



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Estudios Superiores
Zaragoza

CORRELACIÓN ENTRE LA PRODUCCIÓN
DE ÓXIDO NÍTRICO Y LA EXPRESIÓN
DE CITOCINAS DURANTE LA
REINFECCIÓN CON *Plasmodium*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

MARÍA LAURA VENTURA AYALA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA

MÉXICO, D.F.

Agosto, 200



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

- ★ *A mis padres: Roberto y Ventura por enseñarme a ser perseverante para lograr mis metas.*

- ★ *A mis hermanas Sara y María Félix por su asesoría técnica en el escrito de este trabajo y por su apoyo incondicional, gracias .*

- ★ *A Luis Eduardo Villagrán por ser un gran amigo y por motivarme a no desistir.*

AGRADECIMIENTOS

◆ A la UNAM y al Posgrado en Ciencias Biológicas por permitir mi formación académica.

◆ Al CONACYT por apoyar este trabajo con el número de proyecto 34936-N y por haber asignado una partida para mi beca de Maestría.

◆ A la DGAPA por apoyar este trabajo con el número de proyecto: PAPIIT No. IN210100.

◆ Al Comité Tutorial:

Dra. Martha Legorreta Herrera, por confiar en mí y por haberme dado la oportunidad de trabajar con ella.

Dr. Fernando García Tamayo por haber tenido paciencia y tolerancia conmigo durante los tutorales.

Dr. Camilo Ríos Castañeda por las sugerencias recibidas para mejorar este trabajo.

◆ A los laboratoristas: Elia Rincón Simbrón y Ricardo Gerardo Silvestre por su valioso apoyo en el bioterio, porque brindaron las atenciones y cuidados necesarios a los ratones.

◆ Al Instituto de Fisiología Celular, específicamente al laboratorio del Dr. Alejandro Zentella por apoyarme en el aprendizaje de la técnica de western blot.

INDICE

Abreviaturas	1
Resumen	3
1. Introducción	5
2. Objetivos	7
3. Generalidades de malaria	
3.1 Antecedentes	8
3.2 Ciclo biológico	8
3.3 Malaria en México	10
3.4 Síntomas y patogenia	11
3.5 Respuesta inmune en malaria	16
4. Importancia del óxido nítrico	
4.1 Biosíntesis del óxido nítrico	19
4.2 Efectos del óxido nítrico	22
4.3 Papel del óxido nítrico en malaria	23
5. Material	
5.1 Material biológico	24
5.2 Material de laboratorio	24
5.3 Equipo	25
5.4 Reactivos	25
6. Métodos	
6.1 Primoinfección de ratones	30
6.2 Monitoreo de las parasitemias	30
6.3 Reinfeción de ratones	30
6.4 Evaluación de la pérdida de peso	30
6.5 Determinación de hemoglobina	30
6.6 Determinación de índice esplénico	31
6.7 Análisis de nitritos en suero	31
6.8 Determinación de iNOS por Western Blot	32
6.9 Extracción y cuantificación de RNA	34
6.10 Retrotranscripción	36
6.11 Amplificación de los genes para citocinas por PCR	36
6.12 Electroforesis de los productos de PCR	37

6.13 Análisis estadístico	38
7. Resultados	39
8. Discusión de resultados	60
9. Conclusiones	73
10. Anexos	
10.1 Soluciones para extracción de RNA y RT-PCR	74
10.2 Soluciones para extracción de proteínas y Western Blot	77
10.3 Soluciones para la determinación de nitritos	80
11. Referencias	82

Abreviaturas

BFU-E	Unidad eritroide formadora de colonias en estallido
BH ₄	Tetrahidrobiopterina
CFU-GEMM	Unidad formadora de colonias de granulocitos, eritrocitos, macrófagos y megacariocitos
cDNA	DNA complementario
cGMP	Monofosfato de guanosina cíclico
DBL	Ligando de unión al antígeno Duffy
DBP	Proteína de unión al antígeno Duffy
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EBA	Antígeno de unión a eritrocitos
EDRF	Factor de relajación derivado del endotelio
ELISA	Análisis inmunoabsorbente ligado a enzima
EP	Eritrocito parasitado
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FMN	Flavín mononucleótido
GAS	Sitio activado por IFN- γ
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
IFR	Factor regulador de IFN- γ
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
I κ B	Proteína inhibidora de NF- κ B
Hb	Hemoglobina
IFN- γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IKK	Cinasa de I κ B
IL	Interleucina
INDRE	Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencias Epidemiológicas
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
iv	Intravenoso
Jak	Cinasa de tirosina de la familia Janus
KDa	Kilodaltons

LPS	Lipopolisacárido
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MIF	Factor inhibidor de la migración
mRNA	Acido riblonucleico mensajero
MSP	Proteína de superficie del merozoito
NADPH	Fosfato del dinucleótido de nicotinamín adenina
NED	N-1-naftiletildiamina
NIK	Cinasa inductora de NF- κ B
NF- κ B	Factor nuclear kappa B
NK	Célula asesina natural
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasas
<i>P.</i>	<i>Plasmodium</i>
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PECAM	Molécula de adhesión de células endoteliales y plaquetas
<i>PfEMP</i>	Proteína de membrana del eritrocito de <i>P. falciparum</i>
PM	Peso molecular
<i>PfNBP</i>	Proteína de unión a normocitos de <i>Plasmodium falciparum</i>
PTK	Proteína cinasa de tirosina
<i>PvRBP</i>	Proteína de unión a reticulocitos de <i>Plasmodium vivax</i>
r	Coefficiente de correlación
RNA	Ácido ribonucleico
RNI	Reactivos intermediarios del óxido nítrico
RT-PCR	Retrotranscripción-PCR
TBE	Amortiguador de Tris-Ácido bórico-EDTA
TBS	Amortiguador de Tris-salino
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
Th	Células T cooperadoras
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alpha
TRAF	Factor asociado al receptor de TNF- α
STAT	Transductor de señales y activador de la transcripción
VCAM	Molécula de adhesión de células vasculares

RESUMEN

En la actualidad la malaria sigue siendo un problema de salud pública en el mundo, anualmente se infectan 300 millones de personas y causa la muerte de más de un millón principalmente niños; en nuestro país el INDRE reporta el mayor número de casos de malaria por *Plasmodium vivax* en el Estado de Oaxaca siendo los grupos de alto riesgo los niños y las mujeres embarazadas. Desafortunadamente es difícil lograr la erradicación de la malaria debido a diversos factores que involucran tanto al vector como al parásito, por ello las investigaciones de malaria se han enfocado al estudio y comprensión de los mecanismos de inmunidad desarrollados durante la infección con *Plasmodium*.

En el presente trabajo se estudió la correlación entre la producción de óxido nítrico y la expresión de citocinas como un factor determinante en la resolución de una infección letal, utilizando un modelo murino de malaria. Para ello se inmunizaron ratones CBA/Ca con eritrocitos parasitados de la cepa no letal *Plasmodium chabaudi* AS y después de ocho semanas se re infectaron con la cepa letal *Plasmodium yoelii* 17XL. Durante la reinfección se determinó la producción de óxido nítrico y la expresión de citocinas (proinflamatorias e inmunorreguladoras), los resultados indicaron que durante la fase aguda de la reinfección hubo una correlación positiva entre la baja producción de óxido nítrico y la expresión de citocinas IFN- γ , IL-12, IL10 e IL-4, lo que sugiere que el óxido nítrico quizá es uno de los factores que favorecen la eliminación del parásito letal y su producción está regulada estrictamente por las citocinas, además este efecto se induce con exposición previa al parásito no letal.

ABSTRACT

Malaria is still a public health problem in the World, every year 300 million people are infected and more than one million of deaths occur mainly in children. In our country the National Institute for Epidemiology and Reference (INDRE) reported the highest number of *P. vivax* malaria cases in Oaxaca where children and pregnant women represent the highest risk population. Unfortunately, malaria is difficult to eradicate due to different factors which involve the vector and the parasite, thus different malaria research focus in the immune mechanisms developed during a *Plasmodium* infection.

In the present work a correlation between nitric oxide production and cytokines expression as a main factor in resolution of a lethal infection was evaluated using an experimental murine model of malaria. CBA/Ca mice were immunized with the non-lethal *Plasmodium chabaudi* AS parasite, after 8 weeks mice were re-infected with the lethal strain of *Plasmodium yoelii* 17XL. During re-infection, the correlation between nitric oxide and cytokines expression was evaluated. Results showed that nitric oxide could be one of the factors involved in elimination of the lethal parasite and its synthesis is strictly regulated by cytokines, and this effect is induced by the previous exposition to the non lethal parasite.

1. INTRODUCCIÓN

La malaria es un problema de salud pública en el mundo, en el 2005 la OMS y la UNICEF reportaron que anualmente se infectan más de 300 millones de personas y mueren un millón principalmente niños, tan sólo en nuestro país el número de casos generados por *Plasmodium vivax* en el Estado de Oaxaca ha incrementado en los últimos cuatro años, los grupos de alto riesgo son los niños y las mujeres embarazadas, su incidencia va en aumento debido a la creciente resistencia por parte del mosquito a insecticidas y el desarrollo de estrategias de resistencia por parte de los *Plasmodium* hacia los diferentes medicamentos empleados en el tratamiento, además para que un individuo se torne inmune en zonas endémicas se requieren múltiples infecciones, aunque se han reportado casos en los que puede existir parasitemia sin que el paciente presente la sintomatología característica del paludismo.

Los intentos por desarrollar una vacuna efectiva contra malaria no han tenido éxito por la diversidad de antígenos que el parásito presenta tanto en el estadio hepático como en el estadio eritrocítico, aunado a la variabilidad antigénica que desarrolla durante las recrudescencias y la recombinación genética; por ello las últimas investigaciones se han enfocado al estudio de los mecanismos celulares involucrados en la respuesta inmune, no obstante se han realizado en infecciones primarias y en algunos casos durante reinfecciones con el mismo parásito.

Debido al conocimiento deficiente en los mecanismos de respuesta inmune y con el fin de contribuir a posteriores investigaciones enfocadas al desarrollo de nuevas medidas terapéuticas enfocadas a incrementar la respuesta contra el *Plasmodium*, en este trabajo se propuso que una primoinfección con un parásito no letal confiere protección ante una reinfección con un parásito letal mediante mecanismos inespecíficos responsables de regular la patogenia de la infección, tales como óxido nítrico y producción de citocinas, planteando que una posible correlación entre ambos factores fuese la responsable de la protección ante una especie de *Plasmodium* letal. Para ello, se utilizó un modelo murino con ratones CBA/Ca hembras, inmunes a *P. chabaudi* AS (no letal) y reinfectadas con *P.*

yoelii 17XL (letal), durante el curso de la infección se evaluaron las curvas de parasitemia, la anemia, la pérdida de peso y el índice esplénico, considerados parámetros de patogenicidad.

La producción de óxido nítrico con efectos citotóxicos y citostáticos sobre el parásito, se analizó con la determinación de nitritos totales (reacción de Griess) en suero, dado que es el producto de degradación más estable; también se detectó la expresión de iNOS por RT-PCR y Western Blot, dado que el encontrar un incremento en la síntesis del mRNA no significa que suceda lo mismo con la proteína, además esta última técnica nos sirvió para descartar la posible procedencia endotelial del NO. En tanto que la expresión de las citocinas proinflamatorias (IFN- γ , IL-12, TNF- α) y antiinflamatorias o inmunorreguladoras (TGF- β , IL-4, IL-10, IL-6) también se analizó en el bazo por RT-PCR cuya sensibilidad es mayor que el bioensayo o ELISA.

2. OBJETIVOS.

Objetivo General.

- Determinar si existe correlación entre la producción de óxido nítrico y la expresión de citocinas en la protección contra *Plasmodium yoelii* 17XL en ratones inmunes a *Plasmodium chabaudi* AS.

Objetivos Específicos

- Determinar la cinética de la parasitemia en ratones CBA/Ca inmunes y re infectados con *P. yoelii* 17XL
- Evaluar los parámetros de patogenia: anemia, pérdida de peso e índice esplénico durante la infección.
- Estimar la producción de óxido nítrico mediante la determinación de nitritos totales en suero con el reactivo de Griess.
- Determinar la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible por RT-PCR y Western Blot.
- Analizar la expresión de citocinas proinflamatorias (IFN- γ , IL-12, TNF- α) y anti-inflamatorias (TGF- β , IL-4, IL-10, IL-6) por RT-PCR.

3. GENERALIDADES DE MALARIA.

3.1 Antecedentes.

La malaria, fiebre de los pantanos o paludismo es una enfermedad protozoaria transmitida por la picadura del mosquito *Anopheles* hembra infectada y causada por diminutos parásitos protozoarios del género *Plasmodium*, que infectan al hospedero humano y al insecto alternativamente. Se cree que el hombre prehistórico debió haber sufrido malaria, se considera que el paludismo tuvo su origen en África y que acompañó a las migraciones humanas a las orillas del Mediterráneo, a la India y al Sur Oriental de Asia. En el pasado, la malaria era común en las áreas pantaneras de Roma y por lo tanto su nombre se deriva del italiano, (*mal-aria*) o "mal aire", también se conocía como fiebre romana (Tay *et al.* 1995)

Es una de las enfermedades tropicales más graves del mundo, en su informe del 2005 la OMS reportó que afecta a más de 300 millones de personas al año y se estima que anualmente causa un millón de muertes, principalmente en niños; en África se ha reportado que cada 30 segundos muere un niño de malaria (OMS 2005, UNICEF 2004). Dado que los niños son más vulnerables, la Organización Mundial de la Salud (OMS) aconseja no llevar de vacaciones a bebés o niños pequeños a zonas afectadas por la malaria. Las mujeres embarazadas también corren un riesgo mayor; en zonas de África en las que la malaria tiene una elevada incidencia la probabilidad de que las mujeres embarazadas sufran ataques clínicos de malaria es cuatro veces mayor que en cualquier otro momento; pero las probabilidades de sobrevivir a accesos de esta fatal enfermedad son sólo del cincuenta por ciento (OMS 2005).

Existen cuatro especies de *Plasmodium* que infectan al hombre: *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. falciparum*, de los cuales éste último es el más virulento.

3.2 Ciclo biológico.

La infección inicia con la picadura de la hembra del mosquito *Anopheles* infectada, la cual antes de alimentarse con sangre inyecta el material de sus glándulas salivales que contiene las formas infectivas del parásito, llamados esporozoitos; los machos no transmiten la enfermedad ya que se alimentan de los jugos de las plantas (Tay *et al.* 1995).

Los esporozoitos circulan en la sangre y después de 1-2 horas invaden los hepatocitos dando lugar al ciclo exoeritrocítico o esquizogonia preeritrocítica, donde el parásito se multiplica aumentando el volumen de la célula parasitada y se transforma en esquizonte criptozoico que contiene 40, 000 criptomerozoitos en el caso de *P. falciparum* y sólo de 800-1000 en otras especies. Al romperse el hepatocito, los criptomerozoitos infectan otros hepatocitos (excepto los constituidos por *P. falciparum*) además de invadir a los eritrocitos, inician el ciclo eritrocítico y la fase sintomática de la infección (Brown y Neva 1985, Cohen 1984, Tay *et al.* 1995).

Durante la invasión del eritrocito el criptomerozoito pasa por los estadios de anillo, trofozoito y esquizonte en este último la cromatina presenta múltiples fragmentaciones que dan lugar a los merozoitos eritrocíticos (Fujioka & Aikawa 2002, Tay *et al.* 1995) Cuando el esquizonte madura, la pared del eritrocito se rompe y los merozoitos quedan en libertad para invadir nuevos eritocitos, esta invasión se favorece por enzimas proteolíticas del merozoito y por ligandos que se unen a receptores (sialoglicoproteínas) en los eritrocitos (Chitnis & Blackman 2000, Fujioka & Aikawa 2002). Para los merozoitos de *P. falciparum* se han reportado tres ligandos: EBA (erythrocyte binding antigen)-175, EBA-140 y EBA-181 cuyos receptores en los eritrocitos son la glicoforina A, glicoforina C y glicoforina B respectivamente; también se ha reportado la PfNBP1 (*P. falciparum* normocyte binding protein-1), pero su receptor no ha sido identificado, únicamente se ha descrito que la adhesión es dependiente de un factor resistente a la tripsina y sensible a neuraminidasa (Gilberger *et al.* 2003, Rayner *et al.* 2001). Para merozoitos de *P. vivax* se han detectado la PvRBP (*P. vivax* reticulocyte binding protein) y la proteína de unión al antígeno Duffy , DBP (Duffy binding protein) (Baum *et al.* 2003, Chitnis & Blackman 2000) Después de varios ciclos eritrocíticos algunos merozoitos se diferencian en gametocitos: macrogametocito corresponde al femenino y microgametocito al masculino. Con ello se inicia el ciclo sexuado o esporogonia que ocurre en el mosquito cuando ingiere sangre del hospedero parasitado, los gametocitos maduran y se transforman en gametos en su estómago. El microgameto sufre exflagelación formando cuerpos filiformes con funciones de espermatozoides que fecundan a los macrogametos dando lugar al huevo o cigoto, el cual se diferencia a oocineto y adquiere movilidad para atravesar el epitelio del intestino hasta llegar a la capa serosa, donde se convierte en ooquiste, constituido por miles de esporozoitos que son liberados cuando éste se rompe y emigran a las glándulas salivales del mosquito (Day *et al.* 1998, Fujioka & Aikawa 2002, Tay *et al.* 1995) **figura 1.**

3.3 Malaria en México.

Las primeras investigaciones en malaria datan de 1980, donde se describieron cerca de 300 mil casos de esta enfermedad, desde entonces a la fecha el número de casos ha disminuido, no obstante el problema persiste por la resistencia del mosquito a insecticidas y a la ineficacia de las recomendaciones sanitarias (http://www.amc.unam.mx/Agencia_de_Noticias/Notas_Cientificas/nc_31ceron-mosquito.html)

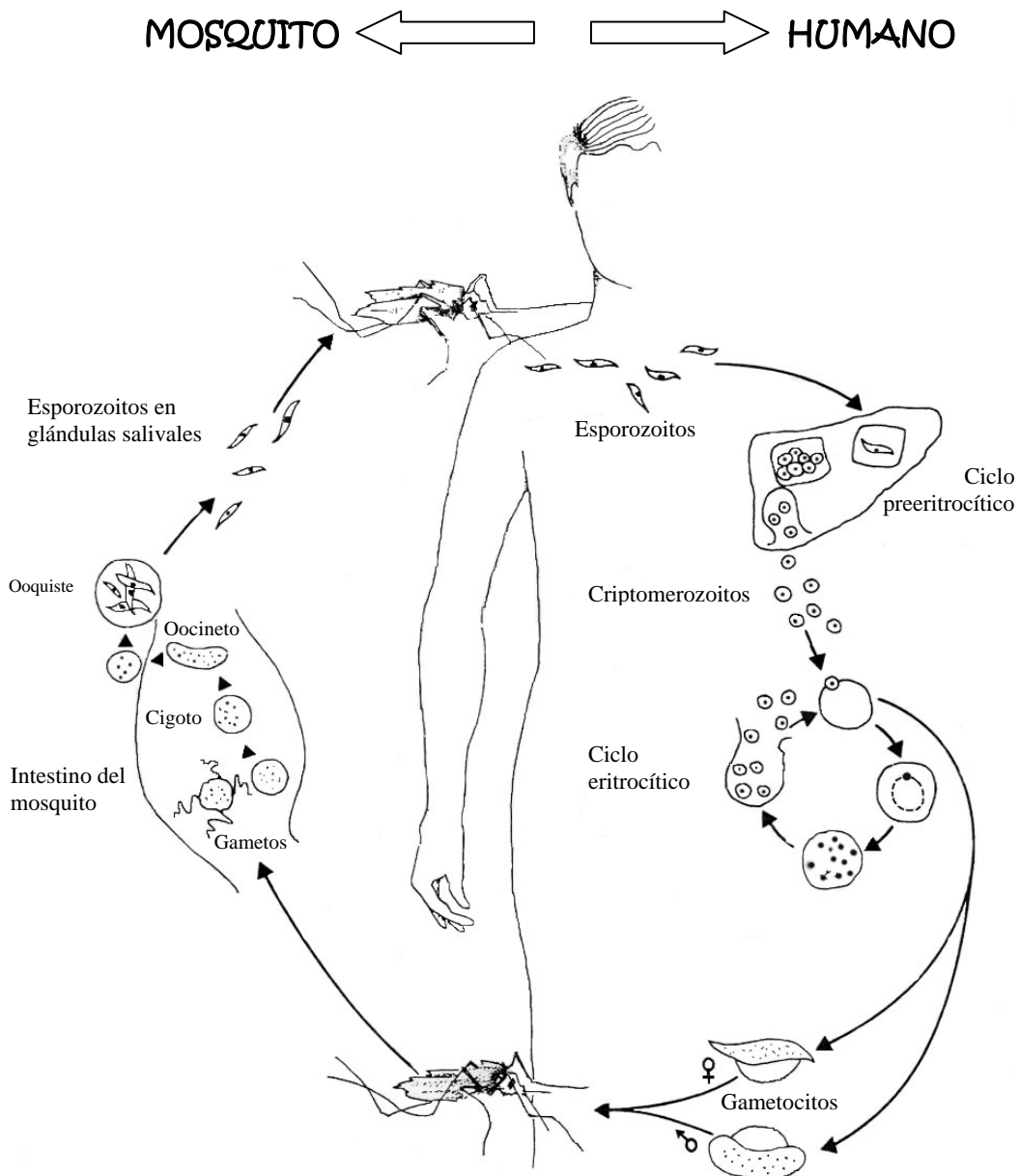


Figura 1. Ciclo biológico del *Plasmodium* (modificado de Ramasamy, 1998)

Los Estados de Chiapas, Sinaloa, Chihuahua, Oaxaca, Quintana Roo y Tabasco son las entidades que el INDRE (Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencias Epidemiológicas) ha reportado con mayor incidencia de malaria por *P. vivax* (**Gráfica 1**), sin embargo no es la única especie que se encuentra en México, puesto que se han descrito casos de malaria por *P. falciparum* en Chiapas y Tabasco, **Tabla 1** (<http://www.epi.org.mx>). *Anopheles albimanus* y *Anopheles pseudopunctipennis* son los principales vectores y transmiten los fenotipos *P. vivax* VK210 y *P. vivax* VK247 respectivamente, según Gonzalez et al. el Centro de Control y Ecología de enfermedades por vectores de la Marina ha reportado que los vectores *Anopheles aztecus* y *Anopheles darlingi* también contribuyen a la transmisión de la enfermedad, aunque en menor grado.

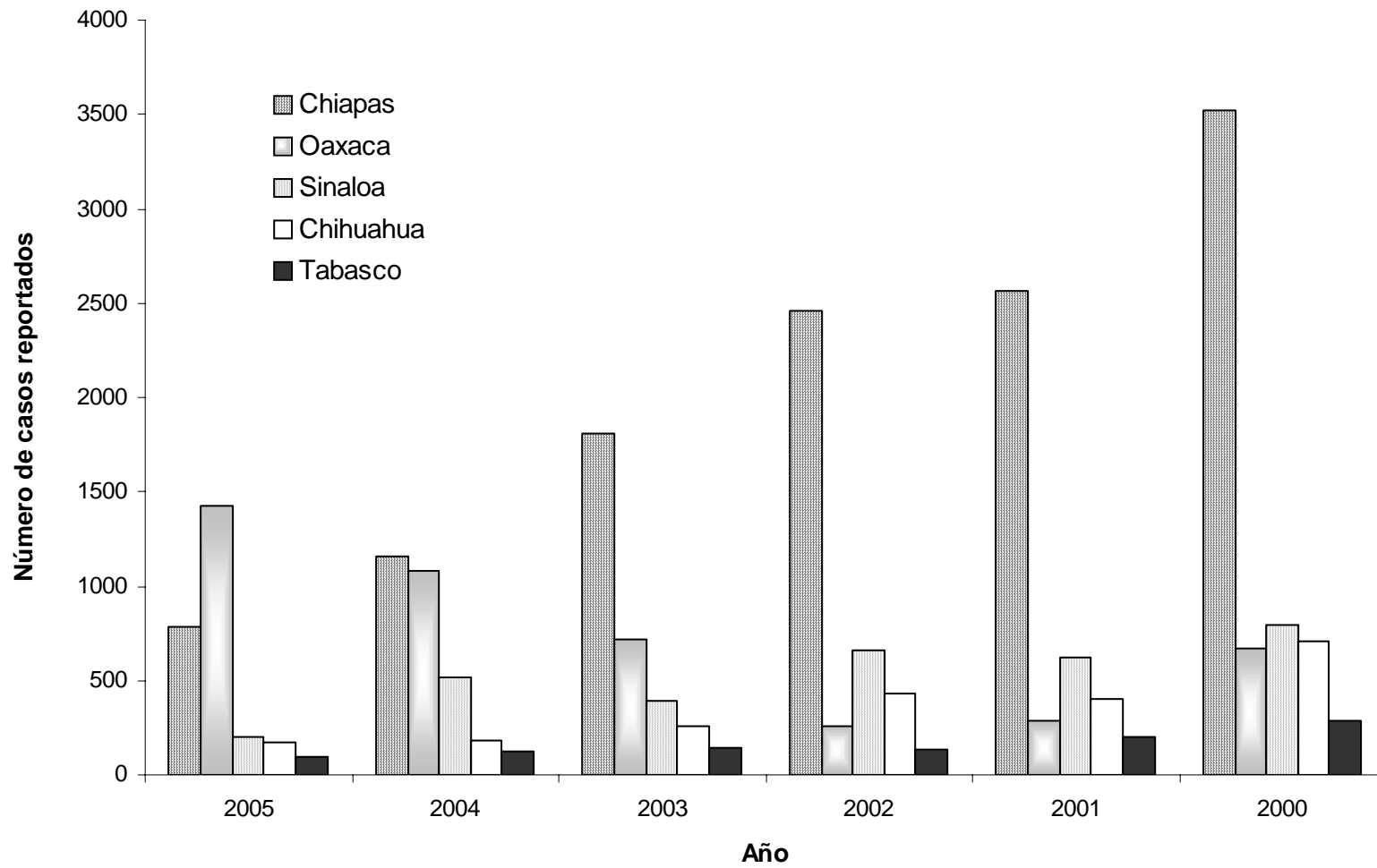
	2000	2001	2002	2003	2004	2005
Chiapas	102	38	13	21	26	19
Tabasco	21	30	3	22	21	3
Jalisco	0	2	0	0	0	
Oaxaca	1	0	0	0	0	
Total	124	70	16	43	47	22

Tabla 1. Casos de malaria por *P. falciparum* en México, reportados por el INDRE.

