferroni, los cálculos se realizaron con el programa GraphPadPrism 5.

9.5.3. Efecto de *C. longa* y *C. citratus* sobre el índice esplénico de ratones infectados con *P. berghei* ANKA

Medir el índice esplénico permite determinar la proliferación celular en bazo, así como la inflamación en respuesta a la infección con *Plasmodium*. Dado que tanto *C. longa* como *C. citratus* poseen propiedades antiinflamatorias (25, 34), en este trabajo evaluamos si su administración individual o en combinación modificaba el índice esplénico de ratones no infectados y en ratones infectados con *Plasmodium berghei* ANKA.

La infección aumentó significativamente el índice esplénico en todos los grupos infectados. Este resultado se esperaba puesto que la infección causa esplenomegalia (6). La administración de las plantas solas o combinadas disminuyó el índice esplénico en comparación con el grupo que recibió vehículo, sin embargo, la diferencia no resultó

estadísticamente significativa. El índice esplénico de los ratones tratados con las plantas fue mayor que el grupo control positivo tratado con cloroquina-(Figura 19).

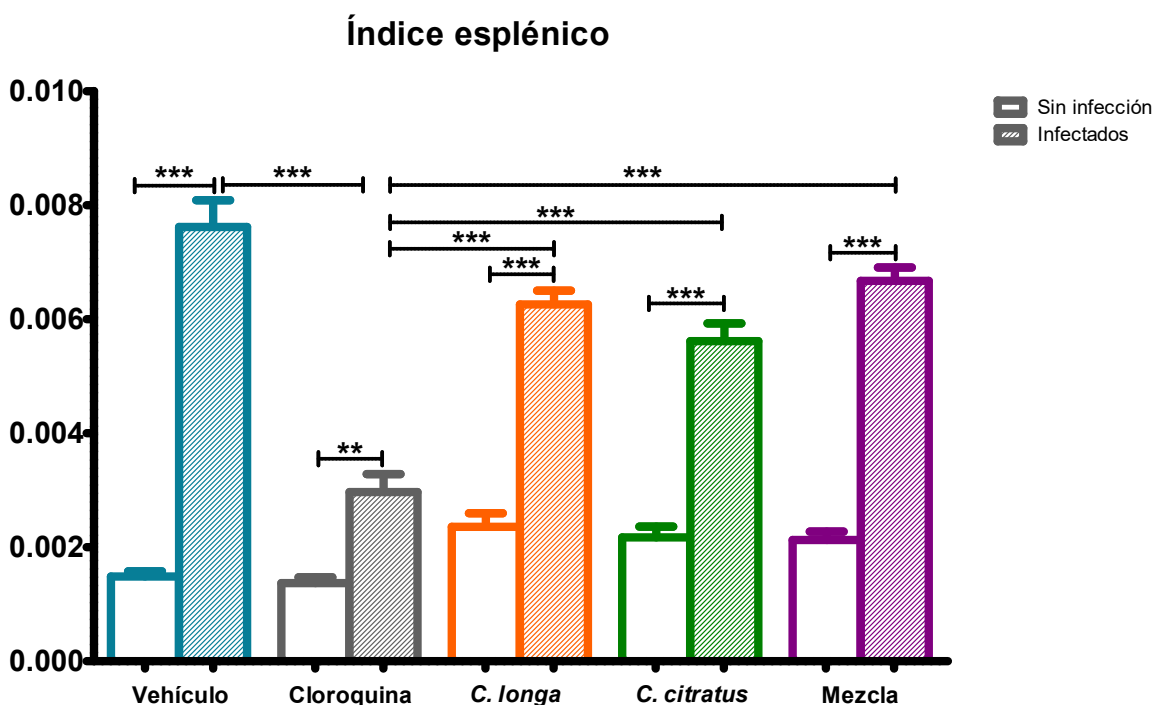


Figura 19 Efecto de la administración de *Curcuma longa* y/o *Cymbopogon citratus*, solas o combinadas, sobre el índice esplénico de ratones sin infección o infectados con *P. berghei* ANKA en el octavo día postinfección. Diez grupos de ratones CBA/Ca machos (n=14) se trataron 4 veces (día 0-3) con: vehículo, o con cloroquina (25mg/Kg), o con *C. longa* (312 mg/Kg), o con *Cymbopogon citratus* (1600mg/Kg) o con la mezcla de ambas plantas (312 mg/Kg *C. longa* + 1600 mg/Kg *C. citratus*). Las barras blancas representan el promedio del índice esplénico en los grupos de ratones no infectados, mientras que las barras rayadas representan el promedio del índice esplénico en los grupos de ratones infectados, el * indica diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de dos vías y la prueba Bonferroni, el cálculo se realizó con el programa GraphPadPrism 5.

9.5.4. Efecto de la administración de *C. longa* y/o *C. citratus* sobre las poblaciones celulares CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD19⁺, CD107b⁺ y CD16⁺/CD32⁺ en el bazo de ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA

El número de células en bazo aumenta en respuesta a un incremento en la parasitemia, este fenómeno se asocia con la expansión de la pulpa roja por un aumento en la población de macrófagos que fagocitan eritrocitos parasitados (6). En este trabajo analizamos si la administración de *C. longa* o *C. citratus* modifican las poblaciones de las células CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD220⁺ y CD107b⁺ y CD16⁺/CD32⁺ en el bazo de ratones infectados con *P. berghei* ANKA.

La infección disminuyó la población CD3⁺ en todos los grupos de ratones a excepción del grupo control tratado con cloroquina en el que se detectó un incremento significativo en

esta población. La administración de *C. longa* o *C. citratus* solas o combinadas, no modificó significativamente el porcentaje de células CD3⁺ (Figura 20).

