



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Estudio de la influencia de *Taenia crassiceps* en la susceptibilidad a la infección por *Plasmodium yoelii* 17XL en un modelo murino de coinfección

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

Salazar Castañón Víctor Hugo

**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MIRIAM RODRIGUEZ SOSA**



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO 2011



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.

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Biomedicina de la Unidad de Biomedicina de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la (UNAM) Laboratorio 5, bajo la asesoría de la Dra. Miriam Rodríguez Sosa.

Bajo la revisión de:

Dra. Martha Legorreta Herrera

Dra. Elvia Manuela Gallegos Neyra

Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdes

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy

Este proyecto fue financiado en parte por PAPIT IN213009

Agradecimientos

La presente Tesis es un esfuerzo en el cual participaron grandes personas, las cuales, forman los principales cimientos de este proyecto.

Un agradecimiento especial a la Dra. Miriam Rodríguez Sosa, Directora de esta Tesis, ya que sin su apoyo y confianza esto no sería posible. Siempre le estaré agradecido.

A la doctora Martha Legorreta Herrera, por contribuir de manera importante en esta tesis, ya que sus observaciones moldearon el desarrollo de este proyecto.

A la M. en C. Imelda Juárez Avelar, por instruirme siempre con la mayor de las paciencias, con una gran sonrisa, porque gracias a sus atenciones se realizó esta obra.

A mis sinodales por la atención prestada a esta tesis:

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy

Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés

Dra. Miriam Rodríguez Sosa

Dra. Martha Legorreta Herrera

Dra. Elvia Manuela Gallegos Neyra.

A los compañeros del laboratorio de los cuales he aprendido.

Dedicatoria

A veces creo que jamás dejare de maravillarme por las cosas que la vida me dio, jamás dejare de agradecerle a dios; por los recuerdos que nunca olvidare, ya que a través de estos, puedo verme y sonreír. Jamás olvidare lo que me ha llevado a estar ahora aquí.

Hoy al mirar estas letras, siento que debería poder decir, todo lo necesario para agradecer a mi padre por todas sus palabras, todos sus detalles y aquellos consejos. Siempre desee ser el mejor hijo para ti, porque cada día y cada momento te he amado.

Este trabajo está inspirado y dedicado a mi madre, que siempre, en cada segundo de su vida, lo ha dado todos por nosotros; porque su dolor ha sido la más dura espina que nos ha dado la vida. Hoy madre mía mi mayor anhelo es verte feliz y darte todo, darte mi vida. Te amo, nada jamás en el mundo será tan grande para mí, que tu amor.

Le doy gracias a mis hermanos por todas las sonrisas y las cosas que vivimos juntos:

Para Sergio por darle luz a mis ojos, porque a través de eso, le diste esperanza a mi vida, me diste sueños y alegría.

Para Cesar por darme ese gran ejemplo, porque siempre quise ser como tú, eras mi ídolo; gracias por cuidarme en mis horas de agonía, por darle paz a mi dolor, al saber que al despertar estarías ahí, a un lado de la cama, con esa sonrisa discreta. Por ser el soporte de mis frágiles pasos, por todo tu amor.

Para Mario aunque parezca a veces distraído, muchas veces me has enseñado un lado dulce, amable y sé que sin ti, mi vida no sería igual, no tendría con quien competir, con quien reír. A pesar de lo distante de mis pasos, mi vida está completa y formada con los detalles de tu cariño.

A mis hermanos Carlos, Marcos.

Le doy gracias a la vida, al destino o a la suerte, por darme un ángel que siempre guio mis pasos, porque a través de tus ojos Samy, y de tus rezos hiciste de mí un gran hombre. Gracias por ser mi centro de gravedad, por sostener mis manos en cada caída, por enseñarme que no se deben enterrar burros. Cuando sentía tus brazos, podía sentir una fuerza que me impulsaba cada día a ser mejor, me hiciste feliz y trazaste el camino que me llevo aquí. Gracias por todo tu amor, tu cariño y comprensión. Tulio y tú siempre vivirán en mi corazón, serán mi sueño.

A mí amada familia: Zhaira, Erick, Marlene, Paty, Tania, Dafne, Ingrid, Rosario, Mauricio, Alejandro, Magaly, José; Porque a pesar de la distancia y el tiempo siempre están en mi mente y en mi corazón.

En especial para mí tía Norma, gracias por enseñarme que la vida puede ser, por tu confianza, por ser mi modelo a seguir; porque tus pasos guiaron mi camino, y en tus cartas encontré consuelo a las duras pruebas que me dio la vida. Ni con toda mi vida podre agradecerte todo lo que has hecho por mí. Gracias por hacer de mi vida alguien mejor, esta tesis es tuya.

A mí querida abuelita rosario. La vida puede ser mil cosas, a veces momentos, a veces sueños, sé que no podré decirte o explicarte que siento por ti. Me gustaría que todo fuese como ayer, cuando escuchaba tus palabras, quizás nunca bastaran los momentos para detenerme, ver el cielo, pensar en ti y dedicarte mis plegarias. Porque aun hoy, sigues bendiciendo mi vida, con tus recuerdos.

Para mis inseparables amigos: Daniel, Fernando, Filorio, Israel, Aarón y Víctor, por que junto a ustedes crecí, viví los mejores tiempos, las cosas que día a día nos hicieron unirnos y reír juntos, porque más que amigos son mi sangre.

Para mis grandes amigos Fernando, Michele, Carolina, Richard, Williams, Rox, Sil, Yuli, Fany, etc. Por las grandes emociones y alegrías que vivimos juntos a través de la carrera, por ser una parte importante en esta etapa de mi vida. Los quiero mucho y espero tenerlos siempre cerca.

A Shantal, Pamela, Jael y Fátima por hacer los días de la universidad más felices y simples, porque su amistad y cariño, alegraron los pesados días de trabajo, porque a pesar de las distancia siempre recordare su ternura y deseare lo mejor para ustedes. Las quiero mucho y siempre las recordare. Ojala la vida nunca separe nuestros caminos.

En memoria de:

María del Rosario de la Peña y Salas Puente
Siempre estás en mi corazón, en cada paso que doy

Eloisa Dafne Salazar de la Peña
Gracias por tu amor, te extrañare

Tulio

CONTENIDO

	Pág.
CONTENIDO	VI
ABREVIATURAS	VIII
ÍNDICE DE TABLAS FIGURAS	IX
RESUMEN	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Inmunidad innata o natural.....	1
1.1.1 Inmunidad adaptativa o específica.....	2
1.2 Infecciones parasitarias.....	4
1.2.1 Malaria.....	5
1.2.1.1 Ciclo de vida.....	6
1.2.1.2 Cuadro clínico de la enfermedad.....	9
1.2.1.3 Distribución mundial.....	9
1.2.1.4 Modelos animales en la malaria.....	11
1.2.1.5 Respuesta inmune a malaria.....	12
1.2.2 Helmintos.....	18
1.2.2.1 Cisticercosis.....	18
1.2.2.2 Ciclo de vida de <i>Taenia crassiceps</i>	21
1.2.2.3 Respuesta inmune a helmintos.....	22
1.2.2.4 Respuesta inmune a <i>T. crassiceps</i>	23
1.3 Coinfección.....	24
1.4 Factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF).....	27
2 JUSTIFICACIÓN	27
3 OBJETIVOS	28
3.1 Objetivos general y particulares.....	28
4 METODOLOGÍA	29
4.1 Animales.....	29
4.2 Parásito.....	29
4.3 Infección y coinfección con <i>Taenia crassiceps</i> <i>Plasmodium yoelii</i> 17XL.....	29
4.4 Sobrevida.....	29
4.5 Obtención del suero.....	29
4.6 Cinética de parasitemia.....	30
4.7 Cuantificación de hemoglobina.....	30
4.8 Detección y evaluación de citocinas.....	30
5 RESULTADOS	31

5.1 Sobrevida.....	31
5.2 Parasitemia.....	32
5.3 Pérdida de peso.....	34
5.4 Cuantificación de hemoglobina.....	35
5.5 Citocinas en suero.....	38
5.5.1 Citocinas proinflamatorias.....	38
5.5.2 Citocinas antiinflamatorias.....	44
6. DISCUSIÓN	52
7. CONCLUSIONES	64
8. BIBLIOGRAFÍA	65
9. APÉNDICE	72

Abreviaturas

Abreviaturas	Significado
AAMΦ	Macrófagos alternativamente activados
BSA	Suero fetal bovino
CD4 ⁺	Células T cooperadoras
Cist	Cisticerco
CM	Malaria cerebral
CPAs	Células presentadoras de antígenos
CSP-2	Proteína de la superficie del esporozoito 2
CTL o CD8	CTL o CD8 Linfocitos T citotóxicos
DCs	Células dendríticas.
ECM	Malaria cerebral experimental
ELISA	Ensayo inmuno enzimático
GPI	Glicosilfosfatidinositol
Hb	Hemoglobina
i.p.	Intraperitoneal
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL-	Interleucina
LSA	Antígenos específicos del estadio hepático
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MIF	Factor inhibidor de la migración de macrófagos
MIF-/-	Ratones deficientes del gen MIF(knock-out)
MSP1	Proteína de la superficie del merozoito 1
MyD88	Proteína 88 de la respuesta primaria de la diferenciación de mieloides
Mφ	Macrófago
ND	No detectado
NK.	Células asesinas naturales
NTD	Enfermedades tropicales negligente
<i>P.</i>	<i>Plasmodium</i>
PAPMs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Buffer de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PRRs	Patrones de reconocimiento de receptores
RBC	Glóbulos Rojos
SMA	Anemia severa malaria
<i>T</i>	<i>Taenia</i>
TB	Tuberculosis
TcES	Antígenos excretados/secretados: <i>T. crassiceps</i>
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
Th1	Linfocito TCD4 ⁺ de tipo 1 (promueve respuestas inmunes proinflamatorias)
Th2	Linfocito TCD4 ⁺ de tipo 1 (promueve respuestas inmunes antiinflamatorias y producción de anticuerpos)
TLRs	Receptores tipo toll
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa

INDICE DE FIGURAS Y CUADROS

Figura	Pág
1.- Ciclo biológico de la malaria	8
2.- Síntomas de la malaria	9
3.- Distribución espacial de <i>P. falciparum</i>	10
4.- Áreas con trasmisión de malaria en México	11
5.- Diagrama que ilustra el posible mecanismo de la inmunidad en ratones infectados con <i>Plasmodium</i> .	17
6.- Fotografías (a) Cisticercosis humana , (b) Neurocisticercosis humana y (c) Músculo esquelético de cerdo con presencia de cisticercos.	19
7.- Fotografía del Adulto de <i>Taenia crassiceps</i>	20
8.- Ciclo de vida de <i>T. crassiceps</i>	21
9.- Fotografía de a) Escólex de céstodos b) Proglotidos de cestodos	22
10.- Porcentajes de sobrevivencia de ratones infectados con <i>Plasmodium</i> comparada con la de ratones coinfectados con <i>P. yoelii</i> - <i>T. crassiceps</i>	32
11.- Curso de la parasitemia en la infección de <i>Plasmodium</i> en ratones hembras BALB/c infectados con <i>P. yoelii</i> 17XL en comparación con ratones coinfectados con <i>P. yoelii</i> - <i>T. crassiceps</i>	33
12.- Porcentajes de peso ganado o perdido en ratones hembras BALB/c infectadas con <i>P. yoelii</i> 17XL comparado con el de ratones coinfectados con <i>P. yoelii</i> - <i>T. crassiceps</i> .	35
13.- Concentración de hemoglobina en ratones hembras BALB/c infectados con <i>P. yoelii</i> 17XL en comparación con ratones coinfectados con <i>P. yoelii</i> - <i>T. crassiceps</i> .	36
14.-. A) Niveles de MIF en suero a los 7 días post-infección con <i>P. yoelii</i> 17XL en ratones BALB/c comparados con el grupo de ratones coinfectados con <i>P. yoelii</i> - <i>T. crassiceps</i> . B) Niveles de MIF en suero de ratones BALB/c durante la infección con <i>T. crassiceps</i>	37
15.- Niveles de TNF- α en suero de ratones BALB/c infectadas con <i>P. yoelii</i> 17XL en comparación con ratones coinfectados con <i>P. yoelii</i> - <i>T. crassiceps</i>	39
16.- Niveles de IL-1 β en suero de ratones BALB/c infectadas con <i>P. yoelii</i> 17XL en comparación con ratones coinfectados con <i>P. yoelii</i> - <i>T. crassiceps</i>	

17.- Niveles de IL-12 en suero de ratones BALB/c infectadas con <i>P. yoelii</i>	41
17XL en comparación con ratones coinfectados con <i>P. yoelii</i> - <i>T. crassiceps</i>	42
18.- Niveles de IFN- γ en suero de ratones BALB/c infectadas con <i>P. yoelii</i>	
17XL en comparación con ratones coinfectados con <i>P. yoelii</i> - <i>T. crassiceps</i>	44
19.- Niveles de IL-10 en suero de ratones BALB/c infectadas con <i>P. yoelii</i>	
17XL en comparación con ratones coinfectados con <i>P. yoelii</i> - <i>T. crassiceps</i>	45
20.- Niveles de IL-4 en suero de ratones BALB/c infectadas con <i>P. yoelii</i>	
17XL en comparación con ratones coinfectados con <i>P. yoelii</i> - <i>T. crassiceps</i> .	47
21.- Niveles de expresión de transcritos de mRNA del gen YM-1 de bazo en ratones BALB/c infectados con <i>P. yoelii</i> en comparación con ratones coinfectados con <i>P. yoelii</i> - <i>T. crassiceps</i> .	48
22.- Niveles de expresión de transcritos de mRNA del gen FIZZ-1 de bazo en ratones BALB/c infectados con <i>P. yoelii</i> en comparación con ratones coinfectados con <i>P. yoelii</i> - <i>T. crassiceps</i> .	49
23.- Niveles de expresión de transcritos de mRNA del gen T.bet de bazo en ratones BALB/c infectados con <i>P. yoelii</i> en comparación con ratones coinfectados con <i>P. yoelii</i> - <i>T. crassiceps</i> .	50
24.- Niveles de expresión de transcritos de mRNA del gen GATA-3 de bazo en ratones BALB/c infectados con <i>P. yoelii</i> en comparación con ratones coinfectados con <i>P. yoelii</i> - <i>T. crassiceps</i> .	51
Cuadro 1.- Taxonomía de <i>Plasmodium</i>	5
Cuadro 2.- Especies de <i>Plasmodium</i> que causa la malaria humana	6
Cuadro 3.- Especies de <i>Plasmodium</i> que causan la malaria en ratones	12
Cuadro 4.- Coinfecciones helmintos-malaria	26

RESUMEN

La malaria es uno de los principales problemas de salud mundial, actualmente existen entre 300 y 500 millones de casos clínicos al año a escala mundial y representa de 0.7 a 2 millones de muertes al año. Aproximadamente el 40 % de la población mundial está expuesta a esta infección, que es causada por un protozoo del género *Plasmodium*. De manera importante la gente que vive en áreas endémicas de malaria, están afectados típicamente por la pobreza con frecuencia se exponen a otros patógenos, como helmintos que representan una causa común de enfermedad. Entender la respuesta inmune del hospedero a la malaria es crucial para el diseño y la implementación de nuevas vacunas efectivas contra *Plasmodium*. En este trabajo ratones BALB/c se infectaron con 10^3 eritrocitos parasitados con *Plasmodium yoelii* 17XL vía intravenosa y se compararon con grupos de ratones que previamente se habían infectado con *Taenia crassiceps* por dos u ocho semanas respectivamente. Los ratones infectados con *P. yoelii* presentaron una disminución en las concentraciones de IL-12p40, así como una sobreproducción de IFN- γ lo cual está asociado con la rápida inducción en la letalidad en la infección. Mientras que la presencia previa del helminto tuvo un efecto sinérgico en la síntesis de citocinas pro y antiinflamatorias, lo cual genero un efecto protector, aumentando la sobrevivencia, disminuyendo la parasitemia, la caquexia (pérdida de peso) y la anemia.

Nuestros resultados indican que la presencia del helminto *Taenia crassiceps* tuvo un profundo efecto en la respuesta inmune contra el parásito de la malaria y afectó el curso de la infección. Los cambios inmunológicos generados por la infección crónica por *T. crassiceps* modificaron la respuesta inmune contra de *P. yoelii* 17XL: se generó una respuesta inmune con niveles incrementados de IL-4, IL-10 e IL-12. La coexistencia de un perfil mixto de citocinas Th1/Th2, junto con macrófagos alternativamente activados podría dirigir el curso de la respuesta inmune.

Palabras claves: *Plasmodium*, *Taenia*, Coinfección, malaria, helminto.

1. INTRODUCCIÓN

El cuerpo está protegido contra agentes infecciosos y la protección es mediada por diversas células y moléculas efectoras en contra de moléculas extrañas y/o perjudiciales, todo esto constituye buena parte del sistema inmune [1]. Los mecanismos de protección son diversos. Algunos incluyen la inmunidad innata o natural y la inmunidad adaptativa [2].

1.1 Inmunidad innata o natural

Representa la primera línea de defensa contra los microorganismos. Los principales componentes que la conforman son: 1) barreras físicas y químicas como epitelios y sustancias antimicrobianas producidas en la superficie epitelial; 2) proteínas sanguíneas como el sistema de complemento y otros mediadores de la inflamación; y 3) células fagocíticas (neutrófilos , macrófagos) y otros leucocitos como las células NK [2].

El sistema de la inmunidad innata también tiene la habilidad de discriminar entre lo propio y los patógenos a través de patrones de reconocimiento de receptores (PRRs), estos receptores reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), los cuales son moléculas conservadas compartidas en varios microorganismos patógenos [3]. Los PRRs mejor caracterizados son los receptores tipo toll (TLRs). Estos se localizan en el plasma o membranas endoplásmicas y poseen una sensibilidad específica a componentes microbianos, tales como estructuras de ácidos nucleicos, componentes de las paredes microbianas y proteínas estructurales[3].

