



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Efecto de la protoxina Cry 1Ac sobre la modulación de la respuesta inmune en un modelo experimental de malaria.

T E S I S

Que para obtener el título de
Químico Farmacéutico Biólogo

Presenta

Ana Laura Rodríguez Morales

Directora: **Doctora Martha Legorreta
Herrera**

Fecha: 22 de abril del 2013



Agradecimientos

Dios sin duda alguna hay mucho por lo cual agradecerte, por la fortaleza, la sabiduría, la paciencia que muchas veces necesite para los momentos difíciles, pero también por los momentos agradables, por las experiencias vividas, por el aprendizaje que recibí, por los logros no solo académicos, como el vencer ciertos miedos, muchas gracias porque me has permitido terminar este proyecto.

También quiero agradecer a:

Dalila Morales, mi mamá quien con sus cuidados, sus atenciones, su compañía en noches de desvelo me motivo a no rendirme y a continuar hasta terminar este proyecto.

José Rodríguez, papá agradezco tus consejos y tu apoyo

José, Julio y Danya gracias por darme la alegría de ser tía, de tener a esos hermosos niños que con sus risas alegraron muchos momentos aunque también me distrajeron mucho, aun así gracias a mis sobrinos **Vannder, Evan, Daniel, Fernanda, Monse e Isaac**

También quiero agradecer a mis otros hermanos, consejeros, **Abi, Jalel, Oscar, David** y muchísimos más que con sus palabras o una oración fueron de gran valor cuando más lo necesitaba

Nelly, Miguel y Adrian que a pesar de la distancia y de nuestras ocupaciones estuvieron ahí dándome palabras que me permitieron no rendirme y continuar hasta este momento.

Luis, Néstor y Fidel, sin duda tengo mucho que agradecerles, su apoyo para realizar este trabajo, gracias por leer laminillas conmigo, por tomar las muestras, también por hacer esos momentos de arduo trabajo más agradables con sus ideas, comentarios, risas y claro con las quesadillas del triangulo.

Sergio, gracias por motivarme a dar más de mí, por las palabras de ánimo que hicieron más fácil este camino y por estar cerca cuando te necesitaba.

Víctor, gracias por tus ocurrencias por tus alegrías, por tus atenciones que ayudaron en gran manera a mitigar el cansancio y el estrés generado por este trabajo, gracias por estar en este último esfuerzo.

Quiero dar las gracias a las personas que estuvieron al frente de este proyecto

Dra. Martha a quien agradezco por compartir sus experiencias, por ser un ejemplo, por el tiempo, el esfuerzo y la paciencia que contribuyeron en gran manera para el termino de esta tesis, pero más a mi experiencia como investigador y como persona.

Maestra Mercedes, Dr. Marroquín, Dra. Raquel y a la **Dra. Isabel** a quienes agradezco por los conocimientos compartidos que permitieron una mejor comprensión para la realización de este proyecto, por sus observaciones que contribuyeron a mejorarlo.

Maestro Armando Cervantes le agradezco por el tiempo, la paciencia y la ayuda para realizar el análisis estadístico.

Para finalizar también agradezco a la **DGAPA** en los proyectos **PAPIIT** que financiaron tu trabajo **IN220310** y **IN217412**.

Índice

1. Introducción.....	1
1. 1 Características de la malaria.....	1
1.1.2 Ciclo de vida del plasmodio.....	2
1.1.3 <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.....	3
1.1. 4 Sintomatología.....	4
1.1.5 Diagnóstico.....	4
1.2 Vacunas y adyuvantes.....	5
1.3 Protoxina Cry1Ac.....	6
1.4 Citocinas.....	7
1.4.1 Interferon- γ (INF- γ).....	8
1.4.2 Factor de necrosis tumoral- α (TNF- α).....	9
1.4.3 Factor de crecimiento transformante- β (TGF- β).....	10
1.4.4 Interleucina 10 (IL-10).....	10
1.5 PCR en tiempo real.....	11
2. Planteamiento del problema.....	14
3. Objetivos.....	15
3.1 Objetivo general.....	15
3.2 Objetivos particulares.....	15
4. Hipótesis.....	16
5. Tipo de estudio.....	16
6. Diseño estadístico.....	16
7. Material.....	17
7.1 Material biológico.....	17
7.2 Reactivos.....	17
7.3 Material.....	19
8. Métodos.....	20
8.1 Obtención de los controles positivos para las citocinas.....	20
8.2 Obtención del antígeno de <i>P. berghei</i> ANKA.....	20
8.3 Evaluación de la parasitemia.....	21
8.4 Determinación de la sobrevida.....	21
8.5 Determinación del Índice esplénico.....	21
8.6 Determinación de la concentración de Hemoglobina.....	21
8.7 Validación de la técnica de PCR en tiempo real para los genes de β -actina, INF- γ , TNF- α , TGF- β e IL-10.....	22
8.8 Administración de la protoxina y de la toxina Cry1Ac a ratones CBA/Ca.....	22
8.9 Extracción del ARNm del bazo.....	23

8.10 Retrotranscripción.....	23
8.11 Amplificación por PCR en tiempo real de las muestras.....	24
9. Resultados.	25
9.1 Controles positivos.....	25
9.2 Obtención del antígeno.....	26
9.3 Validación de la técnica de PCR en tiempo real.	27
9.4 Sobrevida.	29
9.5 Pérdida de peso.	31
9.6 Parasitemia.	33
9.7 Hemoglobina.....	35
9.8 Índice esplénico.....	37
9.9 Efecto de la administración de la protoxina Cry1Ac o la toxina Cry1Ac solas o en combinación con un extracto soluble de antígeno de <i>P. berghei</i> ANKA sobre la expresión de INF- γ en el bazo de ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.....	39
9.10 Efecto de la administración de la protoxina Cry1Ac o la toxina Cry1Ac solas o en combinación con un extracto soluble de antígeno de <i>P. berghei</i> ANKA sobre la expresión de TNF- α en el bazo de ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.....	40
9.11 Efecto de la administración de la protoxina Cry1Ac o la toxina Cry1Ac solas o en combinación con un extracto soluble de antígeno de <i>P. berghei</i> ANKA sobre la expresión del TGF- β en el bazo de ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.	41
9.12 Efecto de la administración de la protoxina Cry1Ac o la toxina Cry1Ac solas o en combinación con un extracto soluble de antígeno de <i>P. berghei</i> ANKA sobre la expresión de IL-10 en el bazo de ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.....	42
10. Discusión.....	44
11. Conclusiones.....	49
12. Anexos.	50
13. Referencias.....	54

Índice de tablas.

Tabla	Titulo	Página
1	Programa de amplificación de los genes de β -actina, INF- γ TNF- α e IL10	20
2	Eficiencias de amplificación por la técnica de PCR en tiempo real para los oligos de β -actina, INF- γ TNF- α , TGF- β e IL10	28

Índice de figuras.

Figura	Titulo	Página
1	Países en riesgo de la transmisión de la malaria.....	1
2	Áreas en riesgo de contraer malaria en México.....	2
3	Fotografía tomada de un frotis sanguíneo de un ratón infectado con <i>P. berghei</i> ANKA en el microscopio óptico a un aumento de 100X	4
4	Inducción de INF- γ en las distintas fases de infección del parásito.....	9
5	Cinética de la reacción de PCR.....	12
6	Curva estándar de β -actina.....	13
7	Amplificación e ADNc para obtener los controles positivos para las distintas citocinas.....	25
8	Electroforesis en acrilamida del extracto de antígeno de <i>P. berghei</i> ANKA, de la toxina y de la protoxina Cry1Ac.....	26
9	Curva de amplificación del INF- γ	27
10	Gráfica de Curva estándar de INF- γ	28
11	Efecto de la administración de la protoxina, antígeno de plasmodio junto con protoxina (Ag + protoxina) y únicamente Ag en la sobrevida en ratones CBA/Ca infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.....	30
12	Efecto de la administración de la toxina, antígeno de plasmodio junto con toxina Cry1Ac (Ag+ toxina) y Ag en la sobrevida en ratones CBA/Ca infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.....	31
13	Efecto de la administración de la protoxina, antígeno de plasmodio (Ag), y antígeno junto con protoxina (Ag + protoxina) sobre la pérdida de peso en ratones CBA/Ca infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.....	32
14	.Efecto de la administración de la toxina, antígeno de plasmodio (Ag), y antígeno junto con toxina (Ag + toxina) sobre la pérdida de peso en ratones CBA/Ca infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.....	33
15	Efecto de la administración de la protoxina, antígeno (Ag) y antígeno junto con protoxina (Ag + protoxina) sobre la parasitemia en ratones CBA/Ca infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.....	34
16	Efecto de la administración de la toxina, antígeno (Ag) y antígeno junto con toxina (Ag + toxina) sobre la parasitemia en ratones CBA/Ca infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.....	35

17	Efecto de la administración de la protoxina, antígeno (Ag) y antígeno junto con protoxina (Ag + protoxina) sobre la concentración de la hemoglobina de ratones CBA/Ca infectados con P. berghei ANKA.....	36
18	Efecto de la administración de la toxina, antígeno (Ag) y antígeno junto con toxina (Ag + toxina) sobre la concentración de hemoglobina en ratones CBA/Ca infectados con P. berghei ANKA.....	37
19	Efecto de la administración de la protoxina o la toxina Cry1Ac solas o en combinación con antígeno de plasmodio sobre el índice esplénico en ratones infectados con P. berghei ANKA.....	38
20	Efecto de la administración de la protoxina o la toxina Cry1Ac solas o en combinación con antígeno de plasmodio sobre la expresión relativa del INF- γ en el bazo de ratones CBA/Ca infectados con P. berghei ANKA.....	40
21	Efecto de la administración de la protoxina o la toxina Cry1Ac solas o en combinación con antígeno de plasmodio sobre la expresión relativa del TNF- α en el bazo de ratones CBA/Ca infectados con P. berghei ANKA.....	41
22	Efecto de la administración de la protoxina o la toxina Cry1Ac solas o en combinación con antígeno de plasmodio sobre la expresión relativa del TGF- β en el bazo de ratones CBA/Ca infectados con P. berghei ANKA.....	42
23	Efecto de la administración de la protoxina o la toxina Cry1Ac solas o en combinación con antígeno de plasmodio sobre la Expresión relativa de la IL-10 en el bazo de ratones CBA/Ca infectados con P. berghei ANKA.....	43

1. Introducción

1.1 Características de la malaria.

La malaria es una infección causada por un parásito del género *Plasmodium* que se transmite a través de la picadura de mosquitos hembra *Anopheles* infectados [1]. En el año 2010, aproximadamente el 50% de la población mundial estaba expuesta a la malaria [2].

Se estima que existen zonas de riesgo de transmisión de la malaria en más de 107 países, asimismo se consideran entre 350 y 500 millones de episodios de malaria nuevos por año, la mayoría causados por *P. falciparum* y *P. vivax* con más de 2.2 millones de muertes al año [3].

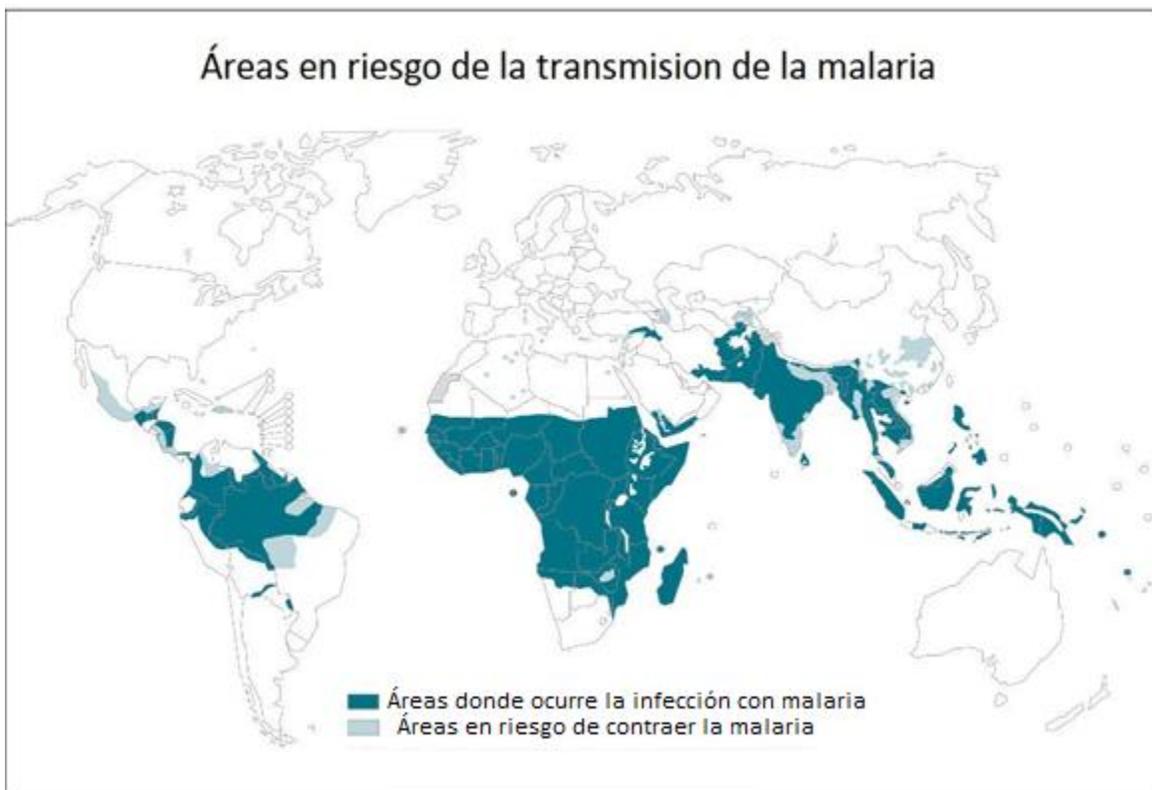


Figura 1. Países en riesgo de transmisión de la malaria [Tomado de OMS, 2010]

En México se ha reducido el número de casos mediante un programa de “tratamiento focalizado” que consiste en un tratamiento más eficaz y rociamiento de acción residual en determinadas zonas, lo que ha logrado interrumpir la transmisión en gran parte del país. Sin embargo, existen focos de transmisión persistentes en los estados de: Nayarit, Michoacán, Oaxaca y en la frontera Sur [3].



Imagen 2. Áreas en riesgo de contraer malaria en México [Modificado de Venkataramani, 2012]

1.1.2 Ciclo de vida del plasmodio

El *Plasmodium* pertenece al subphylum *Apicomplexa*. Se conocen más de 100 especies de *Plasmodium* que infectan a mamíferos, aves y reptiles, pero solo 5 infectan al hombre: *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi*. Todos se transmiten por la picadura del mosquito hembra *Anopheles* infectado. Existen dos fases en el ciclo vital de este parásito: el ciclo sexual que tiene lugar en los mosquitos y el ciclo asexual que se realiza en el hombre o huésped intermediario [1, 4].

El ciclo vital en el hombre comienza con la introducción de esporozoítos desde la saliva del mosquito *Anopheles*. Los esporozoítos atraviesan la piel y al cabo de 30 minutos invaden a los hepatocitos donde se multiplican y se diferencian a merozoítos. *P. vivax* y *P. ovale* desarrollan una forma latente en el hígado llamada hipnozoíto, la cual origina las recaídas que presentan los pacientes [5]. Al llegar al hígado, algunos esporozoítos evaden a la respuesta inmune y a otros los capturan las células de Kupffer y las células NK que estimulan a los hepatocitos para la producción de especies reactivas de nitrógeno. Los esporozoítos se reproducen dentro de los hepatocitos y por mitosis se generan merozoítos en un saco llamado merozoma que le permitirá salir de los hepatocitos sin activar a la respuesta inmune [6]. Los merozoítos entran a la circulación y pueden invadir rápidamente a los eritrocitos a través de procesos eficientes que emplean distintas vías que les permiten establecerse dentro del eritrocito. En el eritrocito los merozoítos maduran y forman un trofozoíto. Posteriormente, el trofozoíto madura y divide su núcleo en varias porciones y se transforma en esquizontes a ese proceso se le conoce como

esquizogonia [6]. Estos esquizontes al madurar generan merozoítos, nuevamente en el ciclo eritrocítico. Algunos merozoítos no se desarrollan a trofozoítos, se diferencian sexualmente en microgametocitos masculino y macrogametocitos femeninos. El mosquito *Anopheles* cuando se alimenta ingiere junto con la sangre a estos gametocitos y dentro de su intestino se forman un macrogameto femenino y ocho microgametos masculinos semejantes a los espermatozoides. Después de la fertilización, el cigoto diploide se diferencia a un oocineto móvil que perfora la pared intestinal donde crece un oocisto dentro del cual se producen numerosos esporozoítos que se liberan y migran a las glándulas salivales listos para continuar con el ciclo cuando el mosquito ingiere su siguiente dosis de sangre [7].

1.1.3 *Plasmodium berghei* ANKA

El *P. berghei* es una de las cuatro especies de *Plasmodium* que infectan a roedores murinos de África Central y se transmite por el mosquito *Anopheles stephensi*. Sirve como un buen modelo para los parásitos humanos con los que comparte características similares a las que se presentan en la malaria cerebral humana, principalmente en los signos neurológicos y en los hallazgos histopatológicos, por lo que los ratones infectados con *P. berghei* ANKA pueden ser un buen modelo experimental de la malaria humana [8, 9].

La morfología estructural del esporozoíto de *P. berghei* ANKA se asemeja a la de los esporozoítos de parásitos humanos, los merozoítos comparten características de invasión a los eritrocitos como los gránulos apicales, los micronemas y los gránulos densos con *P. falciparum* [9].

En muchas cepas de ratones causa la muerte en 1 a 3 semanas y muchos animales presentan complicaciones cerebrales. En ratones BALB/c y en C57BL/6 se ha detectado el secuestro de esquizontes en la microvasculatura cerebral, pero principalmente en el bazo, los pulmones y el tejido adiposo [8, 9].

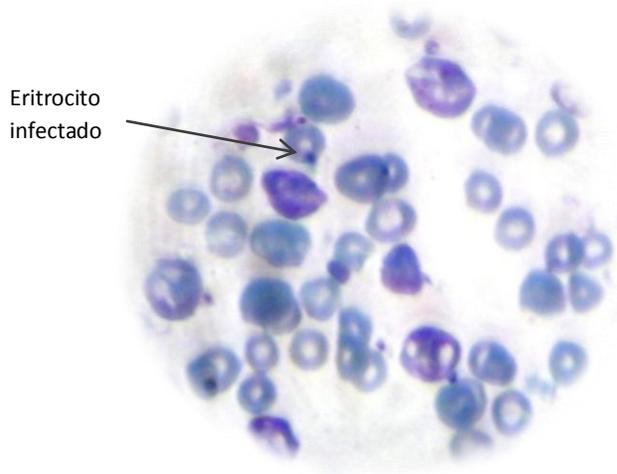


Figura 3. Fotografía tomada de un frotis sanguíneo de un ratón infectado con *P. berghei* ANKA en el microscopio óptico a un aumento de 100X

1.1. 4 Sintomatología.