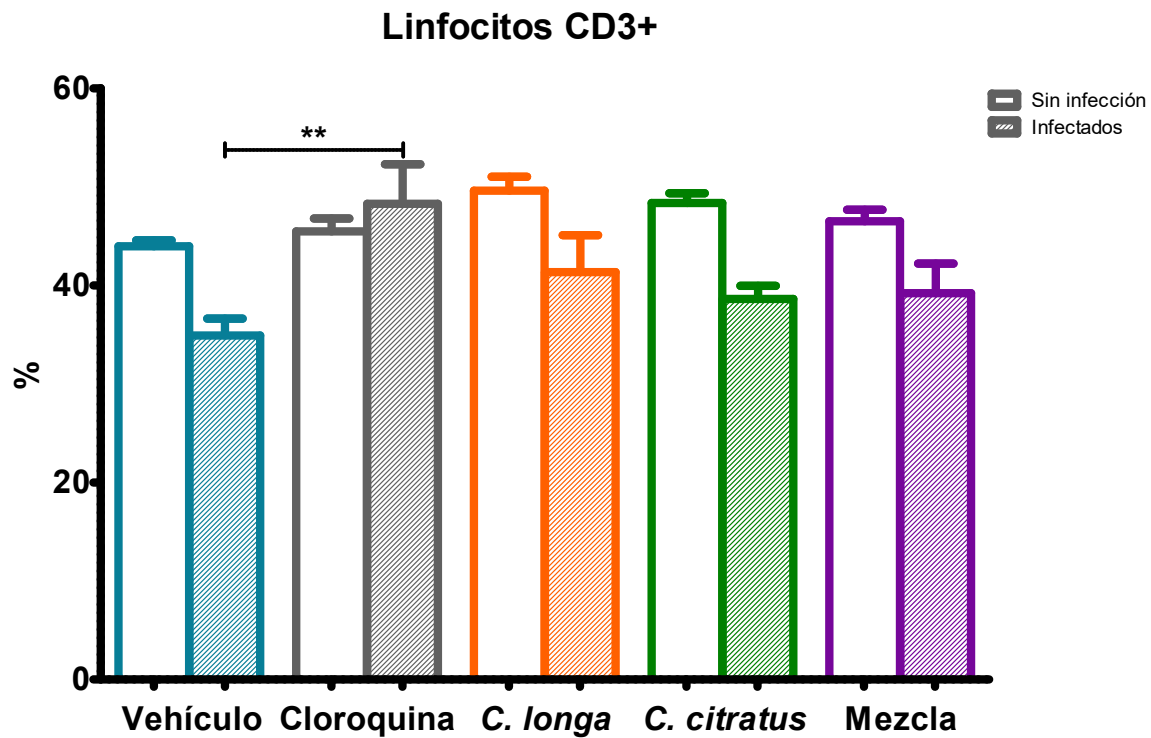


Figura 20 Efecto de la administración de *Curcuma longa* y/o *Cymbopogon citratus* sobre el porcentaje de células CD3⁺ en el bazo de ratones sin infección o infectados con *P. berghei* ANKA en el octavo día postinfección. Diez grupos de ratones CBA/Ca machos (n=14) se trataron 4 veces (día 0-3) con: vehículo, o con cloroquina (25mg/Kg), o con *C. longa* (312 mg/Kg), o con *Cymbopogon citratus* (1600mg/Kg) o con una mezcla de ambas plantas (312 mg/Kg *C. longa* + 1600 mg/Kg *C. citratus*). La mitad de los ratones de cada grupo no se infectó con el parásito (barras blancas) y la otra mitad de ratones se infectó con *P. berghei* ANKA (barras rayadas), la línea horizontal sobre las barras indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos indicados con una P<0.05, para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de dos vías y la prueba Bonferroni, el análisis se realizó con el programa GraphPadPrism 5.

En relación con la población CD3⁺CD4⁺ que corresponde a linfocitos T cooperadores, se detectó que la infección disminuyó significativamente esta población en todos los grupos a excepción del grupo que recibió cloroquina en donde esta población incrementó significativamente en comparación con el grupo que recibió vehículo. Interesantemente, la infección disminuyó significativamente la población de CD3⁺CD4⁺ en el grupo tratado con la mezcla de ambas plantas en comparación con el grupo que recibió cloroquina (Figura 21).

Linfocitos CD3+ CD4+

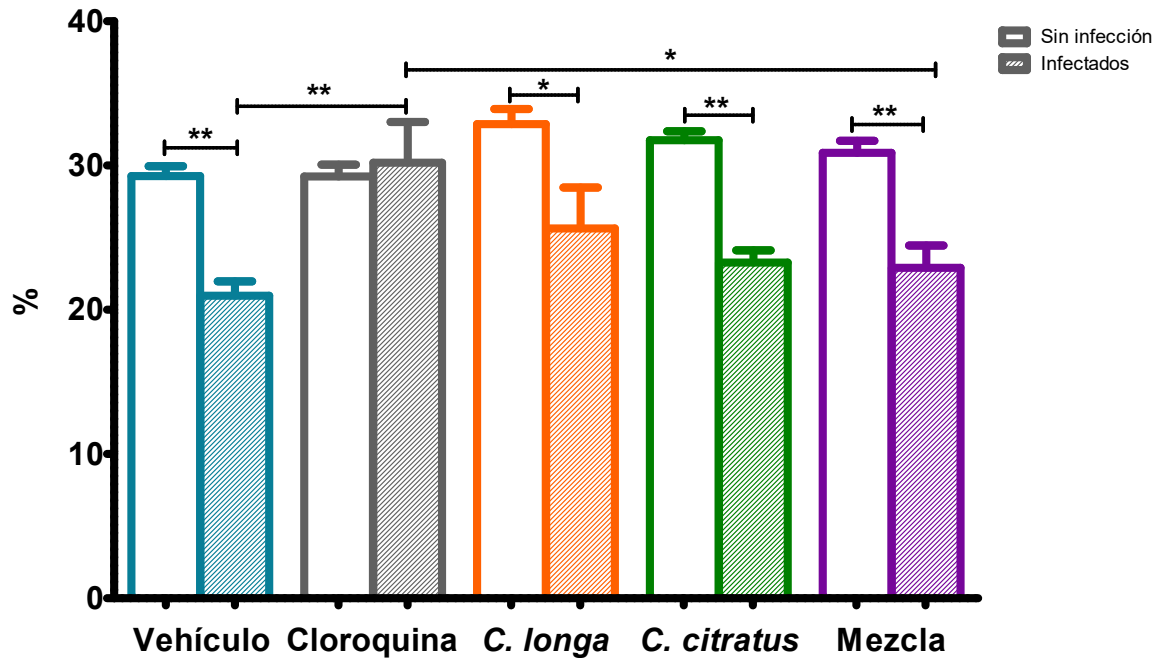


Figura 21 Efecto de la administración de *Curcuma longa* y/o *Cymbopogon citratus* sobre el porcentaje de células CD3+ CD4+ en el bazo de ratones sin infección o infectados con *P. berghei* ANKA en el octavo día postinfección. Diez grupos de ratones CBA/Ca machos (n=14) se trataron 4 veces (día 0-3) con: vehículo, o con cloroquina (25mg/Kg), o con *C. longa* (312 mg/Kg), o con *Cymbopogon citratus* (1600mg/Kg) o con la mezcla de la dosis óptima de ambas plantas (312 mg/Kg *C. longa* + 1600 mg/Kg *C. citratus*). La mitad de los ratones de cada grupo no se infectó con el parásito (barras blancas) y la otra mitad de ratones se infectó con *P. berghei* ANKA (barras rayadas), para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de dos vías y la prueba Bonferroni, el cálculo se realizó con el programa GraphPadPrism 5.

En relación con la población CD3+CD8+ que corresponde a linfocitos T citotóxicos, detectamos que la infección disminuyó el porcentaje de estas células en los ratones control infectados tratados con vehículo. Interesantemente, ambos grupos: el grupo infectado tratado con cloroquina y el grupo infectado tratado con *C. longa* incrementaron significativamente esta población celular con relación al grupo control tratado con vehículo (Figura 22).