3.4 Síntomas y patogenia.

Los síntomas de la infección se presentan durante el estadio sanguíneo, cuando los parásitos presentan ciclos de crecimiento y replicación dentro de los eritrocitos. Los pacientes presentan dolor de cabeza, fiebre, escalofríos, mialgias, artralgias y anemia (Tay *et al.* 1995). Sin embargo, las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo se atribuyen a las complicaciones observadas en anemia severa y malaria cerebral.

Los episodios febriles se generan por la toxina de malaria GPI (glycosylphosphatidylinositol) liberada durante la ruptura de los esquizontes maduros, pero su efecto puede ser bloqueado por la acción de anticuerpos anti-GPI ya que la molécula presenta una región fosfatidilinositol acilada que le confiere inmunogenicidad, **Figura 2** (Naik *et al.* 2000a).



Gráfica 1. Incidencia de malaria por *P. vivax* en México.

La síntesis de GPI es crucial para el desarrollo y sobrevivencia del parásito, es exclusiva del estadio eritrocítico y la utiliza para anclar proteínas transmembranales como la MSP-1 (del Inglés merozoite surface protein-1) y MSP-2, estimula la producción de TNF- α (factor de necrosis tumoral- α) en macrófagos mediante su residuo de manosa terminal (**Figura 2**), esta inducción de TNF- α explica la pirexia transitoria, hipoglicemia y caquexia letal observadas en ratones inoculados con GPI puro (Gerold *et al.* 1996, Naik *et al.* 2000b, Vijaykumar *et al.* 2001). El TNF- α a su vez estimula la síntesis de IL-1 (interleucina-1), así ambos pirógenos probablemente incrementen la temperatura corporal mediante un aumento en la síntesis hipotalámica de la prostaglandina PGE₂ (Dinarelo *et al.* 1986, Tracey *et al.* 1988).

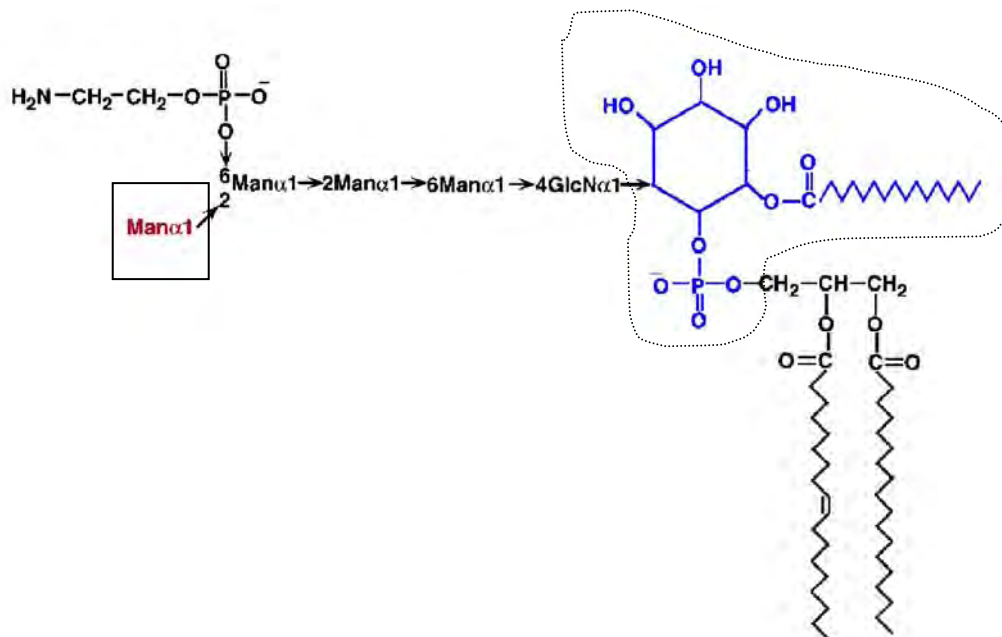


Figura 2. Estructura de la toxina de malaria GPI, con línea punteada se muestra la región inmunogénica y con el recuadro la manosa que induce la producción de TNF- α (modificada de Naik *et al.* 2000a).

La sobrevivencia del parásito en el eritrocito se debe a su capacidad de sintetizar proteasas aspárticas y proteasas de cisteína para obtener aminoácidos de la molécula de hemoglobina, durante la digestión de ésta también existe la formación del subproducto hematina el cual se polimeriza por acción de proteínas ricas en histidina para generar el pigmento palúdico o hemozoína (Olliaro & Yuthavong 1999, Sullivan *et al.* 1996, Zeigler

2001). La hemozoína contribuye en gran parte a la patogenia dado que en los eritrocitos infectados induce lipoperoxidación y los productos finales (hidroxiácidos grasos) inhiben la actividad de monocitos, *in vitro* induce la producción de TNF- α e IL-1 por macrófagos, su concentración en neutrófilos y monocitos de pacientes con malaria severa es mayor que en pacientes con malaria no complicada, su ingestión por macrófagos genera radicales libres de oxígeno que reducen la producción de citocinas, en monocitos inhibe la expresión de las moléculas MCH clase II, CD54 (refuerza la señal del receptor de células T) y CD11c (integrina que se une a CD54), esenciales en la presentación de antígeno y adhesión celular (Like *et al.* 2003, Schwarzer *et al.* 1998, Schwarzer *et al.* 2003, Taramelli *et al.* 2000).

La anemia severa (Hb \leq 5g/dL y Htc \leq 15%) es sin duda una de las complicaciones letales en malaria pues se ha descrito que es la principal causa de muerte en áreas de alta endemicidad (Bojang *et al.* 1997, Schellenberg *et al.* 1999). Los mecanismos que contribuyen a su desarrollo son el incremento en la destrucción de eritrocitos y la supresión de médula ósea. La destrucción acelerada de eritrocitos es producto de: la ruptura de esquizontes maduros, fagocitosis de eritrocitos parasitados, citoadherencia a capilares y vénulas postcapilares, fagocitosis de eritrocitos no parasitados que presentan rigidez en su membrana o que forman complejos inmunes con IgG, además existe lisis de eritrocitos no parasitados por una disminución de las proteínas reguladoras del complemento CR1 y CD55 (Dondorp *et al.* 2000, Srichaikul 1999, Stoute *et al.* 2003, Waitumbi *et al.* 2000). Las evidencias que indican una supresión en médula ósea son: la reticulocitosis retardada, la inhibición de los progenitores eritroides BFU-E (del Inglés Burst-forming-united-erythroid) y del CFU-GEMM (del Inglés colony-forming-united-granulocyte, erythroid, macrophage, megakaryocyte), la muerte prematura de normoblastos, la síntesis defectuosa del grupo hemo, en algunos casos disminución de la síntesis de eritropoyetina y la deseritropoyesis caracterizada por mitosis incompleta, disgregación de cromatina, cariorrexis, puentes intercitoplásmicos (Menéndez *et al.* 2000, Phillips & Pasvol 1992, Srichaikul 1999). La inhibición de la eritropoyesis es multifactorial, la producción de las citocinas TNF- α , IL-1 β e IFN- γ se ha implicado en la deseritropoyesis, sin embargo la deficiencia de IL-12 también contribuye a esta alteración (Clark & Chaudhri 1988, Mohan & Stevenson 1998, Yap & Stevenson 1994). Recientemente Martiney *et al.* 2000 describieron que la producción de MIF (migration inhibitory factor) por macrófagos que ingieren hemozoína suprime el desarrollo de los precursores eritroides BFU-E y CFU-GEM dependientes de eritropoyetina.

La infección con *P. falciparum* puede complicarse y conducir a malaria cerebral causando acidosis metabólica, hipoglicemia, hipertensión intracraneal, edema pulmonar, hemorragias en cerebro, convulsiones, coma y en el peor de los casos culminar en la muerte (English *et al.* 1997, Newton *et al.* 1998). El principal hallazgo que conlleva al desarrollo de hipoxia local cerebral es la obstrucción de vénulas y capilares cerebrales por el secuestro de células, sin embargo investigaciones realizadas en un modelo de malaria murina letal describen la ruptura de vasos en regiones cerebrales y cerebelares con mortalidad restringida a animales jóvenes y síntomas neurológicos reducidos en animales viejos (Clark & Schofield 2000, Heran *et al.* 2000). Clark *et al.* 2003 describieron diferentes categorías de malaria cerebral de acuerdo a la histopatología observada en cerebro, la categoría A se caracteriza por no presentar cambios histológicos discernibles con pigmento palúdico y parásitos dentro de vasos ocasionales; en la categoría B a diferencia de la anterior existe un incremento en el número de eritrocitos parasitados secuestrados y, en la categoría C se observan microhemorragias con acumulación de células mononucleares productoras de hemooxigenasa y eritrocitos parasitados. La obstrucción de vénulas y capilares por eritrocitos parasitados es consecuencia de su citoadherencia y de la formación de rosetas. Durante la maduración del estadio eritrocítico, el parásito sintetiza la molécula adhesiva PfEMP-1 (*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein-1) y la ancla a la membrana del eritrocito, por ello sólo se secuestran los trofozoitos y esquizontes en el endotelio (Baruch *et al.* 1996). PfEMP-1 es un polipéptido de elevado PM (200-400KDa), presenta 1-5 dominios extracelulares similares al ligando de unión al antígeno Duffy (DBL), 1-2 regiones entre los dominios DBL ricos en cisteína, una región transmembranal y un segmento de carácter ácido intracelular (Chen *et al.* 2000). La adhesión de PfEMP se favorece por el incremento de TNF- α pues esta citocina aumenta la expresión de los receptores endoteliales ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule 1), CD36, VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1), selectina E, PECAM-1 (platelet/endotelial cell adhesion molecule 1) y trombospondina. ICAM-1, VCAM-1 y selectina P regulan la rotación del eritrocito parasitado sobre el endotelio y los demás receptores son responsables de la estabilidad de la unión (Newton *et al.* 2000, Senczuk *et al.* 2001). En placenta también se observan eritrocitos parasitados adheridos a condroitinsulfato A y pueden causar muerte a la madre, aborto, parto prematuro, o recién nacidos con peso bajo (Newton *et al.* 2000, Ramasamy 1998). La formación de rosetas por eritrocitos no parasitados y eritrocitos parasitados se induce por la afinidad que PfEMP-1 presenta hacia el receptor del complemento-1, glicosaminoglicanos tipo sulfato

de heparina, CD-36 y antígenos de los grupos sanguíneos A y B (Chen *et al.* 2000). Aunado al secuestro de eritrocitos se ha descrito que en malaria cerebral existe la acumulación de plaquetas en vénulas y capilares, probablemente unidas a PfEMP-1 por medio de CD36 (Grau *et al.* 2003). A pesar de que los neutrófilos no se secuestran, su aumento correlaciona con el desarrollo de malaria cerebral murina e incrementa el desarrollo de microhemorragias y expresión de citocinas Th1 en cerebro (Chen *et al.* 2000). Cabe destacar que la obstrucción de vénulas y capilares no es exclusiva del cerebro, también existe en corazón, pulmón, riñón, hígado e intestino delgado.

3.5 Respuesta inmune en malaria.

Durante la infección con malaria se desarrollan diferentes mecanismos de inmunidad que incluyen la participación de células T, células B, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células NK, complemento y producción de anticuerpos (Artavanis-Tsakonas *et al.* 2003, Langhorne 1994). Sin embargo el desarrollo de una respuesta antiparásito efectiva está limitada por la complejidad del ciclo biológico (estadio hepático y estadio eritrocítico), la diversidad antigénica entre las especies de *Plasmodium* y el polimorfismo de las proteínas de superficie del esporozoito (estadio hepático) o del merozoito (estadio eritrocítico). Si bien es cierto que los habitantes de zonas endémicas de malaria generan inmunidad natural contra el *Plasmodium* después de múltiples exposiciones, ésta es parcial pues presentan sintomatología moderada o son asintomáticos con parásitos en sangre (Branch *et al.* 2005, Modiano *et al.* 1996).

El estadio eritrocítico está asociado directamente con la patogenia, por ello se hará énfasis en la respuesta inmune de esta fase. Los linfocitos T son esenciales en la inmunidad contra el *Plasmodium* por su efecto en la activación de células efectoras (macrófagos y neutrófilos) y por su colaboración en la producción de anticuerpos (Hirunpetcharat & Good 1998, Riley 1999). En la respuesta temprana contra malaria las células T $\gamma\delta$ y las células NK (natural killer) actúan como la primera línea de defensa contra el estadio sanguíneo de la infección ya que son la principal fuente de IFN- γ y TNF- α (Artavanis-Tsakonas & Riley 2002, Choudhury *et al.* 2000, Seixas & Langhorne 1999) necesarios para activar macrófagos, aunque su efecto no se compara con el de las células TCD4⁺. Las células NK por medio de sus diversos receptores regulan la respuesta inmune contra malaria, (Ly49D, Ly49H, NK1.1, NKG2D) y favorecen la respuesta por células Th1; la respuesta mediada por anticuerpos la regula el marcador CD1 (Hansen *et al.* 2005).

Los linfocitos T CD4⁺ también denominados cooperadores, Th (T helper) por su colaboración en la respuesta inflamatoria y en la producción de anticuerpos, rearreglan las cadenas α/β en su receptor TCR (T cell receptor) (Constant & Bottomly 1997). Existen dos subtipos de linfocitos T CD4⁺, los linfocitos Th1 que producen IL-2, IFN- γ , TNF- β y regulan la respuesta de hipersensibilidad retardada; los linfocitos Th2 en cambio sintetizan IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e inducen la maduración de las células B a células plasmáticas productoras de IgG1 e IgE (Kourilsky & Trufa-Bachi 2001). La polarización de Th1/Th2 depende del ambiente en que se encuentren los linfocitos TCD4⁺ $\alpha\beta$, así la IL-12 y el IFN- γ producidos por las células dendríticas y las células NK respectivamente inducen la diferenciación de Th1 mientras que la IL-4 proveniente de basófilos y células cebadas conduce a la diferenciación de Th2 (Avni & RaO 2000, Constant & Bottomly 1997). Durante la infección con malaria los subtipos de linfocitos TCD4⁺ se activan en tiempos diferentes, en la infección con *P. chabaudi chabaudi* las células Th1 predominan en la fase temprana o aguda (antes del pico de parasitemia) y las células Th2 abundan durante la fase tardía (Taylor-Robinson & Phillips 1993). En pacientes con malaria producida por *P. falciparum* no complicada se ha observado que la producción temprana de citocinas Th1 es crucial para obtener una respuesta efectiva y para resolver la infección (Torre *et al.* 2002), sin embargo las citocinas proinflamatorias deben ser altamente reguladas pues el incremento de TNF- α e IL-6 está asociado con la severidad de la enfermedad por ser agentes pirógenos (Lyke *et al.* 2004)..El TNF- α también induce la expresión de moléculas de adhesión endotelial (ICAM-1 y VCAM-1) Lou *et al.* 2001 y se ha asociado con anemia severa (Cross & Langhorne 1998).

En la respuesta temprana contra malaria los eritrocitos parasitados activan a las células dendríticas, a los macrófagos y a los neutrófilos para producir IL-12 (Chen *et al.* 1999, Perry *et al.* 2004, Su & Stevenson 2002). Las funciones principales de IL-12 en el estadio eritrocítico del *Plasmodium* son: la activación de células T y células NK para producir IFN- γ y TNF- α , el aumento de la citotoxicidad de las células NK, la inducción de la proliferación de las células T CD4⁺, la inducción de la diferenciación de células Th1, la estimulación de la eritropoyesis (Chaisavaneeyakorn *et al.* 2003, Mohan & Stevenson 1998, Stevenson *et al.* 2001) y favorecer la producción de anticuerpos IgG1, IgG2a, IgG2b (Su & Stevenson 2002), se ha observado que la combinación de IL-12 con cloroquina protege ante retos letales (Mohan *et al.* 1999).

El IFN- γ y el TNF- α contribuyen a resolver la infección de malaria activando macrófagos que aumentan su actividad fagocítica, favorecen la producción de IL-6 y TNF- α ,

incrementan su actividad parasiticida a través de mecanismos citotóxicos que involucran reactivos intermediarios del oxígeno (H_2O_2 , radicales superóxido O_2^-), e inducen la producción de óxido nítrico por la activación de iNOS (óxido nítrico sintasa inducible) (Clark *et al.* 2003, Jacobs *et al.* 1996) con la subsecuente formación de moléculas tóxicas como radicales hidroxilo (OH^\cdot), ácido hipocloroso (HClO) y peroxinitrito ($ONOO^\cdot$) (Beckman *et al.* 1990, Su & Stevenson 2000, Torre *et al.* 2002).

La sobreproducción de citocinas inflamatorias y la activación prolongada de macrófagos contribuyen a la patogenia de malaria generando anemia severa, aumento de temperatura, pérdida de peso, coma y muerte (Anstey *et al.* 1999, Biemba *et al.* Clark *et al.* 2003, 1998, Lou *et al.* 2001). Por ello, el balance entre las citocinas inmunorreguladoras IL-10/TGF- β y las citocinas inflamatorias IFN- γ /TNF- α es crítico en la resolución de infección pues se favorece una respuesta antienfermedad (disminución de citocinas inflamatorias) y una respuesta antiparásito (producción de anticuerpos) (Li *et al.* 2003, Li *et al.* 1999, Tsutsui & Kamiyama 1999). La IL-10 además de inhibir la producción de TNF- α y de IL-6 en macrófagos, estimula la eritropoyesis, inhibe la actividad parasiticida de macrófagos activados por IFN- γ , suprime la producción de IFN- γ por células NK (Nussenblatt *et al.* 2001). El TGF- β por su parte suprime la producción de TNF- α y óxido nítrico en macrófagos e inhibe la producción de TNF- α e IFN- γ en células NK y células Th1, disminuye la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1 y VCAM-1) reduciendo el riesgo de malaria cerebral (Fakhereldin *et al.* 1998). Otra citocina inmunorreguladora es la IL-4, cuya función más que controlar la respuesta inflamatoria es favorecer el crecimiento de células Th2 e inducir la maduración de células B a células plasmáticas productoras de anticuerpos IgG1 e IgE (Fell & Smith 1998).

4. IMPORTANCIA DEL ÓXIDO NÍTRICO.

4.1 Biosíntesis del óxido nítrico.

El óxido nítrico (NO) se identificó inicialmente en el endotelio vascular como factor de relajación derivado del endotelio (EDRF) (Ignaro *et al.* 1987). El NO presenta un electrón desapareado en su órbita externa que le confiere propiedades de radical libre, es moderadamente soluble en agua, debido a su bajo peso molecular (30Da) y a su naturaleza lipofílica difunde rápidamente a través de las membranas lipídicas, en las células de mamíferos tiene una vida media de 2-30 segundos (Lowenstein *et al.* 1994).

El óxido nítrico se sintetiza por una familia de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOS) a partir de la L-arginina, oxígeno molecular y NADPH, además requiere de los cofactores flavín mononucleótido (FMN), flavín adenín dinucleótido (FAD), tetrahidrobiopterina (BH₄), protoporfirina IX (grupo hemo) y calmodulina (Ferrer *et al.* 1998).

Las NOS activas son homodímeros, cada monómero contiene un dominio oxidasa en su extremo amino terminal y un dominio reductasa en su extremo carboxilo terminal. En el dominio reductasa se encuentran los sitios de unión para los cofactores NADPH, FMN, FAD y calmodulina; en el dominio oxidasa existe la unión de BH₄ y protoporfirina IX (Groves & Wang 2000, MacMicking *et al.* 1997). La calmodulina activa a las NOS, favorece la transferencia de electrones del NADPH a la protoporfirina IX a través del FMN y FAD. La BH₄ favorece la unión del sustrato L-arginina, colabora estabilizando la estructura dimérica de las NOS y la conformación de la protoporfirina IX (Groves & Wang 2000). Existen tres isoformas de las NOS, dos son constitutivas (tipo endotelial y tipo neuronal) y una es inducible (iNOS, inicialmente descubierta en macrófagos), en la **Tabla 2** se resumen las características de cada enzima (Ferrer *et al.* 1998). La activación de las NOS constitutivas depende del aumento del calcio intracelular el cual forma un complejo con la calmodulina; en cambio la iNOS se encuentra unida a la calmodulina y su activación es independiente de los cambios en la concentración de Ca²⁺, su regulación es a nivel transcripcional y se ve favorecida por las citocinas IL-1, TNF- α , IFN- γ y el lipopolisacárido, LPS (Korhonen 2002, Lowenstein *et al.* 1994).

Para la transcripción del gen iNOS se han identificado tres sitios de unión en la región promotora, el elemento NF- κ B (activado por TNF- α , IL-1 y LPS), el factor-1 regulador de IFN- γ (IFR-1) y el sitio activado por IFN- γ (GAS) (Blanchette *et al.* 2003, Taylor *et al.* 1998).

El factor de transcripción NF- κ B (factor nuclear kappa B) reside en el citoplasma y existe como un heterodímero p50/p65 inactivo, unido a sus proteínas inhibidoras I κ B α e I κ B β (Baldwin 1996). La activación del receptor TNF- α conduce a la activación subsecuente del factor-2 asociado al receptor de TNF- α (TRAF-2), la activación del receptor IL-1 activa al factor-6 asociado al receptor de TNF- α (TRAF-6), el reconocimiento de LPS por receptores tipo Toll (RLT) conduce a la activación de TRAF-6. Ambos TRAF-2 y TRAF-6 activan a la cinasa inductora de NF- κ B (NIK), la cual fosforila y activa la cinasa I κ B (IKK). IKK es capaz de fosforilar I κ B lo que conduce a la ubiquitinación y degradación de I κ B de esta forma se libera NF- κ B el cual se transloca en el núcleo y se une al elemento NF- κ B de la región promotora de iNOS (Korhonen 2002). Se ha observado que el IFN- γ sinergiza con TNF- α para activar NF- κ B, aumentando la fosforilación de I κ B α e I κ B β a través de la cinasa I κ B activada por PTK (proteína cinasa de tirosina) Cheshire & Baldwin 1997.

La unión de IFN- γ a su receptor conduce a la activación de las cinasas de tirosina de la familia Janus (Jak1 y Jak2) las cuales a su vez activan el factor de transcripción STAT1- α el cual transloca en el núcleo para unirse a GAS, se ha reportado que IFN- γ también activa a las Erk1/Erk2 (cinasas reguladas por señales extracelulares) que fosforilan a STAT1- α en un residuo de serina (Blanchette *et al.* 2003). STAT1- α también induce la transcripción del gen IRF-1, que genera la proteína IRF-1 la cual funciona como otro factor de transcripción promovido por IFN- γ para incrementar la expresión de iNOS (Faure *et al.* 1999).

La supresión de iNOS puede suceder a nivel transcripcional o postranscripcional, la IL-10 y la IL-4 inhiben la transcripción de iNOS disminuyendo la producción tanto de TNF- α como de IFN- γ , a nivel postranscripcional. La IL-10 y el TGF- β desestabilizan el transcrito de iNOS (mRNA de iNOS) Korhonen 2002, MacMicking *et al.* 1997.

Isoforma	Otros nombres	Comosoma humano	Características del gen	Tamaño de la proteína	Regulación	Expresión en células
Neuronal	Tipo I NOS1 nNOS ncNOS bNOS	12	160Kb 29 exones	1433 aa 160 kDa	Expresada constitutivamente, dependiente de calcio	Células neuronales, Músculo esquelético
Endotelial	Tipo III NOS3 eNOS ecNOS	7	21-22Kb 26 exones	1203 aa 134 kDa	Expresada constitutivamente. Dependiente de calcio	Células endoteliales, Células epiteliales, Cardiomiocitos
Inducible	Tipo II NOS2 iNOS macNOS	17	37Kb 26 exones	1153 aa 130 kDa	Independiente de calcio, inducida por estímulos inflamatorios (citocinas, LPS)	Macrófagos, Hepatocitos, Astrocytos, Fibroblastos, Eosinófilos

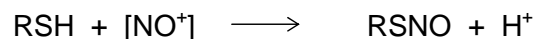
Tabla 2. Características de las óxido nítrico sintasas.

4.2 Efectos del óxido nítrico.

En condiciones fisiológicas el NO puede difundir hacia las células subyacentes donde activa a la enzima guanilato ciclasa por medio de la nitrosilación del grupo hemo lo que aumenta los niveles de cGMP (monofosfato de guanosina cíclico), que es un mediador de la dilatación de los vasos sanguíneos, también está asociado con la desagregación plaquetaria y con la apertura y cierre de algunos canales iónicos (Ferrer *et al.* 1998). La sobreproducción de NO tiene efectos patológicos que están mediados por los reactivos intermediarios del nitrógeno (RNI), ocasionan daño en el DNA, inician la peroxidación de lípidos e inactivan un sin número de enzimas entre las que cabe señalar las involucradas en la respiración mitocondrial, el NO está involucrado en la producción de energía y en la replicación celular (Beckman & Koppenol 1996.). La inactivación de enzimas le confiere propiedades protectoras al NO durante diversas infecciones ocasionadas tanto por parásitos, bacterias, virus y hongos.

El NO reacciona con los metales de transición, compite con el oxígeno para ocupar el sitio de unión en la citocromo c oxidasa (Brown 1995), probablemente actúe de manera similar en las hemoproteínas: hemoglobina, mioglobina y citocromo P450. Se ha reportado que el NO reacciona con la hemoglobina para reducirla a metahemoglobina

Los RNI mas prevalentes *in vivo* son el trióxido de dinitrógeno (N₂O₃) y el peroxinitrito (ONOO⁻), pero los metabolitos finales y estables son los nitritos (NO₂⁻) y los nitratos (NO₃⁻). El **N₂O₃** es el producto de la reacción entre el NO y el O₂, es una especie altamente reactiva que genera nitrosilación mediante la transferencia de iones nitrosonio [NO⁺] a nucleófilos que contienen nitrógeno y azufre (Grisham *et al.* 1994). La reacción de [NO⁺] con aminas produce nitrosaminas, la nitrosilación de aminas heterocíclicas primarias como las purinas y pirimidinas del DNA genera desaminación hidrolítica (Görsdorf *et al.* 1990). La nitrosilación de átomos de azufre produce s-nitrosotioles:



La s-nitrosoalbúmina es el nitrosotiol más abundante en el citoplasma, la hemoglobina también se nitrosila en un residuo de cisteína de la subunidad β (Grisham *et al.* 1999)

El **ONOO-** es un oxidante muy potente, oxida a: las proteínas, los lípidos, los ácidos nucleicos, y a los tioles, también induce la nitración de las proteínas con residuos de tirosina, y fragmenta al DNA (Murphy 1999).