La inmunidad innata también actúa reclutando respuestas antígeno-específicas, no sólo atrayendo células al sitio de infección, también en la presentación de antígenos por las células dendríticas (DC) que transportan antígenos al tejido linfóide para activar respuestas inmunes primarias; en la producción de citocinas que pueden regular la respuesta inmune a través de cascadas de señalización, así como la activación del sistemas de complemento para lisis de los patógenos.

La patogenicidad de los microorganismos está relacionada con la capacidad que tienen para resistir a los mecanismos de la inmunidad innata. Varios hallazgos indican que la inmunidad innata controla la activación de la inmunidad adaptativa.

1.1.1 Inmunidad adaptativa o específica.

Esta inmunidad se desarrolla como una respuesta a la infección, esta es estimulada tras la exposición a agentes infecciosos, su intensidad y capacidad defensiva aumentan después de la anterior exposición a un determinado microorganismo.

Las características de la inmunidad adaptativa son: 1) especificidad para moléculas diferentes; 2) especialización, que le capacita para responder a diferentes tipos de microorganismos; y 3) capacidad para recordar y responder con más fuerza tras exposiciones repetidas al mismo microorganismo.

Los componentes de la inmunidad específica son los linfocitos y sus productos, entre ellos están los anticuerpos. Los antígenos son sustancias extrañas que inducen respuestas inmunitarias específicas o son dianas de tales respuestas; la respuesta inmunitaria es específica para esos antígenos [2].

Las respuestas inmunitarias específicas se clasifican en dos tipos, según el componente del sistema inmune que participa en la respuesta.

- I. **Inmunidad humoral** en la que participan moléculas contenidas en sangre que reconocen a los antígenos, estas moléculas se denominan anticuerpos y los linfocitos B las producen.
- II. **Inmunidad celular**, participan células llamadas linfocitos T.

La inmunidad humoral es el principal mecanismo de defensa contra los microorganismos extracelulares y sus toxinas [2]. Mientras que los microorganismos intracelulares como los virus y algunas bacterias sobreviven y proliferan dentro de los fagocitos y otras células huéspedes donde son inaccesibles para los anticuerpos circundantes. Así, la defensa contra este tipo de infecciones se da por la inmunidad mediada por células [2].

Los linfocitos T se subdividen en: 1) linfocitos T citotóxicos (CTL) o $CD8^+$, que son los encargados de eliminar células infectadas o posibles células tumorales, y 2) linfocitos T cooperadores (helper) $CD4^+$. Esta clasificación se hizo con base al perfil de citocinas que secretan, las células T $CD4^+$ mismas que pueden diferenciarse hacia los subtipos Th1 y Th2. Las células Th1 secretan IL-2, IFN- γ , TNF- α , linfoxina, entre otros, y participan en la generación de la inmunidad celular.

Las células Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 etc. participan en la inmunidad humoral [4, 5]. Estas células efectoras diferenciadas son las armas del sistema inmune que responden rápida y eficazmente contra los patógenos que se han detectado antes y tienen la capacidad de la expansión de clones de linfocitos específicos a esos antígenos.

Los factores que gobiernan la diferenciación ó la reactivación de las células Th1 y Th2 son cruciales, como las células presentadoras de antígenos (APC), las citocinas proTh1 y proTh2, y la expresión de moléculas coestimuladoras que pueden influenciar la activación de las células Th1 y Th2 [6].

Muchos de los diferentes subtipos de células Th se regulan de manera negativa entre sí, de modo que la activación del subtipo Th1 inhibe la activación del subtipo Th2 y viceversa. Así la respuesta inmune a diferentes tipos de infecciones tiende a ser dominada por un subtipo Th sobre el otro [7].

Las células dendríticas (DC) proveen una unión crítica entre la respuesta inmune innata y la adaptativa, se especializan en tomar, procesar y presentar antígenos derivados de los patógenos, maduran y migran hacia un órgano linfoide secundario, donde presentan el antígeno y estimulan a las células T [8]. La maduración de las DC influyen la diferenciación de las células $CD4^+$ hacia Th1 o Th2 [9]. Éstas no son las únicas células presentadoras de antígenos (APC) que pueden activar a las

células TCD4+ vírgenes, también las células B y los macrófagos juegan un papel crítico en la respuesta inmune [10].

La respuesta inmune innata y específica forman un sistema integrado de defensa en el huésped en el que existe una cooperación funcional de numerosas células y moléculas.

1.2 Infecciones parasitarias.

Este tipo de infecciones son aquellas ocasionadas por: protozoos, helmintos, nemátodos, artrópodos, etc.; los cuales son responsables de una mayor morbilidad y mortalidad que cualquier otra clase de microorganismos infecciosos. La persistencia de éstos parásitos en el huésped humano también da lugar a reacciones inmunológicas crónicas que pueden originar lesiones en los tejidos, así como alteraciones en la regulación inmunitaria.

Se estima que las infecciones por helmintos (nemátodos, tremátodos y céstodos) afectan a más de un cuarto de la población mundial (aproximadamente 1.5 mil millones de personas) [11], mientras que las infecciones por parásitos protozoos son uno de los mayores problemas de salud pública mundial y afectan de 0.5 a 1 billón de personas en todo el mundo, provocando enfermedades como la leishmaniosis, tripanosomiosis, malaria y toxoplasmosis, entre otras [12].

El siglo XX ha sido testigo de la más grande lucha contra enfermedades infecciosas alrededor del mundo. Además de las campañas para reducir o eliminar las amenazas planteadas por la polio, difteria, sarampión, tétanos, hepatitis B y lepra. La capacidad de control de contra éstas enfermedades ha sido grande; Sin embargo, otras enfermedades infecciosas (las más notablemente el virus de inmunodeficiencia humana adquirida (VIH), tuberculosis (TB) y la malaria) constituyen barreras al progreso de la salud global [13].

La malaria representa uno de los mayores retos a la salud pública mundial, el parásito ha resistido todos los esfuerzos para su control, aún cuando Laveran lo detectó microscópicamente hace más de 120 años por primera vez [14].

1.2.1 Malaria

La malaria es una enfermedad causada por un protozoo parásito (cuadro 1) del género *Plasmodium*, el cual infecta y destruye los glóbulos rojos (RBC del inglés “Red Blood cells”) [15, 16]. La malaria humana se origina por la infección con una de las 4 especies del género *Plasmodium* (cuadro 2), el parásito se transmite por la picadura de mosquitos hembras *Anopheles* infectados.

Domino	Eukaryota	Whittaker & Margulis, 1978
Reino	Protozoa	Owen
Phylum	Apicomplexa	Levine, 1970
Clase	Aconoidasida	Melhorner, Peters y Haeikorn, 1980
Orden	Haemosporidae	Danieleswski, 1985
Familia	Plasmodiidae	Mesnil 1903
Género	<i>Plasmodium</i>	Marchiaffa y Celli, 1885

Cuadro 1. Taxonomía

Plasmodios	Características
<i>Plasmodium falciparum</i> Welch, 1897	Causante de la forma de malaria más severa. Genera infecciones crónicas, pero no se desarrolla la forma de hipnozoito (estadio que permanece en latencia (dormido) y persiste en el hepatocito, por lo que no se presentan recaídas. Puede ser fatal.
<i>Plasmodium vivax</i> Grassi & Feletti, 1890	El mayor causante de la malaria clínica. Se desarrolla la forma de hipnozoito y pueden presentarse recaídas muchos años después de una aparente cura. Rara vez es fatal.
<i>Plasmodium malariae</i> Laveran, 1881	Casos poco frecuentes causante de la malaria clínica, especialmente en África. Las infecciones sin tratamiento pueden persistir en niveles bajos de parasitemia por varias décadas.
<i>Plasmodium ovale</i> Stephens, 1922	Existen pocos casos y son causantes de una malaria clínica moderada. Se puede detectar en infecciones mixtas con otras especies. Se desarrollan hipnozoitos y pueden existir recaídas

Cuadro 2. Especies de *Plasmodium* que causa la malaria humana.

Plasmodium falciparum es la especie que ocasiona mayor mortalidad, a pesar de que se han hecho muchos esfuerzos para controlar a éste patógeno, actualmente existen entre 300 y 500 millones de casos clínicos anuales a escala mundial y representa de 0.7 a 2 millones de muertes al año [15, 17, 18]. En México, *Plasmodium vivax* es responsable de poco más del 99% de los casos de malaria [19].

1.2.1.1 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Plasmodium* atraviesa varias etapas de desarrollo en el huésped vertebrado (esporozóitos, etapas asexuales exoeritrocítica e intraeritrocítica y gametocitos) y otras más en el invertebrado (gametos, cigoto, oocisto, oocineto y esporozoito), cada etapa expresa proteínas específicas, por lo que su estudio se vuelve complejo [20].

La infección en el humano comienza cuando la hembra del mosquito del género *Anopheles* inyecta los esporozóitos a través de la saliva durante la hematofagia. Los

esporozoitos viajan al hígado e invaden los hepatocitos (típicamente de 1 a 10 en número) se desarrollan por un período de aproximadamente una semana en un esquizonte exoeritrocítico que contiene aproximadamente 30,000 merozoítos; dos de las cuatro especies que infectan al hombre (*P. vivax* y *P. ovale*) pueden desarrollar hipnozoitos (que puede provocar re-infecciones meses o años más tarde), pero en el caso de *P. falciparum*, no desarrolla esta forma inactiva, los merozoitos se liberan de los hepatocitos infectados, invaden a otros hepatocitos o a los eritrocitos. Allí sigue un ciclo de 48 horas durante el cual el merozoito invasor se desarrolla en un trofozoito de anillo, trofozoito maduro, y finalmente en un esquizonte, que da lugar a aproximadamente 16 nuevos merozoítos (ésto ocurre dentro de una vacuola parasitófora en el eritrocito) se liberan e infectan nuevos eritrocitos. El ciclo de vida en el humano se completa al desarrollarse las formas sexuales (gametocitos) en los eritrocitos. La reproducción esporogónica se lleva a cabo en la hembra *Anopheles* que ingiere los parásitos durante la hematofagia de personas infectadas, los gametocitos pasan por el tubo digestivo, ya en el estómago del mosquito por condiciones de baja temperatura, los gametos surgen de los eritrocitos infectados en donde ocurre el proceso de exflagelación del gameto masculino, la fertilización del gameto da lugar a los ooquinetos que atraviesan la pared intestinal, y se transforma en ooquiste que contienen esporozoitos inmaduros, en la ruptura del ooquiste se liberan y se diseminan dentro del cuerpo del vector, viajan a las glándulas salivales del mosquito, vía por la cual se inoculan los esporozoítos en la próxima alimentación del mosquito, dando inicio de nuevo al ciclo de vida (Fig. 1).

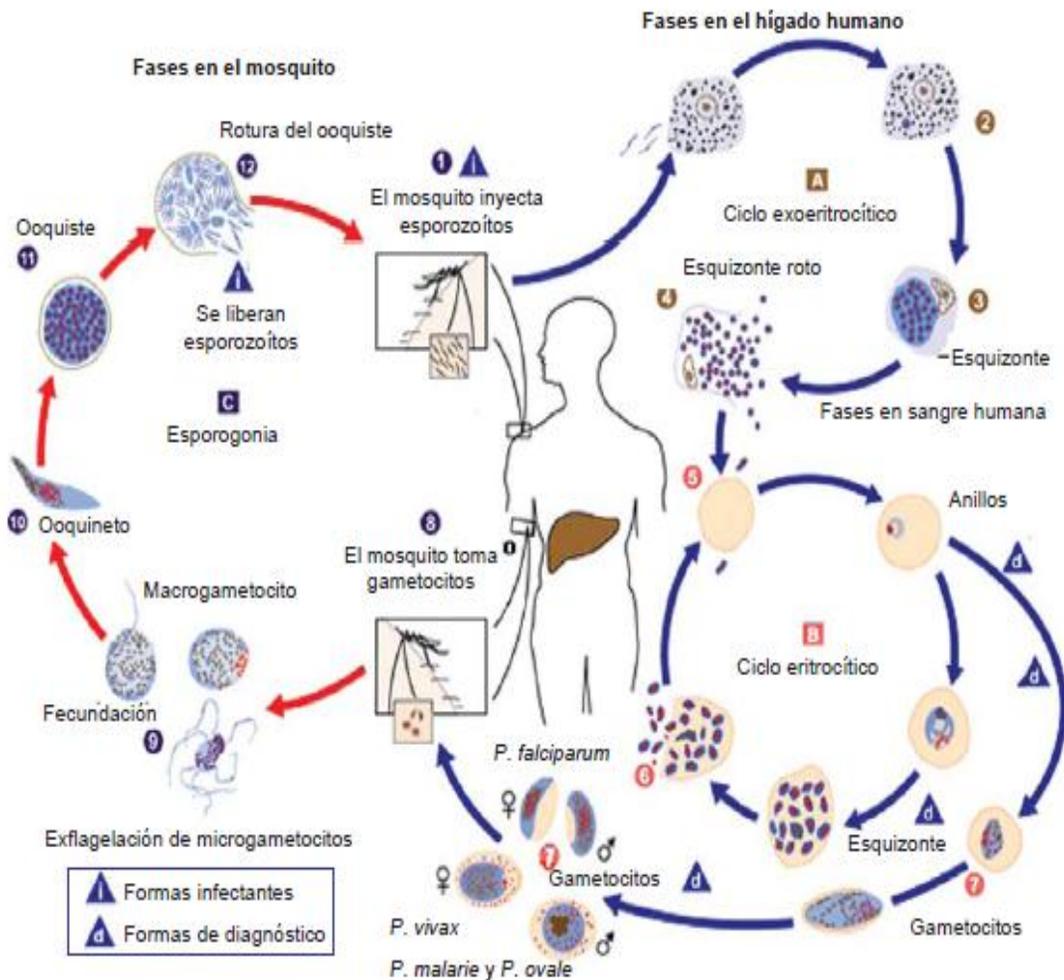


Figura. 1. Ciclo biológico de la malaria. *Plasmodium*. En el proceso de hematofagia la hembra de mosquito *Anopheles* inocula los esporozoítos en el hombre (1). Los esporozoítos infectan a las células hepáticas (2) y se multiplican por esquizogonia (3) dando lugar a la formación de merozoítos (4). Después de esta multiplicación en el hígado (esquizogonia exoeritrocítica) (A), el parásito invade los glóbulos rojos y se reproduce por esquizogonia (esquizogonia eritrocítica) (B). Los merozoítos invaden los glóbulos rojos (5). Los trofozoítos anulares se convierten en esquizontes que darán lugar a nuevos merozoítos (6). Algunos parásitos se diferencian sexualmente (gametocitos) (7). Los gametocitos masculinos (microgametocitos) y femeninos (macrogametocitos) son ingeridos por un mosquito *Anopheles* durante la hematofagia (8). La multiplicación del parásito en el mosquito se conoce como ciclo esporogónico (C). Los microgametos fecundan los macrogametos y se desarrollan los cigotos (9). El cigoto se convierte en ooquinetto móvil (10), invade la pared del intestino y se convierte en ooquiste (11). El ooquiste desarrolla en su interior esporozoítos (12), que una vez liberados ascienden a las glándulas salivales. La inoculación de los esporozoítos en un nuevo hospedador perpetúa el ciclo de la malaria (1).

1.2.1.2 Cuadro clínico de malaria.

Los síntomas característicos son: fiebre, escalofríos, sudoración, cefalea y mialgias. Con menor frecuencia, dolores abdominales, vómito y diarrea. Éstos pueden escalar rápidamente hacia una malaria severa, desarrollándose: malaria cerebral, falla renal, falla hepática, anemia grave, trombocitopenia y edema pulmonar, entre otras (Fig. 2) [14, 21].



Figura. 2. Síntomas de la malaria

Las principales amenazas clínicas para los pacientes con malaria son la malaria cerebral y la anemia. La malaria cerebral es la mayor causa de muerte en los individuos infectados con *P. falciparum*. Se estima que entre el 10 al 20% de las personas que se infectan mueren y una gran proporción de sobrevivientes sufren daño neuronal permanente [22]. La patogénesis de la anemia por *P. falciparum* es compleja y multifactorial y no se conoce completamente, a pesar de ser la principal causa de muerte en las regiones con alta endemicidad [15].

1.2.1.3 Distribución mundial

Aproximadamente el 40 % de la población mundial está expuesta a la malaria. África Subsahariana presenta la mayor incidencia de malaria [18]. A finales de 2004, 107 países tenían zonas de riesgo de transmisión de malaria, de los cuales 21 pertenecen a América Latina, entre ellos México, en donde hasta la mitad del siglo pasado, la malaria se encontraba entre las cinco principales causas de muerte [23]. Existen alrededor de 1.38 mil millones de individuos en riesgo de ser infectados con malaria, de los cuales 0.69 mil millones se encuentran en Centro y Sureste asiático, 0.66 mil millones en África, Yemen, Arabia Saudita, y 0.04 mil millones en América.

Todos expuestos a un riesgo estable de acuerdo a los niveles endémicos del parásito (Fig. 3) [24].