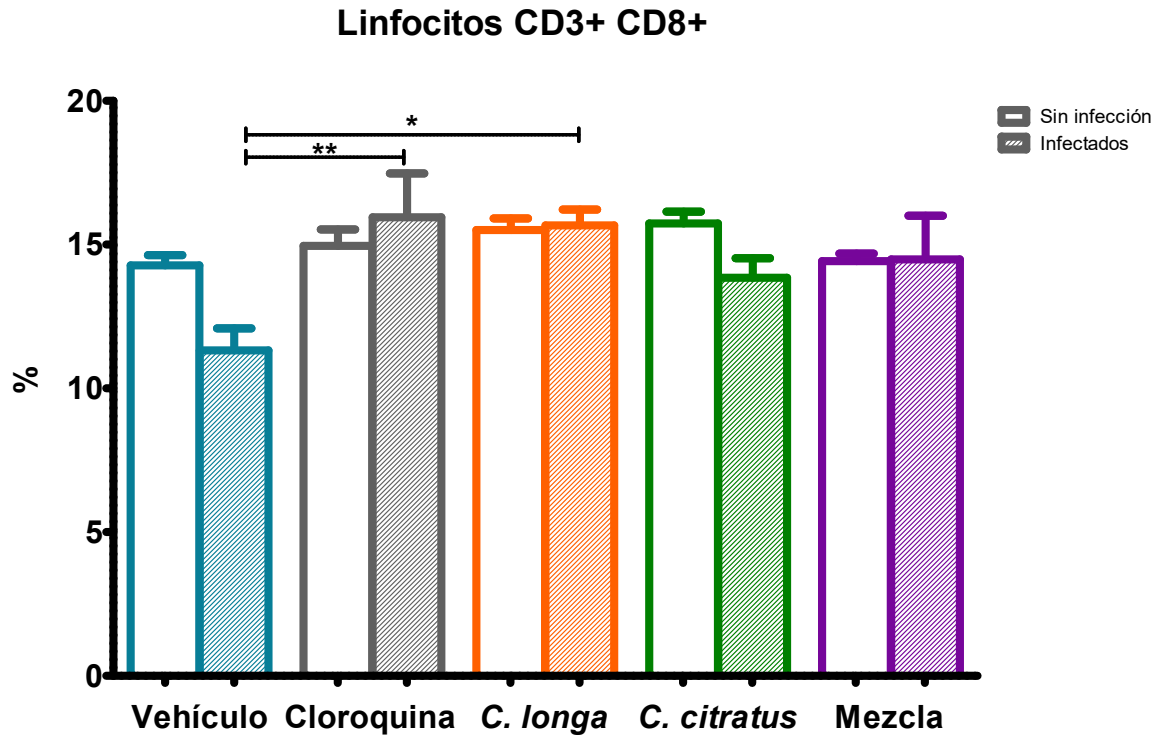


Figura 22 Efecto de la administración de *Curcuma longa* y/o *Cymbopogon citratus* sobre el porcentaje de células CD3+ CD8+ en el bazo de ratones sin infección o infectados con *P. berghei* ANKA en el octavo día postinfección. Diez grupos de ratones CBA/Ca machos (n=14) se trataron 4 veces (día 0-3) con vehículo, cloroquina (25mg/Kg), *C. longa* (312 mg/Kg), *Cymbopogon citratus* (1600mg/Kg) o una-mezcla con la dosis antimalárica óptima de ambas plantas (312 mg/Kg *C. longa* + 1600 mg/Kg *C. citratus*). La mitad de los ratones de cada grupo no se infectó con el parásito (barras blancas) y la otra mitad se infectó con *P. berghei* ANKA (barras rayadas), la barra horizontal indica diferencia estadísticamente significativa para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de dos vías y la prueba Bonferroni, el análisis se realizó con el programa GraphPadPrism 5.

En relación con la población CD19⁺ que corresponde a los linfocitos B. La infección disminuyó significativamente el porcentaje de esta población en todos los grupos a excepción del grupo tratado con *C. citratus*. Interesantemente, los ratones sin infección tratados con *C. citratus* también disminuyeron esta población (Figura 23).

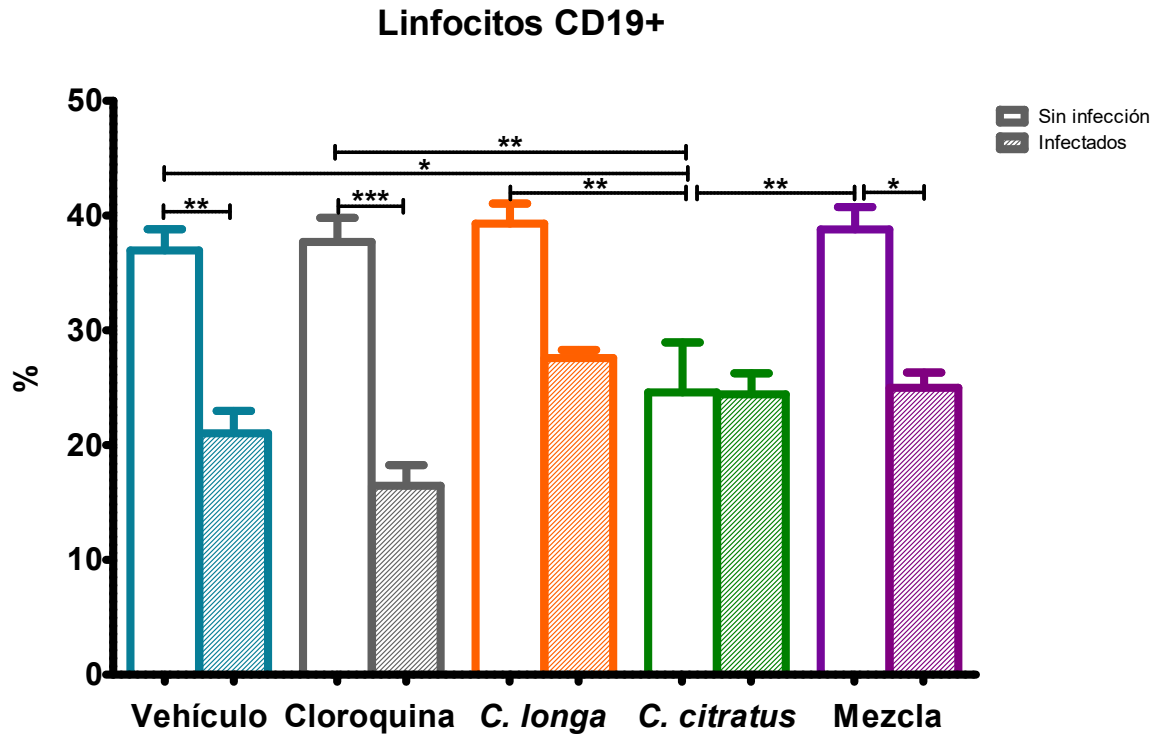


Figura 23 Efecto de la administración de *Curcuma longa* y/o *Cymbopogon citratus* sobre el porcentaje de células CD19+ en el bazo de ratones sin infección o infectados con *P. berghei* ANKA en el octavo día postinfección. Diez grupos de ratones CBA/Ca machos (n=14) se trataron 4 veces (día 0-3) con: vehículo, o con cloroquina (25mg/Kg), o con *C. longa* (312 mg/Kg), o con *Cymbopogon citratus* (1600mg/Kg) o con una mezcla de la dosis antimalárica óptima de ambas plantas (312 mg/Kg *C. longa* + 1600 mg/Kg *C. citratus*). La mitad de los ratones de cada grupo no se infectó con el parásito (barras blancas) y la otra mitad se infectó con *P. berghei* ANKA (barras rayadas), para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de dos vías y la prueba Bonferroni, el cálculo se realizó con el programa GraphPadPrism 5.

Para identificar la población de macrófagos en el bazo se utilizó el marcador CD107b (Mac-3), el cual es una glicoproteína de membrana expresada en la membrana plasmática de los macrófagos. En relación con esta población celular en bazo, se detectó que la infección disminuyó el porcentaje de células CD107b⁺ en todos los grupos analizados. Sin embargo, la disminución solo fue estadísticamente significativa en el grupo que recibió *C. longa*. Además, no se detectaron diferencias significativas entre los diferentes grupos (Figura 24), lo que sugiere que la administración de ambas plantas no tiene efecto en el porcentaje de esta población celular en los ratones infectados con *P. berghei* ANKA.