La sintomatología se debe a la fase eritrocítica. Entre los síntomas de la malaria destaca la fiebre, la cefalea por la liberación de los merozoítos. Si no se trata adecuadamente se pone en riesgo la vida al presentarse las complicaciones que van desde la incapacidad para sentarse sin ayuda, alteración de la conciencia, dificultad respiratoria, convulsiones, colapso circulatorio, sangrado anormal, ictericia, hemoglobinuria, anemia severa ($Hb < 5g/dL$), estado de coma e incluso la muerte. Estas complicaciones ocurren por lo general con una parasitemia del 5% [10].

1.1.5 Diagnóstico.

Un diagnóstico rápido y esencial se obtiene con los frotis de capa fina y gruesa teñidos con Giemsa. Estos deben permitir la identificación de especies y cuantificación (como el porcentaje de eritrocitos infectados o como parásitos por micro litro). La malaria no debe excluirse hasta al menos 3 frotis de sangre negativos que se obtengan dentro de las 48 horas. Las pruebas rápidas incluyen las de detección rápida de antígenos (PDR) que detectan proteínas del parásito en muestras de sangre por punción digital. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica altamente sensible y específica, además, es capaz de detectar parasitemias extraordinariamente bajas [10].

1.2 Vacunas y adyuvantes.

El objetivo de la vacunación es la inducción de una respuesta inmune patógeno-específica que permita la protección contra la infección causada por un patógeno. La respuesta inmune hacia los antígenos se puede mejorar con adyuvantes que se adicionan a la formulación de la vacuna, los primeros adyuvantes que se emplearon fueron las sales de aluminio [11].

Diversas sustancias como el agar poseen capacidad adyuvante, las sales de aluminio se han utilizado en los últimos 80 años en la formulación de una vacuna para la difteria con aplicaciones veterinarias [11]. Los adyuvantes confieren a las vacunas una estimulación más selectiva para obtener una respuesta antígeno-específica. Los adyuvantes también pueden utilizarse para mejorar la respuesta inmune contra antígenos que están en baja concentración [12].

Los adyuvantes pueden actuar de distintas formas: hacen que las células presentadoras de antígeno (APC) incrementen la captación del antígeno. Otros adyuvantes pueden ayudar a los antígenos a activar las vías de la inmunidad innata, predominantemente por el reconocimiento de las APC influenciando también a la inmunidad adaptativa [11].

Un aspecto importante en el desarrollo de las vacunas contra enfermedades infecciosas, incluyendo a la malaria es utilizar un adyuvante apropiado, que sea capaz de estimular una respuesta inmune protectora y segura para los humanos [11].

El hidróxido de aluminio es un adyuvante seguro para los humanos pero no es el adyuvante apropiado, dado que puede estimular a la respuesta tipo Th2 que se caracteriza por un aumento de los niveles de anticuerpos IgG1 e IgE, además de activar a las células T citotóxicas. Estos son algunos de los problemas que se presentan en el desarrollo de vacunas contra enfermedades causadas por patógenos intracelulares, incluyendo al *Plasmodium*. La inmunidad protectora contra patógenos intracelulares generalmente depende de la respuesta Th1. La inmunidad contra el *Plasmodium* en su estadio sanguíneo es particularmente compleja y requiere de una respuesta celular Th1 eficiente pero también requiere de una respuesta tipo Th2 [12].

En el desarrollo de vacunas contra la malaria se trata de identificar antígenos que induzcan protección y para ello se han utilizado diferentes estrategias como la clonación de los genes y la expresión de moléculas recombinantes. Esto ha generado un número importante de antígenos recombinantes derivados de las etapas sanguíneas incluyendo: MSPI, MSP2, MSP3, MSP4, MSP5, AMA I, P[EMP], RESA, RAP1 y RAP2 [12].

1.3 Protoxina Cry1Ac.

El *Bacillus thuringiensis* es una bacteria gram positiva, aerobia estricta, se relaciona morfológicamente con *B. cereus* y *B. anthracis*. Estas especies de bacterias durante su ciclo de vida presentan dos fases bien identificadas: la del crecimiento vegetativo, en la que las bacterias se duplican por bipartición y la de esporulación en la cual se establece un programa de diferenciación a espora [13]. *B. thuringiensis* se diferencia de *B. cereus* y *B. anthracis* por su capacidad para producir δ -endotoxinas en forma de cristales. En el citoplasma durante la esporulación, dicho cuerpo paraesporal se caracteriza por la presencia de las proteínas Cry y Cyt que tienen propiedades insecticidas que se emplean en la agricultura [14].

La toxina Cry tiene un efecto auxiliar en la respuesta celular cuando se co-administra con un patógeno de mucosas, ya que estimula la proliferación de las células inmunocompetentes de forma más intensa que cuando se administra únicamente al patógeno [15, 16]

La co-administración intranasal de la protoxina Cry1Ac con lisados de amibas incrementa la inmunidad protectora contra ratones infectados con *Naegleria fowleri* ya que aumenta los niveles de IgG e IgA [17, 18]. Además de inducir una respuesta de proliferación de monocitos más intensa cuando se co-administró junto con un lisado de *Streptococcus pyogenes* que cuando se administró el lisado bacteriano únicamente. Además, la protoxina Cry1Ac potenció la respuesta celular contra patógenos de mucosas, lo que resulta importante para el diseño de vacunas y para el manejo de infecciones [14].

En un trabajo previo de nuestro grupo de investigación, demostramos que la protoxina Cry1Ac incrementa la sobrevivencia en ratones infectados con *P. berghei* ANKA y *P. chabaudi* AS, esa protección podría deberse al aumento en los niveles de anticuerpos y de INF- γ que a su vez modula positivamente la activación de la respuesta innata, así como la presentación del antígeno lo que permite establecer una rápida respuesta adaptativa [19]. Otros autores han demostrado que los macrófagos profesionales son un blanco celular importante que explica el efecto de la protoxina Cry1Ac sobre el sistema inmune humano [14, 16]. Por lo que su uso tiene 2 ventajas sobre la toxina del cólera (CT), no es tóxica para vertebrados y su producción es de bajo costo [15].

1.4 Citocinas.

La inmunidad contra el *Plasmodium* es sumamente compleja y específica para cada etapa de la infección. El parásito induce una respuesta inmune específica e inespecífica que genera el incremento de los niveles de citocinas. Estas moléculas son importantes porque activan a células como los monocitos, los neutrófilos, las células T y las células NK [7].

En la respuesta inmune contra el plasmodio, tanto los anticuerpos como las citocinas, así como muchas otras moléculas que producen los linfocitos se pueden detectar en el suero. También participan diversos tipos de células y moléculas solubles que se secretan, mientras que otros tipos de células participan ya sea transmitiendo señales a los linfocitos o respondiendo ante las citocinas secretadas por los linfocitos o los macrófagos [20]

Las citocinas se producen durante las fases efectoras de la inmunidad innata y específica, tienen como función mediar y regular la respuesta inmune e inflamatoria. El tiempo en que se secretan es muy corto y no se almacenan como moléculas preformadas. Los ARNm que codifican para las citocinas son inestables. La combinación de un periodo corto de transcripción con un ARNm de vida corta, asegura que la síntesis de las citocinas sea transitoria. Algunas citocinas pueden controlarse por mecanismos post-transcripcionales, como la liberación proteolítica de un producto activo a partir de un precursor inactivo. Una vez sintetizadas, las citocinas suelen secretarse con rapidez, lo que da lugar a un pico de citocinas cuando se necesitan. Las citocinas a menudo influyen en la síntesis de otras citocinas, con frecuencia dos citocinas pueden interactuar para antagonizar sus acciones y producir efectos aditivos o en algunos casos, producir efectos mayores a los previstos [21].

Las citocinas se unen a receptores específicos en la superficie de la célula diana y solo se necesitan cantidades muy pequeñas para desencadenar sus efectos. Estas citocinas modulan las respuestas de las células T, de las células NK y de los macrófagos para que se elimine al parásito ya que el incremento de la parasitemia conduce a complicaciones de la malaria [21].

Diversos investigadores han demostrado que las citocinas pro-inflamatorias se expresan importantemente en la fase aguda, lo que indica la activación del sistema inmune, por lo que algunas citocinas anti-inflamatorias se incrementan en una etapa temprana para contrarrestar los altos niveles de las citocinas pro-inflamatorias [22].

Una producción rápida de citocinas pro-inflamatorias por los fagocitos y las células NK es un factor clave de resistencia del huésped contra la infección intracelular debido a que una rápida inducción de citocinas (IL-12, TNF- α e INF- γ) se ha asociado con la disminución de la replicación del parásito en la etapa sanguínea de la infección. Sin embargo, se requiere de la respuesta adaptativa para poder eliminar completamente al parásito [22].

1.4.1 Interferon- γ (INF- γ)

Las células TCD4+, Th0, Th1, las células NK y en menor medida las CD8+ producen IFN- γ . La transcripción de esta citocina se inicia directamente como consecuencia de un incremento de IL-2 e IL-12. El INF- γ es un activador potente de los macrófagos, induce enzimas mediadoras del estallido respiratorio lo que permite a los macrófagos eliminar a los organismos fagocitados. Aumenta la expresión de moléculas MHC I y MHC II (moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I y 2 respectivamente). Además actúa directamente sobre los linfocitos T y B para promover su diferenciación [21].

El INF- γ representa a la molécula clave en la defensa contra la malaria. Una alta producción de INF- γ es parte de la conducción de la respuesta Th1 asociada con modelos murinos de malaria. Este efecto se ha explicado porque el INF- γ activa la capacidad fagocítica de los monocitos/macrófagos, para eliminar al parásito durante la etapa sanguínea de la infección a través de intermediarios reactivos del nitrógeno y del oxígeno [23].

Diversos autores sugieren que los mecanismos de la inmunidad innata mediados por el INF- γ derivados de las células asesinas naturales (NK) y/o células T $\gamma\delta$, limita la fase inicial de replicación del parásito y la respuesta adaptativa (mediada por células T $\alpha\beta$ y los linfocitos B) para conducir a la eliminación del parásito [24]

La resistencia a la malaria de roedores depende del INF- γ y es una de las diferencias entre una infección letal y una no letal, además, las concentraciones de IL-12, TNF- α , INF- γ y la respuesta sinérgica entre los dos últimos optimiza la liberación de óxido nítrico (NO) que está involucrado en la eliminación del parásito. En los humanos la producción de INF- γ se ha asociado con la resistencia a la reinfección con *P. falciparum* [24].

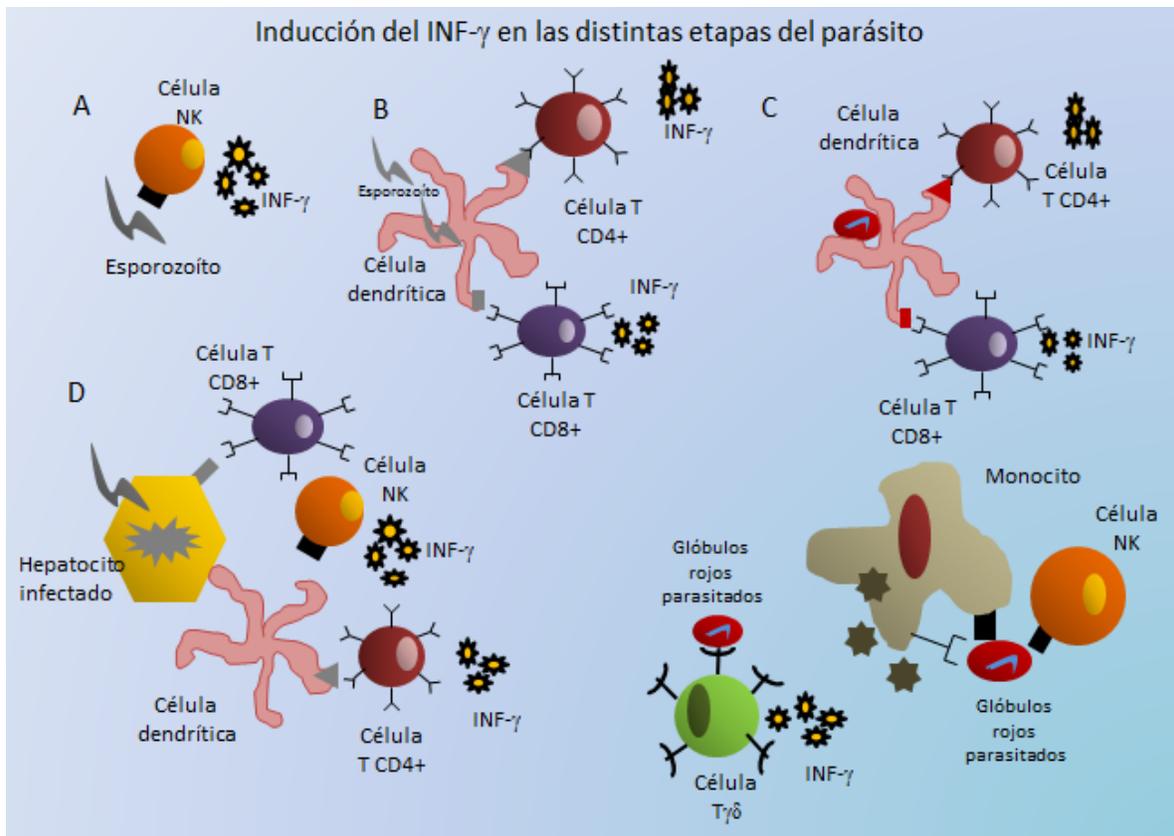


Figura 4. Inducción de INF- γ en las distintas fases de infección del parásito. A) Las células NK reconocen a los esporozoítos directamente; B) las células dendríticas de los nódulos linfáticos atrapan a los esporozoítos invasores y presentan el antígeno (Ag) del parásito a las células Th1 en un contexto de moléculas MHC clase I y a las células Th2 en un contexto de moléculas MHC clase II); C) en el bazo y en la sangre las células T $\gamma\delta$ reconocen al antígeno a través de PRR vía TLR, las células CD4+ y las CD8+ reconocen a los glóbulos rojos parasitados (GRP) en un contexto de moléculas MHCII y MHC I respectivamente; D) las células Th2 reconocen directamente a los hepatocitos infectados [23].

1.4.2 Factor de Necrosis tumoral- α (TNF- α)

1 El TNF- α es una citocina polipeptídica conocida como caquexina o linfotoxina, la sintetizan los macrófagos, las células NK y las células T. Participa en la regulación del crecimiento y la diferenciación celular y activa a los macrófagos [25, 26]. El TNF- α puede tener funciones tanto benéficas como perjudiciales, dado que induce la resistencia contra enfermedades infecciosas, pero también puede generar toxicidad en el proceso inflamatorio en donde participa en la activación de macrófagos; promueve la extravasación de los neutrófilos, los linfocitos y los monocitos para incrementar su adhesión a las células endoteliales vía moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1; afecta la respuesta inmune puesto que regula la actividad de las células T, estimula la expresión de moléculas del MHC; en la superficie celular además induce la síntesis de citocinas pro-inflamatorias como IL-1, IL-6 en los fagocitos mononucleares; además,

estimula la síntesis de prostaglandinas inductoras de fiebre; puede inducir la apoptosis de diversos tipos de células [26]; es capaz de activar el sistema de coagulación, alterando el equilibrio entre actividades pro-coagulantes y anticoagulantes del endotelio vascular; suprime la división de la célula madre en la médula ósea y está involucrado en alteraciones metabólicas al suprimir el apetito y la síntesis de la lipoproteína lipasa [21].

1.4.3 Factor de crecimiento transformante- β (TGF- β)

Es una citocina que sintetizan las células T y los monocitos, se activa por un rompimiento proteolítico. El TGF- β es importante para regular la respuesta inmune frente a *P. falciparum* [7].

El TGF- β está asociado con una reducción de la fiebre, además regula la cascada de citocinas pro-inflamatorias y contribuye a la disminución de la patología en la malaria [27]. Un incremento en la producción de TGF- β se ha asociado con efectos anti inflamatorios ya que inhibe a las citocinas pro-inflamatorias durante la fase temprana de la respuesta inmune contra malaria [7]. El TGF- β tiene actividad pro-inflamatoria a bajas concentraciones, mientras que a concentraciones elevadas tiene actividad anti-inflamatoria [28].

1.4.4 Interleucina 10 (IL-10)

La mejor fuente de IL-10 son las células Th1, Th2, Tr1 (CD25+ Foxp3-) y las T reguladoras (T reg). La estimulación de las células T reg con IL-27 incrementa la producción de IL-10 y de INF- γ [29].

La IL-10 inhibe el incremento de citocinas pro-inflamatorias provenientes de monocitos/macrófagos, inhibe la presentación del antígeno y la síntesis de IL-12 lo que conduce a una disminución en la producción de INF- γ . También inhibe la proliferación y la síntesis de IL-2 e INF- γ en las células Th1 CD4+ y regula la síntesis de IL-4 e IL5 en las células Th2 [30].

Cuando la IL-10 y el TGF- β se producen en niveles elevados inhiben la respuesta pro-inflamatoria, lo que conduce a un incremento en la parasitemia y la anemia severa y puede ocasionar la muerte de los ratones infectados. Los ratones deficientes de IL-10 controlan la parasitemia durante la infección con *P. yoelii* XL y se prolonga la sobrevivencia. En los ratones infectados con *P. yoelii* NXL, se induce la producción de IL-10 y TGF- β en la fase tardía de la infección. Sin embargo, en los ratones deficientes de IL-10 se inhibe la proliferación del parásito, [30].

A medida que disminuyen los niveles de IL-10, se incrementa la producción de TNF- α y de IFN- γ , además cuando se incrementa el TNF- α se favorece la anemia por la fagocitosis de eritrocitos infectados y no infectados [29].

En resumen, la IL-10 regula la respuesta inflamatoria, lo que reduce la patología en malaria [29].

1.4 PCR en tiempo real.

La técnica de PCR se basa en sintetizar numerosas veces un fragmento de ADN utilizando una polimerasa que puede actuar a temperaturas muy elevadas, ya que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive en altas temperaturas. Al realizar una reacción de PCR se simula lo que sucede en la célula cuando se sintetiza el ADN y en un tubo se mezclan los reactivos necesarios para hacerlo: la polimerasa, los oligos o iniciadores, los dNTP's; el ADN donde se encuentra el fragmento que se desea sintetizar y las condiciones necesarias para el óptimo desempeño de la polimerasa que incluyen MgCl₂, KCl y un pH adecuado. Para que esta reacción se lleve a cabo se requiere de temperaturas distintas, la primera de ellas es a 95°C en la cual las dobles cadenas de ADN se desnaturalizan y quedan en forma de cadenas sencillas; después se requiere una temperatura entre 40°C-60°C que se llama temperatura de alineación donde se forman y rompen puentes de hidrógeno entre los oligos y el ADN, y las uniones más estables que son las complementarias permanecerán formando una pequeña región de cadena doble. La polimerasa se une a este pequeño fragmento de ADN de doble cadena y comienza a copiar en sentido 5' a 3' a una temperatura de 72°C en la cual la polimerasa alcanza su máxima actividad y continúa la síntesis de los fragmentos de ADN a partir de los oligos que se habían alineado [31].