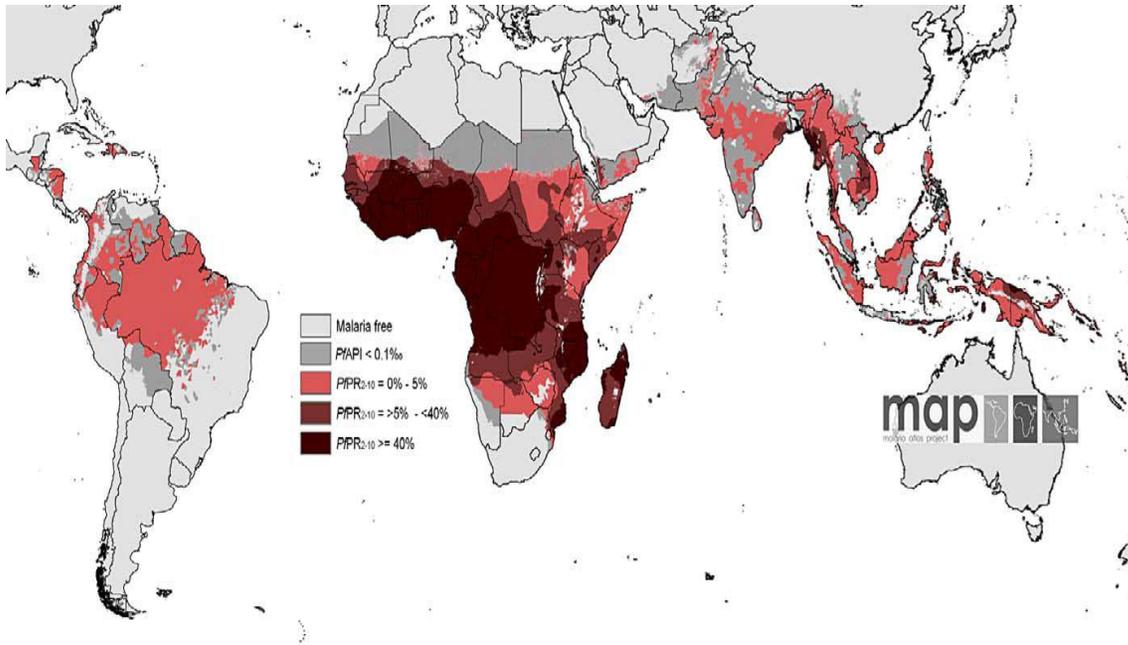


Figura 3. Distribución espacial de *P. falciparum*, malaria de acuerdo a los niveles endémicos. Imagen tomada de Hay, Guerra et al. 2009.

En México las áreas de alto riesgo comprenden a los estados de Chiapas, Tabasco, Campeche, Quintana Roo, Sinaloa, Chihuahua, Durango y Sonora. En el año 2004, se reportaron 3,406 casos, de los cuales 98.5% correspondió a *P. vivax* y sólo el 1.5% a *P. falciparum* (Fig. 4).

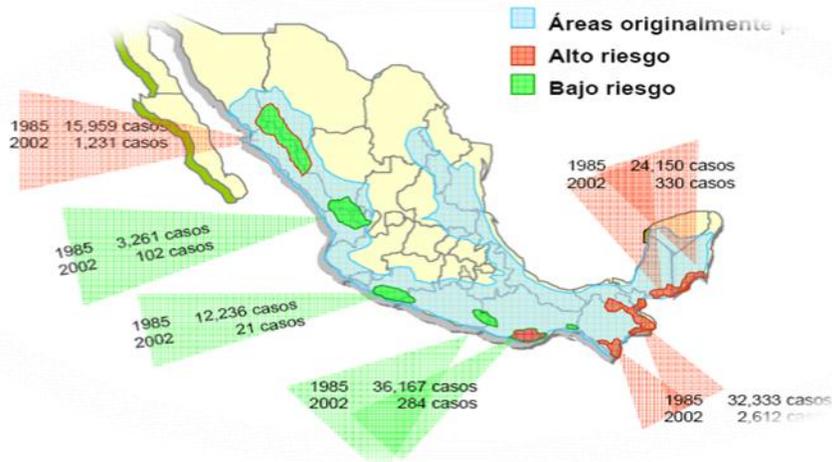


Figura 4. Áreas con transmisión de malaria en México, 1985-2003. El 58 % del territorio corresponde a zonas de alto riesgo potencial de malaria y el 33% de la población habita en ellas. (imagen tomada de: Regional program of action and demonstration of sustainable alternatives for malaria vector control without the use of DDT in Mexico and central América , 2008).

Para poder tener un mejor entendimiento de la malaria humana se han utilizado modelos experimentales en animales, debido a la dificultad que implica interpretar estudios *in vitro*, en las que no están presentes todos los factores involucrados en la patología, en particular para el estudio del sistema inmune. Además para la mayoría de los experimentos no es ético o práctico el uso de pacientes humanos.

1.2.1.4 Modelos animales empleados para el estudio de la malaria

En los modelos experimentales no se pueden reproducir todas las características de la enfermedad en el huésped humano, sin embargo la similitud de la respuesta inmune en ratones y humanos justifica el uso de modelos murinos en los estudios experimentales de malaria [25]. Varias combinaciones de especies de *Plasmodium* y cepas de ratones se han utilizado para mimetizar la respuesta inmune de malaria en humanos (cuadro 3).

Plasmodio	Aplicación
<i>P. chabaudi</i>	<i>P. chabaudi chabaudi</i> AS: se ha utilizado en el estudio de los mecanismos inmunes y la inmunoregulación de las citocinas, además, también se ha utilizado para identificar la susceptibilidad. Causa una infección no letal en cepas de ratones resistentes y letal en cepas susceptibles <i>P. chabaudi adami</i> : Causa una infección letal media
<i>P. berghei</i>	<i>P. berghei</i> ANKA y <i>P. berghei</i> K173. Se han utilizado en estudios de patogénesis. <i>P. berghei</i> ANKA sirve de modelo experimental de la malaria cerebral (ECM), de la variación genética en el desarrollo de ECM entre los ratones, el cual se ha asociado con la producción de citocinas pro-inflamatorias.
<i>P. yoelii</i>	<i>P. yoelii</i> 17 XL, <i>P. yoelii</i> 17XNL y <i>P. yoelii</i> YM se ha utilizado en estudios de los mecanismos inmunes y de la patogénesis incluyendo ECM. <i>P. yoelii</i> 17XL se ha utilizado en la identificación de posibles vacunas
<i>P. vinckei</i>	<i>P. vinckei vinckei</i> : el cual causa infecciones letales, se utiliza para estudiar la patogénesis y la quimioterapia. <i>P. vinckei petteri</i> : el cual causa infecciones no letales y se ha utilizado para estudiar los mecanismos de la respuesta inmune.

Cuadro 3. Especies de *Plasmodium* que causan la malaria en ratones.

1.2.1.5 Respuesta inmune a la malaria

La respuesta inmune hacia la malaria es compleja y poco entendida; la respuesta que se desarrolla hacia los parásitos depende de la especie así como del estadio específico dentro del huésped [26].

La eficiencia de la respuesta inmune parece requerir de una respuesta humoral y una respuesta inmune celular, probablemente en cooperación, aunque la importancia de cada una no es del todo clara.

La utilización de modelos murinos ha contribuido a establecer algunos mecanismos de resistencia a la infección por *Plasmodium*. La respuesta inmune más estudiada en modelos murinos es la desencadenada por la infección con *P. chabaudi chabaudi* la cual puede resultar en una infección no letal en cepas de ratones BALB/c, C57BL/6 y una infección letal en cepas de ratones A/J y DBA/2 [27]. La infección en ratones con *P. chabaudi* se caracteriza por una rápida y marcada respuesta inflamatoria, con producción de IL-12, TNF- α e IFN- γ .

El ciclo de vida de este parásito atraviesa dos etapas principales, la que se presenta en el hígado (etapa exoeritrocítica) y la que se presenta en la sangre (intraeritrocítica), cada una, con una respuesta inmune específica para cada estadio del parásito.

Etapa exoeritrocítica: La inmunidad contra los esporozoítos depende de los anticuerpos contra proteínas de superficie, como la proteína de superficie del esporozoíto (CSP-2) [28] y contra antígenos específicos del estadio hepático (LSA); éstos antígenos inducen la producción de anticuerpos que neutralizan o bloquean la invasión de los hepatocitos [29]. Una vez que los esporozoitos han entrado al hepatocito la forma de inmunidad que predomina es la inmunidad celular.

Se ha demostrado que la eliminación exo-eritrocítica del parásito en ratones requiere principalmente de las células TCD8⁺ [30], de las células asesinas naturales (NK), NKT [27] y de las células T $\gamma\delta$ que producen IFN- γ para eliminar a los hepatocitos infectados [29].

Etapa eritrocítica. El parásito altera dramáticamente la fisiología y los procesos bioquímicos de los eritrocitos de su hospedero y expresa en su superficie moléculas codificadas por el parásito que más tarde afectará la movilidad de los eritrocitos y el tráfico dentro del cuerpo. La biomasa del parásito se incrementa rápidamente y activa los mecanismos de la inmunidad innata, incluyendo las NK y las células T $\gamma\delta$ [14].

Diversas evidencias indican que la inmunidad innata tiene un papel crucial en la generación de una respuesta protectora contra la malaria (Fig. 5). En ausencia de las células NK los picos de parasitemia son elevados durante una infección aguda con *P. chabaudi* [31]. Se ha observado que una producción temprana de IFN- γ por las células NK, puede resolver la infección en ratones infectados con varias especies de *Plasmodium* [31]. Con diferentes cepas de ratón en combinación con diferentes

cepas de *Plasmodium*, muestran claramente que la ausencia de IFN- γ , minimiza la capacidad de los ratones para controlar y eliminar los parásitos [32].

Las células T $\gamma\delta$ se expanden durante la infección, pero no son esenciales para la resolución de esta. En su ausencia la parasitemia se prolonga y cuando están presentes, se retrasa por algunos días.

Los macrófagos juegan un papel crítico en la inmunidad innata contra la malaria por su habilidad de fagocitar eritrocitos parasitados (pRBC) en ausencia de anticuerpos citolíticos específicos para el parásito o por opsonización de éstos. En la inmunidad adaptativa, por el estímulo con IFN- γ , los macrófagos funcionan como células efectoras que pueden, mediante anticuerpos dependientes, inhibir células o producir moléculas contra el anti-parásito [30].

Las DC se activan *in vivo* en el bazo, procesan y presentan los antígenos de la malaria durante la infección, originando citocinas que contribuyen a la polarización de la respuesta de las células TCD4⁺. Las DC fagocitan a los eritrocitos infectados y presentan los péptidos de las proteínas del parásito en un contexto de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC)-II [27], los antígenos estimulan el incremento en la expresión de moléculas coestimuladoras en DC y estas inducen la producción de citocinas proinflamatorias como IL-12, TNF- α e IL-6 [27].

Al parecer, la activación de las DC de murinos requiere el reconocimiento, a través de TLR9/MyD88, de un pigmento del parásito (hemozoina). La respuesta a la activación por ésta vía da como resultado la producción de citocinas como IL-12p40, TNF- α , e IL-6. De manera interesante, la hemozoina también es un inductor de la activación de los macrófagos vía ERK1/2, NF- κ B [33, 34].

Los anticuerpos y las células T juegan un papel importante en la protección inmune contra los parásitos de la malaria. Los anticuerpos específicos contra los merozoítos opsonizan a los merozoítos o inhiben la invasión de los RBC por los

parásitos, los anticuerpos opsonizan a los pRBCs, fagocitan o bloquean la adhesión de los RBC al endotelio vascular. De igual manera el TNF- α y el IFN- γ activa a los macrófagos para que fagociten [9] y eliminen a los pRBCs y a los merozoitos, los anticuerpos anti-glicosilfosfatidinositol (GPI) neutralizan las toxinas del parásito [29]. Los principales anticuerpos involucrados en la eliminación del parásito son principalmente las subclases de IgG del tipo citofílico (IgG1 y IgG3) [35].

Las células TCD4⁺ actúan como células colaboradoras (Th –del inglés “T helper”) para la diferenciación de células B y la producción de anticuerpos; por otro lado, las células Th producen citocinas que favorecen la fagocitosis y en consecuencia la muerte del parásito. Así, las células TCD4⁺, juegan un papel clave en la inmunidad protectora contra la malaria en el hígado y en la sangre [30]. Los experimentos realizados en modelos murinos han permitido demostrar que el IFN- α , las células TCD4⁺ junto con las células B, son cruciales para desarrollar una eficiente protección inmune [36, 37].

La eliminación de los parásitos en el hígado, requiere principalmente de células TCD8⁺. Takashi y cols. en 2010 sugieren las células TCD8⁺ tiene un papel importante en la respuesta inmune protectora de los ratones C57BL/6 infectados con *P. yoelii 17 XL* en la etapa eritrocítica; ya que las células TCD8⁺ podrían activar a los macrófagos por medio de la liberación de IFN- γ . Éstos macrófagos pueden, potencialmente fagocitar eritrocitos infectados. Si el parásito no fuera completamente eliminado por este mecanismo, las células TCD8⁺ podrían provocar la apoptosis vía el sistema PFN-granzimas B en los macrófagos infectados, para eliminar completamente al parásito y reclutar macrófagos nuevos [30].

Los plasmodios modulan la respuesta de las células presentadoras de antígeno como macrófagos y DC lo que conduce a la supresión de la respuesta inmune [38]. En el modelo murino de malaria letal con *P. yoelii YM*, la función de las DC, se afectada con la presencia del TNF- α [39]. Wykes y cols. en 2007 sugieren que el daño en la actividad de las células dendríticas es un factor de virulencia para las

distintas especies del parásito, ya que al transferir a las DC de ratones infectados con una cepa “no letal” a ratones infectados con una cepa “letal” de *Plasmodium*, estos resultaron protegidos [40].

Las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ (Treg) suprimen la activación de las células TCD4⁺ y de las células TCD8⁺, por lo que se cree que contribuyen al establecimiento de una infección crónica. Hisaeda y cols. en 2004 demostraron la importancia de las células Treg en ratones BALB/c infectados con *P. yoelii*, en los cuales la eliminación de las células Treg con el anticuerpo monoclonal anti-CD25 protegió a los ratones infectados e incremento la respuesta de las células T contra los antígenos del parásito [41]. De igual manera, se ha demostrado que la supresión de la células T favorece a la letalidad de las infecciones con *P. yoelii*; mientras que la neutralización de TGF-β e IL-10 prolonga la supervivencia de los ratones infectados, y cerca del 40 % fueron capaces de resolver la infección [42].

En los humanos, la producción de TGF-β y la presencia de las células Treg se ha asociado con parasitemias elevadas, lo que sugiere que la inducción de las células Treg. podrían representar un factor específico de virulencia del parásito [43].

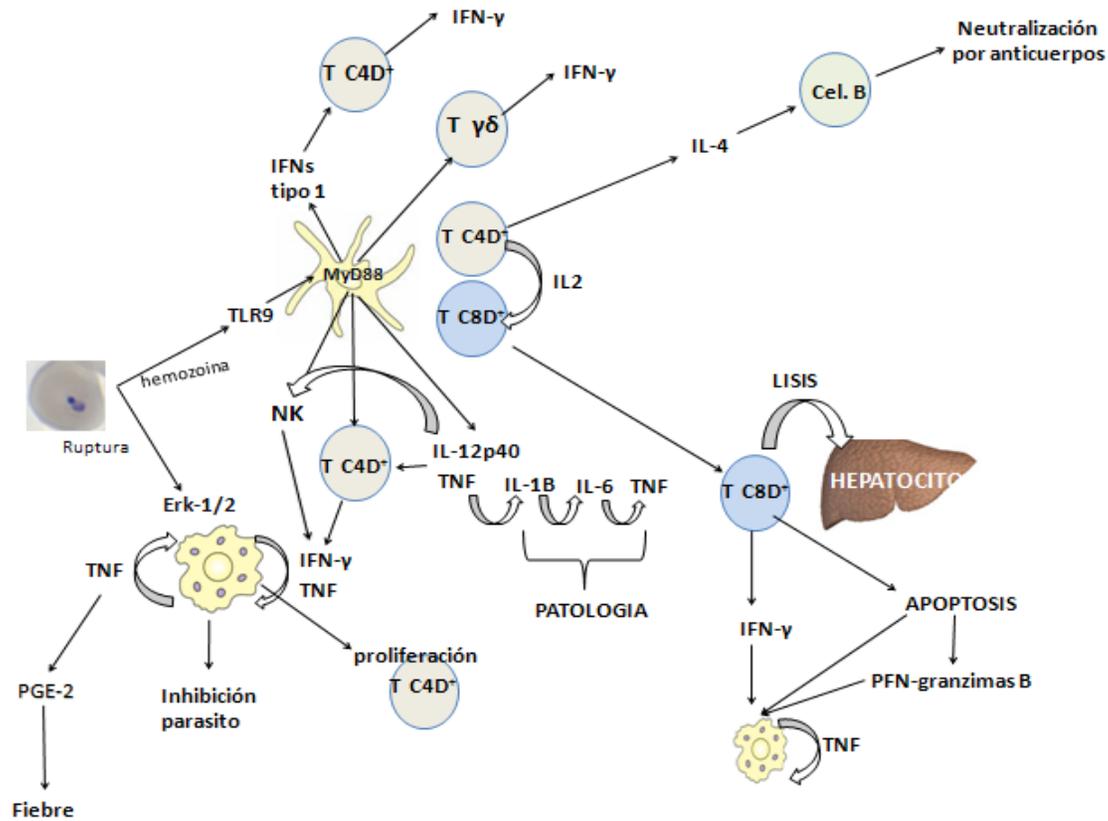


Figura 5. Diagrama que ilustra el posible mecanismo de la inmunidad en ratones infectados con *Plasmodium*. La hemozoina induce la activación de las DC via TLR-9-MYD88. Las células dendríticas activadas producen IFNs tipo 1 los cuales estimulan a las TCD4+ a producir IFN-γ. Las DC activan las células Tγδ. La activación de TLR-9 induce la proliferación de células TCD4+ y TCD8+, las cuales promueven la síntesis de citocinas como IL-12p40, TNF-α, INF-γ e IL-4. La hemozoina también induce la activación de los macrófagos via ERK favoreciendo la proliferación de TCD4+ y promoviendo la síntesis y liberación de IFN-γ, TNF-α, IL-1 e IL-6. La producción de TNF-PGE2 induce el paroxismo en la malaria.

1.2.2 Helmintos

Muchas especies de helmintos son parásitos de organismos multicelulares, son médica y económicamente relevantes por su impacto al infectar animales domésticos y al hombre, ocasionan infecciones letales como esquistosomíosis. Los helmintos son extremadamente diversos. Se clasifican en tres grupos taxonómicos: los nemátodos, los tremátodos y céstodos; cuyos ciclos de vida son frecuentemente distintos [44].