4.3 Papel del óxido nítrico en malaria

Diversos estudios *in vitro* han mostrado que el óxido nítrico, sus metabolitos estables (NO_2^- , NO_3^-) y los derivados S-nitrosotioles tales como S-nitrosocisteína y S-nitrosoglutatión inhiben el crecimiento del *Plasmodium falciparum* (Rockett *et al.* 1991). El óxido nítrico tiene un efecto parasiticida *in vivo*, cuando se inhibe su síntesis durante la infección con *Plasmodium* se incrementa la parasitemia (Taylor-Robinson & Smith 1999) y cuando los ratones infectados con *P. berghei* (letal) reciben tratamiento para aumentar la producción de óxido nítrico son capaces de recuperarse (Dascombe & Nahrevanian, 2003).

La síntesis de óxido nítrico durante la infección con *Plasmodium* es a través de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, NOS2) en macrófagos y monocitos. Los factores que inducen la expresión del transcrito de iNOS son la hemozoina (pigmento de malaria), la molécula de anclaje GPI y las citocinas inflamatorias $\text{IFN-}\gamma$ y $\text{TNF-}\alpha$ (Jacobs *et al.* 1996, Keller *et al.* 2004, Zhu *et al.* 2005).

Durante la infección con *P. falciparum* el óxido nítrico tiene un papel protector, su producción está relacionada inversamente con la severidad de la infección (Anstey *et al.* 2006), se ha demostrado que en pacientes con malaria no complicada a diferencia de los pacientes con malaria severa existe un aumento en la expresión del transcrito de iNOS en células totales de sangre periférica, predominantemente en monocitos aunque los linfocitos, neutrófilos y plaquetas también expresan el mRNA de iNOS (Chiwakata *et al.* 2000).

El óxido nítrico además de tener un efecto tóxico sobre el *Plasmodium* inhibe la proliferación de las células Th1 y por consiguiente bloquea la producción de IL-2, $\text{IFN-}\gamma$ y del pirógeno $\text{TNF-}\alpha$ (Taylor-Robinson & Smith 1999), también inhibe la adhesión de leucocitos y plaquetas al endotelio disminuyendo la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 (Serirom *et al.* 2003) quizá estos efectos generen la tolerancia a malaria inducida por óxido nítrico en pacientes asintomáticos de las zonas endémicas (Boutlis *et al.* 2003).

La sobreproducción de óxido nítrico contribuye a la patogenia de malaria, oxida las lipoproteínas de baja densidad (LDL) las cuales a su vez incrementan la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales promoviendo la citoadherencia y secuestro de eritrocitos parasitados generando complicaciones en malaria cerebral (Sibmooh *et al.* 2004), en altas concentraciones el óxido nítrico inhibe el crecimiento de las colonias eritroides y mieloides induciendo anemia (Shami & Weinberg 1996).

5. MATERIAL.

5.1 Material biológico.

1. Ratones CBA/Ca hembras de 8-12 semanas de edad, mantenidos bajo condiciones libres de patógenos específicos y alimentados con Harlan TD9936.
2. Eritrocitos parasitados (EP) con *Plasmodium chabaudi* AS, criopreservados en nitrógeno líquido.
3. EP con *Plasmodium yoelii* 17XL criopreservados.
4. Suero normal de ratón CBA/Ca.

5.2 Material de laboratorio.

1. Algodón.
2. Cajas Petri de 10cm de diámetro, de plástico, nuevas y estériles.
3. Cubrebocas.
4. Gorros y botas para trabajar en áreas limpias.
5. Gradillas para tubos eppendorf.
6. Gradillas para tubos falcon.
7. Guantes de hule latex
8. Jeringa Hamilton, Daigger.
9. Jeringas de insulina nuevas y estériles.
10. Jeringas de 5mL nuevas y estériles.
11. Malla de acero inoxidable nueva y estéril.
12. Membrana de transferencia PVDF, Millipore.
13. Papel filtro.
14. Película para diagnóstico Kodak, X-Omat^{MR}
15. Pinzas de disección.
16. Pipetas Pasteur de vidrio.
17. Pipeta de Sahli.
18. Pipetas serológicas: 5mL, 10mL.
19. Placas de ELISA.
20. Portaobjetos.
21. Puntas para micropipetas: 2.5 μ L, 10 μ L, 250 μ L, 1000 μ L nuevas y estériles.
22. Tijeras de disección.
23. Tubos eppendorf: 1.5 mL, 650 μ L, 250 μ L nuevos y estériles.

24. Tubos falcon: 15mL, 50mL nuevos y estériles.

5.3 Equipo.

1. Agitador, Hoefler.
2. Autoclave, Tuttnauer Brinkmann 2540M.
3. Balanza analítica, SCIENTECH.
4. Balanza granataria, Ohaus.
5. Cámara de electroforesis BIO-RAD, PROTEAN II xi Cell, 16cm.
6. Cámara de transferencia/electroforesis, BIO-RAD, Mini Trans-Blot®.
7. Campana de flujo laminar, Veco.
8. Centrifuga refrigerada, Eppendorf.
9. Congelador, Nieto.
10. Equipo analizador de geles: Gel Doc 1000, BIO-RAD.
11. Espectrofotómetro UV, WPA.
12. Fuente de voltaje, BIO-RAD
13. Lector de ELISA, Stat fax-2100, Awareness Technology Inc.
14. Microcentrifuga, Eppendorf 5415C.
15. Micropipetas Eppendorf: 2.5 μ L, 10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 1000 μ L.
16. Micropipeta Eppendorf 8 X 200 μ L.
17. Microscopio óptico, Carl Zeiss estándar 25.
18. Placa de agitación, Corning.
19. Potenciometro, Consort.
20. Refrigerador, MayTag.
21. Sonicador VC505, Vibra-Cell
22. Tanque de nitrógeno líquido, 34XT, Taylor-Wharton.
23. Termociclador, Eppendorf.
24. Termociclador, MJ Research.
25. Ultracongelador, REVCO, Legaci Refrigeration System.
26. Vortex Genie 2, Daigger.

5.4 Reactivos.

1. Aceite mineral, Sigma.
2. Acetato de sodio, Sigma.
3. Acido acético, Sigma.

4. Acido bórico, Sigma.
5. Acido fosfórico, Sigma.
6. Acido tricloroacético, Droguería Cosmopolita.
7. Acrilamida, USB/Amersham.
8. Agua bidestilada, Hidropura.
9. Albúmina sérica bovina, Sigma.
10. Amortiguador para retrotranscripción 5X (5X first strand buffer), Invitrogen.
11. Anticuerpo anti-iNOS de ratón (isotipo IgG2a), Becton Dickinson.
12. Anticuerpo secundario anti-IgG de conejo, conjugado con HRP, Sigma.
13. Aprotinina, Sigma.
14. Azul de bromofenol, Sigma.
15. Azul de Comassie R-250, Gibco BRL.
16. Bicarbonato de sodio, Sigma.
17. Bis acrilamida, Sigma.
18. Bromuro de etidio, Sigma.
19. Cianometahemoglobina (Estándar de hemoglobina), Hycel de México.
20. Cianuro de potasio, Sigma.
21. Citrato de sodio, Sigma.
22. Cloroformo, Burdick-Jackson.
23. Cloruro de magnesio, Sigma
24. Cloruro de potasio, USB/Amersham.
25. Cloruro de sodio, USB/Amersham.
26. Colorante de Giemsa, Sigma.
27. Dietilpirocarbonato, Sigma.
28. dNTP's (desoxirribonucleótidos de trifosfato), Invitrogen.
29. Ditioneitol (dTT) Gibco BRL.
30. EDTA, Sigma.
31. Etanol absoluto, Merck.
32. Eter, JT Backer
33. Fenol ácido, Sigma.
34. Ferricianuro de potasio, Sigma.
35. Fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF),Sigma
36. Fosfato de potasio monobásico, Aldrich.
37. Fosfato de sodio monobásico, Sigma.

38. Gelatina, Sigma.
39. Glicina, Sigma.
40. Glicol, Sigma.
41. Hemisulfato de aminoguanidina, Sigma.
42. Estándar de hemoglobina,
43. Heparina de sodio, Sigma.
44. Inhibidor de RNA'sa, Invitrogen.
45. Inhibidor de tripsina Soybean, Sigma.
46. Leche en polvo, Svelty.
47. Leupeptina, Sigma.
48. Marcador de peso molecular 29-285KDa, Sigma.
49. Marcador de peso molecular 120pb, Sigma.
50. M-MLV RT (retrotranscriptasa del virus de leucemia murina moloney), Invitrogen.
51. 2-mercaptoetanol, Sigma.
52. Metanol absoluto, Tecsiquim.
53. NADPH (sal tetrasódica), Roche.
54. NED (Hidrocloruro de N-1-naftiletildiamina), Baker.
55. Nitrato reductasa 20 U, Roche.
56. Oligo (dT)₁₂₋₁₈, Invitrogen.
57. Persulfato de amonio, Sigma.
58. PMSF (fluoruo de fenilmetilsulfonilo)
59. Primers u oligos para los genes: β -actina, IFN- γ , IL-12, TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-10, IL-6, iNOS, Gibco BRL.

β -actina

3' CTC TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC

5' GTG GGC CGC TCT AGG CAC CAA

IFN- γ

3' TGG ACC TGT GGG TTG TTG ACC TCA TTG GC

5' TGC ATC TTG GCT TTG CAG CTC TTC CTC ATG

IL-12

3' CGA AAG CTA ACC ATC TCC TGG TTT G
5' TCC GGA GTA ATT TGG TGC TCC ACA C

TNF- α

3' CCA AAG TAG ACC TGC CCG GAC TC
5' ATG AGC ACA GAA AGC ATG ATC CGC

TGF- β

3' GAC CGC AAC AAC GCC ATC TA
5' GGC GTA TCA GTG GGG GTC AG

IL-4

3' CAG TGA TGT GGA CTT GGA CTC ATT CAT GGT
5' CCA GCT AGT TGT CAT CCT GCT CTT CTT TCT

IL-10

3' ATT TCG GAG AGG TAC AAA CGA GGT TGT T
5' ATC CAG GAC TTT AAG GGT TAC TTG GGT T

IL-6

3' ATG AAG TTC CTC TCT GCA AGA GAC T
5' CAC TAG GTT TGC CGA GTA GAT CTC

iNOS

3' CAG GAT GCT CTG AAC GTA GAC CTT G
5' CAG CTC CAC AAG CTG GCT CG

37. Protein Assay (reactivo para cuantificar proteínas), BIO-RAD.
38. Sacarosa, Sigma.
39. Sarcosil, Sigma.
40. SDS (Dodecilsulfato de sodio), Sigma.
41. Solución fijadora, Kodak GBX.
42. Solución reveladora, Kodak GBX.
43. Sulfanilamida, Sigma.

44. Sustrato de peroxidasa (SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate), Pierce.
45. Taq polimerasa (AmpliTaq DNA polimerase), Perkin Elmer.
46. TEMED, Sigma.
47. Tiocianato de guanidinio, Sigma.
48. Tris base, Sigma.
49. Trizol[™], Invitrogen.
50. Tween 20, Sigma.
51. Xilencianol, Sigma.

6. MÉTODOS.

6.1 Primoinfección de ratones.

Para que los ratones CBA/Ca generaran inmunidad al parásito no letal, se inocularon intravenosamente (iv) con 5×10^4 eritrocitos parasitados (EP) de *P. chabaudi* AS, obtenidos de un ratón donador inoculado previamente con EP criopreservados. El desarrollo de la infección se corroboró con el monitoreo de las parasitemias.

6.2 Monitoreo de las parasitemias.

1. Se realizaron frotis con sangre de la cola y se tiñeron con el colorante de Giemsa.
2. La lectura de las parasitemias se efectuó con un microscopio óptico utilizando el objetivo 100X y de acuerdo a los siguientes criterios:
 - a) Cuando existían menos de 2 EP por campo, se leyeron 50 campos.
 - b) Cuando existían 2 ó más EP por campo, se contaron 200 eritrocitos (incluyendo en este número los EP).
3. De acuerdo al número de EP se calculó la parasitemia y se elaboraron gráficas en escala logarítmica.

6.3 Reinfeción de ratones.

Ocho semanas después de la primoinfección los ratones se re infectaron iv con 5×10^4 EP de *P. yoelii* 17XL, simultáneamente se trabajó con ratones inmunes re infectados con *P. chabaudi* AS y ratones primoinfectados con *P. yoelii* 17XL ó *Plasmodium chabaudi* AS para analizar las diferencias en la respuesta inmune.

6.4 Evaluación de la pérdida de peso.

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

6.5 Determinación de hemoglobina (Hb).

Para conocer la concentración de Hb en sangre se empleó el reactivo de Drabkin y un estándar de Hb. La dilución de la muestra fue de 1:251 (1 μ L de sangre se adicionó en 250 μ L de reactivo), se agitó vigorosamente y se leyó la absorbancia a 540nm.

6.6 Determinación de índice esplénico.

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

6.7 Análisis de nitritos en suero.

Las muestras de sangre para la obtención de suero se centrifugaron a 14,000rpm durante 10 minutos después de que la coagulación fue completa. Los sueros se almacenaron a -70°C hasta que se procesaron.

*** Técnica de Griess (curva patrón).**

La curva se realizó en la campana de flujo laminar con material nuevo y estéril.

1. En una placa de ELISA se colocaron 100 μL de las diluciones seriadas del estándar de nitritos (700 μM , 350 μM , 175 μM , 87.5 μM , 43.75 μM , 21.87 μM , 10.9 μM).
2. Se adicionaron 50 μL de sulfanilamida al 1% en ácido fosfórico al 5% y se incubó por dos minutos a temperatura ambiente protegido de la luz.
3. Se adicionaron 50 μL de NED (hidrocloruro de N-1-naftiletilendiamina) al 1% y se incubó por dos minutos a temperatura ambiente protegido de la luz.
4. Finalmente se determinó la absorbancia a 545nm con un lector de ELISA.

*** Procesamiento de las muestras.**

1. En un tubo eppendorf se colocaron 15 μL de suero, 15 μL de NADPH (1.25mg/mL) y 5 μL de nitrato reductasa (5U/mL).
2. Se incubó por 25 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz.
3. Se adicionaron 50 μL de sulfanilamida y se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz.
4. Se adicionaron 50 μL de NED y se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz.
5. Se adicionaron 100 μL de ácido tricloroacético al 10%.
6. Se centrifugó a 14,000rpm por 15 minutos a temperatura ambiente.
7. Se tomaron 200 μL del sobrenadante y se colocaron en una placa de ELISA.
8. Se midió la absorbancia de la muestra a 545nm en un lector de ELISA.

6.8 Determinación de iNOS por Western Blot.

La determinación de iNOS se realizó en bazo, por lo que este órgano se extrajo y se almacenó a -70°C hasta que se procesó.

* Extracción de la enzima.

1. Los bazos se lavaron con PBS 1X helado para eliminar un poco de eritrocitos.
2. Los bazos se disgregaron con dos volúmenes del amortiguador de sonicación con inhibidores de proteasas.
3. Se sonicó en condiciones frías tres veces por tres segundos a una amplitud de 20%, no se recomienda una amplitud mayor debido a que se producen demasiadas burbujas y éstas desnaturalizan a las proteínas.
4. Se centrifugó a 14,000rpm/ 1 hora a 4°C .
5. Se recuperó el sobrenadante y se guardó -20°C .

* Cuantificación de proteína.

1. La curva patrón se realizó con albúmina estándar ($1\ \mu\text{g}/\ \mu\text{L}$):
 - a) Se etiquetaron 5 tubos eppendorf en la siguiente forma: **B, 2, 4, 8, 16**.
 - b) Para diluir una parte del reactivo en cuatro partes de agua se colocaron $800\ \mu\text{L}$ de agua millipore en los tubos etiquetados.
 - c) Se adicionaron $2\ \mu\text{g}$, $4\ \mu\text{g}$, $8\ \mu\text{g}$ y $16\ \mu\text{g}$ de albúmina estándar a los tubos **2, 4, 8, 16** respectivamente, el tubo **B** correspondió al blanco.
 - d) A cada tubo se le agregaron $200\ \mu\text{L}$ del reactivo para cuantificar proteínas (Bio-Rad Protein Assay, BIO-RAD) y se agitó.
 - e) Se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos.
 - f) Se midió la absorbancia a 595nm .
2. Cuantificación de proteínas en los extractos de la enzima.
 - a) En un tubo eppendorf se colocaron $800\ \mu\text{L}$ de agua, $1\ \mu\text{L}$ de la muestra y $200\ \mu\text{L}$ del reactivo de Bio-Rad.
 - b) Se agitó e incubó a temperatura ambiente por 5 minutos.
 - c) Se midió la absorbancia a 595nm .

*** Electroforesis.**

1. Se mezclaron 50 μg de proteína total con 4 μL del amortiguador de carga Laemmli 5X y se hirvió durante 5 minutos.
2. Inmediatamente se colocó en hielo.
3. Se centrifugó a 14,000rpm durante 5 segundos.
4. Para la electroforesis se utilizó un gel concentrador al 5.14% y un gel separador al 12%.
5. Antes de depositar las muestras y el marcador de peso molecular en los pozos, éstos fueron lavados exhaustivamente con amortiguador de corrimiento 1X utilizando una jeringa Hamilton.
6. Se corrió la electroforesis en amortiguador de corrimiento 1X, para la concentración de las muestras se sometió a un voltaje de 60 volts/1 hora y la separación de las bandas fue a 90 volts/4 horas.

*** Transferencia.**

1. Se cortaron dos trozos de papel filtro y uno de la membrana de PVDF (difluoruro de polivinidilo) al tamaño del gel.
2. El gel concentrador se desechó y el gel separador se recortó para transferir únicamente la región de interés, que se encontró entre 74KDa y 146KDa de acuerdo al marcador de PM.
3. Se realizó un corte en el extremo superior derecho del gel separador y de la membrana para no perder la orientación de las muestras.
4. El gel se colocó sobre un trozo de papel filtro prehumedecido en el amortiguador de transferencia.
5. La membrana se humedeció en el amortiguador de transferencia y se colocó sobre el gel, las burbujas atrapadas se eliminaron rotando un tubo de ensayo.
6. Sobre la membrana se colocó otro trozo de papel filtro previamente humedecido con el amortiguador de transferencia.
7. El sandwich formado se colocó en el casete de la cámara de transferencia con la membrana hacia el ánodo.
8. La transferencia se realizó en una cámara húmeda con un voltaje de 100volts durante 1.5hrs y a 4°C.

* Immunobloting.

1. Se bloqueó la membrana con leche al 5% en TBS-Tween (0.1%) durante 1 hora con agitación constante y a temperatura ambiente.
2. Se retiró la leche.
3. Se lavó la membrana con TBS-Tween.
4. Se colocó el anticuerpo primario (anti-iNOS) diluido 1:1000 en albúmina al 1% en TBS-Tween.
5. Se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente y con agitación constante.
6. Se retiró el anticuerpo
7. Se lavó la membrana con leche al 5%:
 - a) Dos lavados de 10 minutos cada uno.
 - b) Tres lavados de 5 minutos cada uno.
8. Se enjuagó con TBS-Tween.
9. Se incubó 1 hora con el anticuerpo secundario diluido 1:10000 en albúmina al 1% en TBS-Tween.
10. Se lavó con leche al 5%:
 - a) 2 veces durante 10 minutos.
 - b) 1 vez durante 5 minutos.
11. Se lavó dos veces con TBS-Tween,
12. Se lavó tres veces con TBS.
13. Se colocó el sustrato en una dilución 1:1 (peróxido:luminol), durante 10 minutos y se mantuvo con agitación constante.
14. En un cuarto oscuro, la membrana se colocó sobre película kodak dentro de un casete con un tiempo de exposición de 15min y se reveló para apreciar la intensidad de la banda de iNOS.

6.9 Extracción y cuantificación de RNA.

Dado que en la extracción de RNA se manipularon más de dos muestras, éstas se mantuvieron en hielo para evitar la degradación de RNA por RNA'sas, además todas las soluciones empleadas estuvieron en condiciones frías.

1. El RNA se obtuvo del bazo, éste se maceró con el émbolo de una jeringa y se pasó a través de una malla de acero inoxidable, se utilizó PBS libre de calcio y magnesio.

2. Se centrifugó a 1000rpm durante 15 minutos a 4°C y se desechó el sobrenadante.
3. El botón formado se desprendió con agitación vigorosa y se adicionaron 500 µL de TriZol™, nuevamente se agitó hasta que la lisis fue completa.
4. A 100 µL del lisado anterior se adicionaron 150 µL de cloroformo:alcohol isoamílico y se agitó durante 15 minutos.
5. Se centrifugó a 14,000rpm durante 15 minutos a 4°C.
6. Se recuperó la fase acuosa, evitando la interfase.
7. Se adicionaron 500 µL de isopropanol, se homogeneizó y se guardó a -70°C hasta su uso.
8. Para recuperar el RNA precipitado con isopropanol se centrifugó a 14,000rpm durante 15 minutos a 4°C.
9. El sobrenadante se eliminó con una micropipeta.
10. Se adicionaron 800 µL de etanol al 80% en agua DEPC y se agitó suavemente.
11. Se guardó a -70°C durante 24 horas.
12. Se centrifugó a 14,000rpm durante 15 minutos a 4°C.
13. Se descartó el sobrenadante con una micropipeta, teniendo cuidado de no tocar el botón.
14. Se destaparon los tubos y se cubrieron con parafilm, posteriormente se realizaron pequeños orificios con una aguja (limpia y estéril).
15. Los tubos se colocaron en un lugar limpio y a temperatura ambiente, permitiendo que se secan durante 24 horas.
16. Las muestras se hidrataron con 20 µL de agua DEPC al 0.1% estéril.
17. Se agitó durante 5 minutos. Como la hidratación fue incompleta se refrigeró de 1-2 horas, agitando en vortex cada 30 minutos.
18. Se centrifugó a 14,000rpm durante 5 minutos a 4°C.
19. Para determinar la concentración de RNA se realizó una dilución 1:400 y se midió la absorbancia a 260nm. 399 µL de agua DEPC estéril + 1 µL de la solución de RNA.
20. Se calculó la concentración de RNA en µg/ µL de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$[\text{RNA}] = \text{Abs}_{260\text{nm}} \times \frac{40\mu\text{g}}{1000\mu\text{L}} \times 400 = \mu\text{g}/\mu\text{L}$$

Donde:

Abs_{260nm} = Absorbancia de la dilución a 260nm

$\frac{40\mu g}{1000\mu L}$ = Concentración de RNA cuando la absorbancia a 260nm es 1

400 = Factor de dilución

6.10 Retrotranscripción.

1. Para realizar la retrotranscripción se utilizaron 1.5 μ g de RNA. La desnaturalización se llevó a cabo en un volumen de 10 μ L con los siguientes componentes:

Agua DEPC + 1.5 μ L oligo dT (0.5 μ g/ μ L) + 1.5 μ g RNA = 10 μ L

2. Se incubó a 65°C por 10 minutos utilizando el termociclador e inmediatamente se colocó en hielo durante 5 minutos.
3. Se centrifugó a 14,000rpm durante 5 segundos y se volvió a colocar en hielo.
4. Se adicionaron 10 μ L de la mezcla de retrotranscripción.
5. Se incubó a 37°C por 1 hora utilizando el termociclador.
6. Se incubó a 95°C por 5 minutos.
7. Se colocó en hielo durante 5 minutos y se centrifugó a 14,000rpm durante 5 segundos.
8. Se adicionaron 70 μ L de agua DEPC y se guardó a -70°C hasta su uso.

6.11 Amplificación de los genes para citocinas por PCR.

Durante la amplificación de los genes para citocinas también se amplificó el gen que codifica para β -actina como control interno. Todos los reactivos y mezcla de reacción se mantuvieron en hielo.

1. En un tubo eppendorf se colocaron 15 μ L de la mezcla de reacción para PCR.
2. Se adicionaron 50 μ L de aceite mineral.
3. Se depositaron 5 μ L de cDNA o retrotranscrito, atravesando la capa de aceite y sin agitar. Hasta este paso el proceso debe realizarse en hielo.

4. Los tubos se colocaron en el termociclador cuando éste alcanzó la temperatura de 94°C y se corrió el siguiente programa:
 1. 94°C por 6 minutos
 2. 55°C por 2 minutos
 3. 72°C por 2 minutos
 4. 94°C por 45 segundos
 5. Se repitió 30 veces del paso 2-4
 6. 55°C por 2 minutos
 7. 72°C por 7 minutos
 8. 20°C por una hora
 9. Fin
5. Los productos de PCR se guardaron en refrigeración hasta su uso.

6.12 Electroforesis de los productos de PCR.

1. Se prepararon geles de acrilamida al 5% en TBE 1X
2. Al producto de PCR se adicionaron 10µL del amortiguador de carga y se mezcló la fase acuosa sin hacer emulsiones con el aceite.
3. Se depositaron 10 µL de la muestra con amortiguador en el pozo del gel.
4. En un pozo de los extremos se colocaron 10 µL del marcador de PM de 123 pares de bases.
5. Se corrió la electroforesis a 180 volts por 1 hora y media. En TBE 1X.
6. Se procedió a teñir los geles con bromuro de etidio, utilizando 20 µL de una solución de 100mg/mL en 200mL de TBE 1X y se agitó suavemente durante 5 minutos.
7. Se destiñó con agua destilada durante 5 minutos.
8. El gel se colocó en el equipo analizador de geles: Gel Doc para visualizar los resultados.
9. Se determinó la absorbancia de los productos de PCR y se realizaron gráficos para la expresión de cada citocina.