Células CD107b+

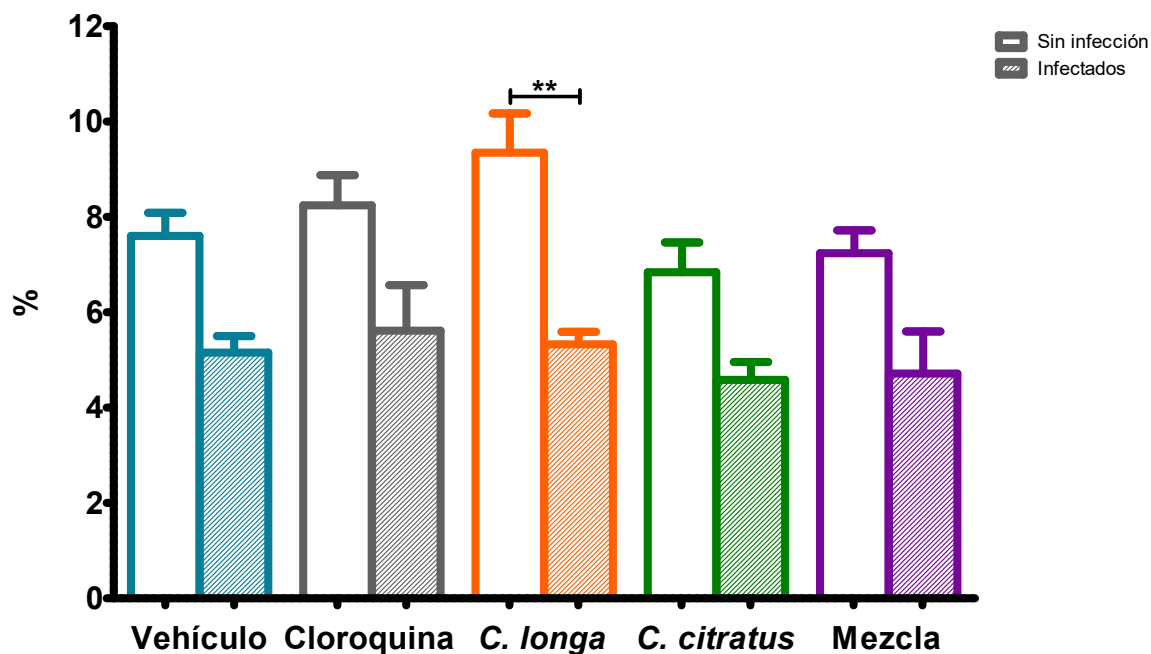


Figura 24 Efecto de la administración de *Curcuma longa* y/o *Cymbopogon citratus* sobre el porcentaje de células CD107b+ en el bazo de ratones sin infección o infectados con *P. berghei* ANKA en el octavo día postinfección. Diez grupos de ratones CBA/Ca machos (n=14) se trataron 4 veces (día 0-3) con: vehículo, o con cloroquina (25mg/Kg), o con *C. longa* (312 mg/Kg), o con *Cymbopogon citratus* (1600mg/Kg) o con una mezcla de la dosis antimalárica óptima de cada planta-(312 mg/Kg *C. longa* + 1600 mg/Kg *C. citratus*). La mitad de los ratones de cada grupo no se infectó con el parásito (barras blancas) y la otra mitad de ratones se infectó con *P. berghei* ANKA (barras rayadas), para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de dos vías y la prueba Bonferroni, el análisis estadístico se realizó con el programa GraphPadPrism 5.

Los resultados más interesantes en relación con las poblaciones celulares se obtuvieron cuando se cuantificó la población (CD16⁺/CD32⁺) que corresponde a células NK. La infección incrementó significativamente la población NK⁺ en los grupos de ratones infectados tratados con vehículo o infectados tratados con cloroquina. Interesantemente, en los grupos infectados tratados con las plantas ya sea solas o con la combinación, se detectó que la población NK disminuyó significativamente en los ratones sin infección, pero disminuyó aún más en los grupos de ratones infectados con *P. berghei* ANKA (Figura 25).

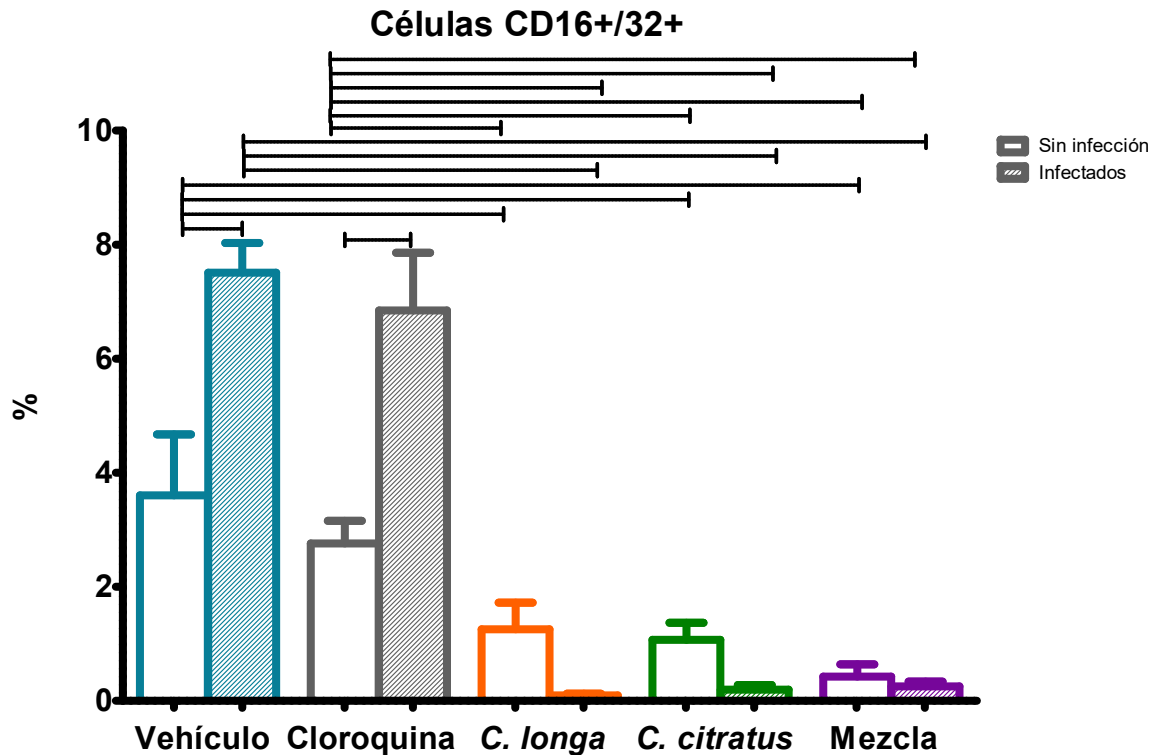


Figura 25 Efecto de la administración de *Curcuma longa* o *Cymbopogon citratus*, solas o en combinación, sobre el porcentaje de células CD16⁺/CD32⁺ en el bazo de ratones sin infección o infectados con *P. berghei* ANKA en el octavo día postinfección. Diez grupos de ratones CBA/Ca machos (n=7) se trataron 4 veces (día 0-3) con: vehículo, o con cloroquina (25mg/Kg), o con *C. longa* (312 mg/Kg), o con *Cymbopogon citratus* (1600mg/Kg), o con la mezcla de las dosis antimaláricas óptimas de ambas plantas (312 mg/Kg *C. longa* + 1600 mg/Kg *C. citratus*). La mitad de los ratones de cada grupo no se infectó con el parásito (barras blancas) y la otra mitad de ratones se infectó con *P. berghei* ANKA (barras rayadas), la barra horizontal indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos indicados, para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de dos vías y la prueba Bonferroni, el cálculo se realizó con el programa GraphPadPrism 5.

9.5.5. Efecto de la administración de *C. longa* y/o *C. citratus* en ratones infectados con *P.berghei* ANKA sobre la concentración sérica de citocinas

Las citocinas regulan la respuesta inmune al modular el crecimiento, diferenciación y función de las células involucradas en la inflamación (52), es por ello que evaluar la concentración sérica de citocinas pro- y anti-inflamatorias nos permitió determinar si la administración de las plantas modulaban las funciones de las poblaciones celulares a través de modificar la concentración de las citocinas.

La infección incrementó significativamente la concentración sérica de IL-10 a excepción del grupo tratado con cloroquina. El tratamiento con la mezcla de *C. longa* y *C. citratus* aumentó significativamente la concentración sérica de IL-10 en ratones infectados con *P. berghei* ANKA en comparación con los ratones infectados que recibieron vehículo o cloroquina (Figura 26). En general, el tratamiento con *C. longa* o con *C. citratus* también incrementó la concentración de IL-10 aunque no de forma significativa.