La técnica de PCR en tiempo real es uno de los métodos cuantitativos para un análisis fiable de la expresión génica aplicada a microarreglos, cuantificación de patógenos, cuantificación de cáncer, estudios de farmacoterapia, etc. La técnica PCR en tiempo real se diferencia de la PCR convencional en que permite monitorear en cada ciclo la aparición del ADN producto de la reacción mediante el uso de fluoróforos como el SYBR Green que se une al ADN, las sondas de hibridación TaqMan y oligos específicos marcados con un fluoróforo, de aquí que la base de la técnica de PCR en tiempo real sea la asociación directa entre la fluorescencia y el número de amplicones [32].

El resultado de una PCR en tiempo real se visualiza en un gráfico de amplificación. En él se grafica la fluorescencia leída por el termociclador en el eje de las ordenadas y el número de ciclos de la PCR en el eje de las abscisas. La cinética de la reacción de PCR tiene 3 fases, la exponencial donde el producto incrementa exponencialmente debido a que los reactivos no son limitantes, la fase lineal donde el producto incrementa linealmente y los reactivos comienzan a escasear y la fase estacionaria donde la cantidad de producto no se modifica debido a que los reactivos son limitantes [32].

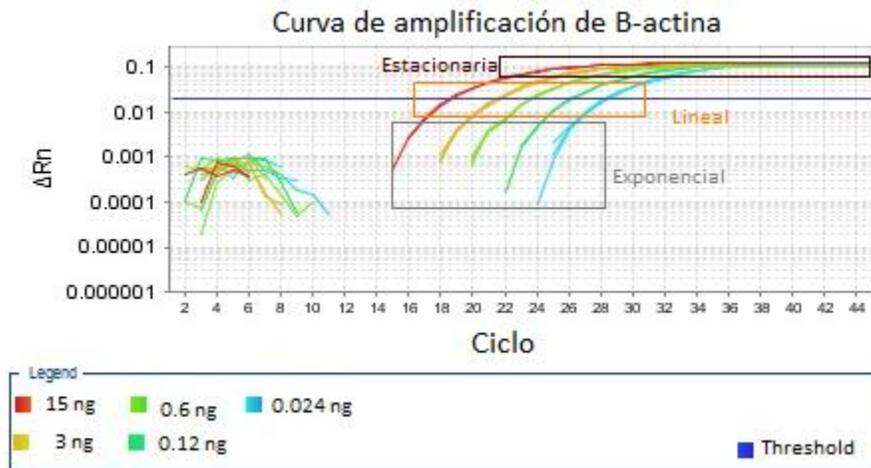


Figura 5. Cinética de la reacción de PCR

El punto de intersección de una curva de amplificación con el umbral se denomina Ct (del Inglés *Threshold Cycle*). Este punto indica el ciclo en el que la fluorescencia alcanza el valor umbral. Cuanto más ADN inicial tenga la muestra, se alcanza más rápido este valor y el número de ciclos necesarios será menor para conseguir el Ct [32].

Los datos que se obtienen de la técnica de PCR en tiempo real se cuantifican absolutamente y/o relativamente. Para la primera se requiere de una curva de calibración interna, mientras que la cuantificación relativa es una comparación de un gen blanco con uno de referencia. Para esto se han desarrollado métodos de análisis de datos, el modelo de eficiencia calibrada y el método del $\Delta\Delta Ct$. Los sistemas experimentales para ambos métodos son semejantes puesto que se requiere de la muestra, un control y para ambos se requiere de la amplificación de un gen de interés y un gen de referencia [33].

Para el modelo de la eficiencia calibrada se requiere calcular la eficiencia con el empleo de diluciones seriadas de ADN y se amplifica el gen de interés y el gen de referencia. Se obtiene el valor denominado Ct que se grafica contra el logaritmo de la concentración.

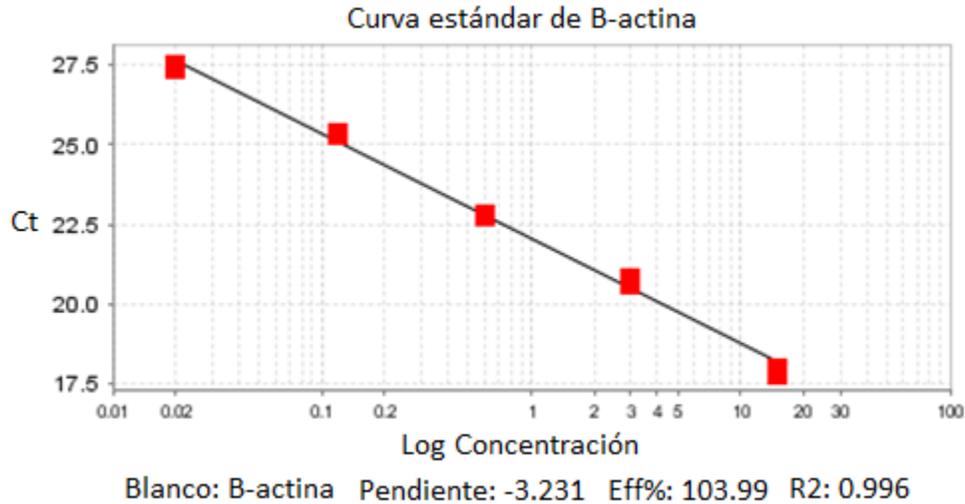


Figura 6. Curva estándar de β -actina. Se obtiene al realizar diluciones seriadas de una muestra de ADN previamente cuantificada.

Se obtiene la pendiente de la recta la cual se introduce a la siguiente ecuación para determinar la eficiencia

$$E_{interes} = 10^{-1/pendiente} - 1 \times 100$$

$$E_{referencia} = 10^{-1/pendiente} - 1 \times 100$$

Para realizar la cuantificación relativa se requiere de la siguiente ecuación

$$Cuantificación\ relativa = \frac{E_{interes}^{\Delta Ct_{interes}}}{E_{referencia}^{\Delta Ct_{referencia}}}$$

Donde

$$E = eficiencia$$

$$\Delta Ct_{interes} = Ct_{control} - Ct_{tratamiento}$$

$$\Delta Ct_{referencia} = Ct_{control} - Ct_{tratamiento} \text{ [32].}$$

2. Planteamiento del problema

La malaria es una infección a la que está expuesta la mitad de la población mundial y el parásito que la ocasiona supera los esfuerzos para erradicarla debido a que desarrolla variación antigénica y resistencia a los fármacos antimaláricos existentes; por lo que una estrategia para su control es el desarrollo de vacunas efectivas. Para ello se requiere el uso de adyuvantes que potencien la eliminación del *Plasmodio* por el sistema inmune sin generar patología. Por esta razón, en un trabajo previo analizamos si administración de la protoxina Cry1Ac previa a la infección con *P. chabaudi* AS o *P. berghei* ANKA inducía protección contra la infección. En ambos casos se detectó que la protoxina Cry1Ac reduce la parasitemia, incrementa la supervivencia y modula la producción de citocinas pro-inflamatorias [19]. Además, se ha demostrado que la protoxina Cry1Ac induce protección contra la infección del protozoario *Naegleria fowleri* [18], ya que estimula la inmunidad innata, lo que se traduce como un potencial adyuvante para el diseño de una vacuna contra otros protozoarios parásitos. Por lo anterior, en este trabajo consideramos importante estudiar si la co-administración de la protoxina Cry1Ac junto con un extracto crudo de antígeno de *P. berghei* ANKA inducía una mejor protección que la administración del antígeno o la protoxina Cry1Ac administrados por separado, por lo que el conocimiento que generó en este trabajo es importante para determinar si la protoxina Cry1Ac podría utilizarse como adyuvante en el diseño de futuras vacunas contra la malaria.

3. Objetivos.

3.1 Objetivo general.

Evaluar si la co-administración del antígeno del plasmodio junto con la protoxina Cry1Ac o la toxina Cry1Ac mejora la protección que se obtuvo inyectando únicamente a la protoxina en una infección con *P. berghei* ANKA.

3.2 Objetivos particulares.

- Evaluar si la co-administración de la protoxina o la toxina Cry1Ac junto con el antígeno de *P. berghei* ANKA modifican la parasitemia en ratones CBA/Ca infectados con ese parásito.
- Estudiar si la co-administración de la protoxina o la toxina Cry1Ac junto con el antígeno modifican la sobrevida en ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA.
- Analizar el efecto de la coadministración de la protoxina o la toxina Cry1Ac junto con el antígeno sobre el índice esplénico en ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA.
- Examinar si la administración de la protoxina o la toxina Cry1Ac junto con el antígeno evita la disminución en la concentración de la hemoglobina en ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA.
- Determinar si la administración de la protoxina o la toxina Cry1Ac solas o en combinación con el antígeno de *Plasmodio* modifican la expresión de citocinas pro y anti inflamatorias (INF- γ , TNF- α , TGF- β e IL-10) en el bazo de ratones infectados con *P. berghei* ANKA.

4. Hipótesis

La co-administración de la protoxina Cry1Ac en combinación con el antígeno de *P. berghei* ANKA a ratones CBA/Ca regulará la respuesta inmune contra el *P. berghei* ANKA lo que permitirá que los ratones presenten mayor sobrevida, menor pérdida de peso, menor índice esplénico y modificará los niveles de expresión de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias.

5. Tipo de estudio

Analítico experimental debido a que se analizó el efecto de la protoxina Cry1Ac sola y su efecto adyuvante en combinación con el antígeno de *P. berghei* ANKA sobre la infección con *P. berghei* ANKA evaluando con sobrevida, pérdida de peso, parasitemia, concentración de hemoglobina y el nivel de expresión de citocinas pro- y anti-inflamatorias.

Población: ratones macho CBA/Ca de 8 semanas

Criterios de inclusión, exclusión y eliminación: Se emplearan ratones CBA/Ca machos de 8 semanas de edad libres de patógenos específicos

Variables dependientes: sobrevida, pérdida de peso, parasitemia, niveles de expresión de las citocinas pro- y anti-inflamatorias.

Variables independientes: concentración de protoxina Cry1Ac y de antígeno de *P. berghei* ANKA

6. Diseño estadístico.

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS (versión 20) y las diferencias significativas entre los grupos se determinaron mediante el análisis de mediciones repetidas empleando la prueba de Tukey considerando un valor de $P < 0.05$ como significativo.

7. Material.

7.1 Material biológico.

Ratones singénicos de la cepa CBA/Ca.

Protoxina Cry1Ac

Toxina Cry1Ac

Antígeno de *P. berghei* ANKA

Plasmodium berghei ANKA

Plasmodium chabaudi AS

7.2 Reactivos y soluciones.

TRIS-HCl 100 mM

Aceite mineral ®Sigma

Acrilamida ®Sigma

Albumina sérica bovina (Sigma)

Amortiguador de retrotranscripción First Strand ®Invitrogen

Azul de Comassie ®Gibco BRL

Bisacrilamida ®USB

Bromuro de etidio ®Sigma

Cloroformo: alcohol isoamilico 49:1

Cloroformo ®Burdick&Jackson

Columnas de celulosa

dNTP's ®Invitrogen

dTT 0.1M ®Invitrogen

EDTA 5mM ®Sigma

Enzima MMLV-RT ®Invitrogen

Etanol ®MERCK

Fluorocromo ROX 5º X Invitrogen

Heparina ®USB

Inhibidor de RNAsa 40U/µL ®Promega

Isopropanol ® Sigma

MgCl₂ 50mM ®Sigma

Oligo dT 500µg/µL ®Promega PBS 1X

Reactivo de BIO-RAD® para cuantificar proteínas

Reactivo de Drabkin

Taq polimerasa 5U/µL ®Applied Biosystems

TBE 10X

TEMED ®Sigma

TriPure ®Roche

Oligos F* y R 10µM ®Invitrogen para

β-actina: 5´a 3´DNA-CGG-GTC-AGG-TAG-TCT-GTC-AGG-TCC[JOE]G

5´a 3´DNA-CTA-TGC-TCT-CCC-TCA-CGC-CAT-C

INF-γ: 5´a 3´DNA-CGG-TGA-GAA-GAT-GTT-CCA-TGC-CAC[FAM]G

5´a 3´DNA-TCT-CCT-TCA-GGA-CAA-TGT-CAA-ACA

TNF-α: 5´a 3´DNA-CGG-CTG-CTG-TCT-TTG-AGA-TCC-ATC-C[FAM]G

5´a 3´DNA-CGT-CGT-AGC-AAA-CCA-CCA-AGT-G

TGF-β 5´a 3´DNA-CGG-GAA-ATA-CAC-CAC-CAG-TCC[FAM]G

5´a 3´DNA-AGG-CTG-ACA-CCC-GTC-ACT-TG

IL-10 5´a 3´DNA-CGG-TTC-TGG-ACA-ACA-TAC-TGC-TAA-C[FAM]G

5´a 3´DNA-TGG-ATC-ATT-TCC-GAT-AAG-GCT-TG

7.3 Material.

Cámara para electroforesis[®] BIORAD

Campana de flujo laminar[®] VECO

Centrifuga y microcentrífuga[®] Eppendorf

Émbolos de jeringas estériles

Espectrofotómetro para luz UV[®] WPA

Estuche de disección

Film óptico[®] Platemax

Parafilm

Placa para PCR en tiempo real[®] Axygen

Termociclador Master Cycler[®] Eppendorf

Termociclador[®] Applied Biosystems 7500

Tubos Eppendorf de 0.5 µL, 1.5 mL

Tubos Falcón 50 mL estériles

Vortex

Pipetas[®] Eppendorf de 2 µL, 10 µL, 50 µL, 100 µL, 200 µL y 1000 µL

Puntas estériles[®] Axygen libres de DNAsas y RNAsas para tomar volúmenes de 2 µL, 10µL, 50µL, 100µL, 200µL y 1000µL estériles.

8. Métodos.

8.1 Obtención de los controles positivos para las citocinas

Se infectó a un grupo de 5 ratones CBA/Ca con 5×10^4 eritrocitos parasitados con *P. chabaudi* AS y a los 7 días post infección los ratones se sacrificaron. Se les extrajo el bazo y se obtuvo el ARNm. El ARN se cuantificó espectrofotométricamente a 260nm y se retrotranscribieron 1.5µg con 10µL de la mezcla de reacción que contenía 4µL de amortiguador First Strand, 2 µL de dTT 1.5M, 200U de la enzima MMLV-RT, 40U del inhibidor de RNAsa y 0.5mM de los dNTP's y se incubó a 37°C durante una hora y a 55°C por 5 minutos en el termociclador y a partir del ADNc obtenido se amplificaron por PCR punto final los genes de β -actina, INF- γ , TNF- α , TGF- β e IL-10 con 2mM de MgCl₂, 100nM de los oligos para cada citocina y 0.025U de *Taq* Polimerasa y se colocó en el termociclador con el programa descrito en la tabla 1. El producto se colocó en un gel de acrilamida al 5% y se corrió durante 40 minutos 170 volts en una cámara de electroforesis. Se tiñó con bromuro de etidio y los resultados se analizaron en un analizador de geles.

Paso	Temperatura	Tiempo
1	50°C	2 minutos
2	95°C	2 minutos
3	95°C	30 segundos
4	65°C	45 segundos
5	72°C	45 segundos
6	Repetir 3-5 40 ciclos	

Tabla 1. Programa de amplificación de los genes de β -actina, INF- γ , TNF- α , TGF- β e IL-10

8.2 Obtención del antígeno de *P. berghei* ANKA.

Se infectaron a 10 ratones CBA/Ca con *P. berghei* ANKA. Cuando presentaron una parasitemia del 30% se sacrificaron y se les extrajo la sangre con solución de Krebs heparinizada. Se pasó por una columna de celulosa CF11 y se lavó 3 veces con la solución de Krebs. El botón que se obtuvo se resuspendió en la solución de Krebs y se le adicionaron 25µL de saponina al 10%. Se centrifugó a 13 000 rpm a 4°C durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el botón se liso con una solución de lisis. Se le adicionaron inhibidores de proteasas y se centrifugaron a 14 000 rpm durante 20 minutos a 4°C.

Para determinar la integridad de las proteínas del antígeno se utilizó la técnica de electroforesis en acrilamida. Primero se procedió a cuantificar la concentración de proteínas con una curva estándar de albumina que se preparó con diluciones seriadas de un estándar de albumina en un volumen de 200 μ L de agua desionizada estéril y se adicionaron 50 μ L del reactivo de *BIO-RAD* para cuantificar al antígeno, se tomó 1 μ L del extracto proteico y se procedió igual que en la curva de albumina, se mezcló perfectamente y después de 5 minutos se leyó la absorbancia a 595nm. Una vez conocida la concentración de proteínas, se colocaron 50 μ g de proteína en un tubo y se adicionaron 4 μ L del amortiguador de Laemli 5X y se hirvió durante 5 minutos, después se incubó en hielo y se adicionaron a cada pozo en un gel de acrilamida que contenía un gel concentrador al 5% y un gel separador al 12%, se aplicaron 60V durante 20 minutos hora y en el gel separador 12% a 90V por 40 minutos. El gel se tiñó con Azul de Comassie, se incubó a 50°C durante 20 minutos y se destiñó en una solución con 25% de metanol y 7.5% de ácido acético.

8.3 Evaluación de la parasitemia.

Se tomó diariamente una gota de sangre de cada ratón, se colocó sobre un portaobjetos y se extendió la sangre. Posteriormente, se fijó con metanol, se tiñó cada laminilla con colorante de Giemsa a una dilución 1:10 durante 20 minutos. Por último se enjuagó con agua.

8.4 Determinación de la sobrevida.

Se registró diariamente el porcentaje de los ratones que se mantenían vivos, para esto se tomó como 100% a una población de 6 ratones.

8.5 Determinación del Índice esplénico.

El día en que se sacrificaron los ratones se pesaron y se extrajo el bazo y se registró el peso, posteriormente se obtuvo la relación entre el peso del bazo y el peso del ratón.

8.6 Determinación de la concentración de Hemoglobina.

Se tomaron 2 μ L de la sangre del ratón que se adicionaron en 498 μ L del reactivo de Drabkin y se leyó la absorbancia a 540 nm. La concentración se determinó con una curva estándar.

8.7 Validación de la técnica de PCR en tiempo real para los genes de β -actina, INF- γ , TNF- α , TGF- β e IL-10.

Para realizar la cuantificación relativa de la expresión de los genes de las citocinas pro-inflamatorias INF- γ y TNF- α y de las citocinas anti inflamatorias TGF- β e IL-10 fue necesario realizar la validación de la técnica de PCR para cada citocina, para asegurar que los genes analizados y el gen endógeno tuvieran eficiencias de amplificación adecuadas y semejantes. Para ello se realizaron diluciones seriadas de ADNc correspondiente a los controles positivos y se amplificaron los genes de β -actina, INF- γ , TGF- β e IL-10 con 6mM de MgCl₂, 0.03U de *Taq* Polimerasa, ROX a 1X y los oligos correspondientes a una concentración de 200nM. Para amplificar el gen de TNF- α la concentración de MgCl₂ fue de 3mM. Cada gen se amplificó en el termociclador de Applied Biosystems 7500 para PCR en tiempo real con temperaturas de desnaturalización de 95°C, de extensión de 72°C y de alineamiento de 60°C para los genes de β -actina, INF- γ , TGF- β , para TNF- α la temperatura de alineamiento fue de 65°C mientras que para IL-10 fue de 63°C.