6.13 Análisis estadístico.

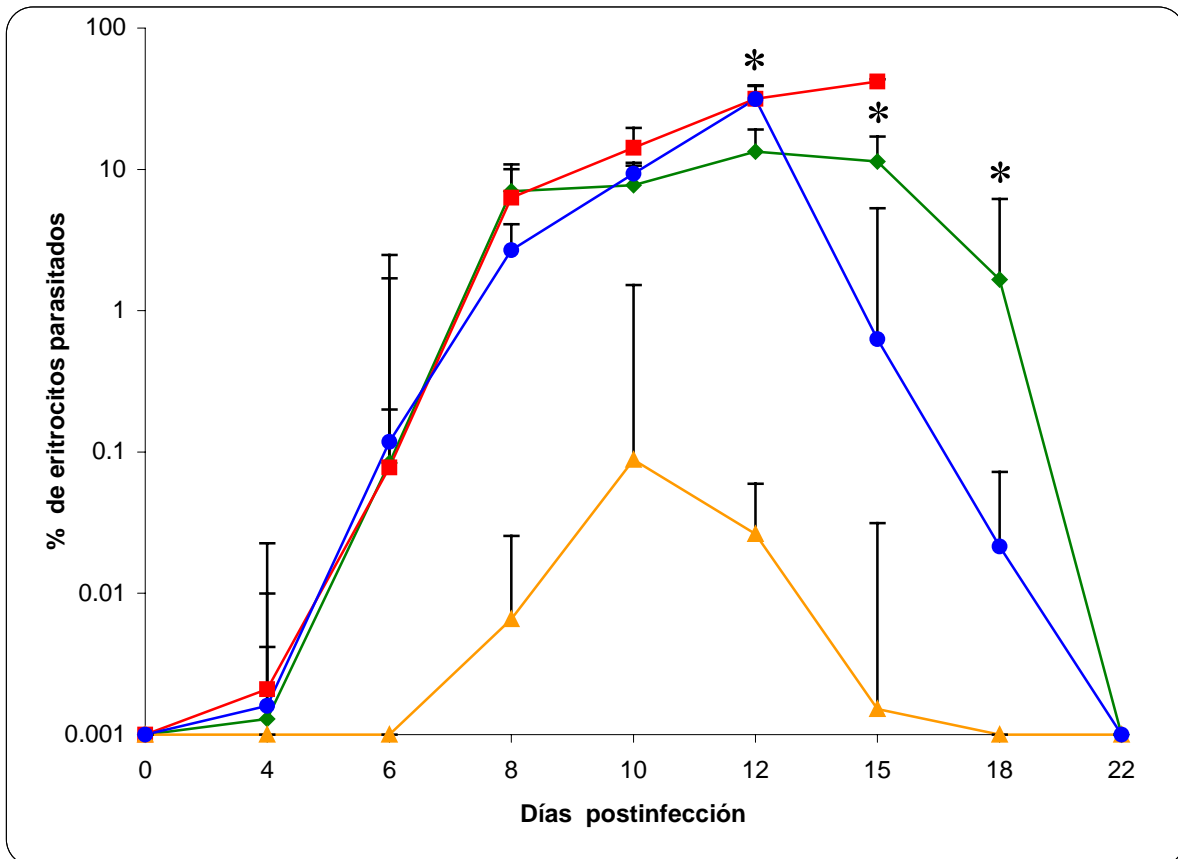
El análisis estadístico se realizó con el programa JMP, versión 3.1.6.2. Los resultados se analizaron con ANOVA y las diferencias significativas se determinaron con la prueba de Tukey HSD (honest significant difference) para $p < 0.05$.

La significancia estadística para los coeficientes de correlación se determinó con la prueba de correlación de Spearman.

7. RESULTADOS.

Curso de la infección.

Los ratones infectados por primera vez (primoinfectados) con *P. yoelii* 17XL (letal) desarrollaron parasitemias significativamente más altas que los ratones inmunes a *P. chabaudi* AS y re infectados con *P. yoelii* 17XL (inmunes re infectados con *P. yoelii* 17XL), ya que en el día 12 postinfección se detectaron parasitemias de 31.66% y 13.38% respectivamente ($p < 0.05$). El día 15, el primer grupo de ratones incrementó el número de parásitos en sangre a 41.81% y perecieron, en tanto que los segundos comenzaron a disminuir la parasitemia (11.35%), $p < 0.05$ (**Gráfica 2**).



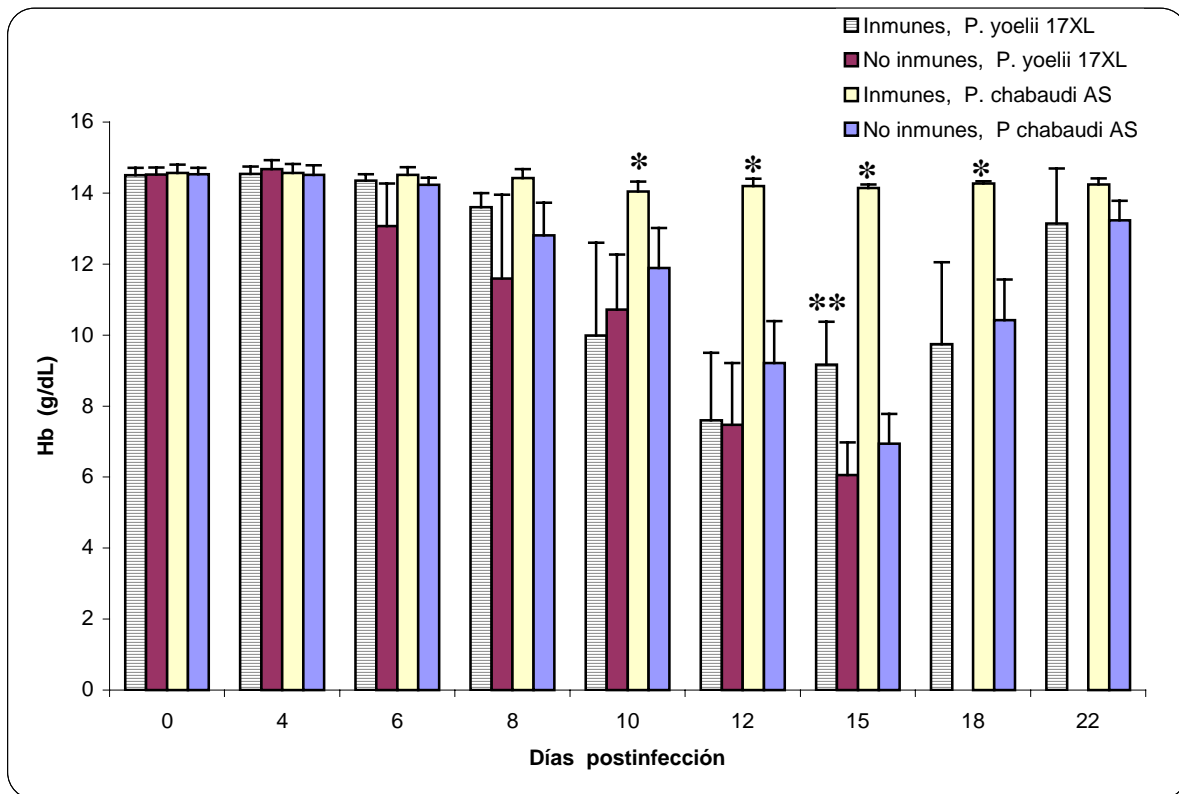
Gráfica 2. Curso de la infección con *Plasmodium*. Ratones CBA/Ca se inocularon i.v. con 5×10^4 EP, se realizaron frotis sanguíneos y se tiñeron con Giemsa. Los resultados muestran la parasitemia promedio de 10 ratones + 1 desviación estándar, el * indica diferencias significativas $p < 0.05$. —●— Corresponde a ratones inmunes re infectados con *P. yoelii* 17XL, —■— ratones primoinfectados con *P. yoelii* 17XL, —▲— ratones inmunes re infectados con *P. chabaudi* AS, —●— ratones primoinfectados con *P. chabaudi* AS.

Pese a que los ratones inmunes se recuperaron de la infección con el parásito letal (*P. yoelii* 17XL), el control de éste fue significativamente más lento que el observado en los ratones primoinfectados con *P. chabaudi* AS, pues en el día 18 éstos últimos disminuyeron su % de eritrocitos parasitados significativamente ($p < 0.05$). Sin embargo, en el día 12 los ratones primoinfectados con *P. chabaudi* AS desarrollaron parasitemias significativamente mayores (31.44%) que los ratones inmunes re infectados con *P. yoelii* 17XL (13.38%) $p < 0.05$, incluso se igualaron con las parasitemias de los ratones primoinfectados con *P. yoelii* 17XL (31.66%) ($p > 0.05$) **Gráfica 2**. En el curso de la infección de los ratones inmunes a *P. chabaudi* AS retados con el mismo parásito (homólogo) las parasitemias fueron significativamente menores al resto de los grupos estudiados ($p < 0.05$) y, dado que estaban protegidos eliminaron la parasitemia en menos tiempo, como puede apreciarse en la **Gráfica 2**.

Control de los parámetros de patogenia.

Como se observaron diferencias significativas durante el curso de la infección entre los diversos grupos de ratones, se decidió evaluar los parámetros de patogenia: anemia, pérdida de peso e índice esplénico. También se analizó si éstos factores se afectaban por un aumento en la parasitemia, determinando los coeficientes de correlación entre las variables.

Durante el curso de la infección el único grupo de ratones que no desarrolló anemia significativa fue el inmune a *P. chabaudi* AS re infectado con el parásito homólogo (**Gráfica 3**). A partir del día 8, la anemia generada en los grupos de ratones: inmunes re infectados con *P. yoelii* 17XL, primoinfectados con *P. yoelii* 17XL y primoinfectados con *P. chabaudi* AS fue igual, ($p > 0.05$) incluso en los días 10 y 12 se siguió la misma tendencia; no obstante, para el día 15 los ratones inmunes re infectados con *P. yoelii* 17XL comenzaron a recuperarse significativamente de la anemia ($p < 0.05$), no así los ratones primoinfectados con el parásito letal y los ratones primoinfectados con el parásito no letal ($p > 0.05$). Finalmente, pese a que los ratones primoinfectados con *P. chabaudi* AS presentaron mayor anemia que los ratones inmunes re infectados con *P. yoelii* 17XL en el día 15, en el día 18 la recuperación de los niveles de hemoglobina se igualó en ambos grupos ($p > 0.05$).



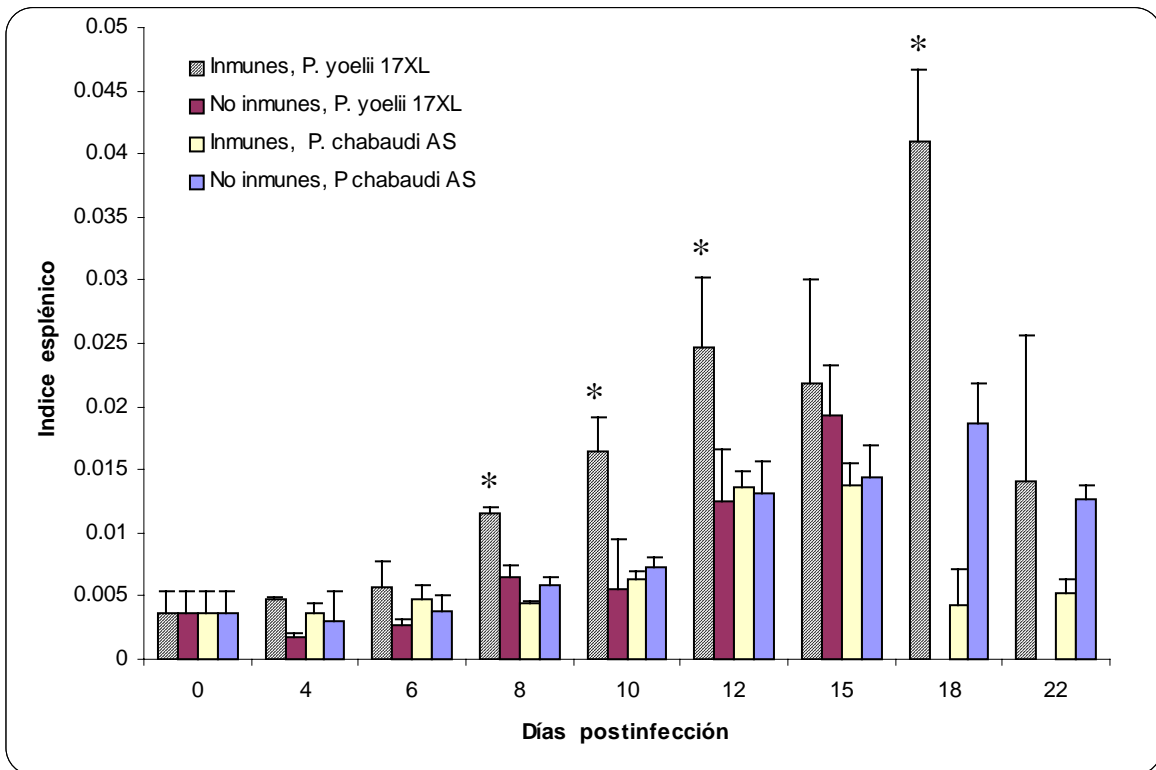
Gráfica 3. Determinación de hemoglobina en la infección con *Plasmodium*. Ratones CBA/Ca se infectaron i.v. con 5×10^4 EP, en los días señalados se obtuvo sangre de la cola para determinar la concentración de hemoglobina con el reactivo de Drabkin. Cada punto representa la Hb promedio de 10 ratones + 1 desviación estándar, * indica diferencias significativas con los ratones inmunes re infectados con *P. chabaudi* AS y ** señala diferencias significativas con los ratones inmunes re infectados con *P. yoelii* 17XL para ($p < 0.05$).

La pérdida de peso durante el curso de la infección en los ratones inmunizados no fue significativa ($p > 0.05$), cuando se retaron con el parásito homólogo o con el parásito heterólogo (**Tabla 3**). En contraste a los ratones inmunizados, los ratones primoinfectados con el parásito letal o con el parásito no letal presentaron una pérdida de peso corporal significativa el día 15 ($p < 0.05$), en la primoinfección con *P. yoelii* 17XL la pérdida de peso fue de 22.24% mientras que en la primoinfección con *P. chabaudi* AS fue de 19.45%, no se detectó diferencia entre ambos grupos ($p > 0.05$) atribuida a la letalidad del parásito **Tabla 3**.

Día postinfección	Inmunes, <i>P. yoelii</i> 17XL	No inmunes, <i>P. yoelii</i> 17XL	Inmunes, <i>P. chabaudi</i> AS	No inmunes, <i>P. chabaudi</i> AS
0	100.00	100.00	100.00	100.00
4	95.25±3.02	95.71 ± 2.29	95.58 ± 5.48	93.13 ± 4.12
6	95.72 ± 3.00	92.79 ± 2.46	96.24 ± 3.53	92.33 ± 6.41
8	94.99 ± 4.57	91.73 ± 4.99	97.23 ± 3.86	94.72 ± 3.31
10	91.43 ± 6.27	91.29 ± 4.13	97.99 ± 4.02	95.1 ± 3.31
12	88.43 ± 7.76	89.6 ± 6.89	94.98 ± 4.80	93.18 ± 3.34
* 15	86.71 ± 7.98	77.76 ± 3.24	94.78 ± 5.73	80.54 ± 6.54
* 18	83.13 ± 9.24		98.53 ± 8.32	86.21 ± 2.70
* 22	87.53 ± 0.83		97.61 ± 6.21	87.25 ± 4.03

Tabla 3. Pérdida de peso durante la infección con *Plasmodium*. Ratones CBA/Ca se inocularon i.v. con 5×10^4 EP, en los días señalados se registró el peso corporal en (%) considerando que el día cero tenían el 100% y se reportó como el peso promedio de 10 ratones \pm 1 desviación estándar. El * señala el día en que se observaron diferencias significativas entre los ratones inmunes re infectados con *P. chabaudi* AS y los ratones no inmunes ($p < 0.05$).

Las alteraciones en el bazo de los ratones inmunes re infectados con el parásito letal fueron notables a partir del día 8 y alcanzó un crecimiento máximo el día 18, justo antes de la eliminación completa del parásito; el desarrollo de la esplenomegalia en este grupo de ratones fue significativamente mayor que en los otros grupos de ratones ($p < 0.05$) en los días 10, 12 y 18 **Gráfica 4**, a excepción del día 15, pues el crecimiento del bazo fue igual para todos los grupos de ratones infectados ($p > 0.05$). En el día 18 los ratones inmunes retados con el parásito homólogo tendieron a reestablecer el tamaño del bazo significativamente ($p < 0.05$), mientras que en los ratones inmunes re infectados con *P. yoelii* 17XL el bazo aún registró crecimiento significativo ($p < 0.05$); también se observó que los ratones primoinfectados con *P. chabaudi* AS tardaron en restaurar el tamaño del bazo sin desarrollar crecimiento en el órgano ($p < 0.05$).



Gráfica 4. Desarrollo de esplenomegalia durante la infección con *Plasmodium*. Ratones CBA/Ca se infectaron con 5×10^4 EP i.v. se sacrificaron en los días señalados y se determinó el índice esplénico (peso del bazo / peso del ratón). Cada punto representa el promedio de 3 ratones + 1 desviación estándar. * marca diferencias significativas con ($p < 0.05$).

Correlación entre las parasitemias y los parámetros de patogenia.

Las correlaciones obtenidas entre las parasitemias y los parámetros de patogenia durante el curso de la infección se resumen en la **Tabla 4**, únicamente se reportaron los factores de correlación en los días 6, 8, 10 y 12 postinfección pues en ellos se encontraron valores de r significantes para $p < 0.05$.

En los ratones inmunes a *P. chabaudi* AS re infectados con *P. yoelii* 17XL hubo una correlación negativa entre las parasitemias y la anemia el día 8 de la infección; entre la parasitemia y la pérdida de peso se detectó correlación negativa el día 12 y las parasitemias con el aumento del índice esplénico se detectó correlación positiva en los días 6 y 8.

En los ratones primoinfectados con *P. yoelii* 17XL sólo se detectó correlación negativa con la concentración de Hb el día 10 de la infección.

El análisis de las parasitemias en ratones inmunes re infectados con *P. chabaudi* AS detectó las siguientes correlaciones: negativa para la concentración de hemoglobina y positiva para el índice esplénico en el día 8.

Por último, en los ratones primoinfectados con *P. chabaudi* AS no se detectó correlación entre las parasitemias y los parámetros evaluados, no obstante el día 12 el coeficiente de correlación con el peso tuvo un valor de -0.9874 a pesar de no ser significativo.

Parámetro de patogenia		Días postinfección			
		6	8	10	12
Hb	A	0.630	* -0.9821	-0.9793	-0.3911
	B	0.3794	0.2288	* -0.9813	-0.3449
	C	----	* -0.8759	0.8736	-0.7858
	D	0.9648	0.8778	-0.4424	0.0951
Peso	A	0.9976	-0.3779	-0.5761	* -0.8576
	B	0.5424	-0.1428	-0.5719	-0.7468
	C	---	0.64	-0.646	0.2738
	D	0.6511	-0.9998	-0.011	-0.9874
Índice esplénico	A	* 0.9657	* 0.765	0.9125	-0.1367
	B	0.3771	-0.2104	0.7304	-0.7772
	C	---	* 0.9225	-0.0536	-0.2441
	D	-0.3223	-0.7136	-0.8946	0.1976

Tabla 4. Coeficientes de correlación r entre las parasitemias y los parámetros de patogenia durante la infección con *Plasmodium*. Las letras corresponden a los diferentes grupos de ratones: (A) inmunes re infectados con *P. yoelii* 17XL, (B) primoinfectados con *P. yoelii* 17XL, (C) inmunes re infectados con *P. chabaudi* AS, (D) primoinfectados con *P. chabaudi* AS. * valores de r significantes para $p < 0.05$

Además se realizó un análisis de la correlación entre los parámetros de patogenia para determinar la afección entre ellos, la **Tabla 5** únicamente muestra las correlaciones significantes con una $p < 0.05$, en ella se aprecia una marcada correlación negativa entre la concentración de hemoglobina y el índice esplénico en los ratones primoinfectados con *P. chabaudi* AS.

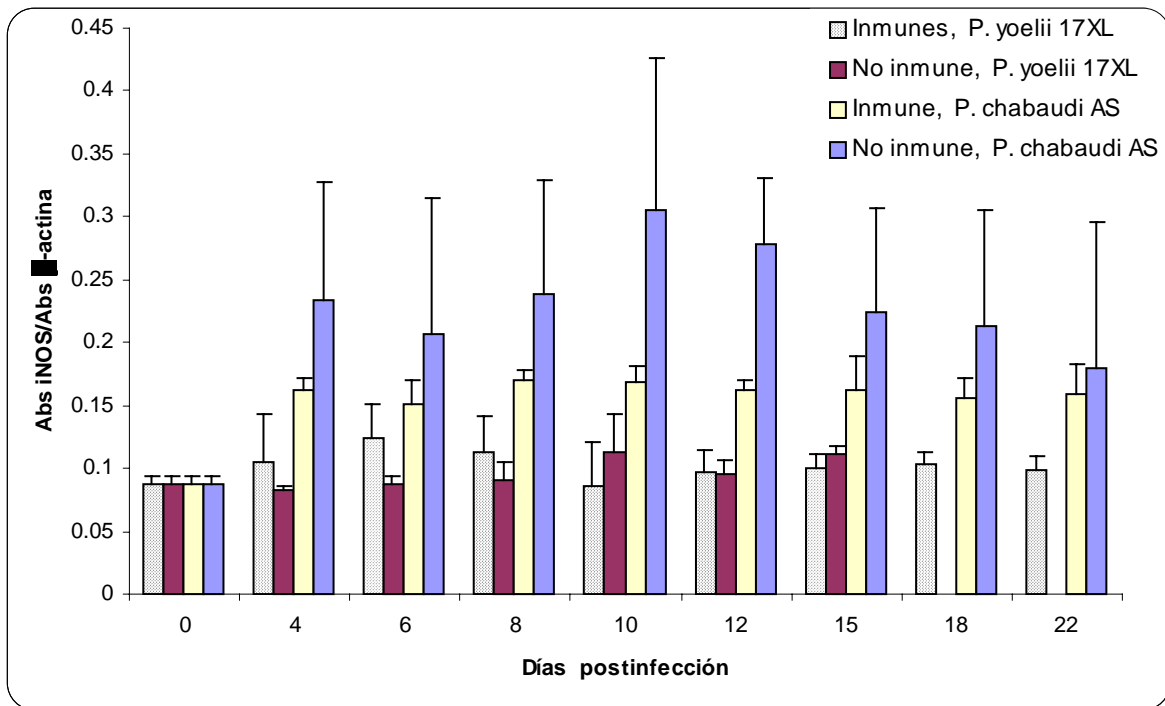
Días postinfección	Ratones inmunes reinfectados con <i>P. yoelii</i> 17XL	Ratones primoinfectados con <i>P. yoelii</i> 17XL	Ratones inmunes reinfectados con <i>P. chabaudi</i> AS	Ratones primoinfectados con <i>P. chabaudi</i> AS
4	Peso -Hb (0.9997)	IE- Peso (0.8338)	IE-Hb (0.9423)	IE- Peso (-0.8434)
6	Peso-Hb (0.6826)	Peso-HB (-0.5716) IE-Hb (1) IE-Peso (-0.5736)	-----	Peso-Hb (0.8278)
8	IE-Hb (-0.6301)	IE-Hb (0.9998)	IE-Hb (-0.6217)	IE-Hb (-0.962)
10	Peso-Hb (0.7297) IE-Hb (-0.9764) IE-Peso (-0.8601)	-----	-----	IE-Hb (0.7966)
12	IE-Hb (0.9652)	IE-Hb (0.8587)	Peso-Hb (-0.81)	IE-Hb (-0.9571)
15	Peso-Hb (0.9143) IE-Hb (0.8658) IE-Peso (0.9943)	IE-Peso (0.8008)	Peso-Hb (-0.8919)	IE-Hb (-0.8706)
18	Peso-Hb (-0.8669)		Peso-Hb (-0.9582) IE-Hb (0.9958) IE-Peso (-0.9281)	-----
22	IE-Hb (-0.9995)		Peso-Hb (0.8822) IE-Hb (-0.8589) IE-Peso (-0.9989)	-----

Tabla 5. Correlaciones entre los parámetros de patogenia durante la infección con *Plasmodium*. Hb-hemoglobina, IE índice esplénico. Todas las correlaciones de la tabla fueron significantes para $p < 0.05$

Producción de óxido nítrico en la infección con *Plasmodium*.

Dado que el óxido nítrico tiene una función destacada en la eliminación de parásitos intracelulares se decidió evaluar su producción durante la infección con *Plasmodium*, partiendo de la premisa que ésta molécula es esencial en la resolución de la infección. Para ello se determinó la expresión de la enzima sintetizadora de óxido nítrico inducible (iNOS) por RT-PCR, **Gráfica 5**.

Los resultados mostraron que únicamente los ratones inmunes reinfectados con *P. chabaudi* AS y los ratones primoinfectados con *P. chabaudi* AS incrementaron significativamente la expresión de iNOS a partir del día 4. Ahora bien, en los ratones citados tan sólo se obtuvieron diferencias significantes el día 12 de la infección, donde los ratones primoinfectados con *P. chabaudi* AS expresaron más iNOS que los ratones inmunes reinfectados con *P. chabaudi* AS ($p < 0.05$).



Gráfica 5. Expresión de iNOS en la infección con *Plasmodium*. La infección se realizó con 5×10^4 EP, en los días señalados se extrajo el RNA total de bazo y por RT-PCR se analizó la expresión de iNOS en relación a la expresión de β -actina. Cada punto representa el promedio de tres determinaciones ± 1 desviación estándar. * señala las diferencias significativas para $p < 0.05$.

Tomando en consideración que la expresión de iNOS determinada por RT-PCR pudiera no representar la producción de la enzima debido a los mecanismos que regulan la traducción de mRNA y a la supervivencia del mismo en el citoplasma, se procedió a evaluar la producción de óxido nítrico por cuantificación de la concentración de nitritos totales en suero, recordando que los subproductos de degradación estables de esta molécula son los nitritos y los nitratos.

Los ratones que mostraron el mayor incremento en la producción de nitritos al principio de la infección fueron los primoinfectados con *P. chabaudi* AS, en éstos se observó un aumento significativo a partir del día 6 ($p < 0.05$) y desarrollaron una concentración máxima el día 12, $p < 0.05$ (123.55 ± 1.84) **Tabla 6**. Los ratones inmunes re infectados con *P. chabaudi* AS al igual que los anteriores incrementaron la concentración de nitritos el día 6 pero en los días posteriores disminuyeron los niveles, hasta que el día 12 nuevamente aumentaron la generación del metabolito sin que se alcanzará una concentración igual a la obtenida en los ratones primoinfectados. Un hallazgo relevante fue el obtenido en los ratones inmunes re infectados con *P. yoelii* 17XL, pues la concentración de nitritos fue

significativamente mayor ($p < 0.05$) en los días 18 y 22, prácticamente al final de la infección. Por último, en los ratones primoinfectados con *P. yoelii* 17XL la concentración de nitritos como subproducto del óxido nítrico no fue relevante puesto que únicamente en los días 8 y 10 se presentó un aumento significativo ($p < 0.05$) y en los días posteriores se registró una caída en su producción.