Las infecciones por helmintos son comunes en vastas regiones del mundo, especialmente en países en vías de desarrollo; se estima que afectan a más de un cuarto de la población mundial (aproximadamente 1.5 mil millones de personas) [11].

1.2.2.1 Cisticercosis

La cisticercosis humana es una enfermedad ocasionada por la larva del céstodo del parásito *Taenia solium*, los humanos son inoculados con la larva al ingerir huevos liberados del gusano plano [45]. La proliferación y transmisión del parásito son favorecidas por métodos primitivos de crianza de puercos, con la pobreza, con falta de higiene y saneamiento, así como la falta de control en la calidad de la carne destinada al consumo humano [46].

Los humanos pueden infectarse y presentar cisticercos en sus tejidos, desarrollándose la cisticercosis, si es en el medio neurológico se produce la neurocisticercosis, que es la forma más seria de la cisticercosis humana (Fig. 6) [47]. La infección causa una sustancial morbilidad y mortalidad, particularmente en varios países de Latinoamérica y en algunas partes de África y en Asia; así como pérdidas económicas en productos derivados del cerdo debido al sacrificio de cerdos infectados (Fig.6) [46].

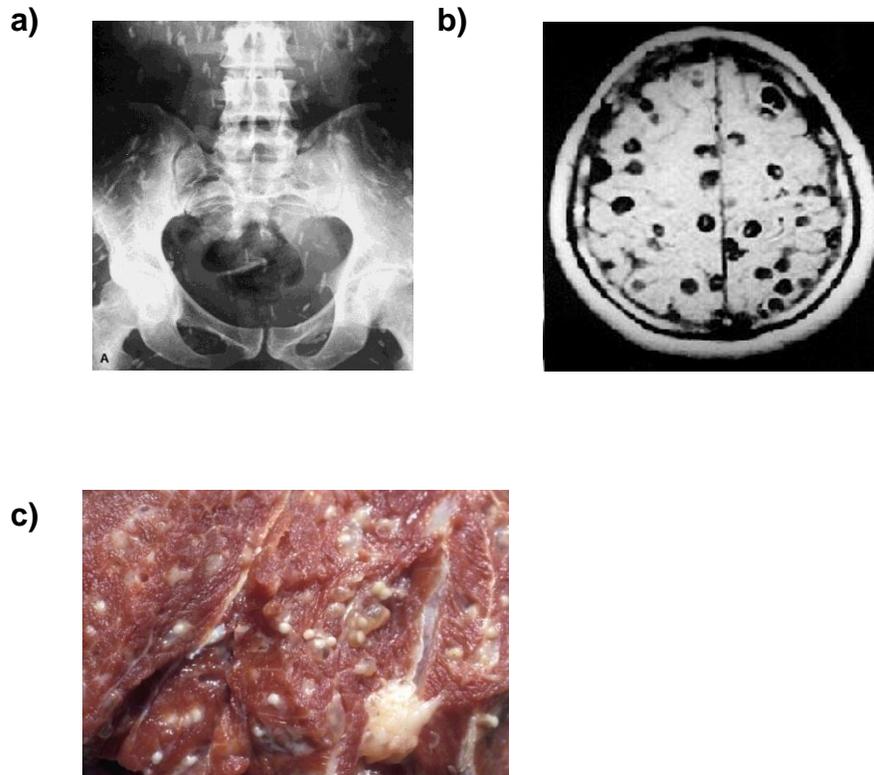


Figura 6. (a) Cisticercosis humana , (b) Neurocisticercosis humana y (c) Músculo esquelético de cerdo con presencia de cisticercos.

Aproximadamente 2.5 millones de personas en el mundo son portadores de gusanos planos de *T. solium* y no menos de 20 millones de personas se infectan con el cisticerco de *T. solium*. Se han descrito 50 000 muertes cada año a causa de la neurocisticercosis [47].

En América Latina se estima que se presentan aproximadamente 400 000 casos de cisticercosis en zonas endémicas, en las cuales habitan cerca de 75 millones de individuos [47]. La cisticercosis humana es muy común en México [45], se estima que el costo por pérdida en la producción de puercos en 1980 fue de 43 millones de dólares [47].

Para aclarar preguntas no resueltas sobre la cisticercosis humana, investigadores han usado el modelo murino de cisticercosis con la infección con *Taenia crassiceps* [48].

Taenia crassiceps es un céstodo que, cuando es adulto vive en el lumen del intestino de algunas especies de carnívoros (i.e. zorros) (Fig. 7) así como en el tejido conectivo subcutáneo, pleural y en las cavidades peritoneales de roedores (i. e. ratones); en éstos se encuentra como metacéstodo (cisticercos) [49, 50]. Varios autores han demostrado que, los humanos inmunodeprimidos, pueden desarrollar cisticercosis por *T. crassiceps* [51], cuando los huevecillos se ingieren en los alimentos o en el agua contaminada con heces de caninos o felinos infectados. Desarrollándose los metacéstodos en la capa subcutánea, entre el tejido muscular, [51] o intraocular [52].

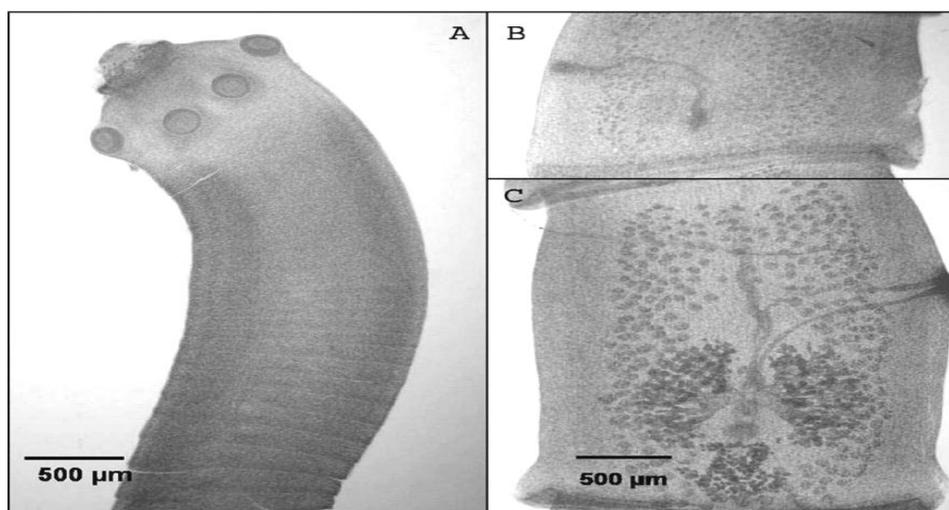


Figura 7. Fotografía del Adulto de *Taenia crassiceps*:

- A) Escólex donde se observa las ventosas y ganchos
- B) Proglotido inmadura
- C) Proglotido maduro

Se ha establecido que los metacéstodos de *T. solium* y *T. crassiceps* comparten antígenos [53], por lo tanto, el suero de los pacientes que sufren de neurocisticercosis, pueden reconocer antígenos de *T. crassiceps* y de manera similar el suero de ratones infectados con *T. crassiceps* contiene anticuerpos capaces de reconocer antígenos de *T. solium*.

1.2.2.2 Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*

Los zorros y los perros, entre otros carnívoros, portan el gusano adulto en el intestino delgado, por lo que los huevos infectivos se liberan en el excremento y cuando éstos son ingeridos por roedores salvajes, la oncosfera atraviesa el epitelio intestinal, alcanzando a los tejidos donde se diferencia a la etapa larval o cisticerco, si el huésped definitivo (carnívoro) en el que los gusanos planos crecen en el duodeno y liberarán huevos infectivos (Fig. 8) [50]. Morfológicamente la ultraestructura del estadio larval y el gusano plano de *T. crassiceps* no difiere significativamente del descrito para otros taenidos o gusanos planos (Fig. 9) [50]

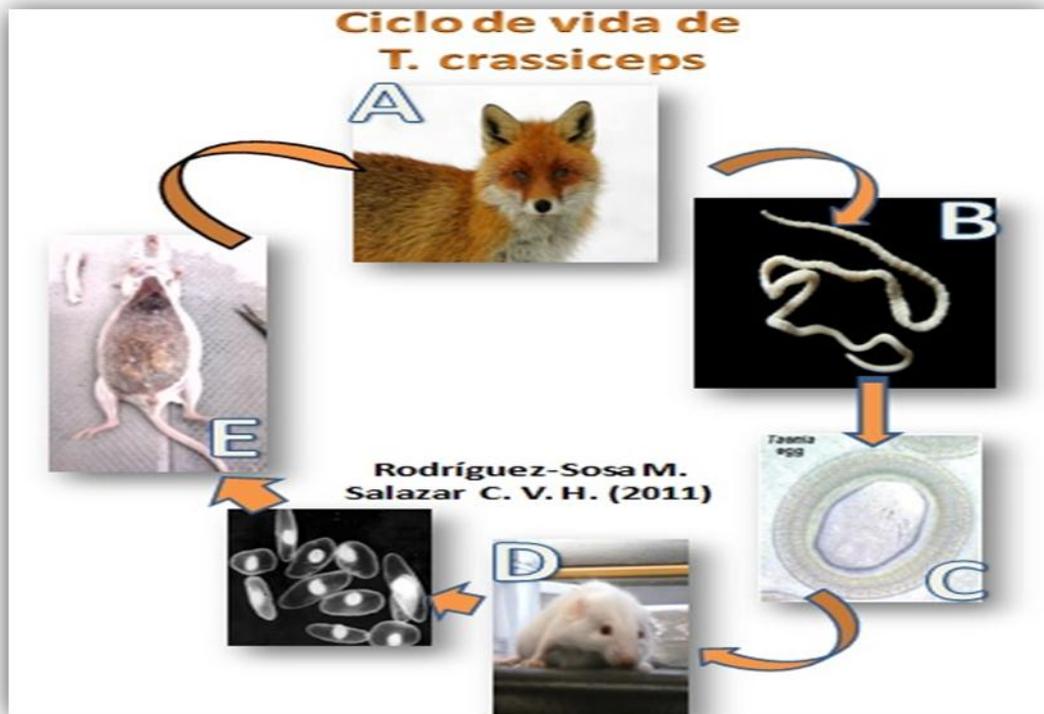


Figura 8. Ciclo de vida de *T. crassiceps*: A) huésped definitivo (carnívoro); B) gusano adulto en el intestino delgado del huésped; C) huevos liberados en las heces; D) ingestión de huevos por el huésped intermediario (roedores); E) crecimiento de la larva en el huésped intermediario y cuando el carnívoro lo ingiere (huésped definitivo) donde los gusanos planos crecen en el duodeno.

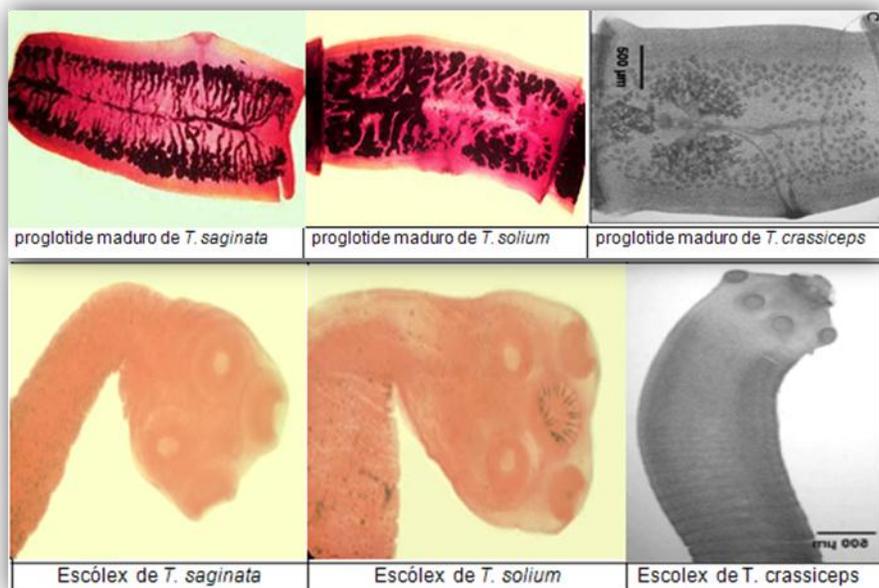


Figura 9.- a) Escólex de céstodos b) Proglotidos de cestodos

T. crassiceps es un cisticerco que ocasiona infecciones crónicas; en los animales de laboratorio, como son los ratones y las ratas. Los cisticercos crecen en la cavidad peritoneal, donde se reproducen, crecen. Es ahí donde pueden ser contados individualmente, para estimar la velocidad de reproducción de diferentes cepas y la susceptibilidad a estos [54].

Un excelente modelo para el estudio de esta enfermedad es la infección de ratones BALB/c con *Taenia crassiceps*. El quiste se multiplica en la cavidad peritoneal del ratón por reproducción asexual de una manera aparentemente incontrolada, haciendo al ratón BALB/c sumamente susceptible a esta infección [45].

1.2.2.3 Respuesta inmune a los Helmintos

La infección con helmintos tiene un efecto profundo en el sistema inmune, resultando en una polarización hacia una respuesta tipo Th2, que se caracteriza por niveles elevados de citocinas como: la IL-4, la IL-5, la IL-13 y niveles altos de inmunoglobulina E (IgE) en suero. A pesar de la fuerte respuesta Th2, los gusanos adultos frecuentemente sobreviven en el huésped humano por décadas. El largo

tiempo de sobrevivencia de los helmintos dentro del huésped, al aparecer inmunocompetente, se facilita por la inducción de mecanismos inmunoreguladores por parte del parásito. Éstos mecanismos incluyen la inducción de células Treg y la regulación negativa de células del sistema inmune innato; tales como los macrófagos y las DC, lo cual resulta en un medio ambiente inmunológico antiinflamatorio, caracterizado por el aumento de los niveles de IL-10 y de TGF- β . Esta red reguladora en el huésped previene la eliminación de los gusanos y al mismo tiempo protege al huésped contra la patología que podría, de otra manera resultar de una excesiva inflamación [28, 55, 56]. El notable equilibrio entre el huésped y el parásito, particularmente la defensa inmune del huésped y la evasión de la respuesta inmune por el parásito, es producto de una co-evolución a lo largo del tiempo [44].

1.2.2.4 Respuesta inmune a *Taenia crassiceps*.

Los ratones con fondo genético BALB/c y H-2d desarrollan una gran carga de metacéstodos de *T. crassiceps* cepa ORF [57], mientras que en los ratones C57BL/6 se restringe la carga parasitaria [58]. Igualmente, se han observado diferencias en la actividad de los macrófagos: los macrófagos de los ratones BALB/c infectados con *T. crassiceps* muestran un fuerte supresión de su actividad; contrario a los macrófagos infectados que provienen de ratones C57BL/6. Estos hallazgos soportan la idea de que las células presentadoras de antígeno juegan un papel importante en la activación temprana y posteriores durante la infección por *T. crassiceps*. Es posible que éstos mecanismos sean, en parte, responsables de las diferencias en la susceptibilidad a la infección por *T. crassiceps* que se ha detectado en éstas cepas de ratón [59].

En la cisticercosis experimental causada por *T. crassiceps* la respuesta inmune en ratones BALB/c es inicialmente del tipo Th1 pero se polariza hacia el tipo Th2 a partir de la 4 semana post-infección. La resistencia a éste parásito se ha asociado con una respuesta temprana del tipo Th1, así como con el fondo genético [54, 60], mientras

que una respuesta tipo Th2 se ha asociado con un aumento en la carga del parásito y producción de citocinas como IL-4, IL-6 y IL-10, así como de eosinófilos. Rodríguez-Sosa y cols. en 2004, demostraron la importancia de la respuesta Th1 al administrar anti-IFN- α a ratones infectados por *T. crassiceps* durante una fase temprana de la infección, lo que los hace más susceptibles a la cisticercosis.

Los factores de transcripción STAT-4 y STAT-6 también se incluyen en la modulación de la respuesta inmune en los ratones infectados con *T. crassiceps* Rodríguez-Sosa y cols. en 2002, demostraron que ratones deficientes en la funcionalidad del gen (STAT6 $^{-/-}$) infectados con *T. crassiceps* controlaron la infección. Ésta resistencia estuvo asociada a una respuesta Th1 sostenida y una deficiente respuesta Th2 mediada por IL-4/IL-13 [61]. Ésto quedó plenamente confirmado cuando se infectaron ratones STAT-4 $^{-/-}$, los cuales fueron altamente susceptibles con una clara deficiencia de la respuesta Th1. Así, se pudo concluir que la respuesta tipo Th1 es crítica para el desarrollo de una inmunidad protectora que restringe la replicación del parásito [62].

Reyes y cols. en 2009, reportaron que los ratones BALB/c desarrollaron niveles elevados de IL-13 asociados con una respuesta inmune tipo Th2 y que la actividad de las DC se modificó con la exposición a antígenos excretados/secretados por *T. crassiceps* (TcES); además, detectaron un número elevado de macrófagos alternativamente activados (AAM Φ) en el sitio de infección y los ratones desarrollaron una gran carga parasitaria. Estos macrófagos mostraron una fuerte expresión de arginasa-1, ym-1, RELM- α y trem-2 pero una respuesta proinflamatoria deficiente [59].

1.3 Coinfección

Las interacciones entre dos parásitos pueden ser antagonicas, al menos para alguno de ellos, como resultado de la escasez de recursos, o bien puede darse una respuesta inmune eficaz cruzada. Pero también pueden ser benéficas para uno o

ambos parásitos, como resultado de una inmunosupresión o regulación negativa de todo o parte del sistema inmune por uno o ambos parásitos [63], es decir, la coinfección con diferentes patógenos puede provocar a, distintas escalas antagonismo e interacciones sinérgicas [64] [65]; entonces la gente que vive en áreas endémicas de la malaria frecuentemente se infecta con otros patógenos. En este contexto, es bien sabido que una gran proporción de la población mundial humana, vive en países en vía de desarrollo, donde las infecciones por helmintos representan una causa común de enfermedad [66].