8.8 Administración de la protoxina y de la toxina Cry1Ac a ratones CBA/Ca.

Se utilizaron grupos de 12 ratones y se les aplicaron los siguientes tratamientos. Al primer grupo se le administró una dosis de 5 μ g de la protoxina Cry1Ac, a un segundo grupo se le co-administró 50 μ g de antígeno de *P. berghei* ANKA junto con 5 μ g de la protoxina Cry1Ac, a un tercer grupo se le administró una dosis de 50 μ g de antígeno de *P. berghei* ANKA, al cuarto grupo se le administró una dosis de 50 μ g de la toxina Cry1Ac, al quinto grupo se le co-administró el antígeno de *P. berghei* ANKA más 50 μ g de la toxina Cry1Ac, y al último grupo que fue el grupo control se le administraron 100 μ L de PBS. Los tratamientos se aplicaron una vez a la semana durante 5 semanas. Veinticuatro horas después de la última dosis, todos los ratones se infectaron con 1x10³ eritrocitos parasitados con *P. berghei* ANKA. La sobrevivencia, la parasitemia y la pérdida de peso se registraron diariamente. Al día 6 y 9 post infección se sacrificaron 3 ratones de cada grupo, se les extrajo el bazo y la sangre de donde se extrajo el ARN.

8.9 Extracción del ARNm del bazo.

Una vez que se registró el peso del bazo, se colocó sobre tela de nylon en un tubo Falcon de 50mL, se le adicionaron 1000µL de PBS y se maceró con un embolo. Las células se lavaron con 4 mL de PBS, se centrifugaron a 3 000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se adicionaron 400µL del reactivo de Trizol[®]. Se agito vigorosamente hasta que se perdió la viscosidad. Esta solución se transfirió a un tubo Eppendorf y se le adicionaron 200µL de la mezcla de cloroformo: alcohol isoamilico (49:1), se agitó en el vortex durante 15 minutos y se centrifugó a 14 000 rpm por 15 minutos. Se obtuvo la fase acuosa y se precipitó con 500µL de isopropanol absoluto enfriado previamente a -20°C.

8.10 Retrotranscripción.

El tubo que contenía el ARN precipitado en isopropanol, se centrifugó a 15 000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se le adicionaron 500µL de etanol al 80% en agua DEPC, se centrifugó nuevamente a 15 000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se secó el ARNm en el termomixer a 45°C. Al botón obtenido se le agregaron 100µL de agua destilada estéril y se disolvió completamente el ARNm.

Para la cuantificación se preparó una dilución 1:100 con 2µL de ARNm y 198µL de agua y se leyó la absorbancia a 260nm. Se calculó la concentración µg/µL con la siguiente formula

$$\frac{A_{260nm} \times 40 \mu g \times \text{Factor de dilución}}{1000 \mu L}$$

En un tubo Eppendorf se colocaron 1.0µL del Oligo dT y el volumen de agua necesario para llevar la reacción a un volumen final de 10µL, se agregaron los µL de ARNm necesarios para tener 1.5µg. Esta mezcla se incubó en el termociclador a 65°C durante 10 minutos e inmediatamente se enfrió en hielo. Se le agregaron 10µL de la mezcla de retrotranscripción y se incubó a 37°C durante una hora y a 90°C por 5 minutos en el termociclador.

8.11 Amplificación por PCR en tiempo real de las muestras.

Se limpió perfectamente el área de trabajo con cloro y alcohol al 70%. Se irradió con luz UV durante 60 minutos. Se preparó la mezcla de reacción de acuerdo a las concentraciones por la validación de cada *primer*. Se analizó por duplicado cada muestra de ADNc a una concentración de 15 ng, se amplificó en el aparato Applied Biosystem 7500 PCR con una temperatura de desnaturalización de 90°C, la temperatura de alineamiento según la obtenida durante la validación y una temperatura de extensión de 72°C. Estos ciclos se repitieron 45 veces y se programó para un análisis mediante la curva de fusión. Una vez obtenidos los resultados se exportaron a Excel y se obtuvo el nivel de expresión relativa del gen de cada citocina respecto a β -actina para cada tejido empleando la

siguiente ecuación Nivel de Expresión = $\frac{\text{Eficiencia de INF} \cdot \gamma^{\Delta Ct}}{\text{Eficiencia de } \beta\text{-actina} \cdot \Delta Ct}$.

9. Resultados.

9.1 Controles positivos.

Para generar los controles positivos de las citocinas se infectaron 5 ratones de la cepa CBA/Ca con *Plasmodium chabaudi* AS y a los 7 días post-infección se sacrificaron, se obtuvo la sangre y el bazo para extraer el ARN que se cuantificó y se retrotranscribió como se describe en la sección de métodos; los ADNc así obtenidos se utilizaron para amplificar por PCR de punto final los genes de IFN- γ , TNF- α , IL-10 y β -actina, los productos de la amplificación se analizaron por electroforesis en geles de acrilamida al 10% (Figura 7).

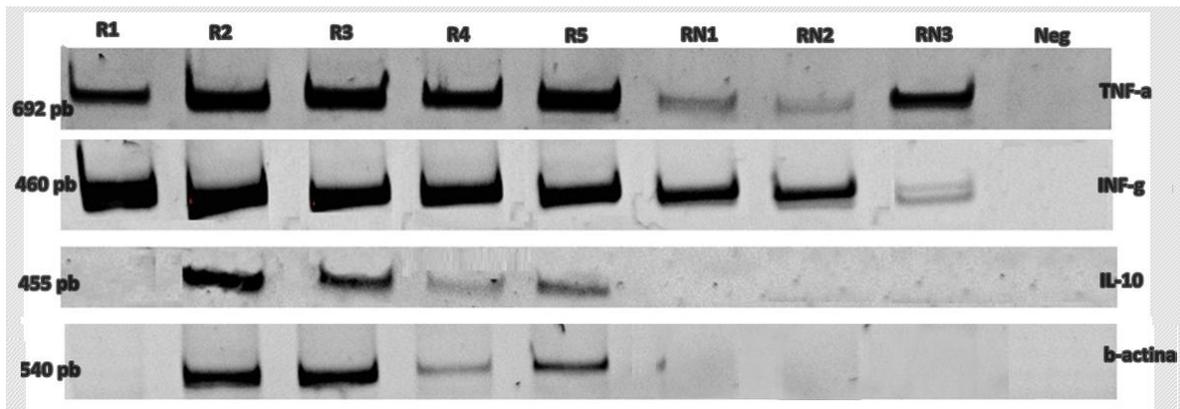


Figura 7. Amplificación de ADNc para obtener los controles positivos para las distintas citocinas. Se infectaron 5 ratones CBA/Ca con 5×10^4 eritrocitos parasitados con *P. chabaudi* AS, a los 7 días post-infección se sacrificaron. Como controles negativos se sacrificaron 3 ratones sin infección. Se les extrajo el bazo y de obtuvo el ARNm, se retrotranscribió y se amplificó a las condiciones óptimas para los oligos de cada citocina.

Los ratones infectados que presentaron la expresión de las citocinas INF- γ , TNF- α e IL-10 fueron los ratones R2, R3 y R5, por lo que las muestras de ADNc de estos ratones se emplearon como controles positivos para la validación y las reacciones de PCR en tiempo real.

9.2 Obtención del antígeno.

Para la obtención del antígeno de *P. berghei* ANKA, se procedió como se describió en la sección de materiales y métodos, las proteínas de los extractos de los antígenos se cuantificaron. Para conocer la integridad de las proteínas en los extractos de antígeno así como de la protoxina y de la toxina Cry se prepararon geles de acrilamida al 12%. Se adicionaron 20µg de antígeno a un tubo Eppendorf y se les agregó la solución amortiguadora de carga. Se procedió de la misma forma con la protoxina y la toxina Cry1Ac, los tubos se incubaron a 90°C por 5 minutos y el contenido se depositó en los carriles del gel de acrilamida. Se aplicó el voltaje y el gel se tiñó con azul de Comassie Brillante R250. (Figura 8).

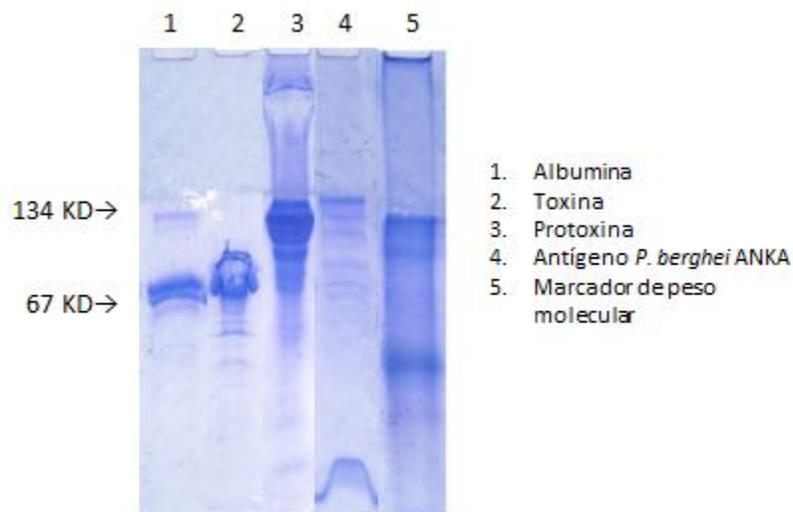


Figura 8. Electroforesis en acrilamida del extracto de antígeno de *P. berghei* ANKA, de la toxina y de la protoxina Cry1Ac. Las proteínas del extracto antigénico, de la toxina y de la protoxina se cuantificaron y 20 µg se incubaron a 95°C con solución de carga se colocaron en un gel que corrió a 90 V durante 40 minutos. Se tiñó con azul de Comassie Brillante R250 y se lavó en la solución desteñidora (25% metanol y 7.5% ácido acético)

En el carril donde se colocó el antígeno de *P. berghei* ANKA se observaron bandas con distinto peso molecular debido a que el parásito contiene diversas proteínas, y al no observarse un barrido se demostró que estas proteínas estaban integras. Es importante indicar que la sangre parasitada se pasó a través de una columna de Nylon para retener a los leucocitos, de tal forma que quedaron únicamente eritrocitos que al lizarlos con saponina liberaron al parásito y a la hemoglobina, en los lavados se eliminó a la hemoglobina por lo que se observa en el gel son proteínas provenientes del parásito.

9.3 Validación de la técnica de PCR en tiempo real.

Para realizar la cuantificación relativa de la expresión de los genes de las citocinas pro-inflamatorias $\text{INF-}\gamma$ y $\text{TNF-}\alpha$ y de las citocinas anti-inflamatorias $\text{TGF-}\beta$ e IL-10 fue necesario realizar la validación de la técnica de PCR para cada citocina, para asegurar que los genes analizados y el gen endógeno tuviesen eficiencias de amplificación adecuadas y semejantes. Para ello se realizaron diluciones seriadas de ADNc correspondiente a los controles positivos y se amplificaron en sus condiciones óptimas descritas en la metodología.

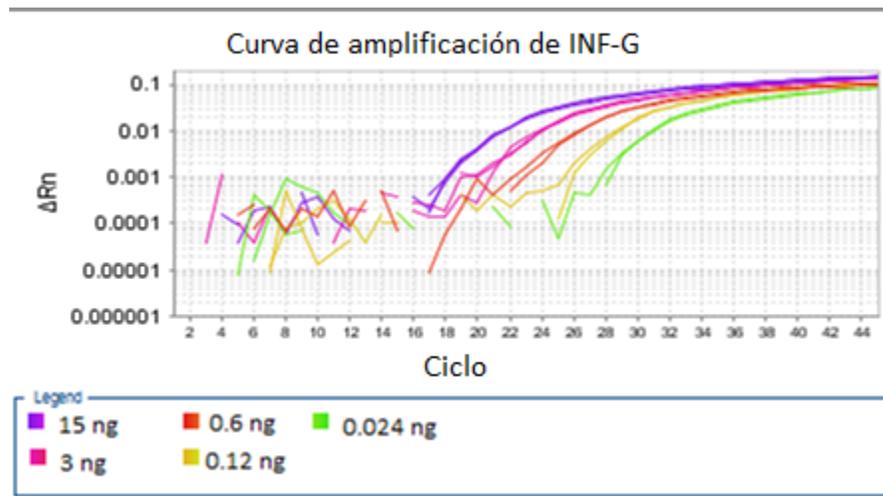


Figura 9. Curva de amplificación del $\text{INF-}\gamma$. Se realizaron diluciones seriadas con factor 1:5 del ADNc del control positivo para $\text{INF-}\gamma$ y se amplificó bajo las condiciones óptimas descritas en el apartado de métodos. Se grafica en el eje de las abscisas el número de ciclos contra unidades arbitrarias de fluorescencia.

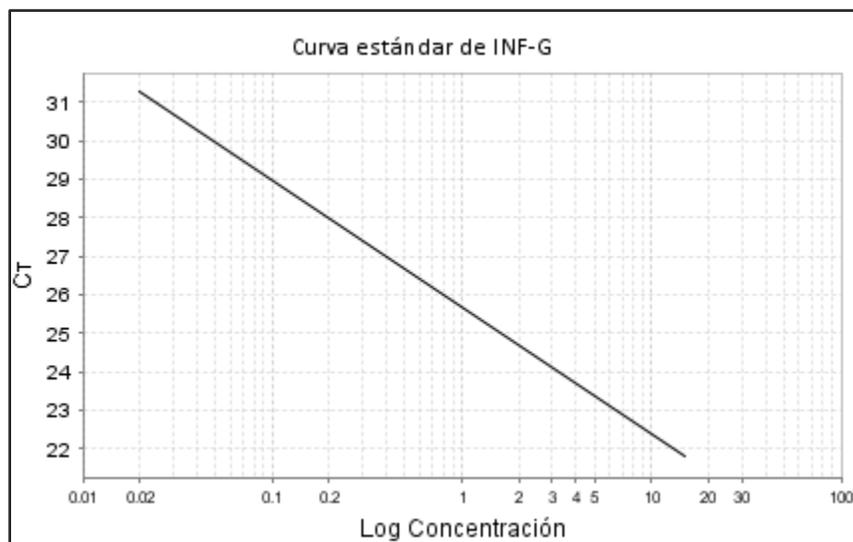


Figura 10. Gráfica de curva estándar de INF-γ. En el eje de las abscisas se grafica el logaritmo base 10 de la concentración de ADN contra el Ct de cada dilución. Cuando se obtiene el 100% de eficiencia se incrementa 10 veces la cantidad del amplicón cada 3.32 ciclos.

Para lograr la validación la regresión debe cumplir con los siguientes parámetros:

Valor de la pendiente de $-3.32 \pm 10\%$

Eficiencia $100\% \pm 10\%$

Las eficiencias de la amplificación en las condiciones ya descritas fueron las siguientes.

Gen	Pendiente	Eficiencia
β -actina	-3.231	103.99
INF-γ	-3.2203	104.59
TNF-α	-3.47	93.91
TGF-β	-3.00	115.43
IL-10	-3.15	107.77

Tabla 2. Eficiencias de amplificación por de la técnica de PCR en tiempo real para los primers de β-actina, INF-γ, TNF-α, TGF-β e IL-10. El ADN_c de los controles positivos se diluyó en serie de 1:5 se realizó la amplificación con las condiciones descritas en materiales y métodos, se utilizó el aparato de PCR en tiempo real Applied Biosystems 7500. Se presentan las pendientes calculadas por el software V2.0.5 y la eficiencia calculada con la ecuación $E = (10^{-1/\text{pendiente}} - 1) * 100$.

Para realizar los cálculos de eficiencia se utilizaron las pendientes de la validación de los distintos genes con la fórmula $E = (10^{-1/\text{pendiente}} - 1) * 100$. Un valor de la pendiente de -3.32 equivale a una reacción con el 100% de eficiencia, valores menores indican una eficiencia menor al 100% que puede deberse a la presencia de un inhibidor. Por otro lado, las pendientes más positivas pueden atribuirse a la calidad de la muestra o bien a problemas de pipeteo. La eficiencia obtenida para el gen de TNF- α fue menor al 100%, pero se encuentra en los valores permitidos para aprobar la validación, mientras que para los demás genes las eficiencias fueron mayores al 100% debido probablemente a inexactitud en el pipeteo.

9.4 Sobrevida.

El *P. berghei* es un parásito letal, que induce la producción de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en el hospedero para eliminar al parásito, sin embargo, las mismas citocinas de la respuesta inmune que protegen, si se producen en exceso pueden generar complicaciones que conducen a la muerte del hospedero. En este trabajo se analizó si la administración de la protoxina Cry1Ac sola o en combinación con un extracto crudo de antígeno de *P. berghei* ANKA modula la respuesta inmune y por lo tanto modifican la sobrevida en comparación con un grupo control al que se le administró PBS. El grupo control sobrevivió hasta el día 16, sin embargo, los ratones empezaron a morir desde el día 10. El grupo que recibió protoxina sobrevivió hasta el día 16, si bien también los ratones murieron a partir del día 10, durante los días 11 al 15 se presentaron más muertes que en el grupo control. En el grupo que recibió antígeno los ratones empezaron a morir a partir del día 9 y el último sobrevivió hasta el día 15 y finalmente el grupo que recibió antígeno junto con la protoxina presentó mayor mortalidad que el que recibió únicamente antígeno, pero un ratón sobrevivió hasta el día 16 (Figura 11).

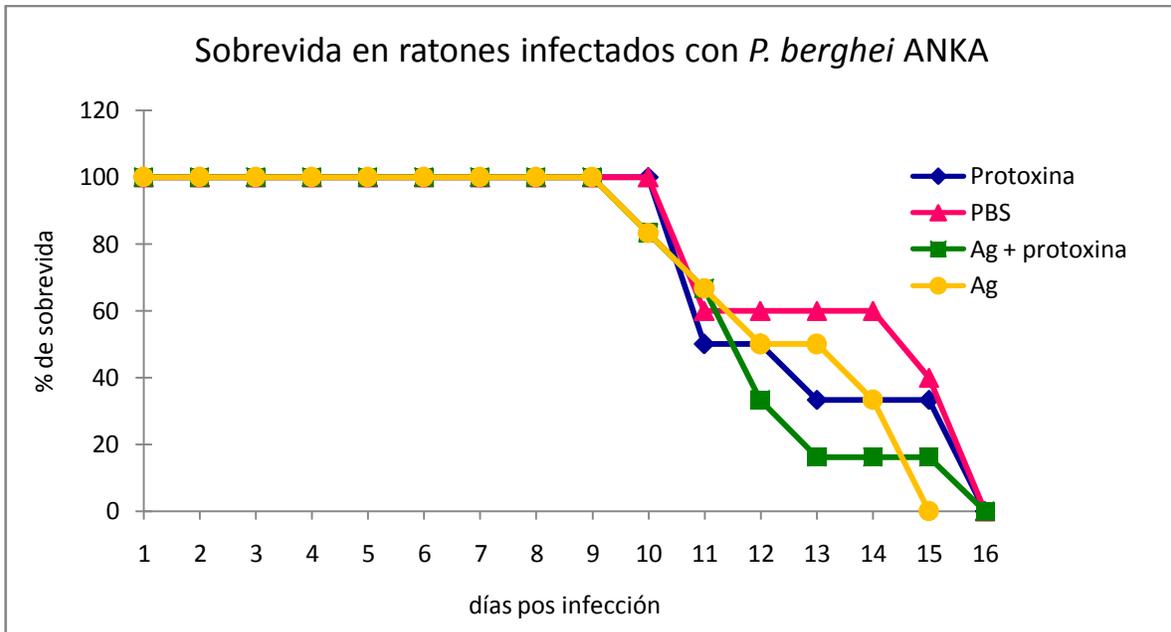


Figura 11. Efecto de la administración de la protoxina, antígeno de plasmodio junto con protoxina (Ag + protoxina) y únicamente Ag en la sobrevida en ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA. Los ratones recibieron 5 dosis (una cada semana) de antígeno o protoxina, o antígeno junto con protoxina. Un día después de la última dosis se infectaron con 1×10^3 glóbulos rojos parasitados. La sobrevida se evaluó diariamente tomando como 100% a la población de 6 ratones.