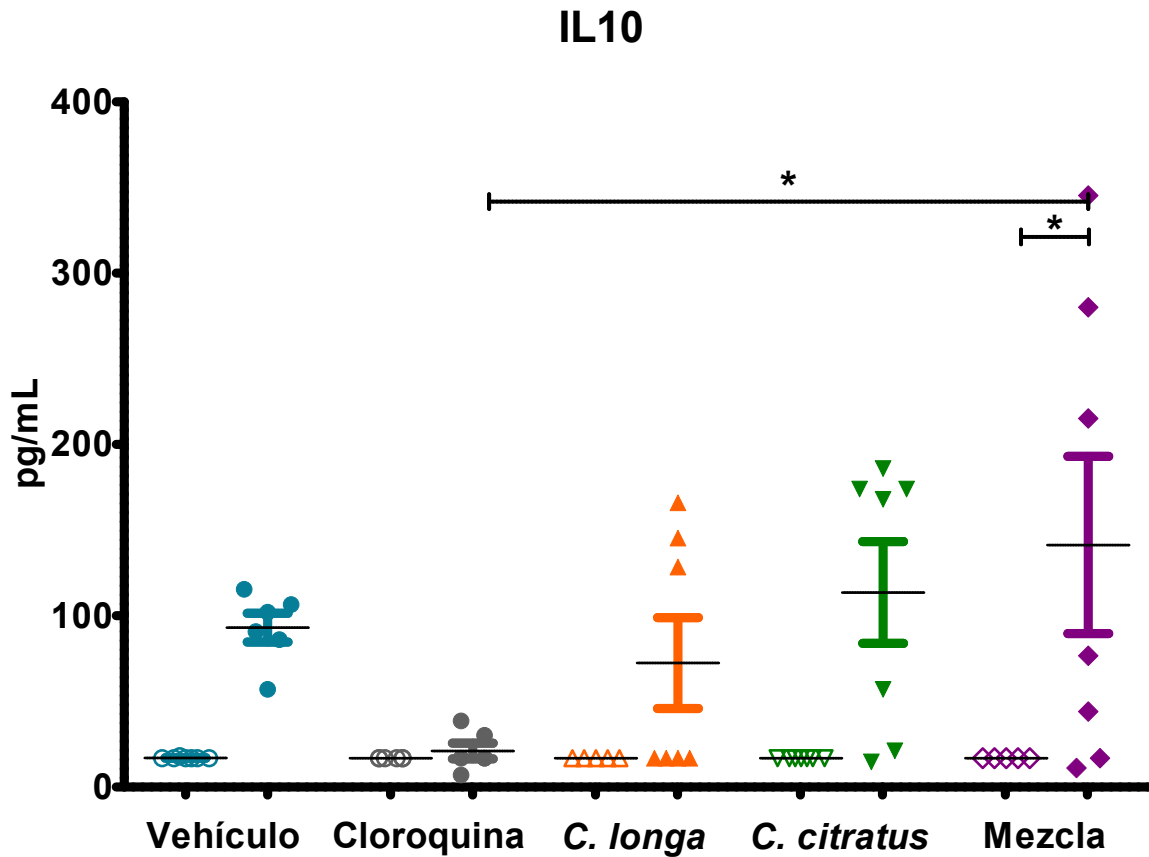


Figura 26 Efecto de la administración de *Curcuma longa* o *Cymbopogon citratus*, solas o en combinación, sobre la concentración sérica de IL-10 en ratones sin infección o infectados con *P. berghei* ANKA en el octavo día postinfección. Diez grupos de ratones CBA/Ca machos (n=7) se trataron 4 veces (día 0-3) con: vehículo, o con cloroquina (25mg/Kg), o con *C. longa* (312 mg/Kg), o con *Cymbopogon citratus* (1600mg/Kg), o con la mezcla de las dosis antimaláricas óptimas de ambas plantas (312 mg/Kg *C. longa* + 1600 mg/Kg *C. citratus*). La mitad de los ratones de cada grupo no se infectó con el parásito (símbolos sin relleno) y la otra mitad de ratones se infectó con *P. berghei* ANKA (símbolos con relleno), la barra horizontal indica diferencia estadísticamente significativa, para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de dos vías y la prueba Bonferroni, el cálculo se realizó con el programa GraphPadPrism 5.

La infección incrementó significativamente la concentración plasmática de IFN- γ en los grupos de ratones infectados con excepción del grupo tratado con cloroquina en el cual la concentración de IFN- γ se mantuvo en el límite de detección de la técnica. La administración de ambas plantas solas o combinadas incrementó la concentración de IFN- γ en comparación con el grupo tratado con cloroquina. Sin embargo, este incremento no resultó significativo cuando se comparó con el grupo que recibió vehículo (Figura 27).

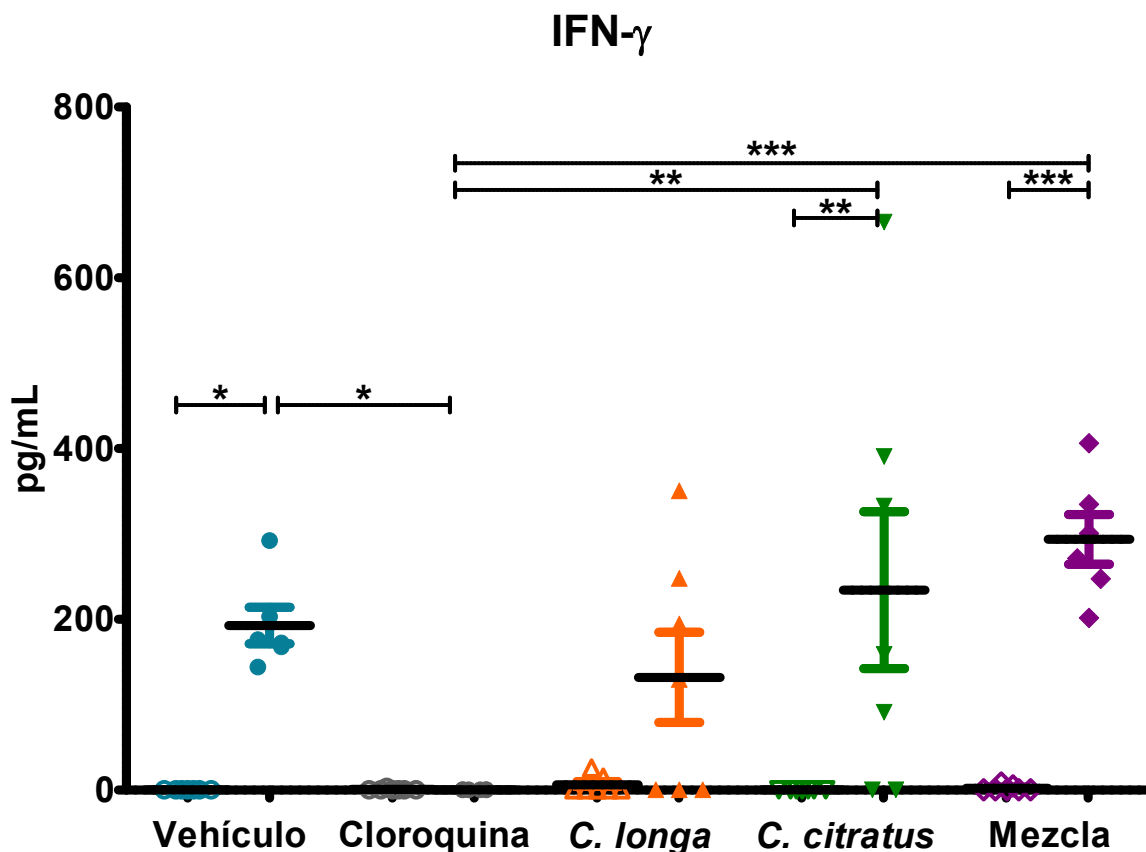


Figura 27 Efecto de la administración de *Curcuma longa* o *Cymbopogon citratus*, solas o en combinación, sobre la concentración sérica de IFN- γ en ratones sin infección o infectados con *P. berghei* ANKA en el octavo día postinfección. Diez grupos de ratones CBA/Ca machos (n=7) se trataron 4 veces (día 0-3) con: vehículo, o con cloroquina (25mg/Kg), o con *C. longa* (312 mg/Kg), o con *Cymbopogon citratus* (1600mg/Kg), o con la mezcla de las dosis antimaláricas óptimas de ambas plantas (312 mg/Kg *C. longa* + 1600 mg/Kg *C. citratus*). La mitad de los ratones de cada grupo no se infectó con el parásito (barras blancas) y la otra mitad de ratones se infectó con *P. berghei* ANKA (barras rayadas), la barra horizontal indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos indicados, para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de dos vías y la prueba Bonferroni, el cálculo se realizó con el programa GraphPadPrism 5.

El efecto más impactante de administrar *C. longa* y de *C. citratus* sobre la respuesta inmune y en particular sobre la concentración de citocinas fue el incremento en la concentración de TNF- α , que se detectó al administrar las plantas por separado o en combinación a los ratones infectados con *P. berghei* ANKA. Sin embargo, es importante indicar que no ocurrió en todos los ratones, por lo que este hallazgo hace importante repetir este experimento e incrementar el número de ratones en esos grupos, ya que se detectó una respuesta bimodal; en el mismo grupo algunos ratones aumentaron importantemente la concentración de TNF- α , mientras que otros ratones no modificaron la concentración de esta citocina en comparación con el grupo control negativo tratado con vehículo (Figura 28).