De manera importante, la gente que vive en las áreas de malaria endémica está frecuentemente expuesta a otros patógenos, típicamente encontrados en situación de pobreza; Como son las 14 principales enfermedades tropicales desatendidas (NTD, del inglés Neglected Tropical Disease), enfermedad de Chagas, cólera, dengue, drancunculosis, tripanosomiosis africana, leishmaniosis, leprosis, filariasis linfática, oncocercosis, esquistosomiosis, helmiantiosis, etc. Las NTD más prevalentes son las de los gusanos de garfio y la esquistosomiosis, las cuales frecuentemente son coendémicas con la malaria, VIH y TB [35].

La respuesta protectora contra algunos agentes infecciosos, principalmente virus y parásitos intracelulares es mediada por células Th1 productoras de IFN- γ e IL-2 [67]; pero no por células Th2, productoras de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 [67, 68]. En contraste, una respuesta Th2 puede proteger contra algunos parásitos extracelulares (e.g. *Trichuris muris*) [69]. La mayor parte de las infecciones por helmintos inducen respuestas de tipo de Th2 [69-71].

Las infecciones por helmintos podrían, entonces, ser responsables de cualquier aumento en la susceptibilidad a otros agentes patógenos contra los cuales se requiere una respuesta Th1, o a la inversa, podrían ser responsables de cualquier reducción en la susceptibilidad del hospedero a aquellos agentes patógenos contra los cuales se requiera una respuesta Th2 para su eliminación. Ejemplos de ambos casos se han observado en los ratones infectados con *Schistosoma mansoni*. La

polarización de la respuesta inmune a un tipo Th2 predominante puede alterar la habilidad para responder a un antígeno no parasitario (esperma de ballena mioglobina, [72]), y la eliminación de virus [73] o, por el contrario puede incrementar la resistencia a otro helminto (*T. muris*) contra el cual una se requiere montar una respuesta tipo Th2 [74].

Por lo que para estudiar la susceptibilidad a la infección y la regulación de la respuesta inmune, se han realizado varios estudios de coinfecciones con helmintos durante el curso de la infección de malaria, con resultados contrastantes (cuadro 4)

Fondo genético del ratón	Cepa de malaria	Tipo de helminto	Tiempo previo de infección semanas	Respuesta de malaria
Swiss TO	<i>P. yoelii</i>	<i>S. mansoni</i>	3- 5	No hay diferencias en la parasitemia o anemia [75] .
Swiss albino	<i>P. berghei</i> (ANKA)	<i>S. mansoni</i>	7	Aumento de la parasitemia y de la mortalidad [76].
C57BL/6	<i>P. chabaudi</i>	<i>S. mansoni</i>	8	Aumento de la parasitemia y de la mortalidad; baja respuesta de TNF- α [77].
A/J	<i>P. chabaudi</i>	<i>S. mansoni</i>	8	Disminución de la mortalidad; altos niveles de IFN- γ [78].
BALB/c	<i>P. chabaudi</i>	<i>L. sigmodontis</i>	0	Aumento de la anemia; altos niveles de IFN- γ [79].
CBA/J	<i>P. berghei</i>	<i>Brugia pahangi</i>	0	Aumento de la anemia. Disminución de la malaria cerebral [80].
C57BL/6	<i>P. chabaudi</i>	<i>H. polygyrus</i>	0	Aumento de la parasitemia y de la mortalidad; bajos niveles de IFN- γ [81].

Cuadro 4. Coinfecciones helmintos-malaria.

1.4 Factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF)

Mientras que la patogénesis severa por malaria se ha asociado a una producción defectuosa de las citocinas proinflamatorias, así como a la sobreproducción del factor inhibidor de la migración (MIF) [82], debido a que MIF inhibe la eritropoyesis *in vitro* en presencia de eritropoyetina [15]. Se ha demostrado que la producción de MIF se incrementa en los ratones BALB/c durante la infección con *P. chabaudi*, y los niveles de MIF se correlacionan con la severidad de la enfermedad y con la anemia en los ratones infectados. También se ha demostrado que MIF se incrementa en sangre periférica de los niños y en la placenta de madres embarazadas que están infectados con *P. falciparum* [83]. Estos estudios sugieren que MIF está involucrado en la patogénesis de la malaria y que promueve la inmunopatología. Sin embargo, niveles de MIF disminuidos en los monocitos de los niños con infección aguda por malaria *falciparum* lo que sugiere que los niveles bajos de MIF podrían potenciar la severidad de la enfermedad; probablemente por una resistencia inmune defectuosa a la infección [84]. Ésto podría explicarse porque es bien sabido que en ausencia de MIF se disminuye la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 y óxido nítrico en los monocitos humanos y murinos con diferentes estímulos o infecciones [85]. Sin embargo aún hacen falta más estudios para establecer con mayor certeza la participación de MIF en esta infección.

2. JUSTIFICACIÓN

La infección por el helminto *Taenia solium* es un problema de salud pública en algunos países de África, Asia y de América Latina. Reportes recientes demuestran una prevalencia en cerdos del 30% en Zambia [86], mientras que en México está prevalencia varía en distintas zonas geográficas pero en cerdos rurales va del 5 al 33% [87][88]. Las infecciones por *T. solium* son de alto riesgo para el humano e impactan fuertemente en la salud pública tanto en áreas rurales como en las urbanas [88]. Además, la cisticercosis es, frecuentemente, una infección masiva, crónica y un fuerte inductor de citocinas tipo Th2. Por lo tanto, ésta infección podría

alterar la susceptibilidad a infecciones subsecuentes por otros patógenos, particularmente por parásitos intracelulares. Por lo cual es importante estudiar si la infección por este helminto puede afectar la susceptibilidad a una infección posterior por un parásito no relacionado.

En este trabajo, se estudia mediante un modelo murino de cisticercosis experimental por *T. crassiceps* para estudiar cómo ésta infección puede influir en el curso de una segunda infección como *Plasmodium yoelii* 17XL, y si la producción de MIF que se genera por la presencia del helminto tiene alguna influencia en la respuesta inmune contra *P. yoelii* 17XL.

Determinamos el curso de la infección de *P. yoelii* 17XL en ratones BALB/c previamente infectados con *T. crassiceps* por dos u ocho semanas antes de la coinfección con *P. yoelii* 17XL. Estudiamos como los cambios en el ambiente inmunológico generado por la primera infección (*T. crassiceps*), afecta la replicación del parásito *P. yoelii* 17XL y la sobrevivencia de los ratones coinfectados. Los resultados obtenidos en este proyecto aportan conocimiento nuevo sobre la interacción cisticercosis-plasmodio y los procesos inmunológicos asociados a esta interacción; lo que tiene relevancia para futuras estrategias de salud pública (como los cuadros de vacunación y desparasitación).

3. OBJETIVOS

Determinar la influencia de la infección previa por el cisticerco de *Taenia crassiceps* en el curso y severidad de la infección generada por *Plasmodium yoelii* 17XL en un modelo murino de coinfección.

3.1 Objetivos particulares

- Infectar con cisticercos de *Taenia crassiceps* a ratones BALB/c y coinfectarlos a las dos y ocho semanas posteriores con *Plasmodium yoelii* 17XL.
- Determinar los niveles séricos de las citocinas: IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ , TFN- α y MIF por la técnica de ELISA en el suero de los diferentes grupos de ratones.

4. METODOLOGÍA

Material biológico de referencia

4.1 Animales.

Se utilizaron ratones hembras de seis y ocho semanas de edad, con un fondo genético BALB/c. Mantenidos en reproducción bajo condiciones estándares en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México.

4.2 Parásitos.

Taenia crassiceps. Los cisticercos de *Taenia crassiceps* (cepa ORF) se extrajeron de la cavidad peritoneal de ratones BALB/c después de cuatro u ocho semanas de infección. Los parásitos se lavaron cuatro veces con solución salina estéril. Los cisticercos se seleccionaron de acuerdo a su estadio (2mm de diámetro, sin gemas) y se inocularon vía intraperitoneal, en una dosis de diez cisticercos por ratón en solución salina.

***Plasmodium yoelii* 17XL**. Se utilizaron eritrocitos parasitados de la sangre (diez gotas) de la cola de un ratón previamente infectados con *Plasmodium yoelii* en 1mL. de PBS. Donada por la Dra. Martha Legorreta Herrera del Laboratorio de Inmunología Molecular, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM.

4.3 Infección y coinfección con *Taenia crassiceps-Plasmodium yoelii* 17XL. Se utilizaron ratones hembras BALB/c, los cuales se infectaron vía intraperitoneal con diez cisticercos de *Taenia crassiceps*, como vehículo se utilizó solución salina. Después de dos y ocho semanas postinfección se re infectaron i.v. con 1×10^3 eritrocitos parasitados con *Plasmodium yoelii* 17XL. Como grupo control se utilizaron ratones hembras sin infección por *T. crassiceps*.

4.4 Sobrevida. El monitoreo de los ratones coinfectados, se llevó cabo diariamente en el laboratorio de Inmunoparasitología de la FES, Iztacala hasta el deceso de todos los ratones infectados.

4.5 Obtención del suero. Los ratones se sangraron el día 7 postinfección. Se utilizó una caja de madera con un foco de 60 watts (Philips), para inducir la dilatación en la vena caudal y de esta manera facilitar el sangrado. Se realizó un corte con un bisturí y se obtuvieron de 500 a 700 μ L de sangre en tubos Eppendorf. la sangre se mantuvo en baño de hielo a hasta que se centrifugó durante 10 minutos a 2500 rpm. Se obtuvo el suero y las muestras se mantuvieron a -20°C hasta su uso para la determinación de citocinas.

5.6 Cinética de la parasitemia. Después de la infección se cortó un mm. de cola de los ratones coinfectados, se tomó una muestra de sangre diariamente post-infección. Se colocó una gota de sangre sobre un portaobjetos, y se extendió formando una capa delgada de células distribuidas uniformemente. Los frotis se fijaron con metanol

absoluto y se tiñeron con el colorante Giemsa (1:10) durante 30 minutos. Las muestras se lavaron a chorro de agua y se dejaron secar, la parasitemia se evaluó con el microscopio óptico con el objetivo de 100X, cuando las parasitemias eran menores a 2 eritrocitos parasitados por campo se contaron 50 campos y cuando las parasitemias eran mayores a 2 por campo se contaron 200 eritrocitos y de ellos se evaluó el porcentaje de glóbulos rojos parasitados.

5.7 Cuantificación de la concentración de hemoglobina. Diariamente, se tomaron muestras de sangre de los ratones coinfectados. Se cortó un mm. de la cola, y se obtuvo 1 µl de sangre. El µl de sangre se adicionó a un tubo Eppendorf que contenía 250 µl de Drabkin, se colocaron 100 µl de la muestra de ésta disolución en una placa de 96 pozos la cual se analizó por espectrometría a 540 nm en un lector de ELISA Mertertech, S 960. Se calcularon los datos de absorbancia y concentración de Hb, con una curva patrón.

5.8 Detección y evaluación de citocinas. Se evaluaron los niveles de citocinas en los sueros de los diferentes grupos de ratones por medio de la técnica de ELISA-Sándwich, siguiendo las recomendaciones del proveedor (Peprotech, México). Las placas de 96 pozos se sensibilizaron con 100 µl por pozo del anticuerpo de captura (2 µL/mL) específico para cada citocina a determinar (purified anti-mouse IL-1β, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFN-γ, TFN-α). Se dejaron incubar toda la noche a 4° C. Transcurrida la incubación se lavaron 4 veces con PBS-Tween 0.05% (PBS-T). Posteriormente las placas se bloquearon con PBS-BSA 3% (100 µL por pozo) se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron cuatro veces con (PBS-Tween), se procedió a hacer la curva de interleucinas (con IL recombinante murina), cada punto se realizó por duplicado en los primeros pozos de la placa (la curva se hizo con una concentración de 2000 pg/mL y se hicieron diluciones a la mitad, hasta el pozo 11 y en el último pozo sólo se agregó PBS-BSA 1%. A los pozos restantes de la placa se le agregaron 50 µL de los sueros de las muestras. Se incubaron toda la noche a 4°C. Después de la incubación se lavaron cuatro veces con (PBS-Tween), se agregaron el segundo anticuerpo (biotinilado) en PBS-BSA a una concentración de 1 µl/mL y se agregaron a cada pozo 100 µL de streptoavidina/peroxidasa diluida 1:1500 en PBS-BSA al 1%. Se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se lavó cuatro veces con (PBS-Tween) y se adicionó a cada placa 10 ml de ABTS y 100 µL de H₂O₂ al 3 %. Se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente y se procedió al leer la placa en el lector de ELISA (Mertertech, S 960) a 405nm.

5. RESULTADOS

5.1. Sobrevida

La sobrevida de los ratones que se infectaron con *Plasmodium yoelii* 17XL (letal) se registró diariamente. En la figura 10 se muestra como se modificó la sobrevida a la infección por *P. yoelii* 17XL en ratones BALB/c que previamente se habían infectado con *Taenia crassiceps*. Se inocularon i.p. ratones hembras BALB/c con una dosis de 10 cisticercos de *T. crassiceps* por ratón, después de dos y ocho semanas, los ratones se infectaron con *P. yoelii* 17XL, se evaluó la sobrevida a través del tiempo.

La infección con *P. yoelii* 17XL generó erizamiento, postración y caquexia en los primeros días de infección, en todos los grupos de ratones. Sin embargo, como se muestra en la figura 10 los ratones que se coinfectaron con (*T. crassiceps*-*P. yoelii*) tuvieron un incremento en el tiempo de sobrevida, en relación al tiempo de infección comparados con los ratones solo infectados con *P. yoelii* 17XL.

Los ratones infectados únicamente con *P. yoelii* 17XL, empezaron a morir a partir del séptimo día posterior a la infección, hasta llegar al deceso de todos los ratones en el día 11. Notablemente, los ratones infectados con *Taenia* dos semanas previas a la infección con *P. yoelii* 17XL, empezaron a morir hasta el décimo día post-infección y el deceso final se prolongó hasta el día 19. De manera similar el grupo que cursaba la infección de ocho semanas con *T. crassiceps* previa, a la infección con *P. yoelii* 17XL, presentó una sobrevida aún más prolongada en comparación con los otros dos grupos. Éstos resultados sugieren que la infección con *T. crassiceps* modificó algunos parámetros en la respuesta inmune de los ratones que se infectaron con la cepa letal de *P. yoelii* 17XL, permitiéndoles sobrevivir por más tiempo.

Sobrevivencia de hembras infectadas con cisticercos de dos u ocho semanas + *P. yoelii* 17 XL

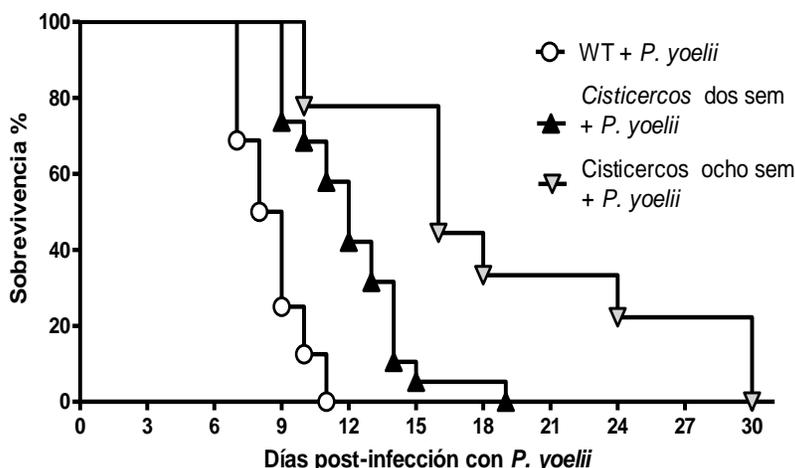


Figura 10. Porcentajes de supervivencia de ratones infectados con *Plasmodium* comparada con la de ratones coinfectados con *P. yoelii* 17XL, después de dos u ocho semanas de infección previa con diez cisticercos vía i.p. de *T. crassiceps*. La infección con diez cisticercos inoculados i.p. de *T. crassiceps* se hizo a las dos (▲) y ocho semanas (▽) previas a la infección con *P. yoelii* 17XL. Los resultados son correspondientes a cinco experimentos independientes.

Se estudió si la infección con *P. yoelii* 17XL en los ratones, que previamente cursaban la infección de *T. crassiceps* por dos u ocho semanas, inducía cambios asociados con la patología como son: parasitemia, anemia y pérdida de peso; los cuales podrían influir en la supervivencia o muerte de los ratones infectados con *P. yoelii* 17XL.

5.2. Parasitemia

En todos los grupos de ratones que se infectaron con *P. yoelii* 17XL, se determinó la parasitemia en frotis sanguíneos teñidos con Giemsa, se evaluó el porcentaje de eritrocitos parasitados a partir del día 3 de la infección hasta el día en que murieron, con el propósito de analizar si una infección previa con el helminto *T. crassiceps* afectaría el número de parásitos en sangre generado por *P. yoelii* 17XL.

Todos los ratones infectados desarrollaron altos niveles de eritrocitos parasitados, sin embargo, los ratones que cursaban una infección previa con *T. crassiceps*,

desarrollaron niveles menores de parasitemia en los primeros días de infección. La infección con *P. yoelii* 17XL fue letal en algunos casos desde el séptimo día post-infección con niveles de parasitemia que variaron del 40 % al 65 %. Esta observación corrobora los reportes previos de la letalidad de *P. yoelii* 17XL en ratones BALB/c [89-91].

Los ratones que cursaban con una infección previa de *T. crassiceps* por dos u ocho semanas, desarrollaron niveles más bajos de parasitemia. En el día 6 las parasitemias fueron de 0.8 % (coinfeción en la 2a semana) y de 8.32% (coinfeción en la octava semana), mientras que los ratones que únicamente se infectaron con *P. yoelii* 17XL tuvieron niveles de parasitemia del 20 % en el mismo día (Fig. 11).