Días postinfección	Inmunes, <i>P. yoelii</i> 17XL	Primoinfección con <i>P. yoelii</i> 17XL	Inmunes, <i>P. chabaudi</i> AS	Primoinfección con <i>P. chabaudi</i> AS ++++
0	50.47 ± 4.70	50.47 ± 4.70	50.47 ± 4.70	50.47 ± 4.70
4	54.25 ± 4.41	52.24 ± 2.14	56.31 ± 1.50	58.29 ± 1.73
*6	43.62 ± 3.46	53.85 ± 5.45	65.08 ± 3.74	65.53 ± 2.84
*8	41.19 ± 6.72	59.84 ± 2.12	54.55 ± 0.59	67.99 ± 4.97
*10	41.75 ± 2.4	61.17 ± 2.21	55.07 ± 2.54	69.68 ± 1.20
*12	48.02 ± 4.70	50.90 ± 3.27	66.90 ± 2.83	123.55 ± 1.84
*15	45.67 ± 0.76	53.13 ± 6.79	68.16 ± 3.12	69.63 ± 3.39
*18	118.53 ± 0.84		57.06 ± 1.09	62.06 ± 4.96
*22	117.48 ± 1.82		59.59 ± 1.04	68.41 ± 1.63

Tabla 6. Concentración de nitritos totales en suero durante la infección con *Plasmodium*. Ratones CBA/Ca se inocularon i.v. con 5×10^4 EP del *Plasmodium* indicado y en los días señalados se determinó la concentración de nitritos totales en suero con el reactivo de Griess. Los resultados representan el promedio de tres determinaciones ± 1 desviación estándar, * Indica diferencias significativas para $p < 0.05$ en los ratones inmunes re infectados con *P. yoelii* 17XL con respecto a los otros ratones +++++ Ratones con incremento significativo a partir del día 6.

DETERMINACIÓN DE INOS POR WESTERN BLOT

Para descartar el posible origen endotelial de los nitritos obtenidos se analizó la expresión de la enzima iNOS por medio de la técnica de Western Blot en bazo. Los resultados muestran diferencias únicamente en el día 4 postinfección, en el que la presencia de la enzima sintasa del óxido nítrico fue ligeramente menor, a los demás días de la infección, además la enzima iNOS se expresó de igual forma en todos los grupos de ratones, dado que no se detectaron diferencias entre ellos.

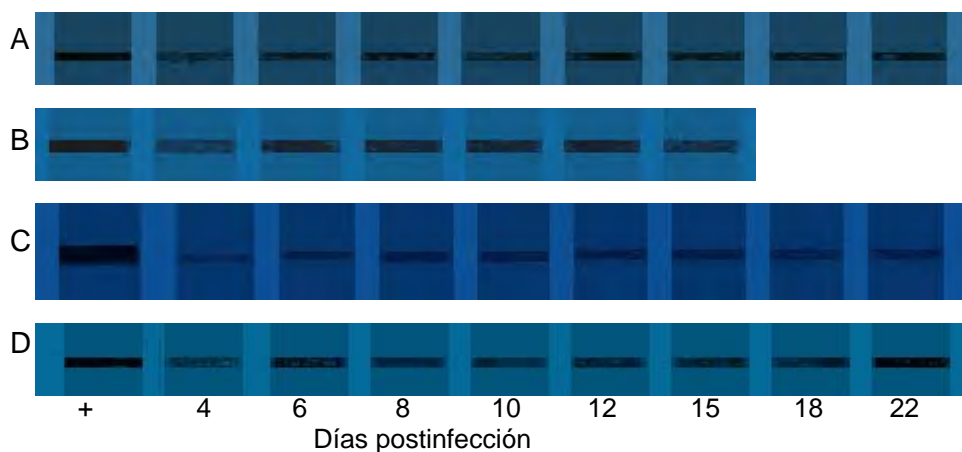
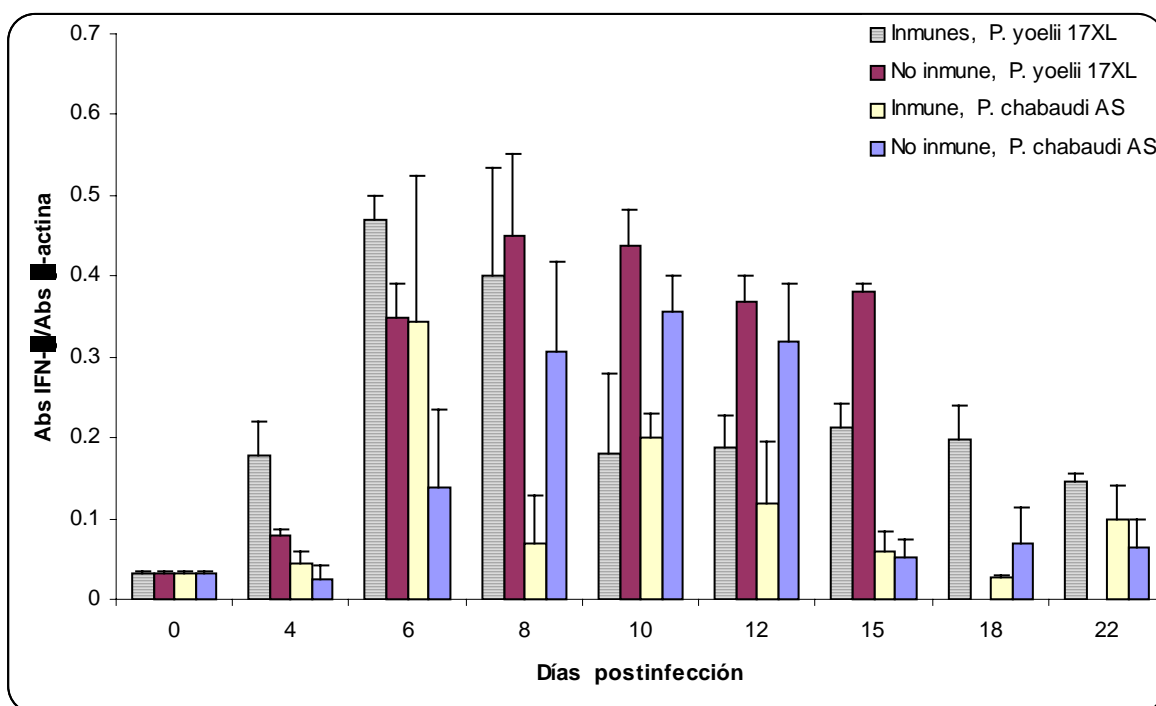


Figura 3. Expresión de iNOS durante la infección con *Plasmodium*. Grupos de 3 ratones CBA/Ca se inocularon i.v. con 5×10^4 EP, en los días señalados se sacrificaron a los ratones y se evaluó la presencia de la proteína en el bazo, utilizando la técnica de Western Blot como se describe en materiales y métodos. La electroforesis para el análisis de iNOS se llevó a cabo con $50 \mu\text{g}$ de proteína total. Las letras indican los diferentes grupos de ratones infectados de la siguiente forma: A) infectados con *P. chabaudi* AS y después de 8 semanas re infectados con *P. yoelii* 17XL, B) infectados por primera vez con *P. yoelii* 17XL, C) infectados con *P. chabaudi* AS y después de 8 semanas re infectados con el mismo y D) infectados por primera vez con *P. chabaudi* AS

Expresión de citocinas proinflamatorias.

Durante el curso de la infección con *Plasmodium* la expresión de IFN- γ tuvo notables diferencias significativas ($p < 0.05$) en todos los grupos de ratones. En los días 4, 6 y 18 postinfección la expresión de esta citocina fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en los ratones inmunes reinfectados con *P. yoelii* 17XL. En el día 8 postinfección la expresión de IFN- γ fue significativamente menor ($p < 0.05$) en los ratones inmunes reinfectados con *P. chabaudi* AS. En los días 10 y 12 postinfección, los ratones que sufrieron por primera vez la infección con *Plasmodium* expresaron significativamente más IFN- γ ($p < 0.05$) que los ratones inmunes. En el día 15 los ratones que mantuvieron significativamente elevada la expresión de IFN- γ ($p < 0.05$) fueron aquellos infectados con *P. yoelii* 17XL (inmunes y primoinfectados) y para el día 18 esta tendencia se repitió, con excepción de los ratones primoinfectados con *P. yoelii* 17XL porque todos perecieron el día 15.



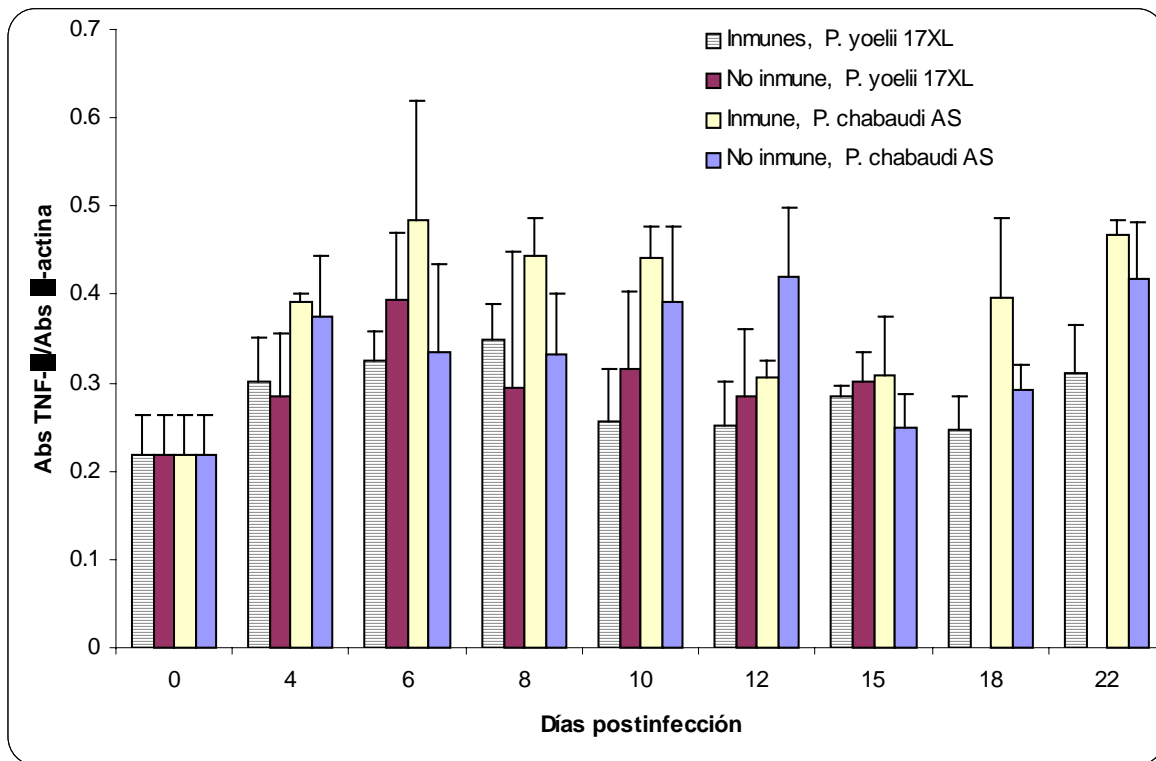
Gráfica 6. Expresión de IFN- γ en la infección con *Plasmodium*. Ratones CBA/Ca se inocularon i.v. con 5×10^4 EP, se realizó la extracción de RNA a partir de bazo y se determinó la expresión de IFN- γ por RT-PCR en relación a la expresión de β -actina. Los resultados representan el promedio de tres determinaciones ± 1 desviación estándar. * indica diferencias significativas para $p < 0.05$.

En el curso de la infección, la expresión de IL-12 aumentó de igual forma en todos los grupos de ratones, excepto el día 8, donde los ratones inmunes reinfectedados con *P. yoelii* 17XL expresaron más IL-12 que los ratones primoinfectados con *P. yoelii* 17XL ó los ratones inmunes reinfectedados con *P. chabaudi* AS ($p < 0.05$) **Tabla 7.**

Días postinfección	Inmunes, <i>P. yoelii</i> 17XL	Primoinfección con <i>P. yoelii</i> 17XL	Inmunes, <i>P. chabaudi</i> AS	Primoinfección con <i>P. chabaudi</i> AS
0	0.052 ± 0.002	0.052 ± 0.002	0.052 ± 0.002	0.052 ± 0.002
4	0.093 ± 0.074	0.133 ± 0.032	0.063 ± 0.018	0.091 ± 0.037
6	0.158 ± 0.075	0.194 ± 0.077	0.061 ± 0.079	0.102 ± 0.043
*8	0.205 ± 0.060	0.114 ± 0.028	0.115 ± 0.024	0.130 ± 0.027
10	0.151 ± 0.072	0.174 ± 0.043	0.107 ± 0.055	0.144 ± 0.015
12	0.136 ± 0.037	0.124 ± 0.122	0.082 ± 0.070	0.167 ± 0.030
15	0.162 ± 0.078	0.129 ± 0.034	0.114 ± 0.094	0.066 ± 0.020
18	0.095 ± 0.052		0.112 ± 0.082	0.056 ± 0.024
22	0.121 ± 0.030		0.192 ± 0.089	0.128 ± 0.038

Tabla 7. Expresión de IL-12 en la infección con *Plasmodium*. La infección se efectuó con 5×10^4 EP, en los días marcados se realizó la extracción de RNA a partir de bazo y se analizó la expresión de IL-12 por RT-PCR en relación a la expresión de β -actina. Los resultados se presentan como el promedio de tres determinaciones ± 1 desviación estándar, * señala diferencias significantes para $p < 0.05$.

El incremento en la expresión del TNF- α durante el curso de la infección fue igual para los siguientes grupos de ratones: inmunes reinfectedados con *P. yoelii* 17XL, primoinfectados con *P. yoelii* 17XL y primoinfectados con *P. chabaudi* AS ($p > 0.05$). En relación a la expresión del TNF- α entre los ratones inmunizados, se obtuvo un mayor incremento en los ratones reinfectedados con *P. chabaudi* AS que en aquellos reinfectedados con *P. yoelii* 17XL en los días 4, 10, 18 y 22 ($p < 0.05$) **Gráfica 7.**



Gráfica 7. Expresión de TNF- α en la infección con *Plasmodium*. Ratones CBA/Ca se inocularon i.v. con 5×10^4 EP, se realizó la extracción de RNA a partir de bazo y se determinó la expresión de TNF- α por RT-PCR en relación a la expresión de β -actina. Los resultados se presentaron como el promedio de tres determinaciones ± 1 desviación estándar. * indica diferencias significativas para $p < 0.05$ entre los ratones inmunes.

Expresión de citocinas inmunorreguladoras.

La expresión para TGF- β incrementó en la misma magnitud en todos los grupos de ratones ($p > 0.05$), **Tabla 8**.

En todos los grupos de ratones se incrementó la expresión de IL-4, pero ésta fue significativamente mayor en los ratones primoinfectados con *P. chabaudi* AS el día 10, sin embargo el día 15 éstos últimos expresaron menos IL-4 que los ratones inmunes reinfectados con *P. yoelii* 17XL ($p < 0.05$) **Tabla 9**.

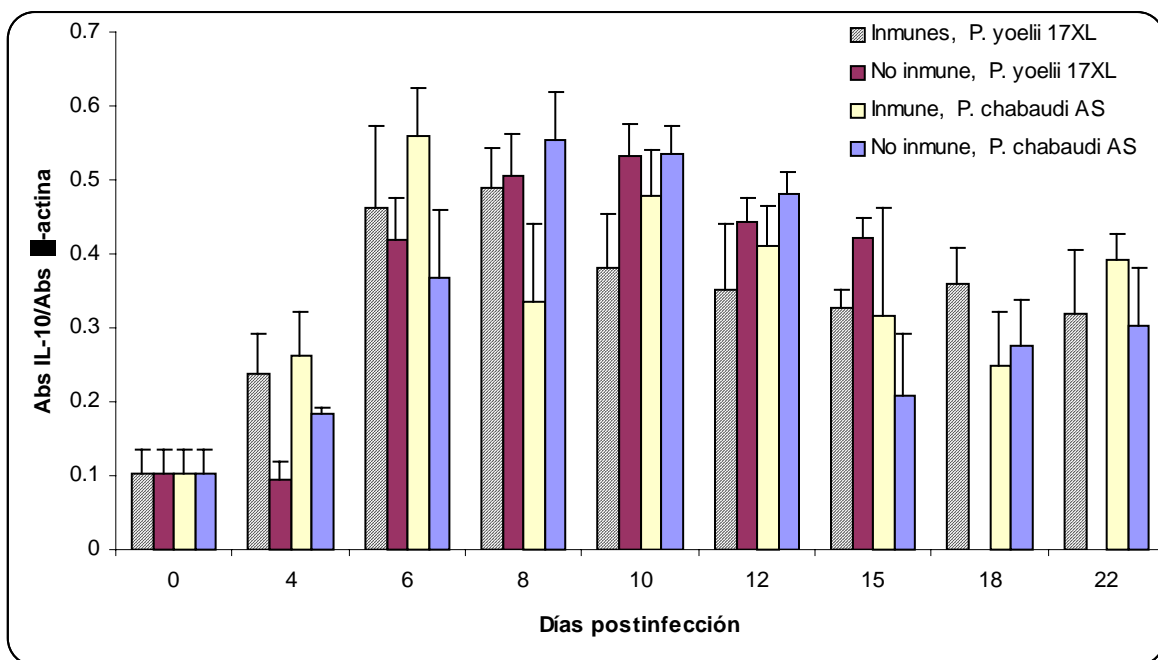
Días postinfección	Inmunes, <i>P. yoelii</i> 17XL	<i>P. yoelii</i> 17XL	Inmunes, <i>P. chabaudi</i> AS	<i>P. chabaudi</i> AS
0	0.590 ± 0.004	0.590 ± 0.004	0.590 ± 0.004	0.590 ± 0.004
4	0.711 ± 0.033	0.749 ± 0.050	0.672 ± 0.044	0.747 ± 0.123
6	0.663 ± 0.078	0.685 ± 0.030	0.658 ± 0.028	0.735 ± 0.048
8	0.667 ± 0.049	0.662 ± 0.051	0.672 ± 0.010	0.716 ± 0.060
10	0.636 ± 0.040	0.616 ± 0.048	0.668 ± 0.026	0.681 ± 0.085
12	0.664 ± 0.054	0.669 ± 0.018	0.691 ± 0.031	0.674 ± 0.026
15	0.652 ± 0.043	0.678 ± 0.028	0.670 ± 0.033	0.703 ± 0.057
18	0.655 ± 0.020		0.659 ± 0.037	0.709 ± 0.034
22	0.671 ± 0.030		0.671 ± 0.023	0.742 ± 0.093

Tabla 8. Expresión de TGF-β en la infección con *Plasmodium*. Ratones CBA/Ca se inocularon con 5×10^4 EP, en los días marcados se realizó la extracción de RNA a partir de bazo y se analizó la expresión de TGF-β por RT-PCR en relación a la expresión de β-actina. Los resultados se representan el promedio de tres determinaciones ± 1 desviación estándar, no hubo diferencias significativas en el aumento de la expresión.

Días postinfección	Inmunes, <i>P. yoelii</i> 17XL	<i>P. yoelii</i> 17XL	Inmunes, <i>P. chabaudi</i> AS	<i>P. chabaudi</i> AS
0	0.070 ± 0.006	0.070 ± 0.006	0.070 ± 0.006	0.070 ± 0.006
4	0.043 ± 0.001	0.038 ± 0.001	0.052 ± 0.024	0.076 ± 0.015
6	0.121 ± 0.120	0.085 ± 0.029	0.076 ± 0.106	0.102 ± 0.009
8	0.163 ± 0.043	0.056 ± 0.060	0.125 ± 0.002	0.124 ± 0.118
*10	0.122 ± 0.047	0.129 ± 0.137	0.215 ± 0.061	0.327 ± 0.031
12	0.088 ± 0.037	0.181 ± 0.045	0.128 ± 0.115	0.195 ± 0.083
*15	0.142 ± 0.018	0.126 ± 0.070	0.102 ± 0.103	0.049 ± 0.018
18	0.112 ± 0.028		0.121 ± 0.060	0.096 ± 0.025
22	0.132 ± 0.049		0.181 ± 0.152	0.128 ± 0.038

Tabla 9. Expresión de IL-4 en la infección con *Plasmodium*. Ratones CBA/Ca se inocularon con 5×10^4 EP, se realizó la extracción de RNA a partir de bazo y se analizó la expresión de IL-4 por RT-PCR en relación a la expresión de β-actina. Los resultados representan el promedio de tres determinaciones ± 1 desviación estándar. Las diferencias significativas son señaladas con *

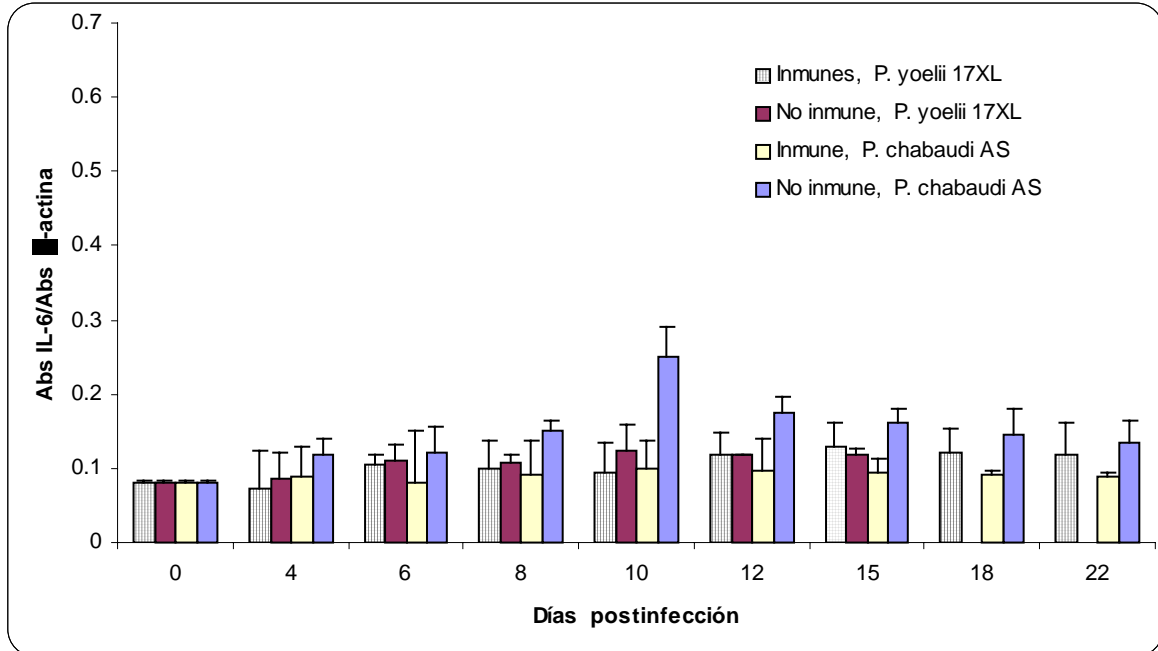
En relación a la IL-10 los ratones inmunes registraron una expresión significativamente mayor ($p < 0.05$) que los ratones infectados por primera vez en el día 4 (**Gráfica 8**). En el día 8 los ratones inmunes re infectados con el parásito homólogo expresaron significativamente menos IL-10 ($p < 0.05$) que los ratones primoinfectados con *P. chabaudi* AS. En el día 15 la expresión de IL-10 en los ratones primoinfectados con *P. yoelii* 17XL fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que en los ratones inmunes re infectados con *P. yoelii* 17XL y que en los ratones infectados por primera vez con *P. chabaudi* AS.



Gráfica 8. Expresión de IL-10 en la infección con *Plasmodium*. Ratones CBA/Ca se infectaron i.v. con 5×10^4 EP, se realizó la extracción de RNA a partir de bazo y se determinó la expresión de IL-10 por RT-PCR en relación a la expresión de β -actina. Los resultados muestran el promedio de tres determinaciones ± 1 desviación estándar. * indica diferencias significativas para $p < 0.05$.

La expresión de IL-6 fue significativamente más elevada en los ratones primoinfectados con *P. chabaudi* AS en los días 10 y 12 (**Gráfica 9**). En los días 8 y 15 la expresión de IL-6 en estos ratones sólo fue significativamente mayor a la obtenida en los ratones primoinfectados con *P. yoelii* 17XL. Es importante destacar que la expresión de IL-6 en los ratones inmunes re infectados con el parásito homólogo no tuvo un aumento relevante,

dato que no se obtuvieron diferencias significativas con la expresión basal, es decir en ratones sin infección.



Gráfica 9. Expresión de IL-6 en la infección con *Plasmodium*. Ratones CBA/Ca se inocularon con 5×10^4 EP y en el curso de la infección se realizó la extracción de RNA a partir del bazo para analizar la expresión de IL-6 por RT-PCR. Los resultados muestran el promedio de tres determinaciones ± 1 desviación estándar. Las diferencias significativas son señaladas con *.

Correlación entre la producción de óxido nítrico y la expresión de citocinas.

En los ratones inmunes re infectados con *P. yoelii* 17XL la expresión de iNOS correlacionó significativamente ($p < 0.05$) con la determinación de nitritos totales en suero los días 4 y 10, con este hallazgo se podría especular que la expresión de iNOS tiene un efecto en la producción de NO en los días citados, sin embargo al analizar los coeficientes de correlación entre la concentración de nitritos y la expresión de citocinas en los días 4 y 10 se encontró que con algunas de ellas no hubo diferencia significativa, por lo que se analizaron las correlaciones en el curso de la infección de forma independiente, es decir: expresión de iNOS – expresión de citocinas y concentración de nitritos – expresión de citocinas; con ello se obtuvo que los días para los cuales las citocinas se correlacionaron

significativamente ($p < 0.05$) con iNOS difirieron cuando la correlación fue significativa ($p < 0.05$) con la concentración de nitritos **Tablas 10 y 11**.

Citocinas	Días postinfección							
	4	6	8	10	12	15	18	22
Nitritos	0.920			1.000				
IFN- γ	0.971			0.984	-0.911		0.989	-0.638
IL-12	0.999	0.950				0.989	0.998	
TNF- α		0.969				-0.991		
TGF- β			0.979					
IL-4	0.831			0.977				
IL-10	0.997	0.957		0.993		1.000		
IL-6			0.957	0.944	0.973			

Tabla 10. Coeficientes de correlación r entre la expresión de iNOS y la expresión de citocinas en ratones inmunes a *P. chabaudi* AS re infectados con *P. yoelii* 17XL. Todos los valores reportados fueron significativos para $p < 0.05$.