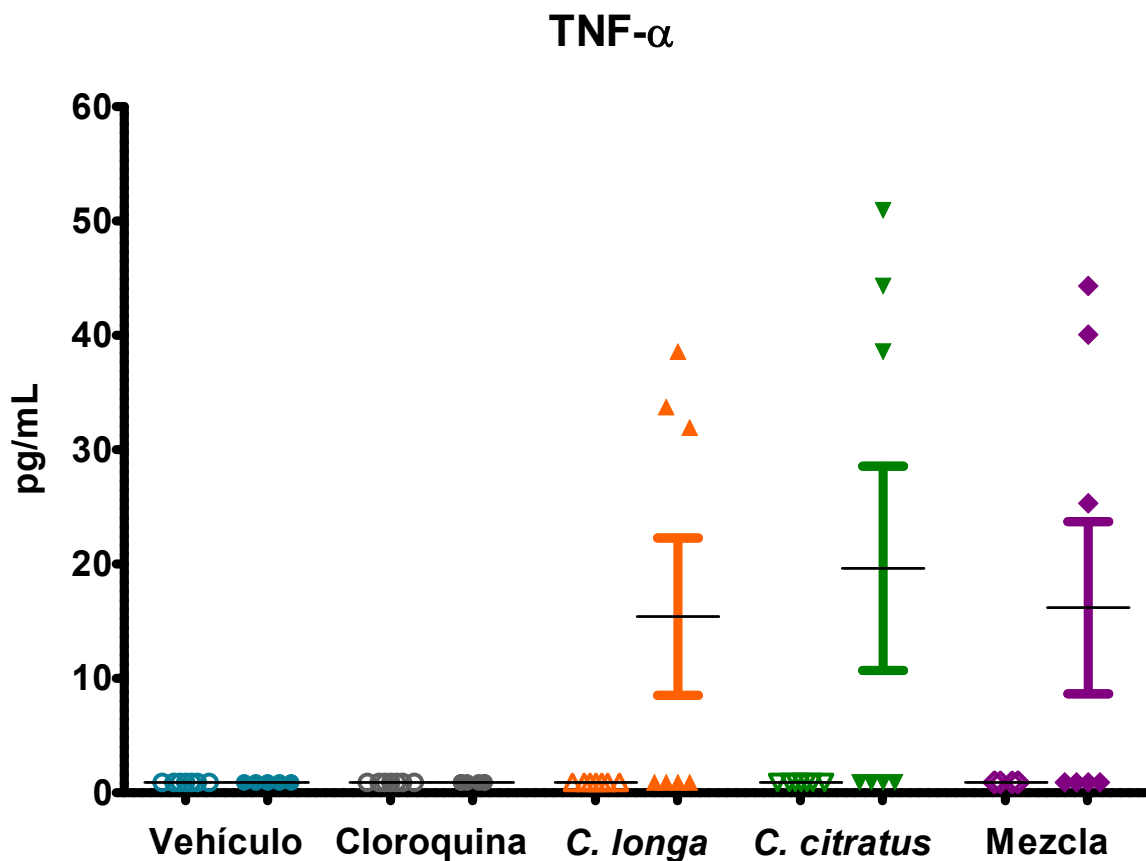


Figura 28 Efecto de la administración de *Curcuma longa* o *Cymbopogon citratus*, solas o en combinación, sobre la concentración sérica de TNF- α en ratones sin infección o infectados con *P. berghei* ANKA en el octavo día postinfección. Diez grupos de ratones CBA/Ca machos (n=7) se trataron 4 veces (día 0-3) con: vehículo, o con cloroquina (25mg/Kg), o con *C. longa* (312 mg/Kg), o con *Cymbopogon citratus* (1600mg/Kg), o con la mezcla de las dosis antimaláricas óptimas de ambas plantas (312 mg/Kg *C. longa* + 1600 mg/Kg *C. citratus*). La mitad de los ratones de cada grupo no se infectó con el parásito (símbolos sin relleno) y la otra mitad de ratones se infectó con *P. berghei* ANKA (símbolos con relleno), la barra horizontal indica diferencia estadísticamente significativa, para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de dos vías y la prueba Bonferroni, el cálculo se realizó con el programa GraphPadPrism 5.

Finalmente, también se cuantificaron las concentraciones de las citocinas IL-2, IL-4, IL-6 e IL-17. Sin embargo, los resultados obtenidos estuvieron abajo del límite de detección de la técnica (datos no mostrados).

10. Análisis de resultados

Se comprobó por espectrometría de infrarrojo que la muestra de rizoma de *Curcuma longa* contenía curcumina (Figura 5), el principio activo de *C. longa*, y se determinó su concentración por comparación con un estándar de curcumina mediante espectrofotometría. El contenido de curcumina en la muestra correspondió al 8.45 %, la concentración reportada en la literatura es entre 0.3 y 5.4% (25), una posible explicación al incremento de la concentración, es que los factores ambientales a los que está expuesta *C. longa* incrementan la concentración de curcumina en el rizoma de la planta en comparación con el rizoma de *C. longa* cultivada en otro nicho ecológico, puesto que se ha demostrado que las condiciones de cultivo afectan las rutas metabólicas e impactan en la producción y acumulación de los fitoquímicos (53).

Previamente, Redy *et al* determinaron que la curcumina a una concentración de 100 mg/Kg poseía actividad antimalárica (27), con base en esa concentración se realizó una curva dosis respuesta con el polvo de rizoma de *Curcuma longa*. Los resultados de ese experimento permitieron determinar que con base en la prueba de tratamiento durante 4 días (método establecido para evaluar la actividad antimalárica (16)) que la concentración con la mayor actividad antimalárica fue la de 312 mg/Kg en el día 6 post infección, con una supresión de la parasitemia del 99.73% (Tabla 6).

El siguiente objetivo fue determinar si era posible obtener un efecto sinérgico al administrar *Curcuma longa* junto con *Cymbopogon citratus* (una planta que en nuestro grupo demostramos posee actividad antimalárica óptima a una dosis de 1600 mg/Kg) (37). Para ello realizamos otra curva dosis respuesta con combinaciones distintas de ambas plantas. No detectamos efecto sinérgico en las combinaciones probadas de *Curcuma longa* y *Cymbopogon citratus* (Figuras 12, 13 y 14) para ello se consideró la sobrevida, la parasitemia y la supresión de parasitemia. Una probable explicación es que los componentes de ambas plantas se antagonicen, o que al combinar su actividad antioxidante no se permita eliminar completamente al parásito ya que el estrés oxidativo es el mecanismo más aceptado para la eliminación del *Plasmodium* (54). Otra posible explicación es que el tratamiento durante cuatro días con *Curcuma longa* y/o *Cymbopogon citratus* no fue suficiente para eliminar completamente al parásito (Figuras 13 y 14), debido a que los componentes antimaláricos se metabolizan muy rápido y disminuye su concentración en sangre, lo que reduce su biodisponibilidad y así su efectividad, una posible solución es aumentar el número de dosis para extender la duración del efecto antimalárico.

Si bien se demostró la actividad antimalárica de ambas plantas, los resultados obtenidos hasta ese momento no permitían determinar si *C. longa* y *C. citratus* tenían un efecto inmunomodulador en esta enfermedad que favoreciera la actividad parasiticida de cada planta a su dosis óptima ya sea administradas por separado o en combinación. Por lo anterior, se evaluó el efecto de *C. longa* y *C. citratus* administradas solas o en combinación sobre la respuesta inmune. Para cubrir este objetivo se evaluó el índice esplénico (que permite conocer tanto la proliferación de células, así como la inflamación en el bazo), por lo que también se cuantificaron las poblaciones celulares CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD19⁺, CD107b⁺ y CD16⁺CD32⁺ y se cuantificaron las citocinas pro y anti-inflamatorias. Detectamos que paradójicamente, aunque la infección incrementó el índice esplénico, las poblaciones CD3⁺ y CD3⁺CD4⁺, CD19⁺ y CD107b⁺ y CD16⁺/CD32⁺ disminuyeron con la infección, lo que sugiere que el sistema inmune las elimina por apoptosis después de su activación y eso explicaría, al menos en parte, la razón por la cual la respuesta inmune celular a malaria tenga una deficiente memoria inmunológica de tipo celular (55). Con las dosis administradas de las plantas no detectamos que se modificaran de forma importante las poblaciones de linfocitos T cooperadores, citotóxicos o los linfocitos B e inclusive tampoco tuvieron efecto sobre los macrófagos (Figuras 19-23) respectivamente. Sin embargo, detectamos que ambas plantas administradas solas o en combinación disminuyeron de forma significativa el porcentaje de células NK (Figura 24), estas células son importantes porque representan una fuente importante de IFN- γ , esta citocina se ha asociado con a la inducción de diversos mecanismos efectores antiparasitarios que promueven una rápida respuesta pro-inflamatoria que a su vez afecta el desenlace letal de la enfermedad (56). Burrack y colaboradores demostraron en un modelo de malaria cerebral que IL-15 regula positivamente a las células NK (57). Adicionalmente, Zhao y colaboradores demostraron que la curcumina modula negativamente la síntesis de IL-15 en un modelo de colitis (58), estos resultados podrían explicar la disminución de la población NK en el bazo de ratones que recibieron el tratamiento con *C. longa* sola o en combinación con *C. citratus* (Figura 24). No existen reportes sobre la relación entre *C. citratus* e IL-15, pero con base en los resultados obtenidos es posible que la relación sea similar a la presente entre *C. longa* e IL-15.