Los ratones tratados con la toxina presentaron una sobrevida de 16 días al igual que el grupo control tratado con PBS, sin embargo, durante los días 11 al 13 mostraron menor mortalidad que el grupo control. Los ratones que recibieron únicamente al antígeno sobrevivieron hasta el día 15 pero empezaron a morir a partir del día 10 post-infección, mientras que los ratones que recibieron la combinación de antígeno con la toxina empezaron a morir a partir del día 9 post infección y sobrevivieron únicamente hasta el día 13. Lo anterior indica que la combinación de antígeno con la toxina redujo la sobrevida en comparación con los grupos que únicamente recibieron antígeno o toxina (Figura 12).

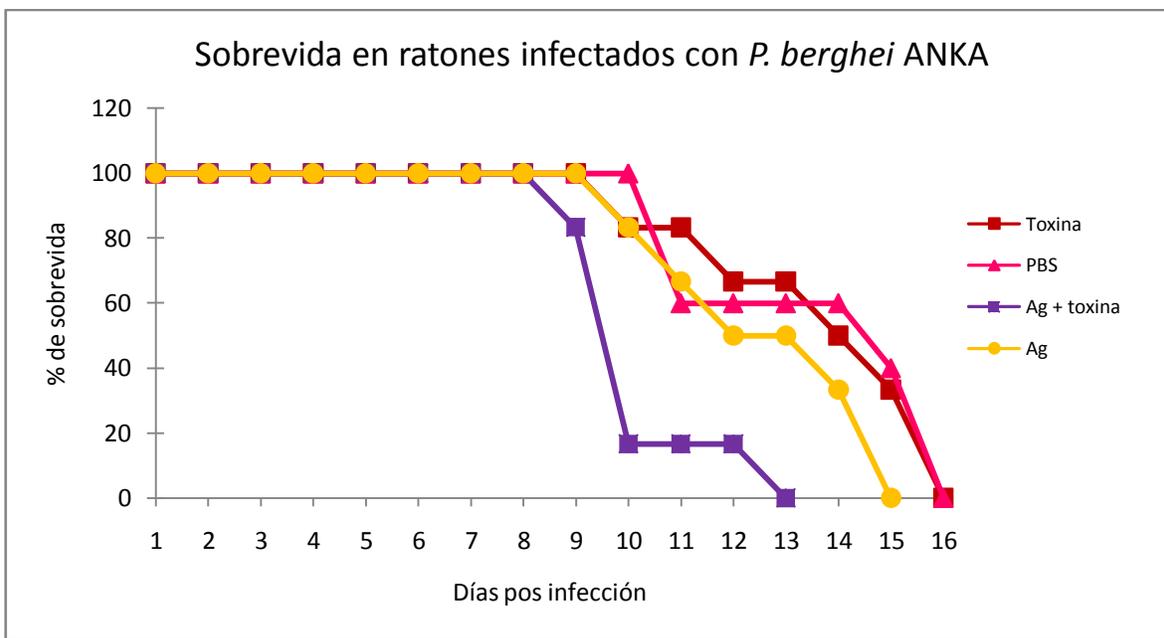


Figura 12. Efecto de la administración de la toxina, antígeno de plasmodio junto con toxina Cry1Ac (Ag+ toxina) y Ag en la sobrevivida en ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA. Los ratones recibieron 5 dosis (una cada semana) de antígeno o toxina, o antígeno junto con la toxina. Un día después de la última administración se infectaron con 1×10^3 glóbulos rojos parasitados. La sobrevivida se evaluó diariamente se consideró como 100% a la población de 6 ratones.

9.5 Pérdida de peso.

La pérdida de peso es una característica importante de muchos desordenes crónicos que también ocurre en enfermedades infecciosas como la malaria. En la malaria los pacientes sufren de hemólisis que ocurre cuando los glóbulos rojos parasitados se rompen y liberan sustancias antigénicas y toxinas que pueden causar daño generalizado y fallas en los órganos. Diversos investigadores demuestran que la pérdida de peso, la astenia y la incapacidad para desarrollar distintas actividades se deben a una persistente activación de la respuesta inmune [34]. Esto se refleja con el aumento de citocinas pro-inflamatorias como el TNF- α .

Para evaluar el efecto de la administración de la protoxina o la toxina Cry1Ac solas o en combinación con un extracto crudo antígeno de plasmodio sobre la pérdida de peso, se evaluó este parámetro en los ratones tratados con protoxina, toxina, antígeno, antígeno con protoxina y antígeno con toxina y se compararon contra el grupo control que recibió PBS. No detectamos diferencias significativas en la pérdida de peso de ninguno de los grupos tratados con respecto al grupo control (PBS).

En general el grupo tratado con protoxina fue el que perdió más peso. El grupo que se trató con antígeno mostró una ganancia de peso en el día 3 y hasta el día 7 post infección y empezó a perder peso a partir del día 8, por lo que sería importante determinar los niveles de TNF- α ; el grupo tratado con la protoxina mostró un porcentaje de peso constante en los primeros 7 días de la infección, pero posteriormente empezó a perder peso de forma continua. En el grupo que se co-administró el antígeno y la protoxina se observó una ganancia de peso en los primeros días de la infección, semejante a la del grupo control. Es importante notar que a partir del día 9 post-infección todos los grupos presentaron una pérdida de peso acelerada entre el 25% y 30% de su peso inicial (Figura 13).

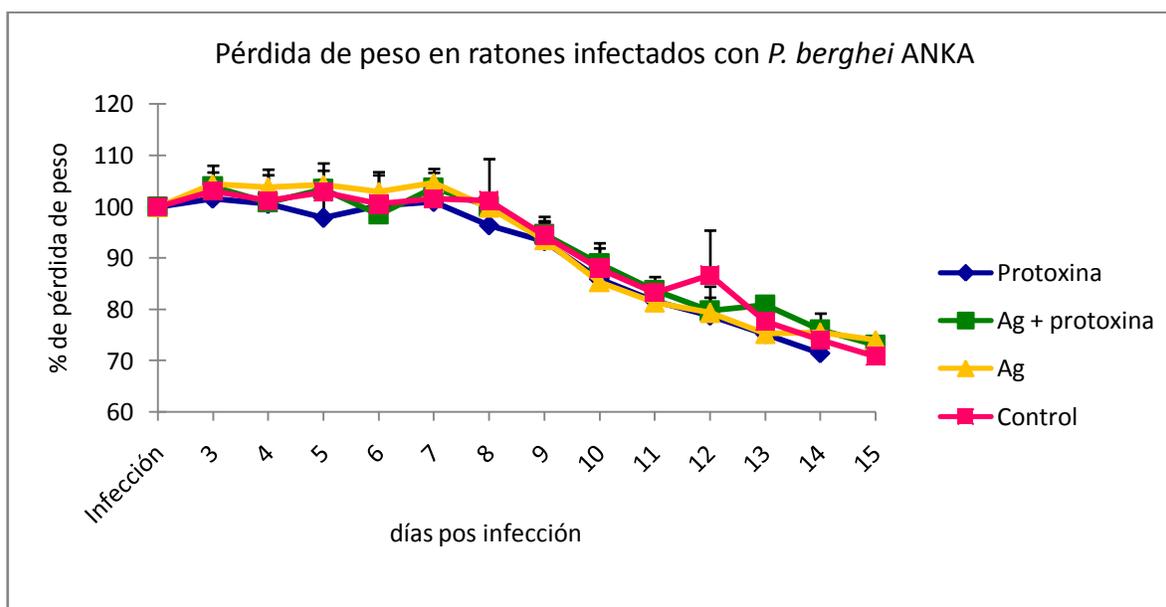


Figura 13. Efecto de la administración de la protoxina, antígeno de plasmodio (Ag) y antígeno junto con protoxina (Ag + protoxina) sobre la pérdida de peso en ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA. Los ratones recibieron 5 dosis (una semanal) y un día después de la última dosis se infectaron con *P. berghei* ANKA, como se describe en materiales y métodos. Diariamente se registró el peso de cada ratón, se consideró como el 100% el peso del ratón antes de infectarse con el plasmodio.

Los ratones que se trataron con la toxina desarrollaron una menor pérdida de peso, incluso se incrementó hasta el día 8 post infección, posteriormente, el peso disminuyó lentamente. Interesantemente, al coadministrar a la toxina con el antígeno se observó una mayor pérdida de peso fue a partir del día 9 en comparación con el grupo control. La pérdida de peso en los grupos que recibieron antígeno o PBS es similar a excepción de los días 12 y 13 en los que los ratones que recibieron PBS desarrollaron más peso que el grupo control (Figura 14).

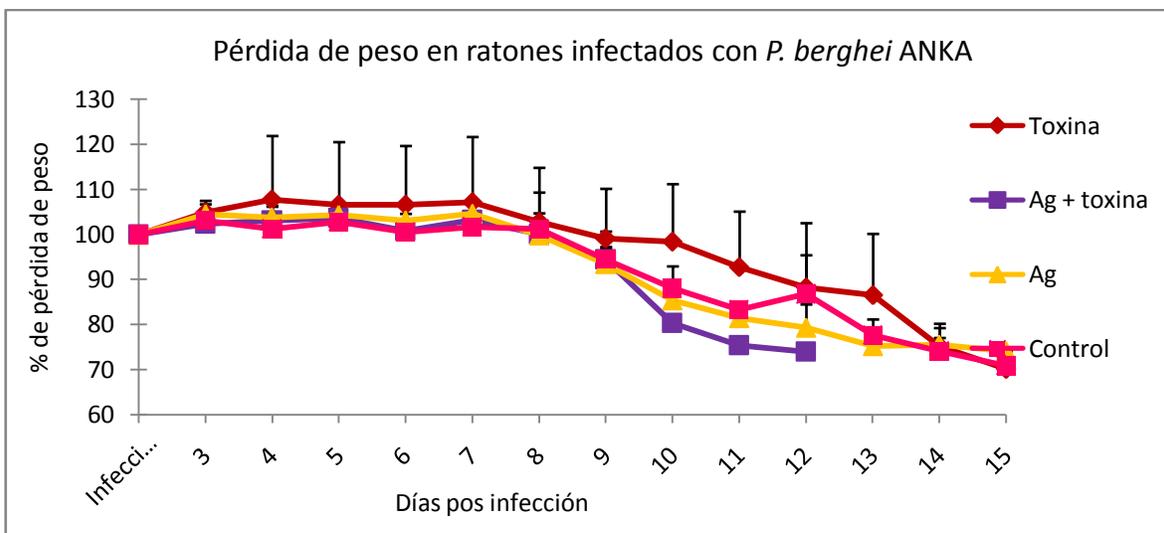


Figura 14. Efecto de la administración de la toxina, antígeno de plasmodio (Ag) y antígeno junto con toxina (Ag + toxina sobre la pérdida de peso en ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA. Los ratones recibieron 5 dosis (una semanal) y un día después de la última dosis se infectaron con *P. berghei* ANKA, como se describe en materiales y métodos. Diariamente se registró el peso de cada ratón, se consideró como el 100% el peso del ratón antes de infectarse con el plasmodio.

9.6 Parasitemia.

El número total de eritrocitos parasitados depende de numerosos factores como la fagocitosis del parásito mediada por los macrófagos los cuales a su vez liberan especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno que eliminan al parásito [35], además en la respuesta inmune adaptativa se producen anticuerpos específicos contra el parásito que favorecen la fagocitosis [36]. En este trabajo, se estudió si la administración de la protoxina, la toxina y el antígeno de plasmodio solo o en combinación con el antígeno modificaban los niveles de parásitos en sangre. La parasitemia se incrementó con una cinética similar en todos los grupos de ratones hasta el día 8 post infección, de ahí en adelante la cinética de la parasitemia se modificó para cada grupo. En los ratones tratados únicamente con la protoxina la parasitemia continuo incrementando hasta del día 10, en el día 11 disminuyó y se incrementa nuevamente en el día 12, de ahí en adelante la parasitemia fue disminuyendo. El grupo que se trató únicamente con el antígeno desarrolló un mayor control de la parasitemia, que tiende a incrementarse ligeramente (0.72%). Al coadministrar el antígeno junto con la protoxina el grupo de ratones presentó una parasitemia menor que todos los otros grupos entre los días 8 al 11 post-infección.

Sin embargo, a partir de ese día la parasitemia se incrementó con mayor velocidad que en los otros. En relación al grupo control se observó que la parasitemia incremento de forma constante a partir del día 6 post infección y alcanzó su máximo del 21.98% en el día 14 post infección. Cuando se compararon las parasitemias en los diferentes grupos, se detectó que los diferentes tratamientos modificaron los niveles de la parasitemia principalmente en el grupo tratado con el antígeno junto con la protoxina y en el grupo tratado con el antígeno se detectó disminución en la parasitemia en relación al grupo control (Figura 15).

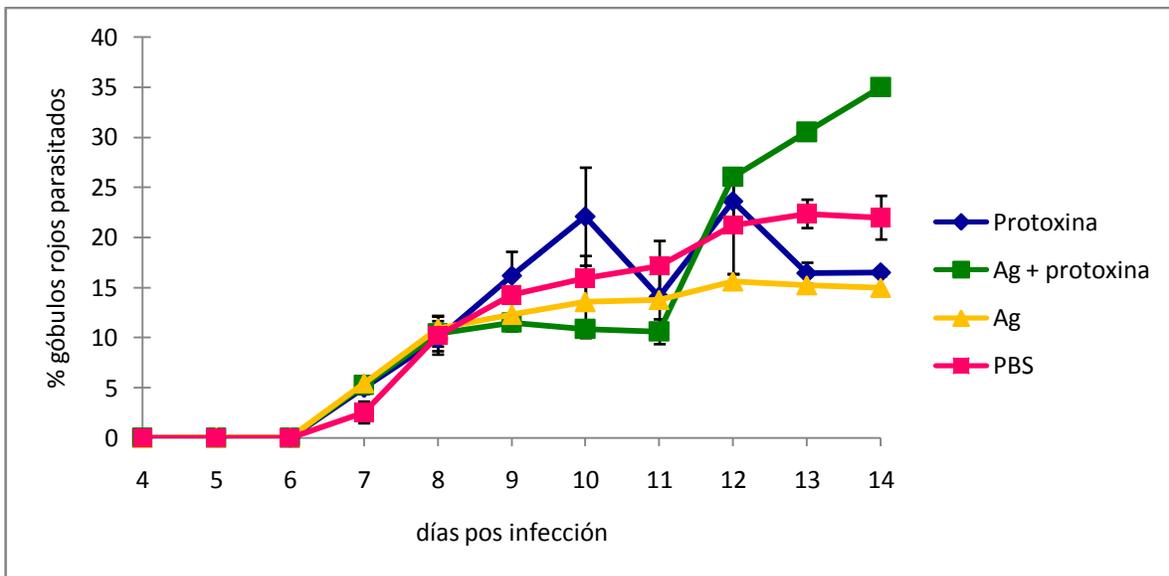


Figura 15. Efecto de la administración de la protoxina, antígeno (Ag) y antígeno junto con protoxina (Ag + protoxina) sobre la parasitemia en ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA. Los grupos de ratones recibieron 5 dosis (una semanal) y un día después de la última dosis se infectaron con *P. berghei* ANKA. Diariamente se tomaron muestras de sangre de cada ratón y se evaluó la parasitemia en frotis sanguíneos teñidos con Giemsa.

El grupo que se trató con la toxina presentó incremento en la parasitemia a partir del día 6 post-infección, alcanzó su nivel máximo (28%) en el día 12 y disminuyó hasta el 19% en el día 12 post-infección. En los ratones que se co-administraron con la toxina y el antígeno, la parasitemia fue menor que la que presentó el grupo que se trató con la toxina sola. Sin embargo, la parasitemia en estos dos grupos fue mayor que la que presentó el grupo tratado únicamente con antígeno o el control (Figura 16).

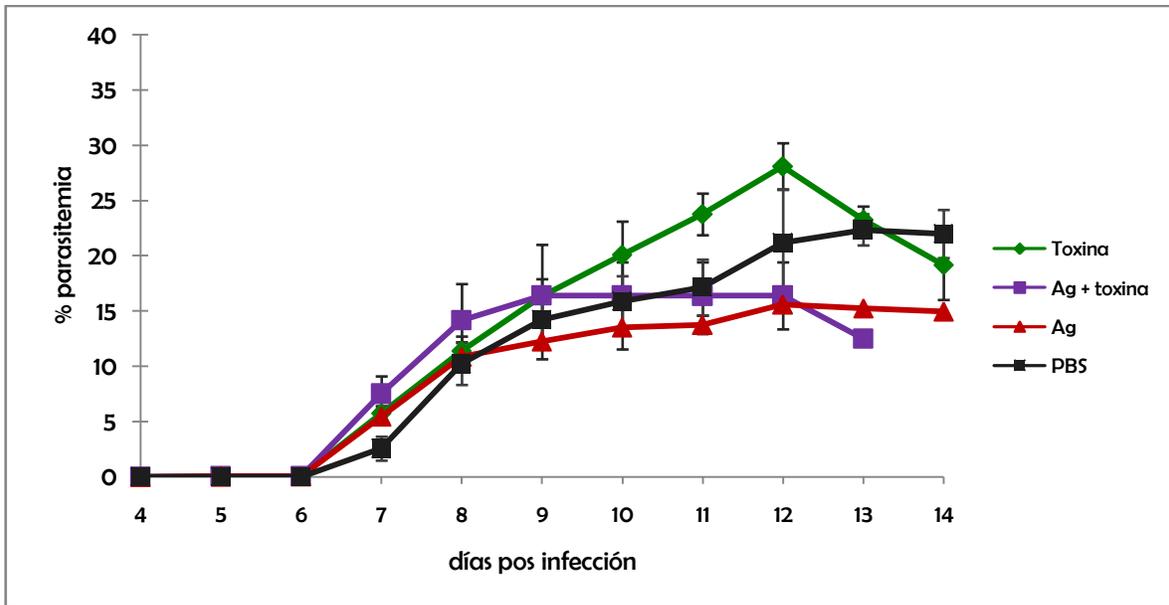


Figura 16. Efecto de la administración de la toxina, antígeno (Ag) y antígeno junto con toxina (Ag + toxina) sobre la parasitemia en ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA. Los grupos de ratones recibieron 5 dosis (una semanal) y un día después de la última dosis se infectaron con *P. berghei* ANKA. Diariamente se tomaron muestras de sangre de cada ratón y se evaluó la parasitemia diariamente 5 en frotis sanguíneos teñidos con Giemsa.