La correlación significativa ($p < 0.05$) para iNOS con IFN- γ fue en los días 4, 10, 12, 18 y 22; con IL-12 se detectó en los días 4, 6, 15, y 18; con TNF- α se destacó los días 6 y 15. Con las citocinas inmunorreguladoras TGF- β , IL-4, IL-10 e IL-6 se obtuvo una correlación positiva que concuerda con los días en que la expresión de iNOS se correlacionó con las citocinas proinflamatorias (**Tabla 10**). Es importante mencionar que la correlación positiva de iNOS con IL-10 se registró en los días 4, 6, 10 y 15 a diferencia de la obtenida con TNF- α , que tan sólo fue el día 6 y cuya correlación se esperaría fuese en mayor tiempo pues es uno de los factores influyentes para la producción de óxido nítrico por iNOS. La correlación significativa ($p < 0.05$) entre la concentración de nitritos e IFN- γ correspondió a los días 4, 6, 8, 10 y 15; con IL-12 se distinguió los días 4, 8 y 22; con TNF- α tan sólo el día 12 y la correlación fue negativa. Al parecer con las citocinas inmunorreguladoras hubo mayor correlación significativa ($p < 0.05$) que con las citocinas proinflamatorias **Tabla 11**, pues con TGF- β se detectó en los días 6, 12 y 15; con IL-4 en los días 4, 8, 10 y 15; con IL-10 los días 4, 8, 10 y 18; con IL-6 el día 10.

Citocinas	Días postinfección							
	4	6	8	10	12	15	18	22
IFN- γ	0.799	-0.975	0.985	0.989		0.767		
IL-12	0.899		0.875					-0.934
TNF- α					-0.980			
TGF- β		0.958			0.751	0.994		
IL-4	0.982	-0.689	0.956	0.983	-1.000	0.984		
IL-10	0.886		0.900	0.989	-0.999		0.850	
IL-6				0.933				

Tabla 11. Coeficientes de correlación r entre la concentración de nitritos y la expresión de citocinas en ratones inmunes con *P. chabaudi* AS reinfectedos con *P. yoelii* 17XL. Sólo se reportaron los valores de r significativos para $p < 0.05$.

En los ratones primoinfectados con *P. yoelii* 17XL la correlación entre la expresión de iNOS y la concentración de nitritos sólo fue significativa ($p < 0.05$) y positiva el día 15 de la infección, **Tabla 12**. Sin embargo la correlación significativa ($p < 0.05$) de iNOS con las citocinas proinflamatorias se observó en los días 4, 8, 10 y 15; con las citocinas inmunorreguladoras hubo correlación significativa ($p < 0.05$) en los días 4, 8, 10, 12 y 15 pero se detectó una mayor correlación significativa ($p < 0.05$) y negativa que en los ratones inmunes reinfectedos con *P. yoelii* 17XL **Tabla 12**. La concentración de nitritos y las citocinas proinflamatorias tuvieron correlación significativa ($p < 0.05$) los días 8 y 15 **Tabla 13**, con las citocinas inmunorreguladoras existió correlación positiva y significativa ($p < 0.05$) en los días 4, 6, 8 y 15 **Tabla 13**.

Citocinas	Días postinfección					
	4	6	8	10	12	15
Nitritos	-0.834	-0.996				0.670
IFN- γ			1.000	1.000		1.000
IL-12				0.976		0.691
TNF- α	0.799					
TGF- β	-0.994	-0.914	-0.787	-0.992		
IL-4			0.984	0.976	0.994	0.994
IL-10	0.882		0.997		-0.799	
IL-6					-0.985	

Tabla 12. Coeficientes de correlación r para la expresión de iNOS y la expresión de citocinas durante la primoinfección con *P. yoelii* 17XL. Los valores que se reportaron fueron significativos para $p < 0.05$.

Citocinas	Días postinfección					
	4	6	8	10	12	15
IFN- γ						0.624
IL-12			-0.951		-0.995	1.000
TNF- α	-0.998		0.987			
TGF- β	0.890	0.946			-0.999	
IL-4						0.702
IL-10	-0.996					
IL-6			0.991			

Tabla 13. Coeficientes de correlación r para la concentración de nitritos y la expresión de citocinas en ratones primoinfectados con *P. yoelii* 17XL. Únicamente se reportaron los valores significativos para $p < 0.05$.

Durante la reinfección con *P. chabaudi* AS la única correlación significativa ($p < 0.05$) de la expresión de iNOS con la concentración de nitritos se obtuvo el día 6 de la infección **Tabla 14**, pero no existió correlación significativa ($p < 0.05$) entre la concentración de nitritos y la expresión de citocinas en este día (**Tabla 15**), de hecho la expresión de iNOS tampoco se correlacionó significativamente ($p < 0.05$) con alguna de las citocinas (**Tabla 14**).

En relación a las citocinas proinflamatorias la expresión de iNOS tuvo una correlación significativa ($p < 0.05$) y positiva únicamente con TNF- α en los días 10, 15, 18 y 22; mientras que con las citocinas inmunorreguladoras se encontró que TGF- β e IL-10 correlacionaron significativamente ($p < 0.05$) con la expresión de iNOS de manera positiva en los días 10, 18 y 4, 15 respectivamente (**Tabla 14**).

La concentración de nitritos presentó correlación significativa ($p < 0.05$) positiva con IFN- γ el día 4, con IL-12 los días 8 y 15; en cambio con TNF- α no hubo correlación significativa ($p > 0.05$); con las citocinas inmunorreguladoras las correlaciones significativas ($p < 0.05$) se notaron con TGF- β el día 22, IL-10 el día 12 e IL-6 el día 8 (**Tabla 15**).

Por último, en la primoinfección con *P. chabaudi* AS el único día que existió correlación positiva entre la expresión de iNOS y la concentración de nitritos totales en suero fue el día 22, pero la expresión de iNOS correlacionó positivamente y de forma significativa ($p < 0.05$) con las citocinas proinflamatorias entre los días 4, 6, 15 y 22; mientras con las citocinas inmunorreguladoras la correlación se obtuvo entre los días 4, 6, 8, 10, 15 y 22

Tabla 16. La correlación positiva y significativa ($p < 0.05$) de la concentración de nitritos con las citocinas proinflamatorias fue en los días 6, 8, 12, 18 y 22; con las citocinas inmunorreguladoras ésta se observó en los días 4, 12 y 22 **Tabla 17.**

Citocinas	Días postinfección							
	4	6	8	10	12	15	18	22
Nitritos		0.820						
IFN- γ					-0.685		-0.980	
IL-12							-0.913	
TNF- α				0.970		0.815	0.996	0.920
TGF- β				0.993		-0.842	0.967	
IL-4				-0.890	-0.765		-0.875	
IL-10	0.955					0.999		
IL-6					-0.680			

Tabla 14. Coeficientes de correlación r para la expresión de iNOS y la expresión de citocinas en ratones inmunes re infectados con *P. chabaudi* AS. Todos los valores reportados fueron significativos para $p < 0.05$.

Citocinas	Días postinfección							
	4	6	8	10	12	15	18	22
IFN- γ	0.993			-0.904		-0.643		-0.880
IL-12			0.997			0.997		
TNF- α								
TGF- β					-0.714			0.999
IL-4	-0.841							
IL-10					0.713			
IL-6	-0.931		0.981					

Tabla 15. Coeficientes de correlación r para la concentración de nitritos y la expresión de citocinas en ratones inmunes re infectados con *P. chabaudi* AS. Los valores fueron significativos para $p < 0.05$.

Citocinas	Días postinfección							
	4	6	8	10	12	15	18	22
Nitritos							-0.796	0.996
IFN- γ	0.830					0.965		
IL-12	0.999	0.925		-0.994		1.000		
TNF- α	-0.944					0.949	-0.815	1.000
TGF- β	0.861					-0.975		0.976
IL-4		-0.973						-0.963
IL-10				0.949		0.982		
IL-6	0.996	0.980	0.929	0.991		0.954		0.753

Tabla 16. Coeficientes de correlación r para la expresión de iNOS y la expresión de citocinas en ratones primoinfectados con *P. chabaudi* AS. Los valores reportados fueron significativos para $p < 0.05$.

Citocinas	Días postinfección							
	4	6	8	10	12	15	18	22
IFN- γ		0.967	-0.997	-0.999	0.987			
IL-12			0.869					
TNF- α		0.814	-0.813	-0.932	0.980		1.000	0.998
TGF- β					-0.975			0.992
IL-4	0.988		-0.972		0.926			-0.983
IL-10								0.809
IL-6								

Tabla 17. Coeficientes de correlación r entre la concentración de nitritos y la expresión de citocinas en ratones primoinfectados con *P. chabaudi* AS. Los valores de la tabla fueron significativos para $p < 0.05$.

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Ante la deficiencia en el entendimiento de los mecanismos involucrados para desarrollar inmunidad permanente contra las cepas letales de *Plasmodium*, el presente trabajo se realizó con la finalidad de analizar una posible correlación entre la producción de óxido nítrico y la expresión de citocinas como factores determinantes en la respuesta inmune contra *P. yoelli* 17XL en ratones que habían sufrido una infección previa con *P. chabaudi* AS.

De inicio, se apreció que la infección de los ratones con un parásito no letal (*P. chabaudi* AS) confirió protección a una exposición subsiguiente con un *Plasmodium* letal (*P. yoelli* 17XL), lo anterior se detectó como una disminución del número de parásitos en sangre que condujo a la sobrevivencia de los ratones, sin embargo los mecanismos de protección son un debate ya que por un lado se ha citado la existencia de anticuerpos con reactividad cruzada entre especies de *Plasmodium* (Holder *et al.* 1983; Ray *et al.* 1994) sin embargo se requiere de la cuantificación de anticuerpos específicos para cada cepa para probarlo y por otra parte existen las células T de memoria reactivas contra malaria que responden a un espectro amplio de antígenos (incluyendo otros parásitos) para incrementar la respuesta proinflamatoria. Durante la primoinfección con *P. yoelli* 17XL no hubo sobrevivientes, en tanto que los ratones inmunes re infectados con el parásito homólogo tuvieron una protección del 100% dado que resolvieron las parasitemias en un periodo corto y las parasitemias fueron significativamente menores al resto de los ratones control (**Gráfica 2**), esta protección se debió a una respuesta de memoria mediada por anticuerpos que se generaron durante la primera infección. En los ratones infectados por primera vez con *P. chabaudi* AS a pesar de que desarrollaron parasitemias mayores que los ratones inmunes re infectados con el parásito heterólogo, durante la fase tardía de la infección lograron eliminar al parásito al mismo tiempo, este incremento de la parasitemia podría ser el resultado de que se requiere mayor tiempo para iniciar una respuesta en una infección primaria puesto que se necesita la activación de los mecanismos celulares para el reconocimiento antigénico, mientras que en una segunda infección los mecanismos de respuesta inmune ya están activados y se cuenta con una respuesta de memoria más eficiente comparado con la inmunidad innata que es con la que el parásito interactúa al principio.

Dado que los ratones inmunes re infectados con *P. yoelii* 17XL presentaron parasitemias iguales a los ratones que perecieron, por lo menos hasta el día 10 de la infección (**Gráfica 2**) se consideró primordial evaluar los parámetros de patogenicidad para detectar las posibles diferencias que explicaran este suceso. En estudios previos enfocados en el desarrollo de anemia severa por malaria (Hb < 5.0 g/dL) la correlacionaron fuertemente con el porcentaje de parasitemia y la consideraron la complicación más común en la infección con *P. falciparum*, lo que conduce a un índice elevado de mortalidad en África antecedido por malaria cerebral (Biamba *et al.* 2000; Newton *et al.* 1998; World Health Organization 1990).

Sorprendentemente, la anemia que desarrollaron los ratones inmunes re infectados con *P. yoelii* 17XL fue igual a la de los ratones infectados por primera vez con *P. yoelii* 17XL o con *P. chabaudi* AS hasta el día 12 de la infección. Únicamente los ratones re infectados con el parásito homólogo (*P. chabaudi* AS) no desarrollaron anemia (**Gráfica 3**), de hecho mantuvieron sus niveles basales de hemoglobina durante el curso de la infección.

Por lo menos hasta el día en que sobrevivieron los ratones primoinfectados con *P. yoelii* 17XL la concentración de hemoglobina fue baja al igual que en los ratones primoinfectados con *P. chabaudi* AS, no obstante éstos últimos lograron reestablecerse de la anemia a medida que se recuperaron de la infección. Con estos resultados se sugiere que la muerte de los ratones primoinfectados con *P. yoelii* 17XL pudo deberse a la persistencia en los niveles bajos de hemoglobina y a los mecanismos propios del parásito para evadir la respuesta inmune entre los cuales están: la formación de rosetas y la citoadherencia al endotelio así como a las reacciones de hemólisis y fagocitosis de eritrocitos parasitados y no parasitados por el sistema reticuloendotelial del bazo. La concentración de hemoglobina presentó una estrecha correlación negativa con la concentración de parásitos en sangre, es decir a medida que la parasitemia aumenta, los niveles de hemoglobina disminuyen y es lógico pues si aumenta el número de eritrocitos parasitados también aumenta el número de eritrocitos destruidos. Si a lo anterior se adiciona que el parásito digiere el 75% de hemoglobina del eritrocito (Allen & Kirk 2004; Francis *et al.* 1997) el grado de anemia aún aumenta pues el producto de degradación es el pigmento hemozoína.

Inicialmente se planteó que los ratones primoinfectados con *P. yoelii 17XL* disminuirían en mayor porcentaje su peso corporal, pues Cross & Langhorne 1998 encontraron que al existir susceptibilidad a un parásito de malaria, el peso corporal se ve notablemente afectado aunque haya disminuido el pico de parasitemia. En el curso de la infección no se observaron diferencias significativas en la pérdida de peso corporal entre los diferentes grupos de ratones (**Tabla 3**) por lo menos hasta el día 12; éstas se visualizaron a partir del día 15 y fue interesante detectar que los ratones infectados con *P. yoelii 17XL* (inmunes y primoinfectados) perdieron peso en la misma magnitud, a pesar de que los inmunes ya estaban controlando la parasitemia (**Gráfica 2**) mientras que los ratones infectados por primera vez, continuaron incrementando la parasitemia y perecieron. Por lo tanto, es evidente que en el modelo experimental de malaria que utilizamos, la pérdida de peso no estuvo asociado con la mortandad en los ratones, sin embargo, dependiendo de las características del reto en la segunda infección este parámetro de patogenia puede variar como se pudo apreciar en el caso del reto homólogo donde la pérdida de peso no se modificó, a diferencia de los ratones inmunes re infectados con el parásito heterólogo quienes perdieron peso de igual forma que los ratones infectados por primera vez con *P. yoelii 17XL* o con *P. chabaudi AS*. Por lo tanto, en esta cepa de ratones la primera infección con *P. chabaudi AS*, generó una protección sólida para el reto homólogo, puesto que la parasitemia fue significativamente menor además de que al menos en los parámetros evaluados, la reinfección resultó prácticamente asintomática de forma similar a lo que ocurre en los niños y adultos que están expuestos constantemente a malaria en áreas endémicas y desarrollan inmunidad sólida después de varias exposiciones lo que se denomina “tolerancia” a malaria, que ha correlacionado con la presencia de anticuerpos anti-GPI (glicosilfosfatidilinositol) (Boutlis *et al.* 2002) y al incremento en la producción de óxido nítrico (Boutlis *et al.* 2003); sin embargo existen reportes que informan que la protección también se podría asociar a una respuesta de memoria favorecida por la interacción del TNF- α con su receptor p55 (p55R) durante la primoinfección con *P. chabaudi AS* (Li & Langhorne, 2000). Aunque las correlaciones existentes entre el peso corporal y las parasitemias no fueron significativas, se considera que existe una correlación inversa entre ambos factores dado que los valores de r (coeficiente de correlación) fueron negativos y elevados.

El bazo tiene un papel primordial en la eliminación de patógenos de la circulación por su capacidad de filtración/aclaración que presentan sus diferentes compartimentos (pulpa blanca, zona marginal y pulpa roja) con células y microarquitectura específicas (Aichele *et al.* 2003; Nolte *et al.* 2004; Yadava *et al.* 1996). En el caso de malaria se ha demostrado que este órgano es esencial para resolver la infección, pues los ratones con esplenectomía son incapaces de controlar y eliminar el parásito de *Plasmodium* (Quinn & Wyler, 1980; Sayles *et al.* 1993; Yap & Stevenson, 1994). Incluso se ha demostrado que el bazo es importante en la eliminación de eritrocitos con el *Plasmodium* muerto dado que pacientes carentes de él mantienen en circulación los eritrocitos con el parásito muerto por meses aún después de recibir el tratamiento (Chotivanich *et al.* 2002). Por ello se analizó el crecimiento del bazo durante la infección *Plasmodium*, de hecho las determinaciones subsiguientes se realizaron en este órgano para comprender mejor los posibles mecanismos de inmunidad que se activan tanto en la fase aguda o precrisis (parasitemia en aumento) como en la fase crónica o crisis (caída de la parasitemia). Los resultados indican que en los ratones inmunes a *P. chabaudi* AS que se re infectaron con *P. yoelii* 17XL hubo un crecimiento del bazo mayor que en el resto de los ratones (**Gráfica 4**), cabe destacar que a diferencia de los ratones primoinfectados con *P. yoelii* 17XL el crecimiento del bazo comenzó a registrarse durante la fase aguda y tal vez por eso lograron controlar las parasitemias; sin embargo este crecimiento pudiera considerarse temprano o precoz ya que ni los ratones infectados con el parásito homólogo ni los ratones primoinfectados con el parásito no letal presentaron un crecimiento prominente del bazo en esa fase y pudiera atribuirse a la previa exposición al *P. chabaudi* AS que a pesar de tener características genéticas y antigénicas diferentes, tal vez ambos parásitos presentan la molécula de anclaje GPI que estimula a macrófagos para producir citocinas (Zhu *et al.* 2005), además la misma molécula se ha asociado con “tolerancia” a malaria en regiones endémicas (Boutlis *et al.* 2002) y probablemente también estimula la hiper celularidad constituida por macrófagos (Gross *et a.* 1988), activación policlonal de células B, células TCD4⁺, células $\alpha\beta$ TCR (Helmbly *et al.* 2000) y células dendríticas (Leisewitz *et al.* 2004).

Nuestros resultados sugieren que en la primoinfección con el *Plasmodium yoelii* 17XL no se estimuló el crecimiento del bazo y debido a la insuficiencia de células de la respuesta inmune (linfocitos T, linfocitos B, macrófagos, células dendríticas) los ratones fueron incapaces de controlar la infección y perecieron (**Gráfica 4**). Como el tamaño del bazo en los ratones primoinfectados con *P. yoelii* 17XL fue similar al de los ratones

primoinfectados con *P. chabaudi* AS, se propone que además de la hipercelularidad en el bazo para resolver la infección se requieren mecanismos adicionales como la producción de anticuerpos, activación del complemento y la funcionalidad eficiente de células dendríticas y polimorfonucleares para que el sistema inmune actúe de manera efectiva y elimine al *Plasmodium*.

Los ratones inmunes re infectados con el parásito homólogo fueron los primeros en reestablecer el tamaño del bazo, que en nuestros experimentos medimos como índice esplénico (**Gráfica 4**), al mismo tiempo que eliminaron completamente la parasitemia. Una probable explicación es que como el sistema inmune no puede permanecer activado cuando ya se eliminó al estímulo antigénico, las células que ya no se requerían podrían haberse eliminado por apoptosis, para de esta forma recuperar la homeostasis.

El bazo es un órgano importante durante la fase aguda de la infección en los ratones inmunes a *P. chabaudi* AS y re infectados con *P. yoelii* 17XL ya que los coeficientes de correlación entre el índice esplénico y la parasitemia fueron significativos en los días 6 y 8, aunque también se puede considerar el día 10 porque tiene un coeficiente de correlación muy alto ($r=0.91$) a pesar de no ser significativo, estos resultados indican de que a medida que la parasitemia aumentó se estimuló el crecimiento del bazo. Por último, se detectó una fuerte correlación negativa entre la concentración de hemoglobina y el índice esplénico en los ratones inmunes re infectados con *P. yoelii* 17XL y en los ratones primoinfectados con *P. chabaudi* AS (**Tabla 5**) este resultado es lógico, puesto que a medida que la parasitemia aumenta existe mayor actividad en el bazo para eliminar a los eritrocitos infectados. Sin embargo en los ratones primoinfectados con *P. yoelii* 17XL la parasitemia se incrementó súbitamente, por lo que es probable que los mecanismos de eliminación del parásito no sean suficientes o no sean los mismos dado que no hubo correlación negativa entre la concentración de hemoglobina y el índice esplénico y probablemente la anemia podría tener otras explicaciones posibles, por ejemplo podría ser la consecuencia de que los antígenos solubles del parásito se fijan a las membranas de eritrocitos sanos y al pasar por el sistema reticuloendotelial se eliminan de la misma forma que los eritrocitos parasitados (Waitumbi *et al.* 2000).

El óxido nítrico se ha asociado con la eliminación de diversos patógenos entre los que se incluyen bacterias, hongos, parásitos (Lowenstein *et al.* 1994, Nathan 1997) y virus (Reiss & Komatsu 1998). El papel que juega el óxido nítrico en malaria es una controversia, existen reportes en donde no le atribuyen un efecto protector (Guillman *et al.* 2004, van der Hiede *et al.* 2000) pero otras investigaciones lo consideran importante en la eliminación del *Plasmodium* (Taylor-Robinson *et al.* 1996, Taylor-Robinson & Smith 1999).

En pacientes semiinmunes o residentes en zonas endémicas de malaria se ha demostrado que un aumento en la expresión de iNOS contribuye a la protección contra *Plasmodium falciparum* (Boutlis *et al.* 2003, Chiwakata 2000, Kun *et al.* 2001). En este trabajo se planteó que el óxido nítrico pudiera favorecer la eliminación de *P. yoelii* 17XL en ratones que ya habían sufrido una infección previa con *Plasmodium chabaudi* AS, además de participar en la regulación de la respuesta inmune contra *Plasmodium*. Para detectar la presencia de esta molécula se analizó la expresión del transcrito de iNOS por RT-PCR y la expresión de la enzima por Western Blot en bazo, dado que es el órgano con hiperactividad durante la infección asociado con la eliminación del parásito (Alves *et al.* 1996, Leisewitz *et al.* 2004), además, como el óxido nítrico es una molécula inestable se decidió determinar la concentración de los metabolitos estables del óxido nítrico (nitritos y nitratos) en suero de los ratones infectados utilizando la reacción de Griess.

En los ratones infectados con *P. yoelii* 17XL (inmunes o infectados por primera vez) la expresión del transcrito de iNOS durante el curso de la infección no fue significativa, por el contrario en los ratones infectados con *P. chabaudi* AS (inmunes o primoinfectados) se observaron diferencias significativas el día 12, precisamente cuando los ratones primoinfectados con *P. chabaudi* AS presentaron el pico de parasitemia y la expresión de iNOS fue mayor al resto de los demás grupos de ratones (**Gráfica 5**). Este resultado, sugiere que no existe un incremento de óxido nítrico en los ratones infectados con *P. yoelii* 17XL, pero podría explicarse por lo siguiente: el óxido nítrico es una molécula cuya expresión está sumamente controlada, además su concentración no se mantiene elevada durante largos periodos de tiempo dada su actividad tóxica y reguladora, por lo que existe la posibilidad de que el intervalo de tiempo que utilizamos (dos días) sea demasiado espaciado, para ello sería importante evaluar la expresión diariamente y además en el día pico a diferentes horas, otra posibilidad es que el parásito posea características específicas que pudieran favorecer la producción de TGF- β para inhibir la expresión y

estabilidad del transcrito (Pellacani *et al.* 2001) puesto que la expresión de la enzima que se evaluó por Western Blot aumentó de igual forma para todos los ratones a partir del día 6 post-infección **Figura 3**.

Considerando que probablemente el transcrito de iNOS fue inestable se decidió evaluar la concentración de nitritos totales en suero como productos finales del óxido nítrico **Tabla 6**. La concentración de óxido nítrico se incrementó únicamente en dos grupos de ratones: en el grupo infectado por primera vez con *P. chabaudi* AS y ese incremento coincidió con el pico en la parasitemia y la posterior eliminación del parásito. El otro grupo en donde se detectaron incrementos en la concentración de óxido nítrico fue el de ratones que sufrieron una infección con *P. chabaudi* AS y se re infectaron con *P. yoelii* 17XL el incremento de nitritos totales se presentó durante los días 18 y 22 justo cuando se inició el control de la parasitemia. Este hallazgo sugiere que el óxido nítrico está involucrado en la eliminación de la infección con *P. chabaudi* AS y de la infección letal con *P. yoelii* 17XL en aquellos ratones que ya habían sufrido una infección primaria con *P. chabaudi* AS, es probable que desarrollaran inmunidad cruzada para *P. yoelii* 17XL y que por lo tanto contaran con células de memoria u otros mecanismos de protección que permitieron frenar al menos en parte la proliferación del parásito lo que dio tiempo al sistema inmune de montar mecanismos que eliminaron al *Plasmodium* y uno de ellos pudiera ser el óxido nítrico, dado que existen reportes en la literatura donde en la infección con *P. chabaudi*, el óxido nítrico está involucrado en su eliminación. El resultado con *P. yoelii* 17XL está de acuerdo con lo descrito en la literatura en donde la elevada actividad de iNOS en pacientes que ya habían resuelto la infección de malaria por *P. falciparum* (Perkins *et al.* 1999). El ligero incremento en la concentración de óxido nítrico durante los días 8 y 10 de la primoinfección con *P. yoelii* 17XL no contribuyó a controlar el parásito, de igual forma que sucedió con la infección con *P. berghei* descrita en la literatura en donde se presentó un incremento en la concentración de nitritos antes de desarrollar parasitemias elevadas para que finalmente los ratones murieran (Nahrevanian & Discombe 2001).

La producción de óxido nítrico durante la infección con malaria también se determinó con la expresión de la proteína iNOS por medio de western blot para descartar así la posible procedencia endotelial del óxido nítrico, se obtuvo que la enzima se expresó de igual forma en todos los grupos de ratones, pero tal vez existan diferencias en la actividad de la enzima, por ello la concentración de nitritos incrementó en diferentes tiempos en todos los grupos de ratones.

Probablemente la fase en la que el óxido nítrico ejerce su papel protector en malaria depende de la letalidad del parásito, pues Dascombe & Nahrevanian 2003, encontraron que los ratones infectados con *P. berghei* tratados con inductores de óxido nítrico durante la fase aguda no sobrevivieron, lo anterior sugiere que si bien es importante el óxido nítrico no es la única molécula involucrada en la eliminación del parásito. Otros investigadores le han atribuido al óxido nítrico un papel inmunoregulador (Taylor-Robinson & Smith 1999), por lo anterior decidimos analizar la correlación entre la expresión del transcrito de iNOS y la expresión de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias ó inmunorreguladoras por lo que se determinó la expresión de estas citocinas en el bazo por RT-PCR.