Estos resultados indican que la infección con *T. crassiceps*, previa a la infección con *P. yoelii* 17XL, retrasa la proliferación del plasmodio, durante los primeros días de infección, lo que conduce a una mayor sobrevida.

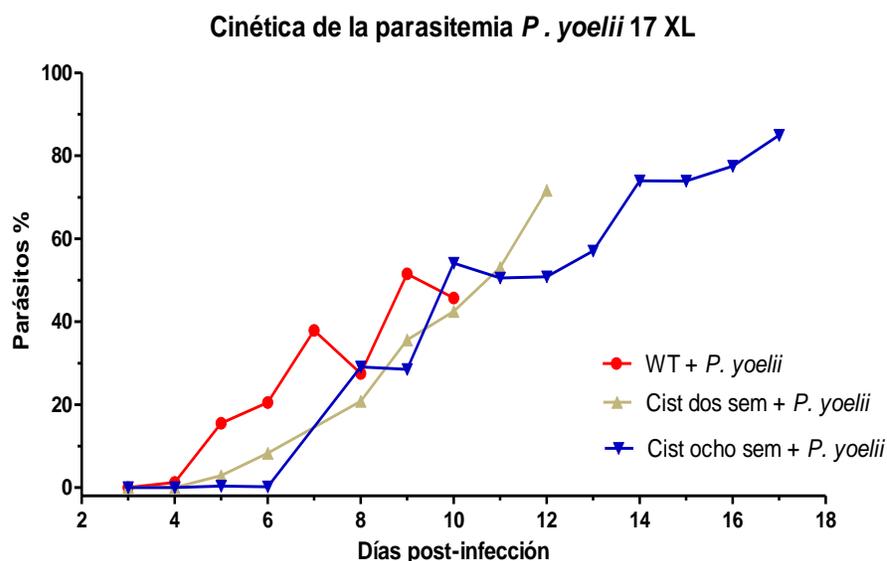


Figura 11.- Curso de la parasitemia en la infección de *Plasmodium* en ratones hembras BALB/c infectados con *P. yoelii* 17XL en comparación con ratones coinfectados con *P. yoelii* 17XL, después de dos semanas u ocho semanas de infección previa con diez cisticercos vía i.p. de *T. crassiceps*. Se inocularon 5×10^4 eritrocitos parasitados por ratón vía i.v. Los datos representan la compilación de cuatro experimentos independientes (n= 5 ratones/grupo).

5.3. Signos y síntomas en los ratones.

Todos los ratones se pesaron diariamente (Fig. 12). Los ratones infectados presentaron síntomas como postración, señales de debilitamiento, erizamiento del pelo y pigmentación amarilla en su pelaje (ictericia), así como pérdida paulatina del color rojo en orejas y ojos. Los signos de caquexia, sin embargo no estuvieron presentes hasta el sexto día post-infección en que se hizo evidente la pérdida de peso, además de signos clínicos más severos, sobre todo en los ratones infectados únicamente con *P. yoelii* 17XL; la pérdida de peso, como consecuencia de la severa patología que enfrentaron, fue considerable en comparación con los ratones coinfectados con *T. crassiceps* por ocho semanas previas.

Los ratones que cursaban con una infección de *T. crassiceps* con dos semanas de evolución cuando se infectaron con *P. yoelii* 17XL, presentaron diferencias de pérdida de peso, porcentualmente significativas, en comparación con los ratones coinfectados de ocho semanas y los ratones sanos. Mientras que los ratones coinfectados a las dos semanas presentaron una reducción paulatina en la pérdida de peso, los ratones coinfectados a las ocho semanas no presentaron una pérdida de peso tan drástica, pero de igual manera, sólo perdieron el peso que habían ganado en los días previos. Por otro lado, los signos de la patología fueron evidentes hasta muy avanzada la infección, por lo que los ratones no presentaron los signos característicos de caquexia en las primeras dos semanas de infección con *P. yoelii* 17XL. Probablemente la infección con *Taenia* regula positivamente la producción de IL-4 e IL-10 lo que disminuye las citocinas inflamatorias que se han asociado con el desarrollo de caquexia como el TNF- α y el IFN- γ [92, 93].

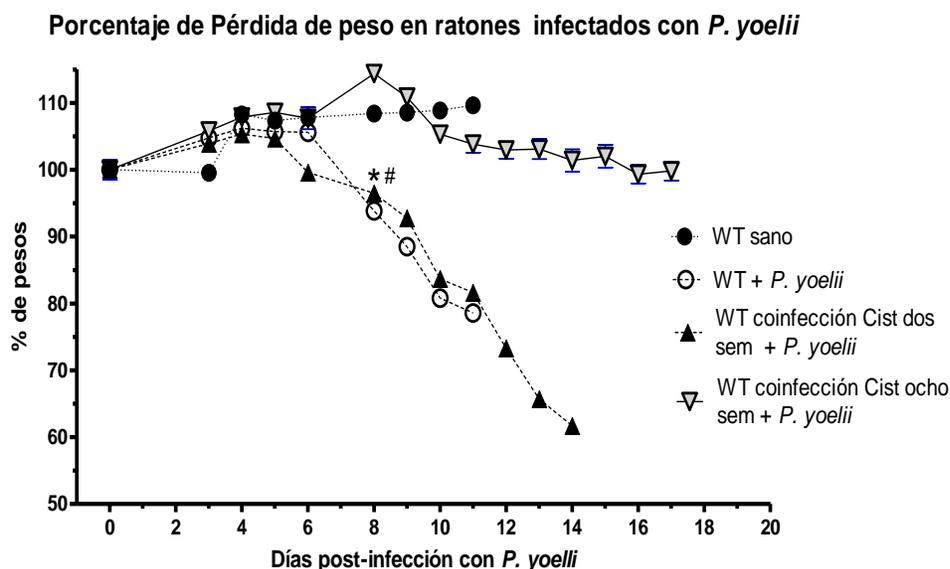


Figura 12. Porcentajes de peso ganado o perdido en ratones BALB/c infectadas con *P. yoelii* 17XL comparado con el de ratones coinfectados con *P. yoelii* 17XL después de dos semanas u ocho semanas de infección previa con diez cisticercos vía i.p. de *T. crassiceps*. En la gráfica se consideró como el 100 % al peso original de los ratones previo a la infección con *P. yoelii* 17XL. * Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo de ratones no infectado, # Diferencia estadísticamente significativa en relación con el grupo coinfectado de 8 semanas.

5.4. Cuantificación de hemoglobina

La anemia es una complicación común durante la infección aguda o crónica de malaria, por lo que para evaluar si la infección previa con *T. crassiceps* modificaba éste parámetro, decidimos analizar la concentración de hemoglobina en todos los grupos de ratones infectados con *P. yoelii* 17XL (Fig. 13). Nuestros resultados demuestran que la infección con *T. crassiceps* previa a la infección con *P. yoelii* 17XL, disminuyó la destrucción de eritrocitos en comparación con los ratones BALB/c que sólo se infectaron con *P. yoelii* 17XL. La infección con *T. crassiceps* con ocho semanas previas a la infección de *P. yoelii* 17XL redujo la destrucción de eritrocitos aún más que en el grupo que tenía dos semanas de infección con *T. crassiceps* previas a la infección con *P. yoelii* 17XL. Se ha descrito previamente, que la destrucción masiva de eritrocitos en los individuos infectados con plasmodios, se debe principalmente a que tanto eritrocitos parasitados como aquellos sanos que han fijado en su superficie antígenos solubles del parásito, se destruyen por el

sistema retículo endotelial al pasar por el bazo, dado que son reconocidos por el sistema inmune como extraños, es decir, la respuesta inmune es la responsable en mayor parte de la destrucción de eritrocitos sanos lo que genera la anemia característica en la malaria. Éstos resultados muestran que la infección previa con *T. crassiceps* modula a la respuesta inmune, lo que resulta en una menor destrucción de eritrocitos, que se refleja en los niveles de hemoglobina.

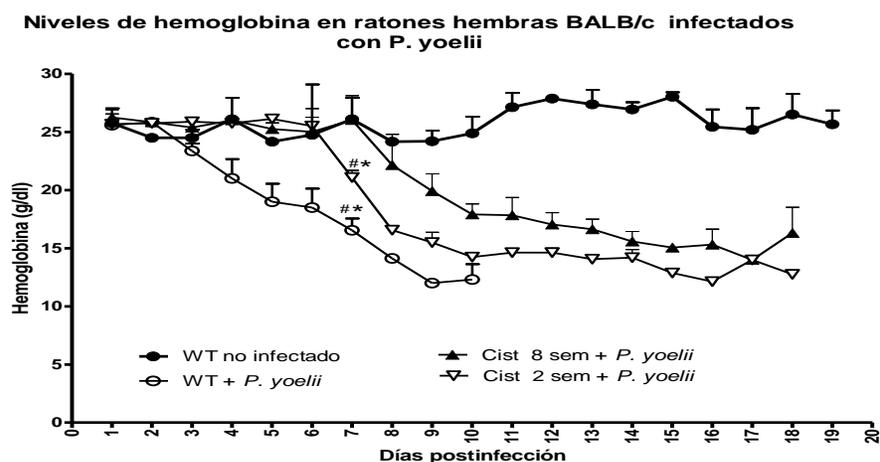


Figura 13. Concentración de hemoglobina en ratones hembras BALB/c infectados con *P. yoelii* 17XL en comparación con ratones coinfectados con *P. yoelii* 17XL, después de dos u 8 semanas de infección previa con diez cisticercos vía i.p. de *T. crassiceps*. En la gráfica los niveles de hemoglobina se cuantificaron por el método de la cianometahemoglobina y se expresan en g/dL * Indica diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo de ratones no infectado con *P. yoelii* 17XL, # Indica diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo de ocho semanas coinfectado.

Dado que se ha descrito que el factor inhibidor de la migración (MIF) suprime la síntesis de eritropoyetina y que además sinergiza con el IFN- γ y el TNF- α para antagonizar con la hematopoyesis [94], decidimos analizar si esta molécula está involucrada en la anemia que presentan los ratones infectados con *P. yoelii* 17XL y la fluctuación de sus niveles en ratones que cursaban una infección con *T. crassiceps* previa.

Los niveles de MIF se evaluaron en el suero de ratones infectados con *T. crassiceps*, *P. yoelii* 17XL y coinfectados con ambos parásitos. En el séptimo día

post-infección con *P. yoelii* 17XL. Se detectaron diferencias estadísticamente significativas en todos los grupos de ratones infectados con *P. yoelii* 17XL; los niveles de MIF se incrementaron aún más en el suero de los ratones que estaban coinfectados en comparación con aquellos que sólo se infectaron con *P. yoelii* 17XL. Lo que sugiere que la infección con el *P. yoelii* 17XL sinergiza el incremento en los niveles de MIF que genera la infección con *T. crassiceps*. En el grupo de ratones con una infección crónica de helmintos (ocho semanas) coinfectado con *P. yoelii* 17XL, fue el que presentó el mayor incremento en la producción de MIF y resultó estadísticamente significativo en comparación con los ratones que únicamente se infectaron con *P. yoelii* 17XL.

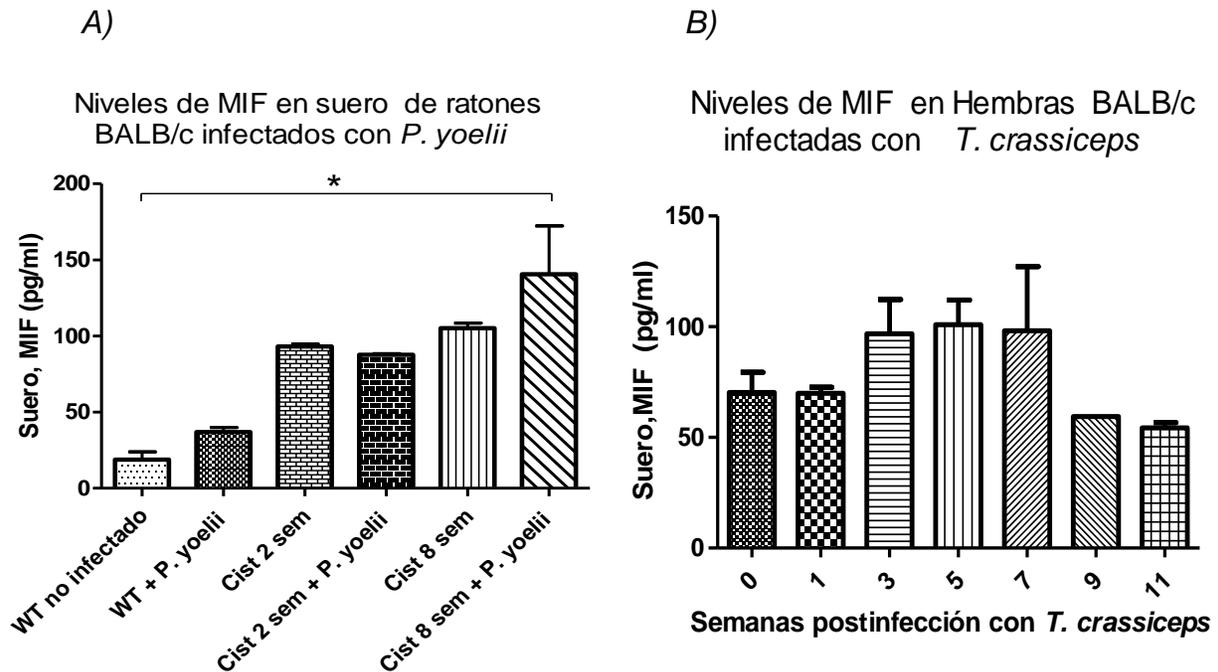


Figura 14. A) Niveles de MIF en suero a los 7 días post-infección con *P. yoelii* 17XL en ratones BALB/c comparados con el grupo de ratones coinfectados con *P. yoelii* 17XL, después de dos semanas u ocho semanas de infección previa con diez cisticercos vía i.p. de *T. crassiceps*. B) Niveles de MIF en suero de ratones BALB/c durante la infección con *T. crassiceps* (infección con diez cisticercos vía i.p. de *T. crassiceps*). * Indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos señalados.

Las infecciones con *T. crassiceps* y *P. yoelii* 17XL generaron un incremento en los niveles séricos de MIF (Fig. 14 A). La coinfección con ambos parásitos sinergizó este incremento y el efecto fue aún más evidente en los ratones coinfectados de 8 semanas. Los resultados corroboran lo descrito previamente por McDevitt *et al* 2006 [94] y explican, al menos en parte, la disminución de los niveles de hemoglobina en los ratones coinfectados con ocho semanas de evolución de *T. crassiceps*.

Los niveles de MIF en la infección simple con el helminto de dos y ocho semanas respectivamente, fueron más elevados en comparación con el grupo de ratones infectados con *P. yoelii* 17XL en el séptimo día post-infección con el plasmodio, por lo que se analizó la producción de MIF durante la infección de *T. crassiceps* (Fig. 14 B) para determinar si el tiempo previo de infección de dos u ocho semanas, influía en sus niveles y la forma en que éste podría favorecer o no la evolución de anemia durante la infección con *P. yoelii* 17XL. Los resultados indican que la infección de *Taenia* incrementó la producción de MIF, a la tercer semana, lo que sugiere que la disminución en la concentración de hemoglobina en la coinfección de dos semanas de *T. crassiceps*-*P. yoelii* 17XL probablemente esté asociada a la alta producción de MIF que induce *T. crassiceps* y *Plasmodium* aunque, éste último, en menor grado.

Por el contrario, los niveles de MIF que induce la infección por *T. crassiceps* disminuyeron progresivamente después de la séptima semana post-infección; lo que puede explicar la menor pérdida de hemoglobina observada en los ratones coinfectados. Este hallazgo sugiere que la destrucción de los eritrocitos es además, causada por la presencia de *P. yoelii* 17XL, o por otro(s) mecanismo(s) inmunológico(s) independiente de MIF.

5.5. Citocinas en suero

5.5.1. Citocinas pro-inflamatorias

Para determinar si cursar una infección previa con *T. crassiceps* afecta la producción de las citocinas proinflamatorias cuando los ratones se inoculan con *P. yoelii* 17XL, se tomaron muestras de sangre, a cada grupo de ratones siete días

posteriores a la infección, para cuantificar en el suero los niveles de citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-12 p40, TNF- α e IFN- γ .

Se ha descrito previamente que la infección con el plasmodio induce la sobreproducción de TNF- α [25]. Existen evidencias que sugieren que el TNF- α es un elemento clave en la patogénesis por malaria cerebral y, a su vez, se ha asociado con la severidad de la enfermedad [95, 96]. (En la figura 15 se muestran los niveles de TNF- α), Se demostró que los ratones coinfectados desarrollaron niveles significativamente más elevados de TNF- α que el grupo de ratones únicamente sometidos a la infección con *P. yoelii* 17XL.

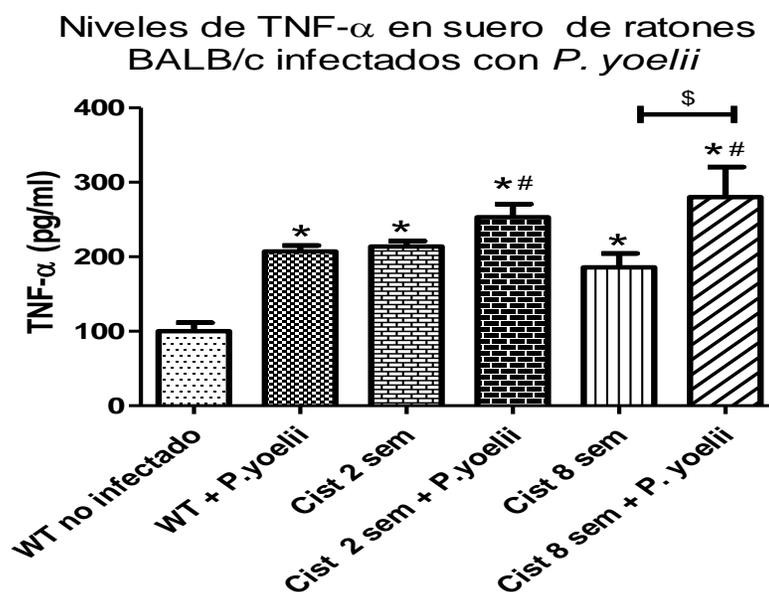


Figura 15. Niveles de TNF-alfa en suero de ratones BALB/c infectadas con *P. yoelii* 17XL en comparación con ratones coinfectados con *P. yoelii* 17XL, después de dos u ocho semanas de infección previa con diez cisticercos vía i.p. de *T. crassiceps*. El séptimo día post-infección se tomó muestra de sangre y los sueros se analizaron mediante la técnica de ELISA - Sándwich. Para el análisis de los resultados se utilizó la prueba "t" student test nonparametric $p < 0.001$ (Graphpad prism 5) # Indica diferencia significativa en comparación con los ratones infectados únicamente con *P. yoelii* 17XL, * indica diferencia significativa en comparación con el grupo de ratones no infectados.