Detectamos que la infección disminuyó todas las poblaciones celulares que analizamos, lo que sugiere que el incremento del índice esplénico se debe a la proliferación de otras estirpes celulares. Es probable que debido a la intensa activación de las células a consecuencia de la infección las conduce a su muerte por apoptosis (59) y en su intento por reconstituir esta pérdida se generen nuevas células que, por no haber alcanzado su estado de maduración completo, no presentan los marcadores de diferenciación que se detectan con los anticuerpos monoclonales empleados.

En general, el tratamiento con *C. longa* o con *C. citratus* incrementó la concentración de IL-10 aunque no de forma significativa (Figura 25). La IL-10 regula negativamente al INF- γ y al factor de transcripción NF κ B, esta molécula se ha asociado con la supervivencia de los linfocitos (60), por lo tanto el incremento en la concentración sérica de IL-10 en los ratones infectados (Figura 26) podría ser la causa de la disminución de las poblaciones de linfocitos (Figura 20-23) en los ratones infectados con respecto a los ratones tratados de la misma forma pero sin infección.

La administración de ambas plantas solas o combinadas incrementó la concentración de IFN- γ , aunque la diferencia no resultó estadísticamente significativa. Es probable que el incremento en la concentración de IFN- γ generado por el tratamiento particularmente con *C. citratus* no genere diferencias estadísticas, pero sí diferencias fisiológicas ya que se alcanzó la concentración fisiológica a la que el IFN- γ tiene actividad biológica (61).

11. Conclusiones

- La administración del rizoma de la planta *Curcuma longa* presentó mayor actividad antimalárica que el principio activo curcumina ya que requiere una menor dosis equivalente para tener el mismo efecto antimalárico.
- No se presentó sinergia al combinar la administración de *Cymbopogon citratus* y *Curcuma longa*, es probable que sus metabolitos sean antagonistas entre sí.
- *Cymbopogon citratus* regula negativamente a las células CD19⁺ en el bazo de los ratones sin infección.
- El tratamiento con la mezcla de *Curcuma longa* (312mg/Kg) y *Cymbopogon citratus* (mg/Kg) reguló positivamente la concentración de IL-10, lo que sugiere que la combinación de ambas plantas induce procesos antiinflamatorios.
- *Curcuma longa* y *Cymbopogon citratus* regulan negativamente a la población CD16⁺CD32⁺ en el bazo de ratones infectados con *P. berghei* ANKA.

12. Referencias

1. WHO. World malaria report 2018. Geneva: World Health Organization. 2018:210.
2. Dunst J, Kamena F, Matuschewski K. Cytokines and Chemokines in Cerebral Malaria Pathogenesis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2017;7:324.
3. Onwuamaegbu ME, Henein M, Coats AJ. Cachexia in malaria and heart failure: therapeutic considerations in clinical practice. *Postgraduate medical journal*. 2004;80(949):642-9.
4. Meireles P, Sales-Dias J, Andrade CM, Mello-Vieira J, Mancio-Silva L, Simas JP, et al. GLUT1-mediated glucose uptake plays a crucial role during Plasmodium hepatic infection. *Cellular microbiology*. 2017;19(2).
5. Wolf AS, Sherratt S, Riley EM. NK Cells: Uncertain Allies against Malaria. *Frontiers in immunology*. 2017;8:212.
6. Maslachah L, Sugihartuti R, Wahyuni RS. Hematologic changes and splenic index on malaria mice models given Syzygium cumini extract as an adjuvant therapy. *Veterinary world*. 2019;12(1):106-11.
7. Niikura M, Inoue SI, Fukutomi T, Yamagishi J, Asahi H, Kobayashi F. Comparative genomics and proteomic analyses between lethal and nonlethal strains of Plasmodium berghei. *Experimental parasitology*. 2018;185:1-9.
8. Gomes PS, Bhardwaj J, Rivera-Correa J, Freire-De-Lima CG, Morrot A. Immune Escape Strategies of Malaria Parasites. *Frontiers in microbiology*. 2016;7:1617.
9. Gomes GS, Maciel TR, Piegas EM, Michels LR, Colome LM, Freddo RJ, et al. Optimization of Curcuma Oil/Quinine-Loaded Nanocapsules for Malaria Treatment. *AAPS PharmSciTech*. 2017.
10. Punchard NA, Whelan CJ, Adcock I. *The journal of inflammation*. BioMed Central; 2004.
11. Wang H, Ma S. The cytokine storm and factors determining the sequence and severity of organ dysfunction in multiple organ dysfunction syndrome. *The American journal of emergency medicine*. 2008;26(6):711-5.
12. Clark IA, Alleva LM, Budd AC, Cowden WB. Understanding the role of inflammatory cytokines in malaria and related diseases. *Travel medicine and infectious disease*. 2008;6(1-2):67-81.
13. Wassmer SC, Grau GER. Severe malaria: what's new on the pathogenesis front? *International Journal for Parasitology*.
14. Lamb TJ, Brown DE, Potocnik AJ, Langhorne J. Insights into the immunopathogenesis of malaria using mouse models. *Expert reviews in molecular medicine*. 2006;8(6):1-22.
15. Stevenson MM, Riley EM. Innate immunity to malaria. *Nature reviews Immunology*. 2004;4(3):169-80.
16. Tarkang PA, Appiah-Opong R, Ofori MF, Ayong LS, Nyarko AK. Application of multi-target phytotherapeutic concept in malaria drug discovery: a systems biology approach in biomarker identification. *Biomarker research*. 2016;4:25.
17. Rasoanaivo P, Wright CW, Willcox ML, Gilbert B. Whole plant extracts versus single compounds for the treatment of malaria: synergy and positive interactions. *Malaria journal*. 2011;10 Suppl 1:S4.
18. Krungkrai SR, Krungkrai J. Insights into the pyrimidine biosynthetic pathway of human malaria parasite Plasmodium falciparum as chemotherapeutic target. *Asian Pacific journal of tropical medicine*. 2016;9(6):525-34.
19. White NJ, Nosten F, Looareesuwan S, Watkins WM, Marsh K, Snow RW, et al. Averting a malaria disaster. *Lancet (London, England)*. 1999;353(9168):1965-7.