9.7 Hemoglobina.

Durante la infección por *Plasmodium* los macrófagos del sistema retículo endotelial eliminan a los eritrocitos infectados en el bazo. Sin embargo, también se eliminan eritrocitos no infectados debido a que el parásito libera antígenos solubles que se adhieren a las membranas de los glóbulos rojos no infectados, y entonces se reconocen como “extraños” y se eliminan en el bazo [37]. Para evaluar el efecto de la administración de la protoxina, el antígeno y la protoxina coadministrada junto con el antígeno sobre el grado de destrucción de los eritrocitos, se determinó la concentración de hemoglobina en los distintos grupos de ratones. No se detectó diferencia estadísticamente significativa en los niveles de hemoglobina en los grupos de ratones que recibieron tratamiento en relación al grupo control. El grupo de ratones tratados con la protoxina presentó una menor concentración de hemoglobina desde los primeros días de la infección, alternando con periodos en los que la concentración incrementaba, presentaron la menor concentración de hemoglobina en los días 6 y 7 post infección. El grupo tratado con el antígeno presentó una disminución en la concentración de hemoglobina hasta el día 5 post infección, en el día 6 se incrementó y nuevamente disminuyó el día 7, a partir de ese día el grupo mostró una tendencia a incrementar los niveles de hemoglobina.

El grupo que recibió a la protoxina junto con el antígeno desarrolló la mayor concentración de hemoglobina desde los primeros días de la infección en comparación con los otros grupos. Sin embargo, a partir del día 6 la concentración disminuyó progresivamente hasta el día 9 (Figura 17).

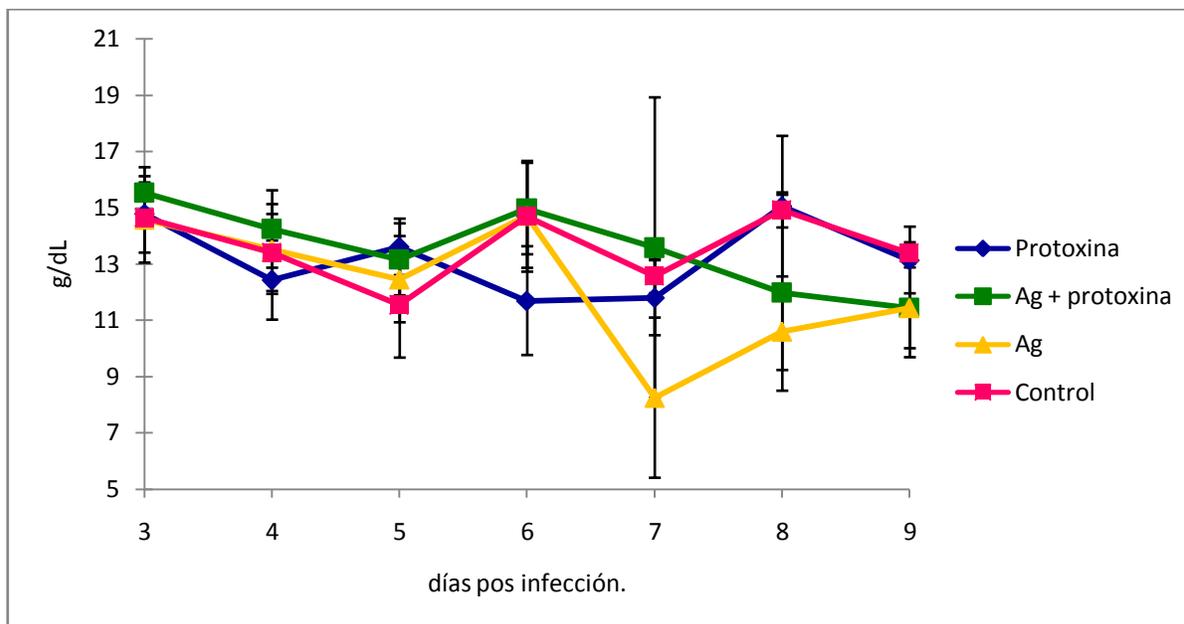


Figura 17. Efecto de la administración de la protoxina, antígeno (Ag) y antígeno junto con protoxina (Ag + protoxina) sobre la concentración de la hemoglobina de ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA. Los grupos de ratones recibieron 5 dosis (una semanal) y un día después de la última dosis se infectaron con *P. berghei* ANKA. Diariamente se tomaron muestras de sangre de cada ratón y se evaluó la concentración de hemoglobina espectrofotométricamente con el reactivo de Drabkin.

Los niveles de hemoglobina disminuyeron de forma similar en todos los grupos de ratones durante los días 3 al 5 post infección, posteriormente en el día 6 los ratones tratados con toxina incrementaron la concentración de hemoglobina más que todos los otros grupos. En el día 7 el grupo con mayores niveles de hemoglobina fue el grupo control y el que tuvo los niveles más bajos fue el tratado con antígeno y esta tendencia se conservó hasta el día 9 post-infección (Figura 18).

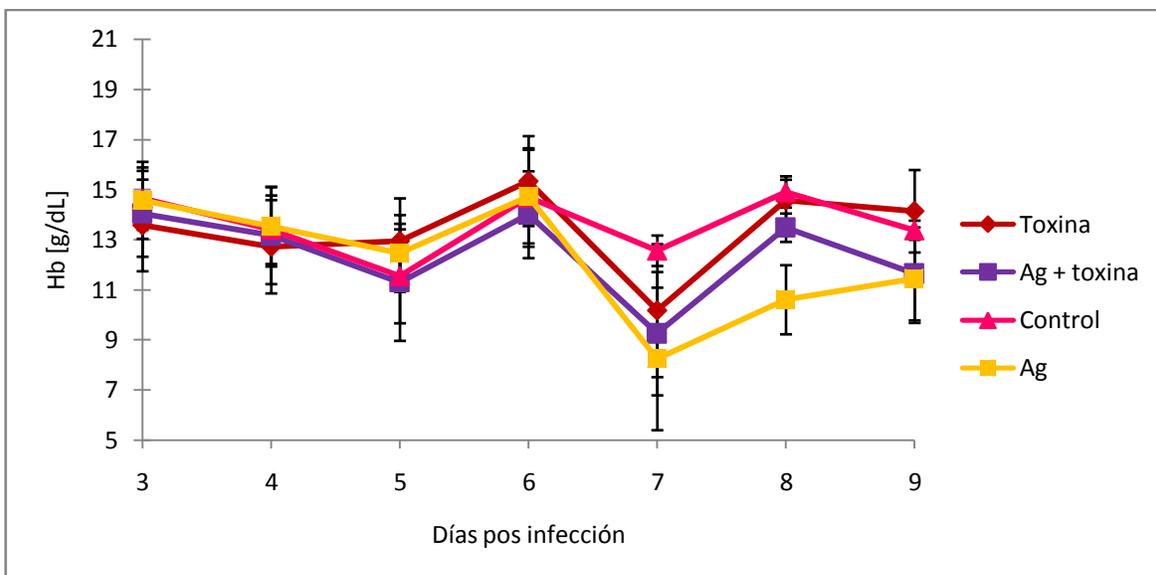


Figura 18. Efecto de la administración de la toxina, antígeno (Ag) y antígeno junto con toxina (Ag + toxina) sobre la concentración de hemoglobina en ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA. Los grupos de ratones recibieron 5 dosis (una semanal) y un día después de la última dosis se infectaron con *P. berghei* ANKA. Diariamente se tomaron muestras de sangre de cada ratón y se evaluó la concentración de hemoglobina espectrofotométricamente con el reactivo de Drabkin.

9.8 Índice esplénico.

El bazo juega un papel importante durante la infección con *Plasmodium* ya que remueve de la circulación a los glóbulos rojos parasitados y dañados, las células B antígeno específicas se generan en las distintas áreas de la zona blanca de este órgano [38]. La esplenomegalia es un fenómeno común asociado con la malaria, tiende a incrementarse al aumentar la destrucción de glóbulos rojos y plaquetas [39]. En este trabajo se analizó si la administración de la protoxina Cry1Ac o la toxina solas o en combinación con antígeno de plasmodio modificaban la esplenomegalia en los días 6 y 9 post infección. No detectamos diferencias significativas entre el índice esplénico de los ratones tratados con la protoxina o el antígeno en comparación con el grupo control en los días 6 y 9 post infección. Interesantemente, el grupo co-administrado con antígeno y protoxina desarrollo menor esplenomegalia en el día 6 que el grupo únicamente tratado con antígeno o protoxina por separado, no detectamos diferencias entre estos tres grupos en el día 9 post infección. Por otro lado, el grupo tratado con la toxina desarrolló el índice esplénico más bajo de todos los grupos, inclusive que el grupo control. La administración de antígeno junto con la toxina generó un incremento del índice esplénico en comparación con el grupo que solo recibió a la toxina que fue menor que el que presentó el grupo tratado únicamente con el antígeno.

Todos los grupos desarrollaron un incremento en el índice esplénico el día 9 en comparación con el día 6 (Figura 19). Los factores que directamente influyen en el índice esplénico son: la activación de las poblaciones celulares del bazo que proliferan en respuesta a la cantidad y calidad del estímulo antigénico, así como la inducción de apoptosis para controlar esa proliferación [39], por lo anterior, los resultados indican que se incrementó la estimulación antigénica a medida que avanzó la infección y que la coadministración de antígeno con protoxina o con toxina moduló negativamente la proliferación celular.

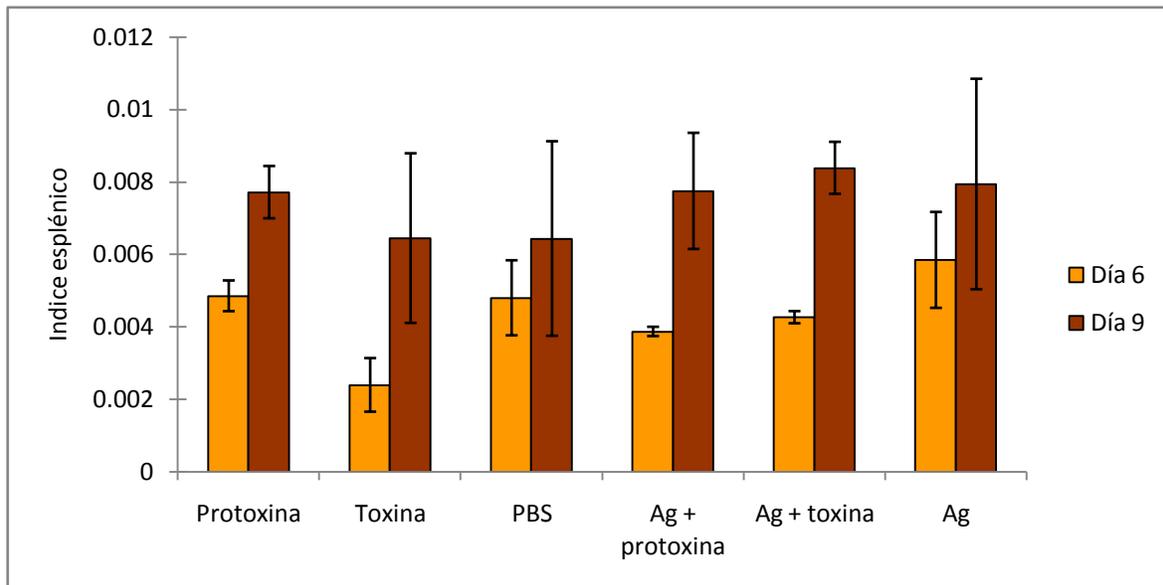


Figura 19. Efecto de la administración de la protoxina o la toxina Cry1Ac solas o en combinación con antígeno de plasmodio sobre el índice esplénico en ratones infectados con *P. berghei* ANKA. Grupos de ratones recibieron 4 dosis de protoxina, toxina o una combinación de antígeno con toxina o antígeno con protoxina. En los días 6 y 9 post infección se sacrificaron 3 ratones de cada grupo, se les extrajo el bazo y se pesó. Se calculó el índice esplénico con la siguiente relación $Indice\ esplénico = \frac{peso\ del\ raton}{peso\ del\ bazo}$.

9.9 Efecto de la administración de la protoxina Cry1Ac o la toxina Cry1Ac solas o en combinación con un extracto soluble de antígeno de *P. berghei* ANKA sobre la expresión de INF- γ en el bazo de ratones infectados con *P. berghei* ANKA

El INF- γ es un activador de macrófagos involucrado en la respuesta inmune innata contra la malaria [23]. En los modelos murinos de malaria el INF- γ juega un papel importante en la protección contra la etapa sanguínea del plasmodio [40]. El INF- γ activa a los macrófagos e incrementa la síntesis del TNF- α y del TGF- β , así como de la IL-6 y de las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno [41].

Las células T secretan INF- γ y también cooperan con las células B para inducir la síntesis de anticuerpos específicos del tipo IgG [42].

En este trabajo analizamos si la administración de protoxina o de la toxina, o de la combinación de antígeno con protoxina o antígeno con toxina modulaba el nivel de expresión del INF- γ en ratones infectados con *P. berghei* ANKA. La administración de los diferentes tratamientos no modificó significativamente la expresión de IFN- γ con relación al grupo control. Sin embargo, en el día 9 se presentó un incremento estadísticamente significativo en los ratones tratados con la protoxina con relación al grupo control (Figura 10). También en el día 9 post-infección detectamos un incremento significativo de la expresión de IFN- γ en el grupo al que se le co-administró el antígeno junto con la toxina con respecto al grupo control. En todos los demás grupos no detectamos cambios significativos en la expresión de esta citocina (Figura 20).

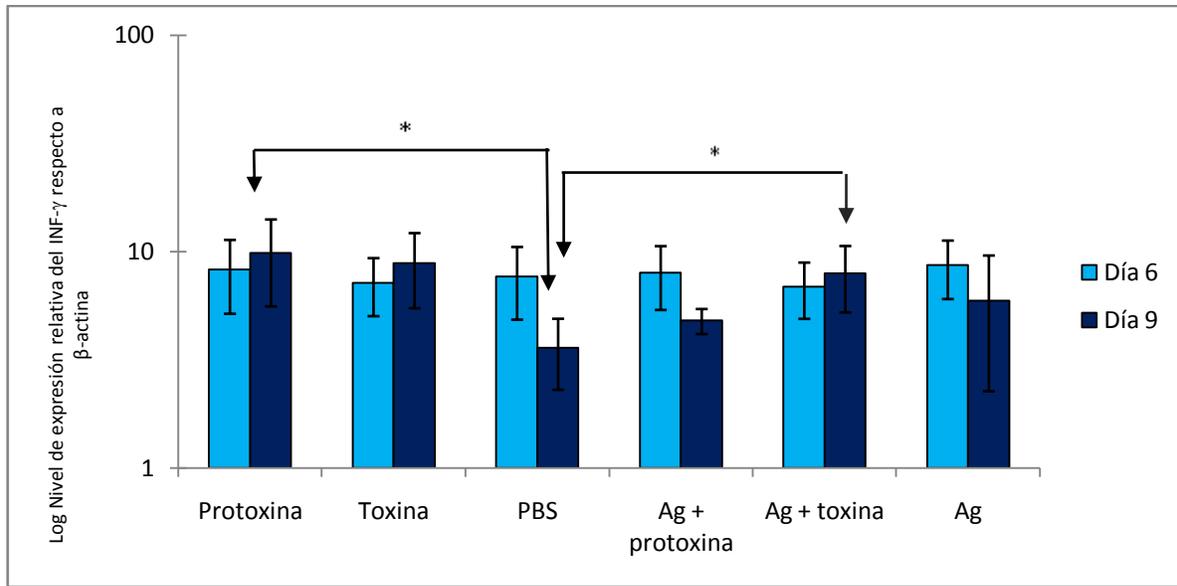


Figura 20. Efecto de la administración de la protoxina o la toxina Cry1Ac solas o en combinación con antígeno de plasmodio sobre la expresión relativa del INF- γ en el bazo de ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA. Seis grupos de ratones recibieron 5 dosis de protoxina, toxina o una combinación de antígeno con toxina o antígeno con protoxina. En los días 6 y 9 post-infección se sacrificaron a 3 ratones de cada grupo, se les extrajo el bazo y se aisló ARN que se retrotranscribió y se amplificó con primers específicos para ese gen utilizando la técnica de PCR en tiempo real. El nivel de expresión relativa se calculó con la siguiente ecuación
$$\text{Nivel de Expresión} = \frac{\text{Eficiencia de INF-}\gamma^{\Delta Ct}}{\text{Eficiencia de } \beta\text{-actina}^{\Delta Ct}}$$
. Para hacer el cálculo se tomó en cuenta la expresión de ratones sanos sin infección. Se graficó el promedio de los niveles de expresión por grupo y día, las barras señalan la desviación estándar y los grupos marcados (*) son significativamente diferentes con $P < 0.05$ al grupo control.

9.10 Efecto de la administración de la protoxina Cry1Ac o la toxina Cry1Ac solas o en combinación con un extracto soluble de antígeno de *P. berghei* ANKA sobre la expresión de TNF- α en el bazo de ratones infectados con *P. berghei* ANKA.

El TNF- α se induce como respuesta a los glóbulos rojos infectados con *P. berghei* ANKA, a la hemozoína y a los glucolípidos sobre los macrófagos y las células NK [43]. Esta citocina puede tener funciones asociadas con la eliminación del parásito, pero también con la patología. Se puede activar a favor del hospedero y promover resistencia contra enfermedades infecciosas, pero también puede estar involucrado en la toxicidad y en el proceso inflamatorio [44].

En este trabajo, detectamos que la expresión de TNF- α fue similar en todos los grupos analizados, las únicas diferencias significativas que detectamos fue una disminución en el grupo tratado con la protoxina en el día 9 post infección y en el grupo que se coadministró con antígeno y toxina también en el día 9 con relación al grupo control tratado con PBS.

En todos los grupos se detectaron niveles mayores en el día 9 que en el día 6 post infección (Figura 21).