Un incremento en la síntesis de IL-1 β , en algunas enfermedades inflamatorias, puede inducir anormalidades hematológicas tales como anemia [97]; además de que se ha descrito que los niveles de IL-1 β se incrementan en individuos con malaria cerebral (CM) y anemia severa malárica (SMA). Por otro lado, se ha demostrado que el polimorfismo de IL-1 β promueve las condiciones de susceptibilidad hacia SMA en función a la fluctuación en los niveles de ésta citocina. En éste trabajo se cuantificaron los niveles de IL-1 β (Fig. 16). Los ratones coinfectados de ocho semanas tuvieron los niveles más elevados de IL-1 β . Interesantemente, en el grupo con coinfección de dos semanas se detectaron niveles menores que en el grupo infectado únicamente con *T. crassiceps* por 2 semanas, sin embargo, solo existieron diferencias significativas en los niveles de IL-1 β entre los ratones coinfectados en comparación con los ratones infectados solo con *P. yoelii* 17 XL .

Los niveles de IL-1 β se incrementaron alrededor de siete veces en los ratones que cursaban una infección con *T. crassiceps* de dos semanas de evolución en relación con los ratones no infectados y, aproximadamente, cuatro veces en comparación con los ratones infectados únicamente con *P. yoelii* 17XL. Los niveles de esta citocina se modificaron según el tiempo de infección. En los ratones infectados con *T. crassiceps* los niveles de IL-1 β fueron menores, a las ocho semanas, que a las dos semanas post-infección. De manera particular, la coinfección con los dos parásitos, modificó los niveles de esta citocina de forma distinta dependiendo del tiempo de evolución de la infección con *T. crassiceps*. Cuando los ratones se infectaron con *P. yoelii* 17XL, a las dos semanas de haber sido infectados con *T. crassiceps*, los niveles de IL-1 β fueron menores que en los ratones infectados con *P. yoelii* 17XL con ocho semanas de infección por *T. crassiceps* (Fig. 16).

Los resultados sugieren que la infección por *T. crassiceps* incrementa los niveles de TNF- α dependiendo del tiempo de evolución y que en los ratones coinfectados con *T. crassiceps* y *P. yoelii* 17XL se sinergiza el incremento de TNF- α .

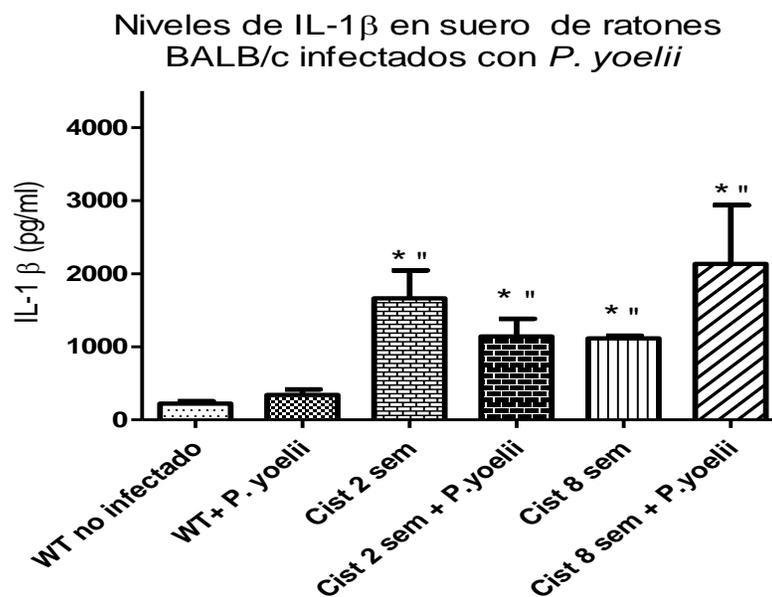


Figura 16. Niveles de il-1 β en suero de ratones BALB/c infectadas con *P. yoelii* 17XL en comparación con ratones coinfectados con *P. yoelii* 17XL, después de dos u ocho semanas de infección previa con diez cisticercos vía i.p. de *T. crassiceps*. El séptimo día post-infección se tomó muestra de sangre y los sueros se analizaron mediante la técnica de ELISA - Sándwich. Para el análisis de los resultados se utilizó la prueba "t" student test nonparametric $p < 0.001$ (Graphpad prism 5). * Indica diferencias significativas en comparación con el grupo de ratones no infectados. " Indica diferencias significativas en comparación con los ratones infectados únicamente con *P. yoelii* 17XL.

La IL-12 se ha asociado con la inducción de una respuesta proinflamatoria en la infección por *Plasmodium chabaudi*. Así como, en el ser humano, los niveles bajos en el plasma de IL-12 se han asociado con la patología en malaria severa [27, 83].

La infección con *P. yoelii* 17XL generó un incremento en los niveles séricos de IL-12p40, que no resultaron estadísticamente significativos en relación con el grupo de ratones control no infectados. La infección con *T. crassiceps* incrementó significativamente los niveles en suero de IL-12p40 en comparación con el grupo no infectado. De manera interesante, los niveles de IL-12p40 se incrementaron de forma sinérgica en los ratones coinfectados y éste incremento fue aún más evidente en los ratones con ocho semanas de infección previa con *T. crassiceps*. Dado que, los niveles de IL-12, se han asociado con protección contra malaria [98]; los niveles

más elevados de ésta citocina, en el grupo coinfectado con ocho semanas de evolución de *T. crassiceps*, podrían explicar, al menos en parte, la mayor sobrevivencia de éste grupo de (Fig. 17). Por lo que el aumento de la producción de IL-12 es inversamente asociado con el riesgo de infección y directamente asociado con la concentración de hemoglobina.

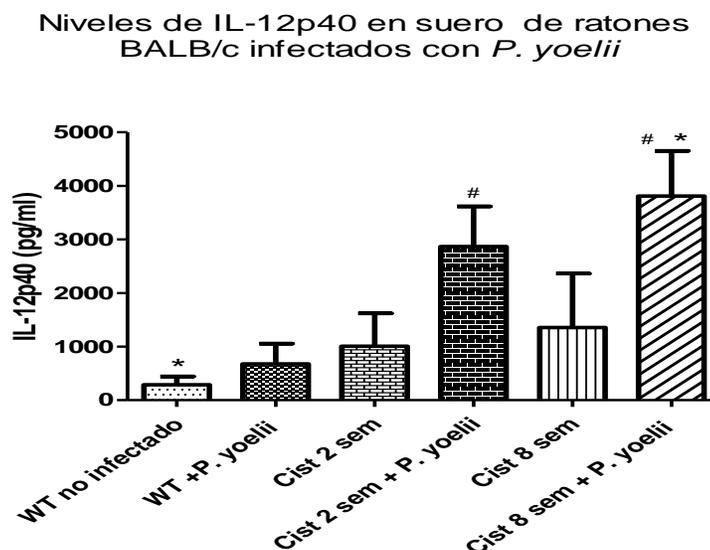


Figura 17. Niveles de IL-12p40 en suero de ratones BALB/c infectadas con *P. yoelii* 17XL en comparación con ratones coinfectados con *P. yoelii* 17XL, después de dos u ocho semanas de infección previa con diez cisticercos vía i.p. de *T. crassiceps*. El séptimo día post-infección se tomó muestra de sangre y los sueros se analizaron mediante la técnica de ELISA - Sándwich. Para el análisis de los resultados se utilizó la prueba "t" student test nonparametric $p < 0.001$ (Graphpad prism 5). * Indica diferencias significativas en comparación con los demás grupos. # Indica diferencia significativa en comparación con los ratones infectados únicamente con *P. yoelii* 17XL.

La producción de INF- γ durante los primeros días de infección con plasmodios, se ha asociado con una respuesta protectora en la mayoría de los modelos animales. Lo que sugiere su participación en el control de la parasitemia [26], además el IFN- γ se requiere para el control de infecciones con cepas no letales de *Plasmodium* [27]. Asimismo, se ha descrito que en los pacientes con malaria no complicada por *P. falciparum* el IFN- γ participa en la protección del huésped. En el presente trabajo se analizó si la infección previa con *T. crassiceps* podría modificar los niveles de IFN- γ en los ratones infectados con *P. yoelii* 17XL.

En la figura 18 se muestra que los ratones infectados solo con *P. yoelii* 17XL presentaron un incremento estadísticamente significativo de IFN- γ en comparación con el grupo control y los demás grupos de ratones. Por otra parte se observó que la infección con *Taenia*, tanto a las dos como a las ocho semanas de evolución indujo un incremento mucho menor de IFN- γ que la infección con plasmodio. En los grupos de ratones coinfectados (*T. crassiceps* y *P. yoelii* 17XL) los niveles de IFN- γ son significativamente menores que en el grupo de ratones infectado únicamente con *P. yoelii* 17XL (Fig. 18).

Los niveles de citocinas durante la infección con plasmodios deben regularse de forma estricta, si bien el incremento del IFN- γ en un inicio de la infección se ha asociado con protección, también se ha descrito que la respuesta inflamatoria tiene que frenarse, puesto que en los modelos de malaria murina, donde se presenta resistencia a la infección, los ratones presentan una respuesta inmune polarizada hacia un tipo Th2 con predominio de IL-4 e IL-10. En nuestros resultados los niveles menores de IFN- γ de los ratones coinfectados a las ocho semanas de infección con *T. crassiceps* podrían estar asociados con el mayor tiempo de sobrevida de ese grupo.

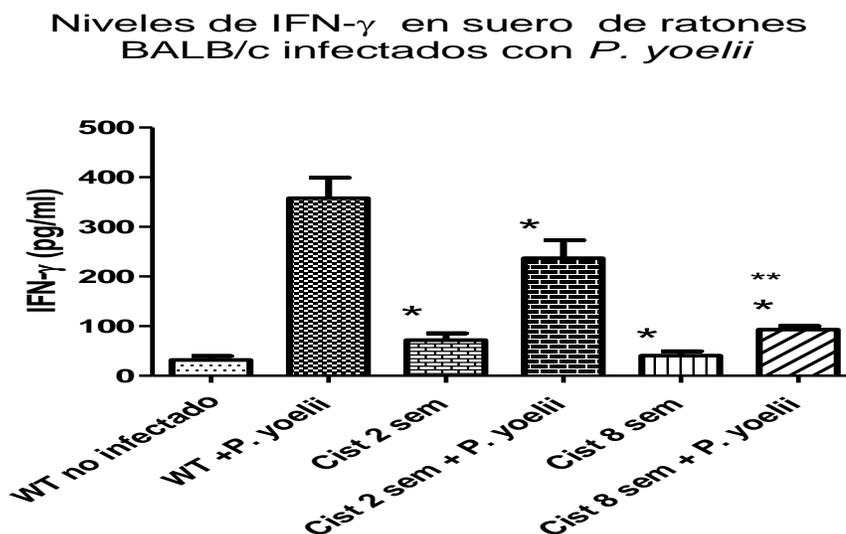


Figura 18. Niveles de IFN- γ en suero de ratones BALB/c infectadas con *P. yoelii* 17XL en comparación con ratones coinfectados con *P. yoelii* 17XL, después de dos u ocho semanas de infección previa con diez cisticercos vía i.p. de *T. crassiceps*. El séptimo día post-infección se tomó muestra de sangre y los sueros se analizaron mediante la técnica de ELISA - Sándwich. Para el análisis de los resultados se utilizó la prueba “t” student test nonparametric $p < 0.001$ (Graphpad prism 5). * Indica diferencia significativa en comparación con los ratones infectados únicamente con *P. yoelii* 17XL, ** indica diferencia significativa en comparación con los demás grupos.

Debido a que la coinfección (*T. crassiceps* + *P. yoelii* 17XL) modificó significativamente los niveles de citocinas proinflamatorias en el suero de los ratones, se decidió analizar la producción de citocinas antiinflamatorias en los mismos grupos de ratones.

5.5.2. Citocinas anti-inflamatorias

Distintos autores han concluido que IL-10 regula la respuesta proinflamatoria inducida por *P. falciparum* [25, 99]; lo que sugiere que ésta citocina podrían modular la respuesta inflamatoria asociada con las complicaciones en los casos de malaria severa. Sin embargo, otros autores han descrito que hay niveles más elevados de IL-10 en plasma de individuos que mueren que en el de los que sobreviven a la

infección [100]. Investigamos si la infección previa con *T. crassiceps* podría modular los niveles séricos de IL-10 y los cuantificamos (Fig. 10). La infección con *T. crassiceps* generó un incremento en los niveles séricos de IL-10 únicamente a las ocho semanas de infección, mientras que la infección con *P. yoelii* 17XL indujo un incremento estadísticamente significativo de ésta citocina en ratones normales, mientras que la infección con *P. yoelii* 17XL en los ratones previamente infectados con *T. crassiceps* por dos y ocho semanas sinergiza la síntesis de IL-10; fenómeno que es más evidente en los ratones con ocho semanas de infección previa con *T. crassiceps* (Fig. 19). Dado que la IL-10 bloquea las respuestas proinflamatorias generadas por $\text{TNF-}\alpha$ y por el $\text{IFN-}\gamma$, la detección de niveles más elevados de esta citocina, en ratones coinfectados de ocho semanas, sugiere que la mayor sobrevida presentada por éste grupo de ratones y las patologías menos severas podrían estar asociadas a los niveles elevados de IL-10.

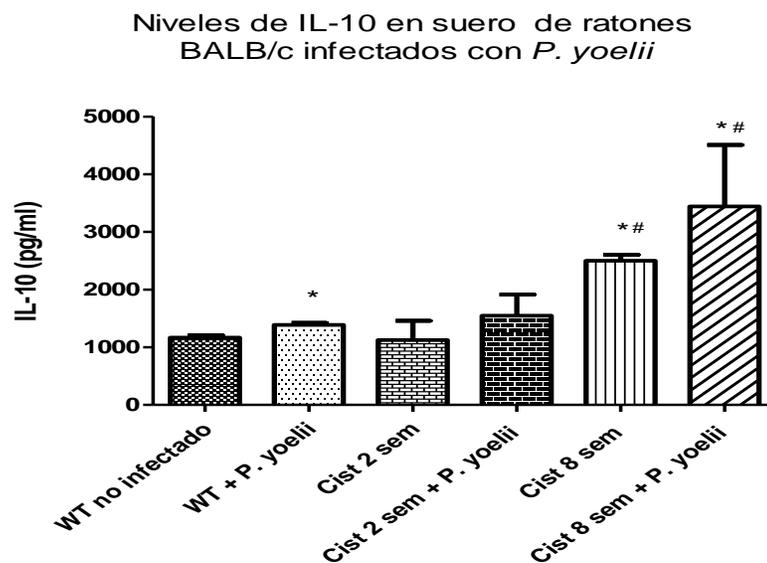


Figura 19. Niveles de IL-10 en suero de ratones BALB/c infectadas con *P. yoelii* 17XL en comparación con ratones coinfectados con *P. yoelii* 17XL, después de dos u ocho semanas de infección previa con diez cisticercos vía i.p. de *T. crassiceps*. El séptimo día post-infección se tomó muestra de sangre y los sueros se analizaron mediante la técnica de ELISA - Sándwich. Para el análisis de los resultados se utilizó la prueba "t" student test nonparametric $p < 0.001$ (Graphpad prism 5). * Indica diferencia significativa en comparación con el grupo de ratones no infectados, # Indica diferencia significativa en comparación con los ratones infectados únicamente con *P. yoelii* 17XL.

Se ha demostrado que los ratones que sobreviven a la infección con *Plasmodium chabaudi* logran controlar finalmente al parásito gracias a la producción de anticuerpos. Dado que la IL-4 es un factor de crecimiento y diferenciación de los linfocitos B, mismos que al madurar generan anticuerpos, se decidió evaluar los niveles de IL-4. En la figura 20, se muestra que la infección con *P. yoelii* 17XL induce un incremento en los niveles de IL-4, así como en la coinfección de ocho semanas con *T. crassiceps* sinergiza la síntesis de IL-4. En ratones infectados con *T. crassiceps*, por dos semanas, se detectaron niveles de IL-4 menores que los del grupo de ratones que cursaba una infección de ocho semanas. Lo anterior demuestra que aunque coexisten ambos tipos de respuesta Th1 y Th2 durante toda la infección (tanto de *T. crassiceps* como la de *P. yoelii* 17XL) existe una polarización hacia una respuesta tipo Th1 en los ratones infectados con *T. crassiceps* a dos semanas post-infección, mientras que a ocho semanas de infección, los ratones tienen una respuesta polarizada tipo Th2.

La coinfección con *P. yoelii* 17XL modificó, significativamente, los niveles de todas las citocinas estudiadas. Las citocinas proinflamatorias se modularon negativamente en los ratones coinfectados a las dos semanas de infección con *T. crassiceps*; mientras que se presentó un efecto sinérgico en los niveles de citocinas antiinflamatorias en los ratones coinfectados con ocho semanas de evolución por *T. crassiceps*. Éstos hallazgos son importantes para el posterior diseño de vacunas efectivas contra *Plasmodium*.