20. Organization WH. Artemisinin and artemisinin-based combination therapy resistance: status report. World Health Organization; 2017.
21. Organization WH. Emergency response to artemisinin resistance in the Greater Mekong subregion: regional framework for action 2013-2015: World Health Organization; 2013.
22. Elfawal MA, Towler MJ, Reich NG, Weathers PJ, Rich SM. Dried whole-plant *Artemisia annua* slows evolution of malaria drug resistance and overcomes resistance to artemisinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(3):821-6.
23. Tarkang PA, Okalebo FA, Ayong LS, Agbor GA, Guantai AN. Anti-malarial activity of a polyherbal product (Nefang) during early and established *Plasmodium* infection in rodent models. *Malaria journal*. 2014;13(1):456.
24. Haddad M, Sauvain M, Deharo E. Curcuma as a parasitocidal agent: a review. *Planta Med*. 2011;77(6):672-8.
25. Akram M, Shahab-Uddin AA, Usmanghani K, Hannan A, Mohiuddin E, Asif M. Curcuma longa and curcumin: a review article. *Rom J Biol Plant Biol*. 2010;55(2):65-70.
26. Dattani JJ, Rajput DK, Moid N, Highland HN, George LB, Desai KR. Ameliorative effect of curcumin on hepatotoxicity induced by chloroquine phosphate. *Environmental toxicology and pharmacology*. 2010;30(2):103-9.
27. Reddy RC, Vatsala PG, Keshamouni VG, Padmanaban G, Rangarajan PN. Curcumin for malaria therapy. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;326(2):472-4.
28. Gupta SC, Sung B, Kim JH, Prasad S, Li S, Aggarwal BB. Multitargeting by turmeric, the golden spice: From kitchen to clinic. *Molecular nutrition & food research*. 2013;57(9):1510-28.
29. Park EJ, Jeon CH, Ko G, Kim J, Sohn DH. Protective effect of curcumin in rat liver injury induced by carbon tetrachloride. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 2000;52(4):437-40.
30. Ghosh A, Banerjee T, Bhandary S, Surolia A. Formulation of nanotized curcumin and demonstration of its antimalarial efficacy. *International journal of nanomedicine*. 2014;9:5373-87.
31. Okere S, Sangodele J, Ogunwole E, Adams M, Shafe M. Antiplasmodial Activity of Aqueous leaf Extract of *Cymbopogon citratus* against *Plasmodium falciparum* Infected Rats. *American Journal of Biomedical and Life Sciences*. 2014;2(3):60-4.
32. Rahim SM, Taha EM, Al-janabi MS, Al-douri BI, Simon KD, Mazlan AG. Hepatoprotective effect of *Cymbopogon citratus* aqueous extract against hydrogen peroxide-induced liver injury in male rats. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines : AJTCAM*. 2014;11(2):447-51.
33. Ekpenyong CE, Akpan E, Nyoh A. Ethnopharmacology, phytochemistry, and biological activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf extracts. *Chinese journal of natural medicines*. 2015;13(5):321-37.
34. Tarkang PA, Okalebo FA, Siminyu JD, Ngugi WN, Mwaura AM, Mugweru J, et al. Pharmacological evidence for the folk use of Nefang: antipyretic, anti-inflammatory and antinociceptive activities of its constituent plants. *BMC complementary and alternative medicine*. 2015;15(1):174.
35. Viana G, Vale T, Pinho R, Matos F. Antinociceptive effect of the essential oil from *Cymbopogon citratus* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000;70(3):323-7.
36. Tchoumboungang F, Zollo PA, Dagne E, Mekonnen Y. In vivo antimalarial activity of essential oils from *Cymbopogon citratus* and *Ocimum gratissimum* on mice infected with *Plasmodium berghei*. *Planta medica*. 2005;71(01):20-3.
37. Chukwuocha UM, Fernández-Rivera O, Legorreta-Herrera M. Exploring the antimalarial potential of whole *Cymbopogon citratus* plant therapy. *Journal of Ethnopharmacology*. 2016;193:517-23.

38. Francisco V, Costa G, Figueirinha A, Marques C, Pereira P, Neves BM, et al. Anti-inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaves infusion via proteasome and nuclear factor- κ B pathway inhibition: Contribution of chlorogenic acid. *Journal of ethnopharmacology*. 2013;148(1):126-34.
39. Manvitha K, Bidya B. Review on pharmacological activity of *Cymbopogon citratus*. *prevent*. 2014;6:7.
40. Leite JR, Seabra Mde L, Maluf E, Assolant K, Suchecki D, Tufik S, et al. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). III. Assessment of eventual toxic, hypnotic and anxiolytic effects on humans. *J Ethnopharmacol*. 1986;17(1):75-83.
41. Danlami U, Rebecca A, Machan DB, Asuquo TS. Comparative study on the Antimicrobial activities of the Ethanolic extracts of Lemon grass and *Polyalthia longifolia*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2011;1(9):174.
42. Silva CdBd, Guterres SS, Weisheimer V, Schapoval EE. Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida* spp. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2008;12(1):63-6.
43. Pedroso RB, Ueda-Nakamura T, Filho BPD, Cortez DAG, Cortez LER, Morgado-Diaz JA, et al. Biological activities of essential oil obtained from *Cymbopogon citratus* on *Crithidia deanei*. *Acta Protozoologica*. 2007;45(3):231.
44. Gluhcheva Y, Atanasov V, Ivanova J, Mitewa M. Cobalt-induced changes in the spleen of mice from different stages of development. *Journal of toxicology and environmental health Part A*. 2012;75(22-23):1418-22.
45. Sharma K, Agrawal S, Gupta M. Development and validation of UV spectrophotometric method for the estimation of curcumin in bulk drug and pharmaceutical dosage forms. *Int J Drug Dev Res*. 2012;4(2):375-80.
46. Clark IA, Budd AC, Alleva LM, Cowden WB. Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. *Malaria journal*. 2006;5:85.
47. Cumnock K, Gupta AS, Lissner M, Chevee V, Davis NM, Schneider DS. Host Energy Source Is Important for Disease Tolerance to Malaria. *Current biology : CB*. 2018;28(10):1635-42.e3.
48. Totino PR, Daniel-Ribeiro CT, Ferreira-da-Cruz MF. Evidencing the Role of Erythrocytic Apoptosis in Malarial Anemia. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2016;6:176.
49. Shengule S, Kumbhare K, Patil D, Mishra S, Apte K, Patwardhan B. Herb-drug interaction of Nisha Amalaki and Curcuminoids with metformin in normal and diabetic condition: A disease system approach. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2018;101:591-8.
50. Wickenberg J, Ingemansson SL, Hlebowicz J. Effects of *Curcuma longa* (turmeric) on postprandial plasma glucose and insulin in healthy subjects. *Nutrition journal*. 2010;9:43.
51. Tallarida RJ. Drug synergism: its detection and applications. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2001;298(3):865-72.
52. Warren JS. Interleukins and tumor necrosis factor in inflammation. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 1990;28(1):37-59.
53. Ramakrishna A, Ravishankar GA. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant signaling & behavior*. 2011;6(11):1720-31.
54. Kavishe RA, Koenderink JB, Alifrangis M. Oxidative stress in malaria and artemisinin combination therapy: Pros and Cons. *The FEBS journal*. 2017;284(16):2579-91.
55. Portugal S, Pierce SK, Crompton PD. Young lives lost as B cells falter: what we are learning about antibody responses in malaria. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2013;190(7):3039-46.

56. Artavanis-Tsakonas K, Riley EM. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Immunol.* 2002;169(6):2956-63.
57. Burrack KS, Huggins MA, Taras E, Dougherty P, Henzler CM, Yang R, et al. Interleukin-15 Complex Treatment Protects Mice from Cerebral Malaria by Inducing Interleukin-10-Producing Natural Killer Cells. *Immunity.* 2018;48(4):760-72.e4.
58. Zhao HM, Xu R, Huang XY, Cheng SM, Huang MF, Yue HY, et al. Curcumin Suppressed Activation of Dendritic Cells via JAK/STAT/SOCS Signal in Mice with Experimental Colitis. *Frontiers in pharmacology.* 2016;7:455.
59. Scholzen A, Sauerwein RW. Immune activation and induction of memory: lessons learned from controlled human malaria infection with *Plasmodium falciparum*. *Parasitology.* 2016;143(2):224-35.
60. Guthmiller JJ, Graham AC, Zander RA, Pope RL, Butler NS. Cutting Edge: IL-10 Is Essential for the Generation of Germinal Center B Cell Responses and Anti-*Plasmodium* Humoral Immunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950).* 2017;198(2):617-22.
61. Amani V, Vigario AM, Belnoue E, Marussig M, Fonseca L, Mazier D, et al. Involvement of IFN-gamma receptor-mediated signaling in pathology and anti-malarial immunity induced by *Plasmodium berghei* infection. *European journal of immunology.* 2000;30(6):1646-55.