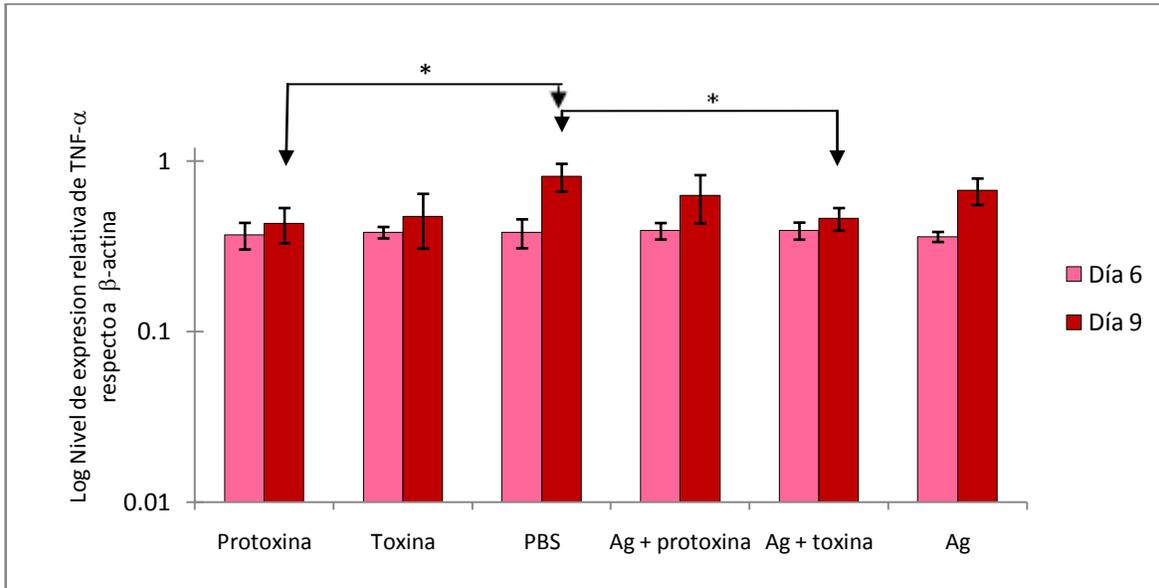


Figura 21. Efecto de la administración de la protoxina o la toxina Cry1Ac solas o en combinación con antígeno de plasmodio sobre la expresión relativa del TNF- α en el bazo de ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA. Seis grupos de ratones recibieron 5 dosis de protoxina, toxina o una combinación de antígeno con toxina o antígeno con protoxina. En los días 6 y 9 post-infección se sacrificaron a 3 ratones de cada grupo, se les extrajo el bazo y se aisló ARN que se retrotranscribió y se amplificó con primers específicos para ese gen utilizando la técnica de PCR en tiempo real. Para realizar el cálculo se tomó en consideración la expresión de ratones sanos sin infección. El nivel de expresión relativa se calculó con la siguiente ecuación
$$\text{Nivel de Expresión} = \frac{\text{Eficiencia de TNF-}\alpha^{\Delta Ct}}{\text{Eficiencia de } \beta\text{-actina}^{\Delta Ct}}$$
. Se gráfico el promedio de los niveles de expresión por grupo y día, las barras señalan la desviación estándar y los grupos marcados (*) son significativamente diferentes con $P < 0.05$

9.11 Efecto de la administración de la protoxina Cry1Ac o la toxina Cry1Ac solas o en combinación con un extracto soluble de antígeno de *P. berghei* ANKA sobre la expresión del TGF- β en el bazo de ratones infectados con *P. berghei* ANKA

Se ha descrito que el TGF- β está asociado con una reducción significativa en el riesgo de la fiebre que conduce a la regulación de la cascada de citocinas pro-inflamatorias, lo que contribuye a la disminución de la patología de la malaria [44].

Los niveles de expresión del TGF- β fueron similares en los diferentes grupos en los días 6 y 9 post infección. La única diferencia significativa que detectamos fue en el día 9 post infección en que el grupo co-administrado con el antígeno y la protoxina, que desarrolló

niveles significativamente menores en relación al grupo control (Figura 22).

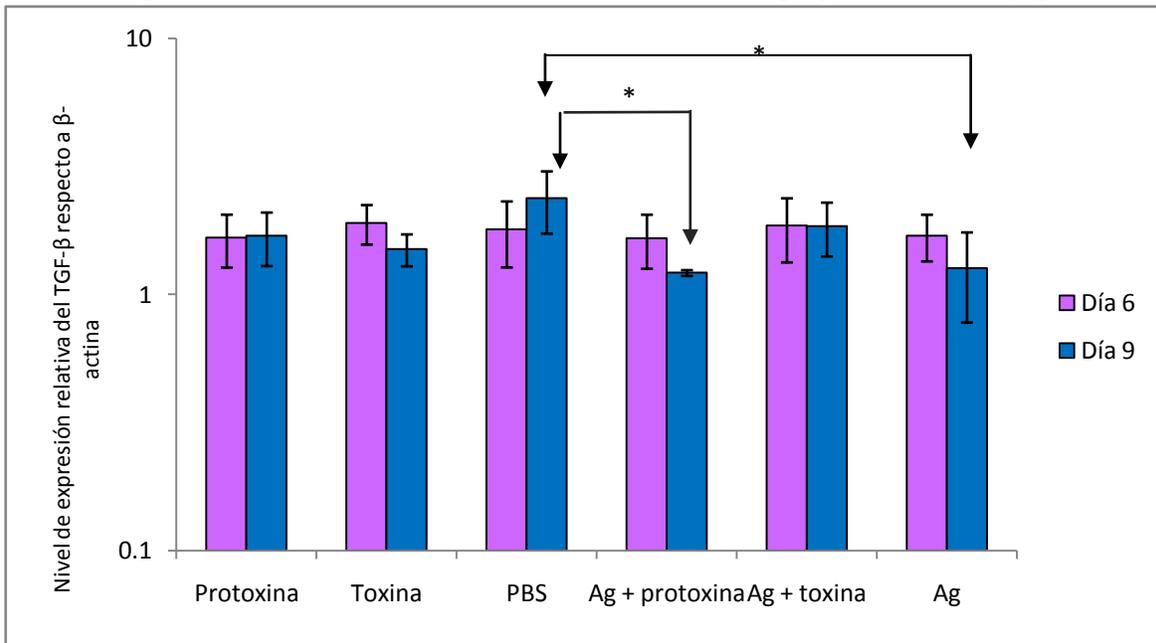


Figura 22. Efecto de la administración de la protoxina o la toxina Cry1Ac solas o en combinación con antígeno de plasmodio sobre la expresión relativa del TGF-β en el bazo de ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA. Seis grupos de ratones recibieron 5 dosis de protoxina, toxina o una combinación de antígeno con toxina o antígeno con protoxina. En los días 6 y 9 post-infección se sacrificaron a 3 ratones de cada grupo, se les extrajo el bazo y se aisló ARN que se retrotranscribió y se amplificó con primers específicos para ese gen utilizando la técnica de PCR en tiempo real. Se tomó en consideración la expresión de ratones sanos sin infección. Para realizar el cálculo se tomó en consideración la expresión de ratones sanos sin infección. El nivel de expresión relativa se calculó con la siguiente ecuación
$$\text{Nivel de Expresión} = \frac{\text{Eficiencia del TGF-}\beta^{\Delta Ct}}{\text{Eficiencia de } \beta\text{-actina}^{\Delta Ct}}$$
 Se gráfico el promedio de los niveles de expresión por grupo y día, las barras señalan la desviación estándar y los grupos marcados (*) son significativamente diferentes con $P < 0.05$

9.12 Efecto de la administración de la protoxina Cry1Ac o la toxina Cry1Ac solas o en combinación con un extracto soluble de antígeno de *P. berghei* ANKA sobre la expresión de IL-10 en el bazo de ratones infectados con *P. berghei* ANKA.

La IL-10 inhibe la secreción de INF-γ y de IL-2 en las células Th1 del humano; también regula la expresión de moléculas MHC clase II y la producción de citocinas por monocitos, macrófagos y células dendríticas, por lo que inhibe la diferenciación de Th1 y la proliferación de células T, además promueve la diferenciación de los linfocitos B [21].

En el día 6 post-infección no detectamos diferencia significativa en ningún grupo en relación al grupo control. En el día 9 se detectó una disminución significativa en los niveles de expresión de IL-10 en el grupo tratado con protoxina con relación al grupo control.

El nivel de la expresión de la IL-10 en el día 9 de todos los grupos fue menor al que desarrolló el grupo control, lo que sugiere que la protoxina y la toxina modularon negativamente la expresión de esta citocina (Figura 23). Esto pudo generar un desequilibrio entre citocinas pro-inflamatorias y anti inflamatorias que llevó a una mayor patología en los ratones.

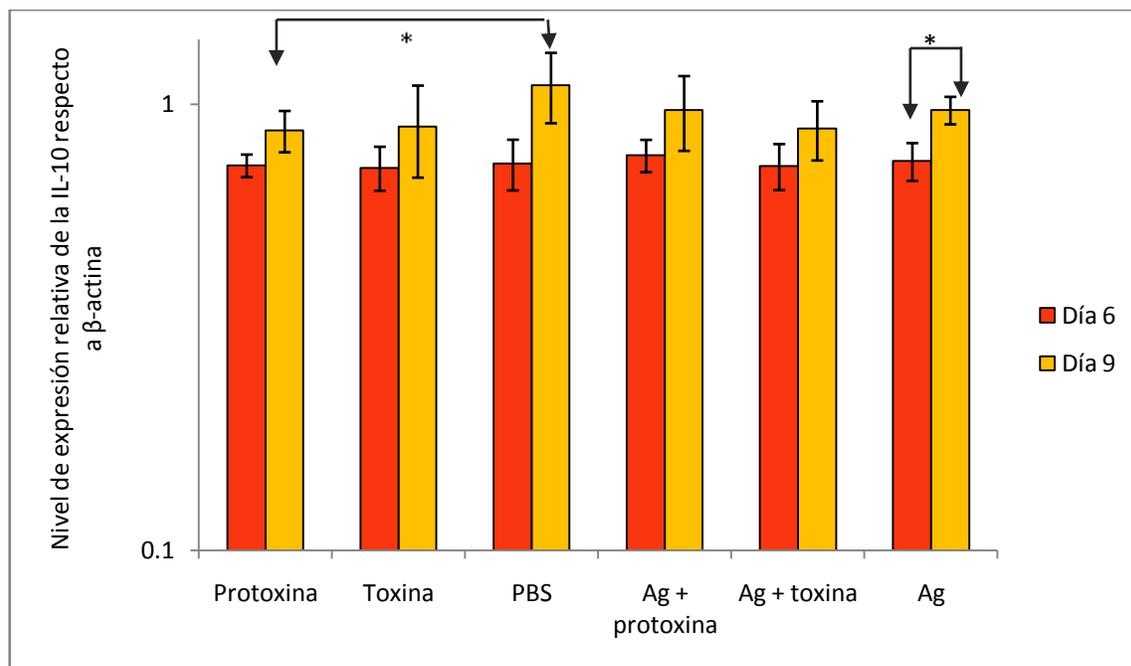


Figura 23. Efecto de la administración de la protoxina o la toxina Cry1Ac solas o en combinación con antígeno de plasmodio sobre la expresión relativa de la IL-10 en el bazo de ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA. Seis grupos de ratones recibieron 5 dosis de protoxina, toxina o una combinación de antígeno con toxina o antígeno con protoxina. En los días 6 y 9 post-infección se sacrificaron a 3 ratones de cada grupo, se les extrajo el bazo y se aisló ARN que se retrotranscribió y se amplificó con primers específicos para ese gen utilizando la técnica de PCR en tiempo real. Para realizar los cálculos, se tomó en consideración la expresión de ratones sanos sin infección. Se tomó en consideración la expresión de ratones sanos sin infección el nivel de expresión relativa se calculó con la siguiente ecuación
$$\text{Nivel de Expresión} = \frac{\text{Eficiencia de la IL-10}^{\Delta Ct}}{\text{Eficiencia de } \beta\text{-actina}^{\Delta Ct}}$$
. Se graficó el promedio de los niveles de expresión por grupo y día, las barras señalan la desviación estándar y los grupos marcados (*) son significativamente diferentes con $P < 0.05$.

10. Discusión.

La malaria o paludismo es la enfermedad infecciosa que ocasiona el mayor número de muertes en el mundo [6]. A pesar de la intensa investigación en las últimas décadas no se ha logrado obtener una vacuna efectiva que elimine esta enfermedad, debido entre otras razones a la enorme variación antigénica del parásito y una memoria inmunológica deficiente. Por otro lado, la patología en esta enfermedad la origina la propia respuesta inmune que se dispara cuando los mecanismos de protección no se modulan adecuadamente, por lo que las vacunas además de inducir la eliminación del parásito también deben generar una respuesta inmune regulada para evitar la patología. En un intento por entender como inducir una respuesta inmune que controle la parasitemia pero que no genere patología, administramos vía intraperitoneal a la protoxina Cry1Ac a una dosis de 5 µg/ratón por semana durante cuatro semanas y logramos cierto grado de protección que se manifestó con una mayor sobrevida y menores niveles de parasitemia [19]. Por esta razón, también analizamos el efecto adyuvante de la protoxina Cry1Ac al administrarla junto con un extracto de antígeno de *P. berghei* ANKA. Además, probamos el efecto de la toxina Cry1Ac, puesto que en experimentos preliminares en nuestro laboratorio, detectamos que era también altamente inmunogénica. Lo primero que evaluamos fue si la protoxina Cry1Ac o la toxina Cry1Ac administradas solas o en combinación con el antígeno modificaban la sobrevida de los ratones infectados con *P. berghei* ANKA, como grupo control se utilizó un grupo de ratones que recibió PBS y que se infectó con el plasmodio. También se estudió un grupo tratado únicamente con el antígeno de plasmodio y dos grupos adicionales que se coadministraron con la protoxina y antígeno o bien con la toxina y antígeno.

Con las dosis que se utilizaron tanto de protoxina por separado como en combinación con el antígeno, no se mejoró el tiempo de la sobrevida que genera el administrar únicamente el antígeno o el vehículo (PBS) (Figura 11). Este hallazgo podría deberse a lo siguiente: a) La infección con *P. berghei* ANKA es letal y la protección que se generó resultó muy pobre y no fue suficiente para extender la vida de los ratones a los que se les administró la protoxina. b) Dado que la protoxina Cry1Ac modula positivamente la síntesis de citocinas pro-inflamatorias como IFN- α o TNF- α que si bien se requieren para iniciar la respuesta inmune contra el parásito, también es cierto que si estas citocinas se producen en exceso, pueden generar diferentes patologías, por lo que más adelante evaluaremos la expresión de esas citocinas pro-inflamatorias y la de los genes reguladores de la inflamación como el TGF- β y la IL-10.

También analizamos el efecto de la administración de la toxina Cry1Ac (es el producto de la digestión de la protoxina Cry1Ac con tripsina) sobre la sobrevida. Interesantemente, detectamos que la toxina sola generó un tiempo de sobrevida mayor que cuando se coadministró con el antígeno. La administración únicamente del antígeno generó menor sobrevida que la toxina (Figura 12). Lo anterior sugiere que la dosis a la que se administró la toxina pudo actuar sinérgicamente con el antígeno y eso pudo generar mayor patología.

Otro aspecto asociado con la patología en malaria es la pérdida de peso, dado que citocinas como el TNF- α generan pérdida de peso [34], por lo que en este trabajo analizamos el efecto de la protoxina sola o en combinación con antígeno sobre la pérdida de peso. El grupo que recibió a la protoxina fue el que perdió más peso y la administración de la combinación de antígeno con protoxina mejoró esta condición de los días 8 al 14 post infección, en relación al grupo al que se le administró únicamente el antígeno. El grupo tratado con la toxina fue el que conservó mejor su peso, e inclusive al principio de la infección manifestó un incremento (Figura 12). Detectamos que la coadministración de antígeno con toxina exacerbó la pérdida de peso en relación a los demás grupos de ratones (Figura 13). Este dato en particular corrobora que la coadministración de la toxina con el antígeno puede generar respuestas inmunes muy intensas que conducen a acelerar la muerte.

Otra forma adicional de medir la protección es evaluar la parasitemia. A la dosis de protoxina empleada no detectamos que se disminuyera la parasitemia, inclusive en los días 9 y 10 post infección se detectó un incremento en relación a los demás grupos de ratones. La coadministración de antígeno con protoxina generó niveles de parasitemia menores en los días 9 al 11 post infección que los demás grupos (Figura 15). Sin embargo, la protección se detectó en una ventana de tiempo muy corta, dado que después de ese día la parasitemia se incrementó inclusive más que en los otros grupos.

La administración únicamente de la toxina incrementó la parasitemia, sin embargo al combinarla con el antígeno se detectó una disminución importante que no superó la protección de administrar únicamente al antígeno (Figura 16). Lo anterior indica que las dosis empleadas de toxina no generaron protección y por el contrario exacerbaron la patología.

La concentración de hemoglobina se puede utilizar para analizar otro aspecto de la patología que es la anemia, que es una de las complicaciones más graves de la malaria. A medida que disminuye la concentración de hemoglobina es mayor la anemia y refleja la destrucción de eritrocitos tanto los sanos como los parasitados [45].

En los días 6 y 7 post infección el grupo tratado con protoxina presentó niveles menores de hemoglobina que el grupo control, mientras que el grupo administrado con el antígeno presentó una menor concentración de Hb que el grupo control. Sin embargo, el grupo que recibió la combinación de antígeno con protoxina fue el que presentó los niveles más elevados de Hb hasta el día 7 post infección. Esos valores correlacionan con una menor parasitemia en ese grupo (Figuras 15 y 17). Por otro lado, el grupo tratado con la toxina desarrolló niveles de hemoglobina más elevados en comparación con el grupo que se coadministró con el antígeno y que el grupo que recibió antígeno solo (Figura 18). Este resultado indica que se generó menor anemia en el grupo tratado solo con la toxina, es en ese grupo donde se generó menor daño en los eritrocitos. Interesantemente, fue el grupo que presentó mayor parasitemia, lo que indica que la destrucción de eritrocitos no correlacionó con el nivel de parasitemia, este hallazgo indica que la anemia es el resultado de la parasitemia pero también de otros factores adicionales como pueden ser la destrucción en el sistema retículo endotelial de eritrocitos que portaban antígenos del parásito sobre su superficie. La respuesta inmune probablemente se activó de manera más intensa en el grupo que recibió únicamente a la toxina.

El índice esplénico permite conocer el tamaño del bazo, este órgano es importante, porque destruye a los eritrocitos dañados, viejos, alterados o infectados. El bazo elimina eritrocitos por una selección física y por la interacción célula-célula [46]. A medida que los plasmodios se desarrollan, los eritrocitos se deforman, pierden agua y disminuyen de tamaño lo que incrementa su densidad, esos cambios los detectan los macrófagos del sistema retículo endotelial del bazo y los eliminan. La esplenomegalia es común en malaria y se ha asociado con la eliminación del parásito. En el bazo también ocurre la estimulación de la respuesta inmune por la presentación del antígeno y la proliferación de células de la respuesta inmune con la consecuente producción de inmunoglobulinas [47]. En el día 6 post infección el grupo tratado con antígeno fue el que generó la mayor esplenomegalia, seguido del control y el tratado con la protoxina, interesantemente el grupo que se coadministró con antígeno y protoxina desarrolló menor índice esplénico en comparación con el que recibió la protoxina o el antígeno solo. El grupo que se trató con la toxina desarrolló el índice esplénico menor (Figura 19), mientras que en el día 9 post infección el índice esplénico incremento en todos los grupos y no detectamos diferencias significativas en relación al grupo control. Este hallazgo podría explicarse por el nivel de parásitos en sangre, a medida que es más alto, la estimulación antigénica aumenta y por lo tanto también proliferan más las células de la respuesta inmune, lo que incrementó el índice esplénico en todos los grupos en el día 9.

Las citocinas son moléculas importantes en la activación y regulación de la respuesta inmune y se han asociado tanto a la protección como a la patología en malaria [47, 48]. En este trabajo analizamos como influía la administración de la protoxina y la toxina Cry1Ac solas o combinadas con antígeno de plasmodio sobre la expresión del RNAm que codifica para dos citocinas pro inflamatorias (IFN- γ y TNF- α) y dos citocinas anti inflamatorias (TGF- β e IL-10). El IFN- γ se ha asociado a protección durante el inicio de la fase hepática [49] y de la fase sanguínea de la infección [50]. Sin embargo, los niveles elevados de esta citocina también pueden generar patología en malaria [48, 51]. En este trabajo se detectó que la administración de la protoxina y la coadministración de la toxina y el antígeno incrementaron significativamente los niveles de IFN- γ en el día 9 post infección (Figura 20), ese aumento no se relacionó con protección dado que en ese día los niveles de parasitemia resultaron mayores en ambos grupos comparados con el grupo control (Figuras 15 y 16).