En todos los grupos de ratones hubo un incremento en la expresión de IFN- γ , sin embargo en los ratones que habían sufrido una infección con *P. chabaudi* AS y se re infectaron con *P. yoelii* 17XL la expresión fue significativamente mayor en los días 4, 6 y 18 de la infección (**Gráfica 6**), este resultado corrobora los hallazgos descritos en la literatura en donde asociaron la producción temprana de IFN- γ con la protección contra malaria en modelos murinos (Choudhury *et al.* 2000, de Souza *et al.* 1997). Como las células T $\gamma\delta$ y a las células NK se activan durante la respuesta innata, es probable que sean las responsables de la producción temprana de IFN- γ . El papel del IFN- γ en la protección contra estadios sanguíneos del *Plasmodium* se ha demostrado previamente en ratones que recibieron tratamiento con anticuerpos anti-IFN- γ (Meding *et al.* 1990), en ratones deficientes en el receptor de IFN- γ (Favre *et al.* 1997) y en ratones knockout para el gen de IFN- γ (Su & Stevenson 2000). En este trabajo dado que la expresión de IFN- γ en los ratones que habían sufrido una infección previa con *P. chabaudi* y se re infectaron con *P. yoelii* 17XL fue mayor que en los ratones primoinfectados con *P. yoelii* 17XL se infiere que la previa exposición al parásito no letal favoreció la inducción del transcrito de IFN- γ , este hallazgo está de acuerdo con lo que se observó en niños de África expuestos a reinfecciones con *Plasmodium* en donde se encontró un aumento en la síntesis de IFN- γ por células mononucleares de sangre periférica y el curso de la infección fue moderada, a diferencia de las infecciones severas donde la producción de IFN- γ fue menor (Luty *et al.* 1999), es posible que esta citocina contribuya a eliminar el parásito indirectamente

mediante la activación de macrófagos y neutrófilos para fagocitar merozoitos (Kumaratilake & Ferrante 2000) o por la producción de peróxido de hidrógeno, H₂O₂ (Shear *et al.* 1989). Es importante destacar que en los ratones primoinfectados con *P. yoelii* 17XL y durante la infección primaria con *P. chabaudi* AS la expresión de IFN- γ fue igual en los días 8, 10 y 12 **Gráfica 6**, incluso el día 15 la expresión se mantuvo elevada durante la infección con el parásito letal pero aún así ningún ratón sobrevivió, tal vez porque el parásito evade la fagocitosis mediante la adherencia de eritrocitos parasitados al endotelio, fenómeno que posiblemente no ocurra en los ratones inmunes re infectados con el parásito no letal, ya que la expresión del transcrito de IFN- γ fue significativamente menor a la que presentaron los ratones infectados por primera vez con *P. yoelii* 17XL en los días 10, 12 y 15. Probablemente durante la infección con *P. chabaudi* AS no sea relevante el fenómeno de citoadherencia y la producción de IFN- γ sea lo suficientemente elevada como para activar los mecanismos de respuesta inmune necesarios en la eliminación del *Plasmodium*, ya que el último día en que se mantuvo elevada la expresión del transcrito de IFN- γ fue precisamente cuando se registró el pico de la parasitemia.

En relación a la IL-12 la expresión del transcrito aumentó en la misma proporción durante el curso de la infección para todos los ratones, excepto el día 18 puesto que los ratones inmunes re infectados con *P. yoelii* 17XL presentaron la expresión de IL-12 significativamente más elevada que el resto de los ratones (**Tabla 7**), quizá este aumento evitó el desarrollo de malaria severa como se ha observado en los pacientes con malaria moderada ocasionada por *P. falciparum* (Luty *et al.* 2000), dado que la IL-12 posee diversas funciones entre las que están: la capacidad de inducir la producción de IFN- γ por las células T y las células NK, además induce la proliferación de células Th0, favorece la diferenciación de las células Th1, estimula la eritropoyesis (Stevenson *et al.* 2001) y facilita la producción de anticuerpos específicos del parásito de las subclases IgG2a e IgG3 (Su Z & Stevenson 2002), incluso se ha propuesto utilizar la combinación de IL-12-cloroquina como terapia para inducir inmunidad (Mohan *et al.* 1999).

Con respecto a la expresión de TNF- α fue significativamente mayor en los ratones inmunes re infectados con *P. chabaudi* AS a diferencia de los ratones infectados con *P. yoelii* 17XL (inmunes o primoinfectados) (**Gráfica 7**). Si bien es cierto que la producción

de TNF- α se asocia con hipoglicemia, pérdida de peso, fiebre y deseritropoyesis (Karunaweera *et al.* 1992, Manis *et al.* 2003, Tracey *et al.* 1988) también tiene un papel importante en la inmunidad innata: puesto que activa a los macrófagos para la producción de radicales de oxígeno y estimula a los monocitos para aumentar la expresión de receptores para IgG (Muñiz-Junqueira *et al.* 2001); últimamente se ha descrito que la interacción de TNF- α con su receptor p55 (p55R) es esencial para desarrollar una respuesta de memoria (Li & Langhorne 2000). Por lo que es probable que la interacción temprana entre TNF- α y p55R favorezca la activación de las células B de memoria que se desarrollaron en la primera infección y por ello los ratones inmunes re infectados con el parásito homólogo expresaron TNF- α con mayor intensidad.

En relación al transcrito de TGF- β nuestros resultados muestran que su expresión aumentó en la misma forma en todos los grupos de ratones **Tabla 8**, es probable que esa sea la razón por la que no detectamos un incremento significativo en el transcrito de iNOS durante la infección con *P. yoelii* 17XL, este posible efecto de TGF- β sobre la expresión de iNOS correlaciona con los resultados de Tsutsui & Kamiyama 1999 quienes encontraron que un incremento de TGF- β en la fase aguda de la infección inhibe la producción de óxido nítrico determinado por la expresión de mRNA de iNOS y la concentración de nitritos en suero, aunque es importante recalcar que pueden existir efectos diversos dependiendo del modelo de malaria tanto murino como del parásito, ya que ellos encontraron un incremento máximo en la expresión de TGF- β exactamente el día en que se registró el pico de parasitemia, en cambio en este trabajo se encontró un aumento desde la fase aguda de la infección y este nivel de expresión se mantuvo constante hasta que la infección se eliminó por completo.

La expresión de IL-4 aumentó en la misma proporción en todos los grupos de ratones con exclusión del día 10 **Tabla 9**, donde la expresión del transcrito en los ratones que sufrieron una infección con *P. chabaudi* AS y se re infectaron con *P. yoelii* 17XL fue significativamente menor que en los ratones primoinfectados con *P. chabaudi* AS y en el día 15 este valor se invirtió, una probable explicación es que quizás existió un control más eficiente en la inhibición de IFN- γ (Powrie *et al.* 1993), también es probable que se produjeran anticuerpos de mayor afinidad pues la disminución de la parasitemia en la fase

crónica se observó primero en los ratones primoinfectados con *P. chabaudi* AS y no en los ratones inmunes re infectados con *P. yoelii* 17XL.

Únicamente en el día 4 de la infección la expresión del mRNA de IL-10 fue significativamente mayor en los ratones inmunes ya sea que hayan sido re infectados con el parásito letal o con el parásito no letal (**Gráfica 8**), en los días restantes de la infección la expresión de IL-10 se incrementó de la misma forma en todos los grupos de ratones, una probable explicación podría ser que esta citocina regula al TNF- α para de esta forma disminuir su efecto patológico además de que la IL-10 también puede inhibir la producción de IFN- γ (Li *et al.* 1999, Nussenblatt *et al.* 2001). Otra probable explicación es que la IL-10 también pudo haber bloqueado la expresión de iNOS por la inhibición de NF- κ B (Wang *et al.* 1995). En el día 15 postinfección los ratones infectados por primera vez con *P. yoelii* 17XL expresaron más IL-10 que los ratones inmunes re infectados con el parásito letal y que los ratones primoinfectados con *P. chabaudi* AS, tal vez para regular la expresión de IFN- γ , que en el mismo día estuvo significativamente elevada.

En relación a la expresión de la IL-6, únicamente los ratones infectados por primera vez con *P. chabaudi* AS desarrollaron un incremento significativo en la expresión de esta citocina antes del pico de parasitemia en los días 8, 10 y 12 **Gráficas 2 y 9** con respecto a esta citocina, los reportes de su asociación con malaria son escasos, sin embargo este incremento podría asociarse a la estimulación temprana de las células B para que maduraran a células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas, como lo describió previamente Akanmori *et al.* 1996 quien reportó que la administración de IL-6 recombinante en ratones infectados con *P. chabaudi chabaudi* incrementó el título de anticuerpos IgG1, aunque para IgG2a e IgG2b también se observó un incremento.

Aunque en los ratones inmunes re infectados con *P. yoelii* 17XL la expresión del mRNA de iNOS se correlacionó significativamente con la concentración de nitritos totales en suero únicamente los días 4 y 10 de la infección (**Tabla 10**) es importante señalar que en los días 15, 18 y 22 los valores de r fueron de 0.87, 0.77 y 0.96 respectivamente por lo que biológicamente se pueden considerar importantes para inferir que la expresión del mRNA de la enzima está relacionada con la concentración de nitritos en suero durante la fase

crónica y dado que hubo una correlación positiva con las citocinas proinflamatorias como con las inmunorreguladoras durante la fase aguda es probable que a pesar de existir una estimulación de macrófagos para producir óxido nítrico inducido por IFN- γ , IL-12 y TNF- α las citocinas inmunorreguladoras contrarrestan este efecto dañando la expresión de iNOS a nivel transcripcional y postranscripcional. En nuestros experimentos la concentración de nitritos presentó una correlación positiva en la fase aguda de la infección con la expresión de las citocinas proinflamatorias e inmunorreguladoras (**Tabla 11**), sin embargo en la fase crónica sólo existió correlación positiva el día 15 con la expresión de IFN- γ , una probable explicación a ello es que esta citocina tiene un efecto mínimo en la expresión de iNOS que sinergiza con la actividad de GPI para inducir la producción de óxido nítrico (Zhu *et al.* 2005), ya que en el día 22 (cuando la concentración de nitritos se encontró elevada, **Tabla 6**) no hubo correlación entre el transcrito de iNOS e IFN- γ , como tampoco la hubo entre la concentración de nitritos e IFN- γ .

Durante la primoinfección con *P. yoelii* 17XL hubo una correlación positiva y significativa entre la expresión del transcrito de iNOS y la concentración de nitritos totales en el día 15 (**Tabla 12**), en ese día la expresión del mRNA de IFN- γ , IL-12 e IL-4 también correlacionaron significativamente tanto con la expresión de iNOS como con la concentración de nitritos (**Tabla 13**) por lo que se infiere que estas citocinas tienen un efecto directo en la expresión del transcrito de iNOS ya sea en su inducción o en su inhibición. Como en las correlaciones: expresión del mRNA de iNOS - expresión del mRNA de citocinas hubo relaciones inversas (coeficientes de correlación negativos) durante la fase aguda de la infección se propone que las características de la correlación entre las variables en esta fase es crítica para resolver la infección, ya que en los ratones inmunes re infectados con *P. yoelii* 17XL no se observaron correlaciones inversas.

Como en los ratones inmunes re infectados con *P. chabaudi* AS sólo existió correlación positiva del mRNA de iNOS con la concentración de nitritos el día 6 (**Tabla 14**), pero la concentración de nitritos no correlacionó con alguna de las citocinas en ese día una probable explicación podría ser que la producción de óxido nítrico fue estimulada por el antígeno soluble del parásito GPI o por la hemozoina. Es probable que en este grupo de ratones existió una respuesta mediada por anticuerpos específicos, por ello la respuesta innata mediada por citocinas proinflamatorias no correlacionó con la producción de óxido nítrico. En la primoinfección con *P. chabaudi* AS la correlación en el día 10 entre la

expresión del mRNA de iNOS y la concentración de nitritos no fue significativa, pero al igual que en los ratones inmunes re infectados con *P. yoelii* 17XL el coeficiente de correlación (0.929) puede considerarse importante (**Tabla 16**), aunque cabe señalar que no hubo correlación positiva con la expresión del mRNA de las citocinas proinflamatorias, existe la posibilidad que la producción de óxido nítrico fue inducida por GPI. En el día 12 (cuando existió el pico de parasitemia) la expresión de las citocinas proinflamatorias correlacionó significativamente con la concentración de nitritos **Tabla 17**, mientras que la expresión del mRNA de iNOS y la concentración de nitritos tuvieron un coeficiente de correlación de 0.81 no significativo pero podría ser importante biológicamente. Otro hallazgo relevante fue la correlación que existió entre la expresión del mRNA de iNOS y la producción de nitritos cuando la parasitemia se eliminó por completo (día 22), pues se obtuvo que la expresión del mRNA de las citocinas proinflamatorias que correlacionó con la expresión del mRNA de iNOS y con la concentración de nitritos, aunque con algunas de las citocinas los valores de r (cerca de 0.9) no fueron significativos. Es posible que esta correlación al final de la primoinfección con *P. chabaudi* AS haya generado tolerancia en los ratones que fueron re infectados con el parásito letal, ya que en la literatura existe un trabajo en pacientes de Papua Nueva Guinea expuestos a reinfecciones múltiples quienes desarrollaron malaria moderada y un incremento en la actividad de iNOS, a diferencia de los pacientes que desarrollaron malaria severa con una producción baja de óxido nítrico (Boutlis *et al.* 2003).

9. CONCLUSIONES.

La previa resolución de malaria no letal con *P. chabaudi* AS genera protección a reinfecciones letales con *P. yoelii* 17XL en ratones.

La protección contra *P. yoelii* 17XL se refleja en la disminución de eritrocitos infectados pero los parámetros de patogenicidad (anemia y pérdida de peso) no se modifican favorablemente.

El crecimiento del bazo está asociado con la eliminación de la infección con *P. yoelii* 17XL en los ratones inmunes a *P. chabaudi* AS.

Como la producción del óxido nítrico disminuyó durante la fase aguda de la reinfección con *P. yoelii* 17XL se descarta que contribuya en la eliminación de este parásito.

De las citocinas proinflamatorias, únicamente el IFN- γ pudiera contribuir en la resolución de la infección con *P. yoelii* 17XL en los ratones inmunes dado que su expresión aumentó significativamente durante la fase aguda de la infección.

A pesar de que la producción de óxido nítrico (concentración de nitritos) en los ratones inmunes re infectados con *P. yoelii* 17XL disminuyó durante la fase aguda de la infección, ésta correlacionó con una mayor expresión de IFN- γ .

En los ratones inmunes a *P. chabaudi* AS y re infectados con *P. yoelii* 17XL el incremento en la expresión de las citocinas IFN- γ , IL-12, IL-10 e IL-4 se asoció con la baja producción de óxido nítrico durante la fase aguda de la infección.

10. ANEXOS.

10.1 Soluciones para extracción de RNA y RT-PCR.

Acril-biscarilamida al 30%

Acrilamida		29.0g
Bisacrilamida		1.0g
Agua bidestilada	cbp	100mL

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

Agua DEPC 0.1%.

Dietilpirocarbonato		1g
Agua bidestilada		1000mL

NOTA. Distribuir en frascos de 250ml, dejar actuar el DEPC durante 4-12 horas y remover el DEPC por esterilización.

Amortiguador de carga 5X

Reactivo	Concentración final
TRIS, pH=8	50mM
EDTA, pH=8	75mM
SDS	0.5% P/V
Sacarosa	30.0% P/V
Ficoll	10.0% P/V
Azul de bromofenol	0.12% P/V
Xilencianol	0.12% P/V

NOTA. Guardar a temperatura ambiente.

Amortiguador de PCR 10X con Mg⁺⁺

Stock	Reactivo	[Final] en el tubo de Rx = PCR 1X	10ml PCR 10X	[10X]
1M	MgCl ₂	2mM	0.2mL	20mM
2.5M	KCl	50mM	2.0mL	500mM
2.0M	Tris pH=8.3	10mM	0.5mL	100mM
20 ^{mg} / _{mL}	Gelatina	0.1mg/mL	0.5mL	1 ^{mg} / _{mL}
	Agua millipore		6.8mL	

NOTA. Distribuir el amortiguador de PCR 10X en tubos eppendorf de 650µl.

Gel de acrilamida al 5%	100mL (2 geles 16X16)
Agua bidestilada	72.2mL
TBE 10X	10.0mL
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	16.8mL
APS 10%	950µL
TEMED	100µL

Mezcla de reacción para PCR.

Para un tubo de reacción realizar la mezcla de la siguiente forma:

Stock	Reactivo	[¹]/ _{Rx}	µl/ _{Rx}
10X	Amortiguador de PCR	1X	2.0µl
5mM	dNTP's	0.2mM	0.8µl
20µM	Oligo β-actina	0.1µM	0.1µl
20µM	***Oligos	0.1µM	0.1µl
5 ^U / _{µl}	Taq DNA pol	0.5U	0.1µl
Agua para PCR			11.9µl
Volumen final			15.0µl

***De acuerdo al gen que se amplifique, colocar el oligonucleótico correspondiente

Mezcla de reacción para retrotranscripción

En un tubo eppendorf realizar la mezcla para una reacción:

	1 Rx
Amortiguador de retrotranscripción 5X	4.0µl
0.1M dTT	2.0µl
5mM dNTP's	2.0µl
Enzima M-MLV RT	1.0µl
Inhibidor de RNAsa	0.1µl
Agua DEPC	1.0µl
Volumen final	10.1µl

PBS (solucion amortiguadora de fosfatos) para extracción de RNA, libre de calcio y magnesio.

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

NOTA. Alicuotar en frascos de 250mL y esterilizar.

Persulfato de amonio (APS) al 10%.

Persulfato de amonio	10.0g
Agua bidestilada	100mL

NOTA. Preparar alícuotas de 500µL y guardar en el congelador.

TBE (amortiguador Tris-Acido bórico-EDTA) 10X.

Tris 1M		121.10g
Acido bórico 1M		61.83g
EDTA 50mM		18.61g
Agua bidestilada	cbp	1000mL

NOTA. Calentar la solución para disolver más rápido los reactivos

10.2 Soluciones para extracción de proteínas y Western-Blot.

1. Acrilamida/Bis-acrilamida 30% 0.8%

Acrilamida		30.0g
Bisacrilamida		0.8g
Agua milliQ	cbp	100mL

Guardar en frasco ámbar a 4°C

2. Amortiguador de carga 5X (Laemmli)

Tris-HCl 1M, pH 6.8		3.12mL
SDS		1.0g
Glicerol		5.0mL
β-mercaptoetanol		0.5mL
Azul de bromofenol		0.005g
Agua milliQ	cbp	10mL

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

3. Amortiguador de corrimiento 10X, pH 8.3

Glicina		144g
Tris		30.55g
SDS		10g
Agua bidestilada	cbp	1000mL

Ajustar el pH con HCl antes de aforar, para obtener la solución de trabajo 1X, diluir 1:10.

4. Amortiguador de sonicación, pH 7.5

Sacarosa 0.32M	10.95g
Tris 10mM	0.121g
EDTA 1mM	0.037g
DTT 1mM	0.0154g
Agua milliQ	cbp 100mL

Disolver en 70mL de agua milliQ,
ajustar el pH a 7.5 con HCl y
aforar a 100mL. Almacenar a 4°C.

5. Amortiguador de sonicación con inhibidores de proteasas

Aprotinina (10µg/µL)	1µL
Leupeptina (1µg/µL)	10 µL
Soybean (1 µg/µL)	10 µL
PMSF (200mM)	0.5 µL
Amortiguador de sonicación	1mL

Preparar en el momento de utilizar

6. Amortiguador de transferencia

TRIS 25mM	3.03g
Glicina 192mM	14.4g
SDS 0.05%	0.5g
Metanol 20%	200mL
Agua milliQ	cbp 1000mL

7. Gel concentrador 5.14%

Acrilamida 30% 0.8%	1.67mL
Tris 0.5M, pH 6.8	2.5mL
Agua milliQ	5.7mL
SDS 10%	100µL
TEMED	10 µL
APS 10%	40 µL

8. Gel separador 12%

Acrilamida 30% 0.8%	3.9mL
Tris 1.5M, pH 8.8	2.5mL
Agua milliQ	3.5mL
SDS 10%	100 μ L
TEMED	13 μ L
APS 10%	40 μ L

9. SDS al 10%

SDS	10g
Agua milliQ	100mL

10. TBS (Amortiguador Tris-salino), pH 7.5

NaCl 150mM	8.76g
Tris 20mM	2.42g
Agua bidestilada	cbp 1000mL
Ajustar el pH con HCl antes de aforar	

11. TBS-Tween 0.1%

Tween	100 μ L
TBS	100mL

Preparar en el momento de utilizar.

12. Tris 0.5M, pH 6.8

Tris	60.57g
Agua milliQ	cbp 1000mL
Ajustar el pH con HCl	

13. Tris 1.5M, pH 8.8

Tris 181.71g

Agua milliQ cbp 1000mL

Ajustar el pH con HCl

10.3 Soluciones para la deteminación de nitritos

1. Acido tricloroacético al 10%

Acido tricloroacético 10g

Agua bidestilada 100mL

Guardar en frasco ámbar y almacenar de 0-4°C

2. NADPH

NADPH 1.25g

PBS 1X 1mL

Almacenar a -20°C

3. NED (Naftiletildiamina) al 1%

NED 0.04g

Agua bidestilada 40mL

Conservar en frasco ámbar de 0-4°C.

4. Nitrato reductasa (*Aspergillus*)

Nitrato reductasa 20U

PBS 1X 2mL

Preparar alícuotas de 0.25mL y almacenar a 4°C

5. Nitrito de sodio 0.7mM

NaNO ₂		1.932mg
Agua bidestilada	cbp	40mL

6. PBS 10X

NaCl		87g
KH ₂ PO ₄		4g
Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O		67.82g
Agua bidestilada	cbp	1000mL

Filtrar y esterilizar, para obtener la solución 1X
diluir 1:10

7. Sulfanilamida al 1% en ácido fosfórico al 5%

Sulfanilamida		0.4g
Acido fosfórico al 5%		40mL

Guardar en frasco ámbar y de 0-4°C

11. REFERENCIAS.

1. Aichele P, Zinke J, Grode L, Schwendener RA, Kaufmann SHE & Seiler P. Macrophages of the splenic marginal zone are essential for trapping of blood-borne particulate antigen but dispensable for induction of specific T cell responses. *J Immunol* 2003; **171**: 1148-1155.
2. Akanmori BD, Kawai S & Suzuki M. Recombinant mouse IL-6 boosts specific serum anti-plasmodial IgG subtype titres and suppresses parasitaemia in *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection. *Parasite Immunol* 1996; **18**: 193-199.
3. Allen RJW & Kirk K. Cell volume in the *Plasmodium*-infected erythrocyte. *Trends Parasitol* 2004; **20**: 7-10.
4. Alves HJ, Weidanz W & Weiss L. The spleen in murine *Plasmodium chabaudi adami* malaria: stromal cells, T lymphocytes and hematopoiesis. *Am J Trop Med Hyg* 1996; **55**: 370-378.
5. http://www.amc.unam.mx/Agencia_de_Noticias/Notas_Cientificas/nc_31ceron-mosquito.html
6. Angulo I & Fresno M. Cytokines in the pathogenesis of and protection against malaria. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; **9**: 1145-1152.
7. Anstey NM, Granger DL, Hassanali MY, Mwaikambo ED, Duffy PE & Weinberg JB. Nitric oxide, malaria and anemia: inverse relationship between nitric oxide production and hemoglobin concentration in asymptomatic malaria-exposed children. *Am J Trop Med Hyg* 1999; **61**: 249-252.
8. Anstey NM, Weinberg JB, Hassanali MY, Mwaikambo EO, Manyenga O, Musukonis MA, Arnelle DR, Hollis D, MacDonald MI & Granger DL. Nitric oxide in Tanzanian children with malaria: inverse relationship between malaria severity and nitric oxide production/nitric oxide synthase type 2 expression. *J Exp Med* 1996; **184**: 557-567.
9. Artavanis-Tsakonas K & Riley EM. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN- γ from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Immunol* 2002; **169**: 2956-2963.
10. Artavanis-Tsakonas K, Tongren JE & Riley EM. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clin Exp Immunol* 2003; **133**: 145-152.
11. Avni O & RaO A. T cell differentiation: a mechanistic view. *Curr Opin Immunol* 2000; **12**: 654-659.

12. Baldwin AS Jr. The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Ann Rev Immunol* 1996; **14**: 649-681.
13. Baruch DI, Gormely JA, Howard RJ & Pasloske BL. *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 is a parasited erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intercelular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 3497-3502.
14. Baum J, Thomas AW & Conway DJ. Evidence for diversifying selection on erythrocyte-binding antigens of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *Genetics* 2003; **163**: 1327-1336.
15. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA & Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitiric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 1620-1624.
16. Beckman JS & Koppenol WH. Nitric oxide: superoxide and peroxynitrite: The good, the bad and the ugly. *Am J Physiol* 1996; **271**: C1424-C1437.
17. Biemba G, Dolmans D, Thuma PE, Weiss G & Gordeuk VR. Severe anaemia in Zambian children with *Plasmodium falciparum* malaria. *Trop Med Int Health* 2000; **5**: 9-16.
18. Biemba G, Gordeuk VR, Thuma PE Mabeza GM & Weiss G. Prolonged macrophage activation and persistent anaemia in children with complicated malaria. *Trop Med Int Health* 1998; **3**: 60-65.
19. Blanchette J, Jaramillo M & Olivier M. Signalling events involved in interferon- γ -inducible macrophage nitric oxide generation. *Immunology* 2003; **108**: 513-522.
20. Boutlis CS, Gowda DCh, Naik RS, Maguire GP, Mgone ChS, Bockarie MJ, Lagog M, Ibam E, Lorry K & Anstey NM. Antibodies to *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidilinositols: inverse association with tolerance of parasitemia in Papua New Guinean children and adults. *Infect Immun* 2002; **70**: 5052-5057.
21. Boutlis CS, Tjitra E, Maniboey H, Misukonis MA, Saunders JR, Suprianto S, Weinberg JB & Anstey NM. Nitric oxide production and mononuclear cell nitric oxide synthase activity in malaria-tolerant Papuan adults. *Infect Immun* 2003; **71**: 3682-3689.
22. Branch O, Casapia WM, Gamboa DV, Hernandez JN, Alava FF, Roncal N, Alvarez E, Perez EJ & Gotuzzo E. Clustered local transmisi3n and asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria infections in a recently emerged hipoendemic Peruvian Amazon community. *Malaria J* 2005; **4**: 1-16.