De igual forma que el IFN- γ , el TNF- α es crítico tanto para mediar la eliminación del plasmodio como para promover la enfermedad [49]. El IFN- γ y el TNF- α actúan sinérgicamente para inducir la muerte del parásito dentro de los fagocitos. Sin embargo, los niveles elevados de TNF- α correlacionan con la severidad en la malaria cerebral, se ha demostrado que la pérdida de peso en malaria depende de la caquexina o TNF- α [51], también la anemia, esto es porque el TNF- α activa a los macrófagos para fagocitar eritrocitos [52]. En este trabajo, detectamos que en el día 9 post infección, los niveles más altos de TNF- α se presentaron en el grupo control y que al administrar a la protoxina o al antígeno junto con la toxina la expresión de TNF- α disminuyó significativamente (Figura 21), lo que indica que tanto la administración de la protoxina, como la coadministración del antígeno y la toxina juntos, pudieron haber regulado negativamente la respuesta inflamatoria. Sin embargo, esta regulación no fue suficiente para incrementar la supervivencia en relación al grupo control (Figuras 11 y 12).

Otra citocina importante en la regulación de la respuesta inflamatoria en malaria es el TGF- β , se ha demostrado que la virulencia de las infecciones con malaria depende de la fuente celular de TGF- β así como del tiempo de su producción. El TGF- β regula negativamente al TNF- α y al IFN- γ [53]. Se ha descrito que los niveles bajos de TGF- β y de IL-12 se asocian con malaria severa y malaria cerebral [54]. En este trabajo, detectamos que los niveles de TGF- β permanecieron prácticamente sin modificación a lo largo de la infección (días 6 y 9), sin embargo, detectamos una disminución estadísticamente significativa en el día 9 post infección en el grupo que se coadministró con el antígeno junto con la protoxina Cry1Ac en comparación al grupo control (Figura 22).

Es probable que la disminución de los niveles de expresión de TGF- β en ese grupo se asocie con la menor sobrevivencia justo después del día 9 post infección (Figura 11).

Finalmente, otra citocina anti-inflamatoria por excelencia es la IL-10. Al igual que el TGF- β también regula la respuesta inflamatoria en la infección por plasmodio lo que puede conducir a anemia severa y al incremento en la parasitemia. La principal fuente de IL-10 son las células T, las Th1, Th2, Tr1 y las T regs [55]. Se ha descrito que el TGF- β induce la expresión de IL-10 [56]. En el presente trabajo la expresión de IL-10 disminuyó significativamente en el grupo que se trató con protoxina en el día 9 post infección en comparación con el grupo control (Figura 23). Esa disminución explica por qué los niveles de expresión de IFN- γ en este grupo fueron más elevados que en el grupo control (Gráfica 10) ya que la IL-10 reprime la expresión de IFN- γ .

Los resultados obtenidos indican que en los ratones que se trataron con la protoxina más el antígeno, la respuesta inmune se modificó permitiendo la eliminación del parásito sin embargo la protección que se generó no fue lo suficiente para una eliminación total del parásito, en otros casos como en el grupo que se trató con la toxina, la respuesta inmune que se generó fue elevada lo que llevó a la muerte de los ratones.

11. Conclusiones.

- La administración de la protoxina incrementó la pérdida de peso, incrementó los niveles de IFN- γ , disminuyó los niveles de TNF- α y de IL-10.
- La administración de la toxina, incrementó temporalmente la sobrevida, disminuyó la pérdida de peso pero generó un incremento en la parasitemia.
- La coadministración del antígeno con toxina disminuyó la sobrevida, incrementó la pérdida de peso, disminuyó temporalmente la parasitemia e incrementó los niveles de IFN- γ .
- La coadministración de la protoxina junto con el antígeno disminuyó la sobrevida, disminuyó temporalmente la parasitemia y disminuyó los niveles de TGF- β .
- A las dosis utilizadas de toxina 50 μ g y protoxina 5 μ g, no se generó mejor protección con la coadministración junto con el antígeno, que cuando se utilizaron únicamente la toxina o la protoxina por separado ya que no se incrementó la sobrevida.

Por lo anterior, concluimos que la administración de la protoxina con el antígeno estimula la respuesta inmune generando protección temporal. Sin embargo, se requiere de un mayor estudio acerca de cómo extender esta protección para que la protoxina Cry1Ac pueda emplearse como adyuvante en vacunas contra la malaria.

12. Anexos.

Preparación de soluciones.

Columnas de celulosa en jeringas de 5mL

- Nylon
- Celulosa
- Jeringas de 5mL sin aguja ni embolo

Se colocó un poco de nylon en la base de la jeringa sin aguja y séllelo de celulosa, se cubrieron con aluminio y se esterilizaron en el autoclave.

Solución salina de Krebs

- NaCl 0.15M.....100mL
- KCl 0.15M.....4mL
- Amortiguador de fosfatos.....12mL
- MgSO₄ 0.15M.....1mL
- CaCl₂ 0.11M.....1mL (adicionar antes de usarse para evitar la precipitación)
- Ajustar el pH a 7.4 con NaOH 1M

Amortiguador de fosfatos 10x (PBS)

- NaCl.....87g
- KH₂PO₄.....4g
- Na₂HPO₄.....67.82g
- Agua bisdestilada cbp.....1L

Solución de Lisis

- Tritón 1%.....100 µL
- Tris-HCl 100mM pH 8.....500 µL
- EDTA 5mM.....100 µL
- Agua destilada estéril cbp.....10mL

Solución de carga Laemli

- Tris-HCl 1M pH 6.8.....3.12mL
- SDS.....1.0 g
- Glicerol.....5mL
- β -mercaptoetanol.....0.5mL
- Azul de Bromofenol.....0.005g
- Agua MQ estéril cbp.....10mL

Amortiguador de corrimiento

- Sacarosa.....1.09g
- Tris 2M.....50 μ L
- EDTA 0.5M.....2 μ L
- DTT 1Mm.....0.00154g
- Agua MQ cbp.....10mL

Azul de Comassie

- Azul de Comassie.....0.25g
- Metanol.....50mL
- Ácido acético.....10mL
- Agua destilada.....40mL

Acrilamida/Bisacrilamida

- Acrilamida.....29g
- Bisacrilamida.....1g
- Agua destilada cbp.....100mL

Persulfato de amonio 10% (APS)

- Persulfato de amonio.....1g
- Agua destilada esteril.....10mL

Gel de acrilamida al 10%

Stock	Volumen
Agua	2.24mL
Acrilamida 30%/ Bisacrilamida 0.8%	1.68 mL
TBE 10X	1mL
APS al 10%	45µL
TEMED	6µL

Gel concentrador

Stock	Volumen
Agua	2.85mL
Acrilamida 30%/ Bisacrilamida 0.8%	835µL
Tris 1.5M pH 6.8	1.25mL
SDS al 5%	100µL
APS al 10%	45µL
TEMED	6µL

Gel separador

Stock	Volumen
Agua	1.70mL
Acrilamida 30%/ Bisacrilamida 0.8%	1.95mL
Tris 1.5M pH 6.8	1.25mL
SDS al 5%	100µL
APS al 10%	45µL
TEMED	6µL

Tris-HCl 100mM

Se colocaron 660µL de Tris 1.5M en 40mL de agua destilada y se ajustó el pH 8 con HCl y se aforo a 50mL.

SDS (Lauril Sulfato de sodio) al 5%

- Lauril Sulfato de Sodio.....5g
- Agua destilada cbp100mL

TBE 10X (Tris-Ácido Bórico-EDTA)

- Tris 1M.....121.10g
- Ácido Bórico.....61.58g
- EDTA 50mM.....14.62g
- Agua cbp.....1L

Reactivo de Drabkin

- Bicarbonato de Sodio.....1g
- Cianuro de potasio.....0.05g
- Ferrocianuro de potasio.....0.2g

Aforar a 1L, proteger de la luz y guardar en refrigeración

13. Referencias.

1. Sullivan, D. D, S., *Uncertainty in Mapping Malaria Epidemiology: implication for Control Epidemiologic*. Epidemiologic Reviews, 2010. **32**: p. 175-187.
2. Autino B, N.A., Russo R, Castelli F. , *Epidemiology of malaria in endemic areas*. Mediterr J Hematol Infect Dis, 2012. **4**.
3. S, A., *Early life exposure to malaria and cognition in adulthood*. Journal of Health Economics, 2012. **31**: p. 767-780.
4. R, R.C., *Microbiología y Parasitología Humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias humanas*. 3 Edición ed, ed. E. Panamericana2007, México.
5. Singh S, M.M.A., Pal-Bhowmick I, Brzostowski J A, Chithis C E, *Distinct Extremal Signals Trigger Sequential Release of Apical Organelles during Erythrocyte Invasion by Malaria Parasites*. PloS Pathogens, 2010. **6**.
6. Hafalla J C, S.O., Matuscheweskim K, *Cell biology and immunology of malaria*. Immunological Reviews, 2011. **270**: p. 297-316.
7. Malaguarnera L, M.S., *The immune response to Plasmodium falciparum malaria*. The Lancet Infectious Diseases, 2002. **2**: p. 472-478.
8. Nacer A, M.A., Baer K, Mikolajczak S, Kappe S, Frevert U, *Neuroimmunological Blood Brain Barrier Opening in Experimental Cerebral Malaria*. PLOS Pathogens, 2012. **8**(10).
9. Kota Arun Kumar, S.S., Phanithi Prakash Babu, *Studies on the glycoprotein modification in erythrocyte membrane during experimental cerebral malaria* Experimental Parasitology, 2006. **114**: p. 173-179.
10. Suh N K, K.C.K., Kestone S J, *Malaria*. CMAJ, 2004. **170**: p. 1693-1702.
11. G, L.-R., *Unmet needs in modern vaccinology adjuvants to improve the immune response*. Vaccine, 2010. **28**: p. C25-C36.
12. Su Z, T.M., Jankovic D, Stevenson M, *Vaccination with Novel Immunoestimulatory Adjuvants against Blood-Stage Malaria in Mice*. Infection an Immunity, 2003. **71**: p. 5178-5781.
13. Bravo A, G.S., Soberon M, *Mode of action of Bacillus thuringiensis Cry and Cyt toxins and their potential for insect control*. Toxican, 2007. **15**: p. 423-435.
14. Rodríguez-Orozco A, R.-R.H., Sánchez N S *Efecto de la toxina Cry1Ac de Bacillus thuringiensis sobre el crecimiento de algunos hongos alergénicos aislados de pacientes con rinitis aguda*. Revista Mexicana de Micología, 2009. **29**: p. 43-50.
15. Rodríguez-Orozco A, *Efecto adyuvante de la protoxina Cry1Ac en la inmunidad celular al coadministrarla con un buen agente patógeno de mucosas*. Revista Alergia México 2006.
16. Rodríguez-Orozco A, R.-R.G., López-Revilla R, *El efecto de Cry1Ac en monocitos humanos y la activación de neutrófilos*. Mundial de Alergia Organ J, 2005. **7**.
17. Carrasco-Yepz M, R.-H.S., Rodríguez-Monroy M, Terrazas L, Moreno-Fierros L, *Protection against Naegleria fowleri infection in mice immunized with Cry1Ac plus amoebic lysates is dependent on the STAT6 Th1 response*. Parasite Immunology, 2010. **32**: p. 667-670.
18. Rojas-Hernández S, R.-M.M.A., López-Revilla R, Reséndiz-Albor A A, Moreno-Fierros L, *Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against Naegleria fowleri meningoencephalitis*. Infect Immun. , 2004. **78**(8): p. 4368-4375.
19. Legorreta-Herrera, M., R.O. Meza, and L. Moreno-Fierros, *Pretreatment with Cry1Ac protoxin modulates the immune response, and increases the survival of Plasmodium-infected CBA/Ca mice*. Journal of biomedicine & biotechnology, 2010. **2010**: p. 198921.
20. M, R.B., *Inmunología. Fundamentos*. 11 ed, ed. E.M. Panamericana2008.

21. Abbas A, L.A., Prober, *Inmunología Celular y Molecular*. 4° ed, ed. M.-G.-H. Interamericana2002, España.
22. Bakir Y H, T.C., Abo T, *Cytokine profile of murine malaria: stage-related production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines*. Biomedical Research, 2011. **32**: p. 203-208.
23. Mc Call B, S.R., *Interferon- γ central mediator of protective immune responses against the pre-erythrocytic and blood stage of malaria*. J Leukoc Biol, 2010.
24. Rhee, M.S., et al., *Changes in cytokine production associated with acquired immunity to Plasmodium falciparum malaria*. Clinical and experimental immunology, 2001. **126**(3): p. 503-10.
25. Parslow T, T.G., Stites P D, Terr I A, Imboden B J, *Inmunología básica y clinica*, ed. E.m. Moderno2002, México.
26. Gimenez F, B.d.L.S., Fernandez C, Pino P, Mazier D, , Cellular and Molecular Life Sciences 2003: 60, 1623-1635, *Tumor necrosis factor α in the pathogenesis of cerebral malaria*. . Mol Cell Life Sci. , 2003. **8**: p. 1623-1635.
27. Ocana-Morgner, C., et al., *Role of TGF-beta and PGE2 in T cell responses during Plasmodium yoelii infection*. European journal of immunology, 2007. **37**(6): p. 1562-74.
28. Doodoo, D., et al., *Absolute levels and ratios of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production in vitro predict clinical immunity to Plasmodium falciparum malaria*. The Journal of infectious diseases, 2002. **185**(7): p. 971-9.
29. Niikura, M., S. Inoue, and F. Kobayashi, *Role of interleukin-10 in malaria: focusing on coinfection with lethal and nonlethal murine malaria parasites*. Journal of biomedicine & biotechnology, 2011. **2011**: p. 383962.
30. de Waal Malefyt, R., et al., *Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes*. The Journal of experimental medicine, 1991. **174**(5): p. 1209-20.
31. Espinoza A, *Las herramientas Moleculares. Guía práctica sobre la técnica de PCR*.
32. D, K., *Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations*. Trends Mol. Med., 2002. **8**(6): p. 257-260.
33. Yuan, J.S., et al., *Statistical analysis of real-time PCR data*. BMC bioinformatics, 2006. **7**: p. 85.
34. Onwuamaegbu, M.E., M. Henein, and A.J. Coats, *Cachexia in malaria and heart failure: therapeutic considerations in clinical practice*. Postgraduate medical journal, 2004. **80**(949): p. 642-9.
35. Doolan DL, M.-A.N., *Immune response to pre-erythrocytic stages of malaria parasites*. Curr Mol Med, 2006. **6**(2): p. 169-185.
36. Riley E M, W.S., Perkins D J, Schofield L, *Regulating immunity to malaria*. Parasite Immunol., 2006. **28**: p. 35-49.
37. Llanos C, F.M., Arévalo-Herrera, Herrera S, *Mecanismos de generación de anemia en malaria*. Colombia Medica, 2004. **35**.
38. Engwerda, C.R., L. Beattie, and F.H. Amante, *The importance of the spleen in malaria*. Trends in parasitology, 2005. **21**(2): p. 75-80.
39. G, R.A., *Fundamentos de Hematología*. 4° ed, ed. E.M. Panamericana2009.
40. Stevenson M M, R.E.M., *Innate immunity to malaria*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(3): p. 169-180.
41. Valko M, L.D., Moncol J, Cronin M T, Mazur M, Telser J, *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(1): p. 44-84.

42. Frucht D M, F.T., Bogdan C, Schindler H, O'Shea J J, Koyasu S., *IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge*. Trends Immunol, 2001. **22**(10): p. 556-560.
43. Jaramillo M, G., Olivier M, *Hemozoin Induce Macrophage Chemokine Expression through Oxidative Stress-Dependent and –Independent Mechanisms*. J Immunol. , 2005. **174**(1): p. 475-484.
44. Omer F M , R.E.M., *Transforming growth factor beta production is inversely correlated with severity of murine malaria infection*. J Exp Med., 1998. **188**(1): p. 39-48.
45. Biemba G , D.D., Thuma P E , Weiss G , Gordeuk V R *Severe anaemia in Zambian children with Plasmodium falciparum malaria*. Trop Med Int Health, 2000. **5**(1): p. 9-16.
46. Billig E M, O.M.W.P., Riley E M, McKenzie F E, *Developmental allometry and paediatric malaria*. Malar J., 2012. **11**.
47. Haque A, G.M., Kasper L H, Haque S., *Immunization with heat-killed Toxoplasma gondii stimulates an early IFN-gamma response and induces protection against virulent murine malaria*. Vaccine, 1999. **17**: p. 2604-2611.
48. Amani V , V.A.M., Belnoue E , Marussig M, Fonseca L, Mazier D , Renia L, *Involvement of IFN-gamma receptor-mediated signaling in pathology and anti-malarial immunity induced by Plasmodium berghei infection*. Eur J Immunol, 2000. **30**(6): p. 1646-1655.
49. Hirunpetcharat C, F.F., Clark I A, Good M F, *Malaria parasite-specific Th1-like T cells simultaneously reduce parasitemia and promote disease*. Parasite Immunol., 1999. **21**(6): p. 319-329.
50. Su, Z. and M.M. Stevenson, *Central role of endogenous gamma interferon in protective immunity against blood-stage Plasmodium chabaudi AS infection*. Infect Immun, 2000. **68**(8): p. 4399-406.
51. Kremsner P G, N.S., Chaves M F, Rudolph R, Bienzle U *Interferon-gamma induced lethality in the late phase of Plasmodium vinckei malaria despite effective parasite clearance by chloroquine*. Eur J Immunol, 1992. **22**(11): p. 2873-2878.
52. Taverne J, S.N., de Souza J B, Playfair J H, Probert L, Kollias G., *Anaemia and resistance to malaria in transgenic mice expressing human tumour necrosis factor*. Immunology, 1994. **82**(3): p. 397-403.
53. Omer F M, d.S.J.B., Riley E M, *Differential induction of TGF-beta regulates proinflammatory cytokine production and determines the outcome of lethal and nonlethal Plasmodium yoelii infections*. J Immunol., 2003. **171**(10): p. 5430-5436.
54. Chaiyaroj S C, R.A.S., Muenthaisong K, Watkins P, Na Ubol M, Looareesuwan S, *Reduced levels of transforming growth factor-beta1, interleukin-12 and increased migration inhibitory factor are associated with severe malaria*. Acta Trop, 2004. **89**(3): p. 319-327.
55. Maynard C L, H.R.D., Helms W S, Oliver JR, Stephensen C B, Weaver C T, *Contrasting roles for all-trans retinoic acid in TGF-beta-mediated induction of Foxp3 and Il10 genes in developing regulatory T cells*. J Exp Med., 2009. **206**(2): p. 343-357.
56. Murai M, T.O., Kim G, Madan R ,Karp C L , Cheroutre H , M Kronenberg . *Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis*. Nat Immunol, 2009. **10**(11): p. 1178-1184.