23. Brown GC. Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase. *FEBS Lett* 1995; **369**: 136-139.
24. Brown HW y Neva FA. *Parasitología clínica*. 5ª edición. México: Ed Interamericana, 1985: 84-105.
25. Clark IA, Awburn MM, Harper CG, Liomba NG & Molyneux ME. Induction of HO-1 in tissue macrophages and monocytes in fatal falciparum malaria and sepsis. *Malaria J* 2003; **2**: 41-53.
26. Clark IA & Chaudhri G. Tumor necrosis factor may contribute to the anaemia of malaria by causing dyserythropoiesis and erythrophagocytosis. *Br J Haematol* 1988; **70**: 99-103.
27. Clark IA & Schofield L. Pathogenesis of malaria. *Parasitol Today* 2000; **16**: 451-454.
28. Cohen S. Immunology of malaria. En: Lachman and Peters. *Clinical aspects of immunology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1984: 1582-1604.
29. Constant SL & Bottomly K. Induction of Th1 and Th2 CD4⁺T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 1997; **15**: 297-322.
30. Cross CE & Langhorne J. *Plasmodium chabaudi chabaudi* (AS): inflammatory cytokines and pathology in an erythrocytic-stage infection in mice. *Exp Parasitol* 1998; **90**: 220-229.
31. Chaisavaceyakorn S, Othoro C, Shi YP, Otieno J, Chaiyaroj SC, Lal AA & Udhayakumar V. Relationship between plasma interleukin-12 (IL-12) and IL-18 levels and severe malarial anemia in an area of holoendemicity in western Kenya. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; **10**: 362-366.
32. Chen L, Zhang Z-H & Sendo F. Neutrophils play a critical role in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Clin Exp Immunol* 2000; **120**: 125-133.
33. Chen Q, Schlichtherle M & Wahlgren M. Molecular aspects of severe malaria. *Microbiol Rev* 2000; **13**: 439-450.
34. Cheshire JL & Baldwin AS Jr. Synergistic activation of NF- κ B by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon via enhanced I κ B α degradation and the novo I κ B β degradation. *Mol Cell Biol* 1997; **17**: 6746-6754.
35. Chitnis CE & Blackman MJ. Host cell invasion by malaria parasites. *Parasitol Today* 2000; **16**: 411-415.
36. Chiwakata CB, Hemmer Ch J & Dietrich M. High levels of inducible nitric oxide synthase mRNA are associated with increased monocyte counts in blood and have a beneficial role in *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun* 2000; **68**: 394-399.

37. Chotivanich K, Udomsangpetch R, McGready R, Proux S, Newton P, Pukrittayakamee S, Looareesuwan S & White NJ. Central role of the spleen in malaria parasite clearance. *J Infect Dis* 2002; **185**: 1538-1541.
38. Choudhury HB, Sheikh NA, Bancroft GJ, Katz DR & de Souza B. Early nonspecific immune responses and immunity to blood-stage nonlethal *Plasmodium yoelii* malaria. *Infect Immunity* 2000; **68**: 6127-6132.
39. Dascombe MJ & Nahrevanian H. Pharmacological assessment of the role of nitric oxide in mice infected with lethal and nonlethal species of malaria. *Parasite Immunol* 2003; **25**: 149-159.
40. Day KP, Hayward RE & Dyer M. The biology of *Plasmodium falciparum* transmission stages. *Parasitology* 1998; **116**: s95-s109.
41. de Souza JB, Williamson KH, Otani T & Playfair JHL. Early gamma interferon responses in lethal and nonlethal murine blood-stage malaria. *Infect Immun* 1997; **65**: 1593-1598.
42. Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM, Bernheim HA, Beutler B, Cerami A, Figari IS, Palladino MA & O'Connor JV. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J Exp Med* 1986; **163**: 1433-1450.
43. Dondorp AM, Kager PA, Vreeken J & White NJ. Abnormal blood flow and red blood cell deformability in severe malaria. *Parasitol Today* 200; **16**: 228-232.
44. English M, Sauerwein R, Waruiru C, Mosobo M, Obiero J, Lowe B & Marsh K. Acidosis in severe childhood malaria. *Q J Med* 1997; **90**: 263-270.
45. <http://www.epi.org.mx>
46. Faure V, Hecquet Ch, Courtois Y and Goureau O. Role of interferon regulatory factor-1 and mitogen-activated protein kinase pathways in the induction of nitric oxide synthase-2 in retinal pigmented epithelial cells. *J Biol Chem*. 1999; **274**: 4794-4800.
47. Favre N, Ryffel B, Bordmann G & Rudin W. The course of *Plasmodium chabaudi chabaudi* infections in interferon-gamma receptor deficient mice. *Parasite Immunol* 1997; **19**: 375-383.
48. Fell AH & Smith NC. Immunity to asexual blood stages of *Plasmodium*: is resistance to acute malaria adaptive or innate? *Parasitol Today* 1998; **14**: 364-368.
49. Ferrer VD, Fonseca CJ, García RRE y Martínez APF. Óxido nítrico. Importancia biológica y participación en algunas funciones cardiovasculares y hematológicas. *MEDISAN* 1998; **2**: 45-53.

50. Francis SE, Sullivan DJ & Goldberg DE. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annu Rev Microbiol* 1997; **51**: 97-123.
51. Fujioka H & Aikawa M. Structure and life cycle. *Chem Immunol* 2002; **80**:1-26.
52. Gerold P, Schofield L, Blackman MJ, Holder AA & Schwarz RT. Structural analysis of the glycosylphosphatidylinositol membrane anchor of the merozoite surface proteins-1 and -2 of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 1996; **75**: 131-143.
53. Gilberger TW, Thompson JK, Triglia T, Good RT, Duraisingh MT & Cowman AF. A novel erythrocyte binding antigen-175 paralogue from *Plasmodium falciparum* defines a new trypsin-resistant receptor on human erythrocytes. *J Biol Chem* 2003; **278**: 14480-14486.
54. Gillman BM, Batchelder J, Flaherty P & Weidanz WP. Suppression of *P. chabaudi* parasitemia is independent of the action of reactive oxygen intermediates and/or nitric oxide. *Infect Immun* 2004; **72**: 6359-6366.
55. González CL, Rodríguez MH, Nettel JA, Kain KC, Hernández JE, Villarreal C & Wirtz RA. Differential susceptibilities of the two main mosquito vectors in Mexico to the two *P. vivax* CSP phenotypes and its effect on transmission and epidemiology. http://mim.nih.gov/english/events/vivax_research_conf/rodriguez1-eng.html
56. Görsdorf A, Appel KE, Engeholm C, Günter O. Nitrogen dioxide induces DNA single-strand breaks in cultures Chinese hamster cells. *Carcinogenesis* 1990; **11**: 37-41.
57. Grau GE, Mackenzie ChD, Carr RA, Redarol M, Pizzolato G, Allasia C, Cataldo C, Taylor TE & Molineux ME. Platelet accumulation in brain microvessels in fatal pediatric cerebral malaria. *J Infect Dis* 2003; **187**: 461-466.
58. Grisham MB, Jour'Heuil D & Wink DA. Nitric oxide. I Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol* 1999; **276**: G315-G321.
59. Gross A, Gera S & Frankenburg S. *Plasmodium berghei*: lymphocyte and macrophage dynamics in the spleen of Balb/c mice in the course of infection and after rechallenge of cured mice. *Exp Parasitol* 1988; **65**: 50-60.
60. Groves JT & Wang Ch CY. Nitric oxide synthase: models and mechanisms. *Curr Opin Biol* 2000; **4**: 687-695
61. Hansen DS, Evans KL, D'Ombrian MC, Bernard NJ, Sexton AC, Buckingham L, Scalzo AA & Schofield L. The natural killer complex regulates severe malarial pathogenesis and influences acquired immune response to *Plasmodium berghei* ANKA. *Infect Immun* 2005; **73**: 2288-2297.

62. Hearn J, Rayment N, Landon DN, Katz DR & de Souza JB. Immunopathology of cerebral malaria: morphological evidence of parasite sequestration in murine brain microvasculature. *Infect Immun* 2000; **68**: 5364-5376.
63. Helmbj H, Jönsson G & Troye-Blomberg. Cellular changes and apoptosis in the spleens and peripheral blood of mice infected with blood-stage *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS. *Infect Immun* 2000; **68**: 1485-1490.
64. Hirunpetcharat Ch & Good MF. Deletion of *Plasmodium berghei*-specific CD4⁺T cells adoptively transferred into recipient mice after challenge with homologous parasite. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 1715-1720.
65. Holder AA, Freeman RR & Newbold CI. Serological cross-reaction between high molecular weight protein: synthesized in blood schizonts of *Plasmodium yoelii*, *Plasmodium chabaudi* and *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 1983; **9**: 191-196.
66. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE & Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and veins is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987; **84**: 9265-9269.
67. Jacobs P, Radzioch D & Stevenson MM. *In vivo* regulation of nitric oxide production by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon, but not by interleukin-4 during blood stage malaria in mice. *Infect Immun* 1996; **64**: 44-49.
68. Karunaweera ND, Gra GE, Gamage P, Carter R & Mendis KN. Dynamics of fever and serum levels of tumor necrosis factor are closely associated during clinical paroxysms in *Plasmodium vivax* malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 3200-3203
69. Keller ChC, Kremsner PG, Hittner JB, Misukonis MA, Weinberg JB & Perkins DJ. Elevated nitric oxide production in children with malarial anaemia: hemozoin-induced oxide synthase type 2 transcripts and nitric oxide in blood mononuclear cells. *Infect Immun* 2004; **72**: 4868-4873.
70. Korhonen R. Regulation of inducible nitric oxide production in activated macrophages. Finlandia: Medical School of the University of Tampere 2002; 1-90.
71. Kourilsky P & Trufa-Bachi P. Cytokine fields and the polarization of the immune response. *Trends Immunol* 2001; **22**: 502-509.
72. Kumaratilake LM & Ferrante A. Opsonization and phagocytosis of *Plasmodium falciparum* merozoites measured by flow cytometry. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; **7**: 9-13.

73. Kun JF, Mordmüller B, Perkins DJ, May J, Mercereau-Puijalon O, Alpers M, Weinberg JB & Kremsner PG. Nitric oxide synthase 2^{Lambaréné} (G-954C), increased nitric oxide production and protection against malaria. *J Infect Dis* 2001; **184**: 330-336.
74. Leisewitz AL, Rockett KA, Gumede B, Jones M, Urban B & Kwiatkowski DP. Response of the splenic dendritic cell population to malaria infection. *Infect Immun* 2004; **72**: 4233-4239.
75. Li Ch & Langhorne J. Tumor necrosis factor alpha p55 receptor is important for development of memory responses to blood-stage malaria infection. *Infect Immun* 2000; **68**: 5724-5730.
76. Li Ch, Corraliza & Langhorne J. A defect in interleukin-10 leads to enhanced malarial disease in *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection in mice. *Infect Immun* 1999; **67**: 4435-4442.
77. Li Ch, Sanni LA, Omer F, Riley E & Langhorne J. Pathology of *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection and mortality in interleukin-10-deficient mice are ameliorated by anti-tumor necrosis factor alpha and exacerbated by anti-transforming growth factor β antibodies. *Infect Immun* 2003; **71**: 4850-4856.
78. Like KE, Oiallo DA, Dicko A, Kone A, Coulibaly D, Guindo A, Cissoko Y, Sangare L, Coulibaly S, Dakouo B, Taylor TE, Duombo OK & Plowe ChV. Association of intraleukocyte *Plasmodium falciparum* malaria pigment with disease severity, clinical manifestations, and prognosis in severe malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2003; **69**: 253-259.
79. Lou J, Lucas R & Grau GE. Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. *Clin Microbiol Rev* 2001; **14**: 810-820.
80. Lowenstein ChJ, Dinerman JL & Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Int Med* 1994; **120**: 227-237.
81. Luty AJF, Lell B, Schmidt-Ott R, Lchman LG, Luckner D, Greve B, Matousek P, Herbich K, Schmid D, Migot-Nabias F, Deloron P, Nussenzweig RS & Kremsner PG. Interferon- γ responses are associated with resistance to reinfection with *Plasmodium falciparum* in young African children. *J Infect Dis* 1999; **179**: 980-988.
82. Luty AJF, Perkins DJ, Lell B, Schmidt-Ott R, Lehman LG, Luckner D, Greve B, Matousek P, Herbich K, Schmid D, Weinberg JB & Kremsner PG. Low interleukin-12 activity in severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun* 2000; **68**: 3909-3915.
83. Lyke KE, Burges R, Cissoko Y, Sangare L, Dao M, Diarra J, Kone A, Harley R, Plowe CV, Doumbo OK & Szein MB. Serum levels of the proinflammatory cytokines

- interleukin-1 beta (IL-1 β), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha and IL-12 (p70) in Malian children with severe *Plasmodium falciparum* malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls. *Infect Immun* 2004; **72**: 5630-5637.
84. MacMicking J, Xie Q-W & Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Ann Rev Immunol* 1997; **15**: 323-350.
85. Manish R, Tripathy R & Das BK. Plasma glucose and tumour necrosis factor- α in adult patients with severe *falciparum* malaria.
86. Martiney JA, Sherry B, Metz ChN, Espinoza M, Ferrer AS, Calandra T, Broxmeyer HE & Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor release by macrophages after ingestion of *Plasmodium chabaudi*-infected erythrocytes: possible role in the pathogenesis of malarial anemia. *Infect Immun* 2000; **68**: 2259-2267.
87. Meding SJ, Chen SCh, Simon-Haarhaus B & Langhorne J. Role of gamma interferon during infection with *Plasmodium chabaudi chabaudi*. *Infect Immun* 1990; **58**: 3671-3678.
88. Menendez C, Fleming AF & Alonso PL. Malaria related anaemia. *Parasitol Today* 2000; **16**: 469-476.
89. Modiano D, Petrarca V, Sirima BS, Nebié I, Diallo D, Esposito F & Colluzi M. Different response to *Plasmodium falciparum* malaria in West African sympatric ethnic groups. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 13206-13211.
90. Mohan K, Sam H & Stevenson MM. Therapy with a combination of low doses of Interleukin 12 and chloroquine completely cures blood-stage malaria, prevents severe anemia and induces immunity to reinfection. *Infect Immun* 1999; **67**: 513-519.
91. Mohan K & Stevenson MM. Dyserythropoiesis and severe anaemia associated with malaria correlate with deficient interleukin-12 production. *Br J Haematol* 1998; **103**: 942-949.
92. Muniz-Junqueira MI, Santos-Neto LL & Tosta CE. Influence of tumor necrosis factor- α on the ability of monocytes and lymphocytes to destroy intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *Cell Immunol* 2001; **208**: 73-79.
93. Murphy MP. Nitric oxide and cell death. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1411**: 401-414.
94. Nahrevanian H & Dascombe MJ. Nitric oxide and reactive nitrogen intermediates during lethal and nonlethal strains of murine malaria. *Parasite Immunol* 2001; **23**: 491-501.
95. Naik RS, Branch OH, Woods AS, Vijaykumar M, Perkins DJ, Nahlen BL, Lal AA, Cotter RJ, Costello CE, Ockenhouse ChF, Davidson EA & Gowda DCh.

- Glycosylphosphatidylinositol anchors of *Plasmodium falciparum*: molecular characterization and naturally elicited antibody response that may provide immunity to malaria pathogenesis. *J Exp Med* 2000a; **192**: 1563-1575.
96. Naik RS, Davidson EA & Gowda DC. Developmental stage-specific biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol anchors in intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* and its inhibition in a novel manner by mannosamine. *J Biol Chem* 2000b; **275**: 24506-24511.
97. Nathan C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest* 1997; **100**: 2417-2423.
98. Newton CRJC, Hien TT & White N. Cerebral malaria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000; **69**: 433-441.
99. Newton CRJC, Taylor TE & Whitten RO. Pathophysiology of fatal falciparum malaria in Africa children. *Am J Trop Med Hyg* 1998; **58**: 673-683.
100. Nolte MA, Arens R, Kraus M, van Oers MHJ, Kraal G, van Lier RAW & Mebius RE. B cells are crucial for both development and maintenance of the splenic marginal zone. *J Immunol* 2004; **172**: 3620-3627.
101. Nussenblatt V, Mukasa G, Metzger A, Ndeezi G, Garret E & Sembra RD. Anemia and interleukin-10, tumor necrosis factor alpha and erythropoietin levels among children with acute, uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; **8**: 1164-1170.
102. Olliaro PL & Yuthavong Y. An overview of chemotherapeutic targets for antimalarial drug discovery. *Pharmacol Ther* 1999; **81**: 91-110.
103. Omer FM & Riley EM. Transforming Growth factor β production is inversely correlated with severity of murine malaria infection. *J Exp Med* 1998; **88**: 39-48.
104. OMS. World malaria report 2005. http://rbm.who.int/wmr2005/pdf/adv_sp.pdf
105. Perry JA, Rush A, Wilson RJ, Olver ChS & Avery AC. Dendritic cells from malaria infected mice are fully functional APC. *J Immunol* 2004; **172**: 475-482.
106. Pellacani A, Wiesel P, Rasavi S, Vasilij V, Feinberg MW, Chin MT, Reeves R & Perella MA. Down-regulation of high mobility group-I (Y) protein contributes to the inhibition of nitric-oxide synthase 2 by transforming growth factor- β 1. *J Biol Chem* 2001; **276**: 1653-1659.
107. Perkins DJ, Kremsner PG, Schmid D, Misukonis MA, Kelly MA & Weinberg JB. Blood mononuclear cell nitric oxide production and plasma cytokine levels in healthy

- Gabonese children with prior mild or severe malaria. *Infect Immun* 1999; **67**: 4977-4981.
108. Phillips RE & Pasvol G. Anaemia of *Plasmodium falciparum* malaria. *Baillieres Clin Haematol* 1992; **5**: 315-330.
109. Powrie F, Menon S & Coffman RL interleukin-4 and interleukin-10 synergize to inhibit cell-mediated immunity *in vivo*. *Eur J Immunol* 1993; **23**: 2223-2229.
110. Quinn TC & Wyler DJ. Resolution of acute malaria (*Plasmodium berghei* in the rat): reversibility and spleen dependence. *Am J Trop Med Hyg* 1980; **29**: 1-4.
111. Ramasamy R. Molecular basis for evasion of host immunity and pathogenesis in malaria. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1406**: 10-27.
112. Ray P, Sahoo N, Singh B & Kironde FAS. Serum antibody immunoglobulin G of mice convalescent from *Plasmodium yoelii* infection inhibits growth of *Plasmodium falciparum in vitro*: blood stage antigens of *Plasmodium falciparum* involved in interspecies cross-reactive inhibition of parasite growth. *Infect Immun* 1994; **62**: 2354-2360.
113. Rayner JC, Vargas SE, Huber CS, Galinski MR & Barnwell JW. A *Plasmodium falciparum* homologue of *Plasmodium vivax* reticulocyte binding protein (PvRBP1) defines a trypsin-resistant erythrocyte invasion pathway. *J Exp Med* 2001; **194**: 1571-1581.
114. Reiss CS & Komatsu T. Does nitric oxide play a critical role in viral infections? *J Virol* 1998; **72**: 4547-4551.
115. Riley EM. Is T-Cell priming required for initiation of pathology in malaria infections? *Immunol Today* 1999; **20**: 228-233.
116. Rockett KA, Awburn MM, Cowden WB & Clark IA. Killing of *Plasmodium falciparum in vitro* by nitric oxide derivatives. *Infect Immun* 1991; **59**: 3280-3283.
117. Sayle P, Yanes D & Wassom DL. *Plasmodium yoelii*: splenectomy alters the antibody responses of infected mice. *Exp parasitol* 1993; **76**: 377-384.
118. Schwarzer E, Alessio M, Ulliers D & Arese P. Phagocytosis of the malarial pigment, hemozoin, impairs expression of major histocompatibility complex class II antigen, CD54 and CD11c in human monocytes. *Infect Immun* 1998; **66**: 1601-1606.
119. Schwarzer E, Kühn H, Valente E & Arese P. Malaria-parasitized erythrocytes and emóción nonenzymatically generate large amounts of hydroxy fatty acids that inhibit monocyte functions. *Blood* 2003; **101**: 722-728.

120. Seixas EMG & Langhorne J. $\gamma\delta$ Cells contribute to control of chronic parasitemia in *Plasmodium chabaudi* infections in mice. J Immunol 1999; **162**: 2837-2841.
121. Senczuk AM, Reeder JC, Kosmala MM & Ho M. *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 functions as a ligand for P-selectin. Blood 2001; **98**: 3132-3135.
122. Serirom S, Raharjo WH, Chotivanich K, Loareesuwan S, Kubes P & Ho M. Anti-adhesive effect of nitric oxide on *Plasmodium falciparum* cytoadherence under flow. Am J Path 2003; **162**: 1651-1660.
123. Shear HL, Srinivasan R, Nolan T & N GCh. Role of IFN- γ in lethal and nonlethal malaria in susceptible and resistant murine hosts. J Immunol 1989; **143**: 2038-2044.
124. Shami P & Weinberg J. Differential effects of nitric oxide on erythroid and myeloid colony growth from CD34+ human bone marrow cell. Blood 1996; **87**: 977-982.
125. Sibmooch N, Yamanont P, Krudsood S, Leowattana W, Brittenhan G, Loareesuwan S & Udomsangpetch R. Increased fluidity and oxidation of malarial lipoproteins: relation with severity and induction of endothelial expression of adhesion molecules. Lipids Health Dis 2004; **3**: 1-11.
126. Srichaikul T. Hematologic changes in malaria. Bagkok Thailand 1999:24-28.
127. Stevenson MM, Su Z, Sam H & Mohan K. Modulation of host responses to blood-stage malaria by interleukin-12: from therapy to adjuvant activity. Microbes infect 2001; **3**: 49-59.
128. Stoute JA, Odindo AO, Owuor BO, Mibei EK, Opollo MO & Witumbi JN. Loss of red blood cell-complement regulatory proteins and increased levels of circulating immune complexes are associated with severe malarial anemia. J Infect Dis 2003; **187**: 522-525.
129. Su Z & Stevenson MM. Central role of endogenous gamma interferon in protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. Infect Immun 2000; **68**: 4399-4406.
130. Su Z & Stevenson MM. Il-12 is required for antibody-mediated protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS malaria infection in mice. J Immunol 2002; **168**: 1348-1355.
131. Sullivan DJ, Gluzman IY, & Goldberg DE. *Plasmodium* hemozoin formation mediated by histidine-rich proteins. Science 1996; **271**: 219-222.

132. Taramelli D, Recalcati S, Basilico N, Olliato P & Cairo G. Macrophage preconditioning with synthetic malaria pigment reduces cytokine production via heme iron-dependent oxidative stress. *Lab Invest* 2000; **80**: 1781-1788.
133. Tay ZJ, Lara AR, Velasco CO y Gutiérrez QM. *Parasitología médica*. 5^a ed. México: Editores Méndez, 1995: 157-170.
134. Taylor BS, de Vera ME, Ganster RW, Wang Q, Shapiro RA, Morris SM, Billiar TR & Geller DA. Multiple NF- κ B enhancer elements regulated cytokine induction of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1998; **273**: 15148-15156.
135. Taylor-Robinson AW & Phillips RS. Protective CD4⁺T-cell lines raised against *Plasmodium chabaudi* show characteristics of either Th1 or Th2 cells. *Parasite Immunol* 1993; **15**: 301-310.
136. Taylor-Robinson AW, Severn A & Phillips RS. Kinetics of nitric oxide production during infection and reinfection of mice with *Plasmodium chabaudi*. *Parasite Immunol* 1996; **18**: 425-430.
137. Taylor-Robinson AW & Smith EC. A dichotomous role for nitric oxide in protection against blood stage malaria infection. *Immunol Lett* 1999; **67**: 1-9.
138. Torre D, Speranza F, Giola M, Matteelli A, Tambini R & Biondi A. Role of Th1 and Th2 cytokines in immune response to uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; **9**: 348-351.
139. Tracey KJ, Wei H, Manogue KR, Fong Y, Hesse DG, Nguyen HT, Kuo GC, Beutler B, Cotran RS, Cerami A & Lowry SF. Cachectin/Tumor necrosis factor induces cachexia, anemia and inflammation. *J Exp Med* 1988; **167**: 1211-1227.
140. Tsutsui N & Kamiyama T. Transforming growth factor β -induced failure of resistance to infection with blood-stage *Plasmodium chabaudi* in mice. *Infect Immun* 1999; **67**: 2306-2311.
141. UNICEF. Malaria a major cause of child death and poverty in Africa. 2005. <http://www.unicef.org/>
142. van der Heyde HC, Gu Y, Zhang Q, Sun G & Grishman MB. Nitric oxide is neither necessary nor sufficient for resolution of *Plasmodium chabaudi* malaria in mice. *J Immunol* 2000; **165**: 3317-3323.
143. Vijaykumar M, Naik RS & Gowda DCh. *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositol-induced TNF α secretion by macrophages is mediated without membrane insertion or endocytosis. *J Biol Chem* 2001; **276**: 6909-6912.

144. Waitumbi JN, Opollo MO, Muga RO, Misore AO & Stoute JA. Red cell surface changes and erythrophagocytosis in children with severe *Plasmodium falciparum* anemia. *Blood* 2000; **95**: 1481-1486.
145. Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW & Billah MM. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor κ B (NF κ B) activation in human monocytes. *J Biol Chem* 1995; **270**: 9558-9563.
146. World Health Organization. Severe and complicated malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990; **84**: 1-64.
147. Yadava A, Kumar S, Dvorak JA, Milon G & Miller LH. Trafficking of *Plasmodium chabaudi adami*-infected erythrocytes within the mouse spleen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 4595-4599.
148. Yap GS & Stevenson MM. Inhibition of *in vitro* erythropoiesis by soluble mediators in *Plasmodium chabaudi* AS malaria: lack of a major role for interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and gamma interferon. *Infect Immun* 1994; **62**: 357-362.
149. Yap GS & Stevenson MM. Differential requirements for an intact spleen in induction and expression of B-cell dependent immunity to *Plasmodium chabaudi* AS. *Infect Immun* 1994; **62**: 4219-4225.
150. Zeigler J, Linck R & Wright DW. Heme aggregation inhibitors: antimalarial drugs targeting an essential biomineralization process. *Curr Med Chem* 2001; **8**: 171-189.
151. Zhu J, Krishnegowda G & Gowda DCh. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* 2005; **280**: 8617-8627.