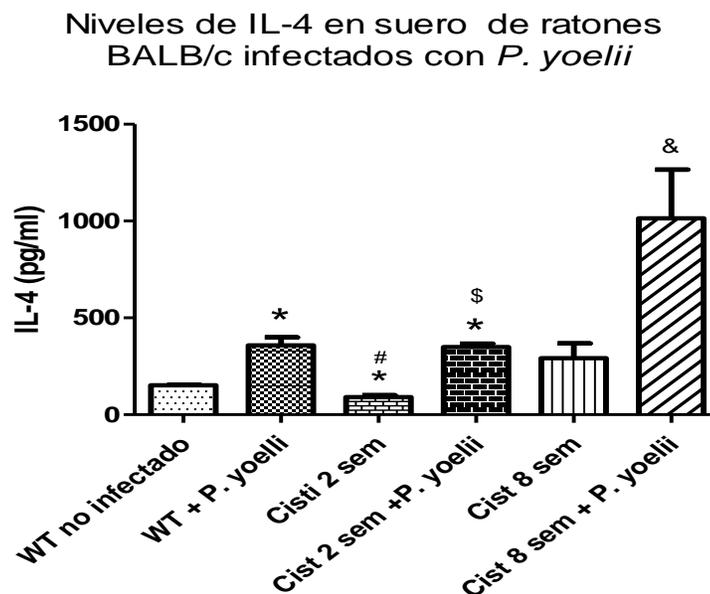


Figura 20.- Niveles de IL-4 en suero de ratones BALB/c infectadas con *P. yoelii* 17XL en comparación con ratones coinfectados con *P. yoelii* 17XL, después de dos u ocho semanas de infección previa con diez cisticercos vía i.p. de *T. crassiceps*. El séptimo día post-infección se tomó muestra de sangre y los sueros se analizaron mediante la técnica de ELISA - Sándwich. Para el análisis de los resultados se utilizó la prueba “t” student test nonparametric $p < 0.001$ (Graphpad prism 5). * Indica diferencia significativa en comparación con el grupo de ratones no infectados, # Indica diferencia significativa en comparación con los ratones infectados únicamente con *P. yoelii* 17XL, & Indica diferencia significativa significancia con respecto a los demás grupos.

Para demostrar el estado de activación de los macrófagos obtenidos del bazo de ratones infectados con *P. yoelii* 17XL, realizamos RT-PCR de ratones sanos e infectados previamente con *T. crassiceps* vía i.p. fueron sometidos a una segunda infección con *P. yoelii* a las dos y ocho semanas respectivamente; con el fin de encontrar los marcadores que indicarían la presencia de macrófagos activados alternativamente (M ϕ AA).

En la figura 21 se observa que los ratones únicamente infectados con *T. crassiceps* expresan en mayor magnitud transcritos de mRNA del gen Ym-1 (característicos de M ϕ AA en ratones BALB/c) en comparación con los M ϕ de ratones sanos WT (ND) confirmando la susceptibilidad de ésta infección y la

diferencia de los M ϕ AA. Cuando se presenta coinfección de dos semanas de *Taenia* con *Plasmodium*, no existe una expresión de Ym1.

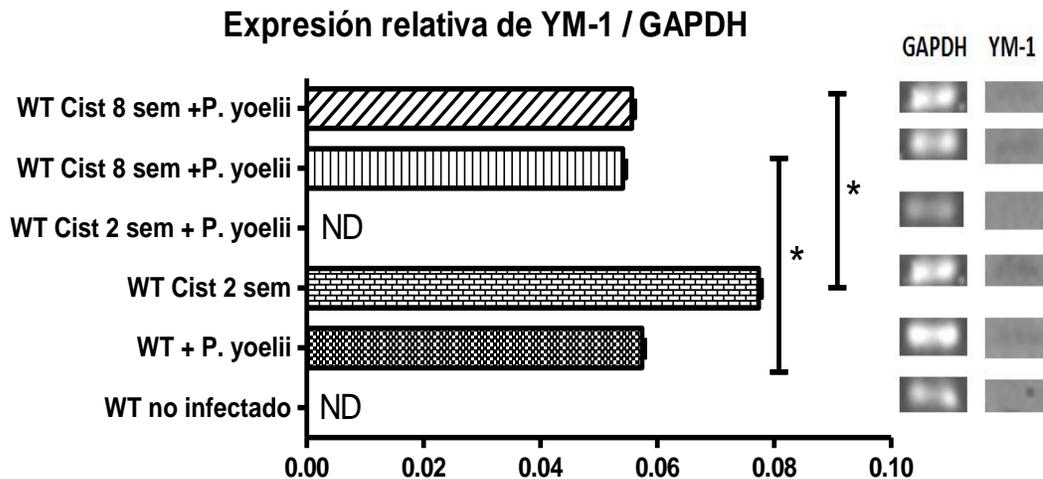


Figura 21.- Niveles de expresión de transcritos de mRNA del gen Ym1 de bazo en ratones BALB/c infectados con *P. yoelii* 17XL vs ratones coinfectados con *P. yoelii* 17XL, después de dos semanas ú ocho semanas de infección previa con diez cisticercos vía i.p. de *T. crassiceps*. En el séptimo día posterior a la inoculación con *P. yoelii* 17 XL se tomó la muestra. ND= no detectado.

Asimismo, analizamos los niveles del transcrito de mRNA del gen FIZZ1, el cual también es un marcador de M ϕ AA (Fig. 22). Observamos que los M ϕ s provenientes de los ratones infectados con *Taenia* con una evolución de ocho semanas presentaron los mayores niveles de transcritos para este gen en comparación con los ratones sanos y los que sólo tenían infección con *Plasmodium*.

Además, los ratones infectados con *Taenia* presenta la expresión de FIZZ1 a menos que presente una coinfección de dos semanas, pero cuando la coinfección es crónica, hay un significativo incremento en los transcritos de FIZZ1, ésto quiere decir, que la infección crónica presenta un cambio en la activación de dichos macrófagos, sin embargo, la coinfección con *P. yoelii* 17XL tiene un efecto sobre ésta transcripción: disminuye la expresión de éstos marcadores. La ausencia de expresión de los marcadores de YM1 y FIZZ-1 probable se debe a los niveles de producción de IFN- γ ; lo cual demuestra que la coinfección de dos semanas induce

una respuesta inmune tipo Th1, de aquí que la activación de los M ϕ sea por la “vía clásica”.

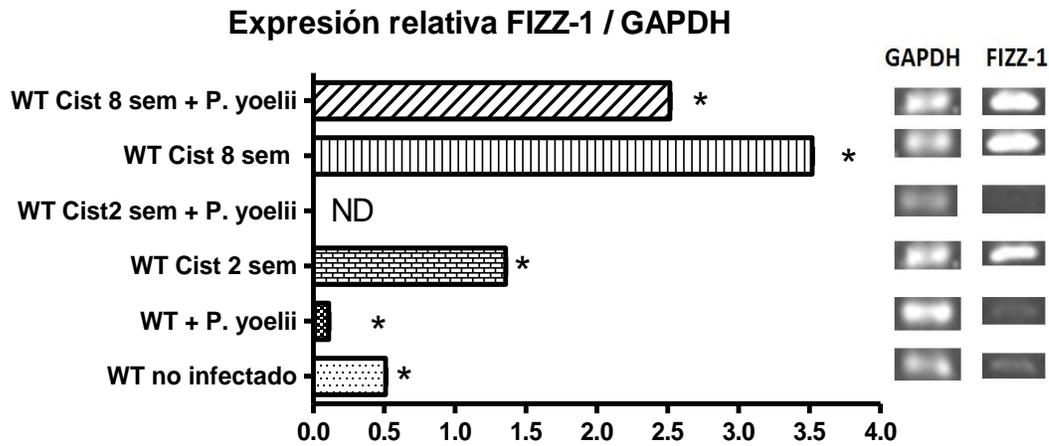


Figura 22.- Niveles de expresión de transcritos de mRNA del gen FIZZ1 de bazo en ratones BALB/c infectados con *P. yoelii* vs ratones coinfectados con *P. yoelii* 17XL, después de dos semanas ú ocho semanas de infección previa con diez cisticercos vía i.p. de *T. crassiceps*. En el séptimo día posterior a la inoculación con *P. yoelii* 17 XL se tomó la muestra.* Indica diferencia estadísticamente significativa. ND= no detectado.

Analizamos la expresión de T-bet a fin de determinar si la expresión de este transcrito suprime la polarización de una respuesta inmune tipo Th2, induciendo así altos niveles en la producción de IFN- γ , promoviendo una respuesta tipo Th1. En la figura 23 observamos que dicha expresión solo fue evidente en los ratones infectados únicamente con *T. crassiceps* con una evolución de dos semanas, corroborando lo que ha sido descrito anteriormente en este tipo de infecciones [60]. Por otro lado, al analizar los niveles de este gen en la infección de ocho semanas no se detectó su expresión (ND), lo que demuestra la polarización de dicha respuesta, debido a que es sabido que éstos producen una respuesta tipo Th2. Por otra parte no se detectaron los transcritos de T-bet en ningún grupo de ratones infectado con *P. yoelii*.

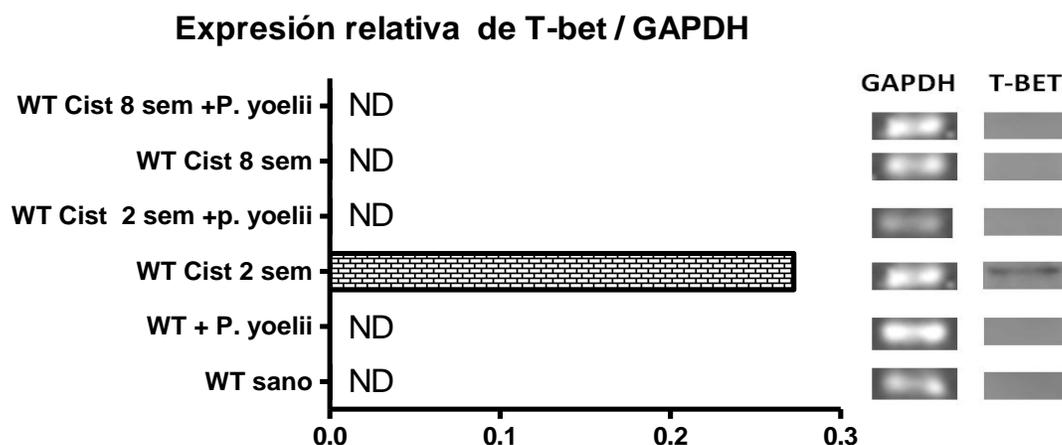


Figura 23. Niveles de expresión de transcritos de mRNA del gen T-bet de bazo en ratones BALB/c infectados con *P. yoelii* vs ratones coinfectados con *P. yoelii* 17XL, después de dos semanas u ocho semanas de infección previa con diez cisticercos vía i.p. de *T. crassiceps*. En el séptimo día posterior a la inoculación con *P. yoelii* 17 XL se tomó la muestra. ND= no detectado.

Para determinar el tipo de respuesta inducida por la coinfección con ambos parásitos, y conocer la influencia de la respuesta tipo Th2 inducida por la infección previa con *Taenia*, analizamos la expresión del transcrito para el gen GATA-3, el cual se ha demostrado que induce o aumenta la producción de citocinas del tipo Th2. En la figura 24 se demuestra que la infección con *T. crassiceps* de dos y ocho semanas respectivamente, induce la expresión de transcrito del gen GATA-3, por lo tanto se estimula una producción de citocinas Th2 y la polarización de la respuesta inmune hacia una respuesta tipo Th2; mientras que en los ratones infectados con *P. yoelii* no se detectó su expresión (ND). De manera particular, se observa que hay diferencias significativas en la expresión de este gen que aumenta tres veces en ratones coinfectados de dos semanas comparados con los ratones infectados sólo con *Taenia* (dos semanas); mientras que se presentan diferencias significativas en la disminución de la expresión del gen durante la coinfección de 8 semanas comparadas con los ratones que presenta una infección de 8 semanas sólo con *Taenia*. Lo cual probablemente, se debe a que la infección con *P. yoelii* cambia la activación de los macrófagos.

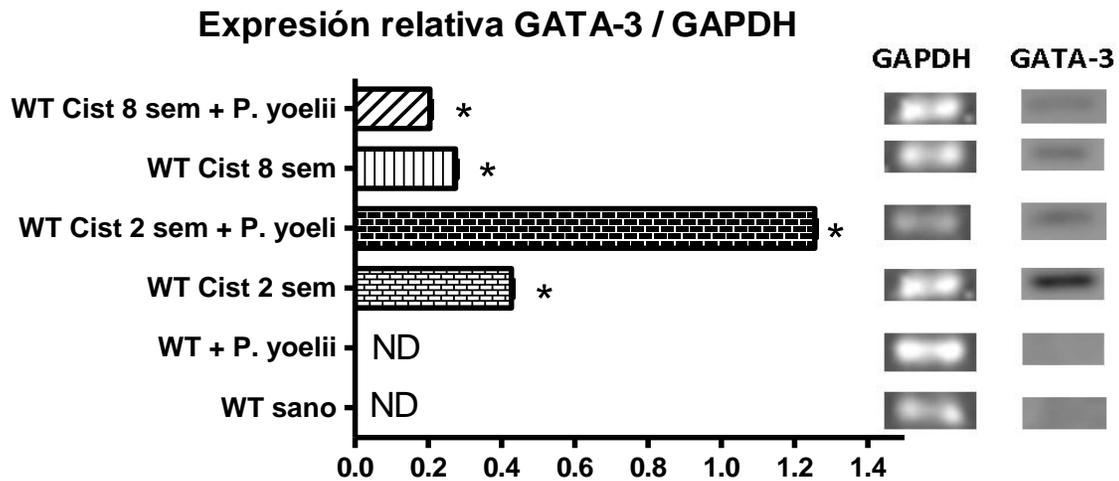


Figura 24. Niveles de expresión de transcritos de mRNA del gen GATA-3 de bazo en ratones BALB/c infectados con *P. yoelii* en comparación con ratones coinfectados con *P. yoelii* 17XL, después de dos semanas ú ocho semanas de infección previa con 10 cisticercos vía i.p. de *T. crassiceps*. En el séptimo día posterior a la inoculación con *P. yoelii* 17 XL se tomó la muestra. * Indica diferencia estadísticamente significativa. ND= no detectado

6. DISCUSIÓN

La malaria sigue siendo una de las principales causas de muerte por enfermedades infecciosas en el mundo, a pesar de los grandes esfuerzos por controlarla. Ésto, debido a que aún son pobremente entendidos los factores relacionados con la inmunidad y patogénesis relacionadas con la misma.

La respuesta inmune a la malaria, al igual que la ocasionada por otras enfermedades infecciosas, necesita de una respuesta inflamatoria capaz de controlar el crecimiento del parásito hasta la erradicación del mismo; pero al mismo tiempo, ésta respuesta no debe resultar excesiva para no dañar al hospedero. En éste contexto, muchas de las infecciones parasitarias intracelulares son letales, entre otras cosas, debido a que inducen respuestas inmunes inflamatorias exacerbadas que comprometen la salud del hospedero y lo llevan a la muerte.

Por el contrario, las infecciones por helmintos son bien toleradas y los parásitos prevalecen por mucho tiempo en el hospedero, lo que ha llevado a concluir que los helmintos tienen eficientes mecanismos para evadir y suprimir una respuesta inmune inflamatoria exacerbada que pudiera dañar la integridad de su hospedero y por lo tanto, su sobrevivencia [101].

Diversos estudios dan soporte a esta observación. Se ha descrito que la infección por helmintos tiene un papel benéfico en el control de las reacciones inflamatorias excesivas, tales como enfermedad de Chrons [102], colitis ulcerativa [103], así como en enfermedades alérgicas: como asma, dermatitis y rinitis [7], y en enfermedades autoinmunes como la encefalomiелitis [104, 105], y la artritis [106]. Además previamente se ha descrito que las infecciones por helmintos afectan la respuesta inmune hacia patógenos intracelulares como *Leishmania* [107] y *Trypanosoma* [108].

La fuerte inducción de una respuesta antiinflamatoria generada por la presencia de helmintos podría interferir regulando la respuesta inflamatoria exacerbada que genera la patología en individuos infectados por el plasmodio [35].

En éste trabajo de tesis se utilizó un modelo murino de infección por cisticercos de *T. crassiceps* para coinfectar con *P. yoelii* 17X, con la finalidad de conocer si una infección por helminto podría modificar la respuesta inmune contra la malaria.

Los resultados obtenidos en este estudio corroboran lo descrito previamente, la letalidad en los ratones BALB/c por la infección por *P. yoelii* 17XL es muy alta [89-91]. Sin embargo, pudimos demostrar que la infección previa con *T. crassiceps* permitió a los ratones sobrevivir por más tiempo a la infección con *P. yoelii* 17XL, esto estuvo asociado a un retraso en el proceso patológico y a una evidente restricción de la replicación del parásito. Por lo tanto, una infección previa retrasó la proliferación del plasmodio de *P. yoelii* 17XL minimizando la replicación del parásito en los primeros días de la infección.

Estos resultados son congruentes con estudios de coinfecciones con helmintos en ratones A/J y CBA infectados con *P. chabaudi-Schistosoma mansoni* donde se demuestra que existe una disminución en los niveles de la parasitemia [78, 109]. Contrastante a lo observado en otro estudio con un modelo de ratones SWISS y CBA, donde se reportó que no existían diferencias en la parasitemia o en el desarrollo de anemia en la coinfección *S. mansoni* - *P. yoelii* [75, 109]. Sin embargo, otros reportes indican que existe un incremento en la carga parasitaria y en la mortalidad en ratones C57BL/6 infectados con *P. chabaudi* - *S. mansoni* [77], *P. chabaudi* - *H. polygyrus* [81], así como en con *P. berghei* - *S. mansoni* [76].

Los resultados tan contrastantes entre distintos experimentos indican que el tipo de helminto y la cepa de ratón utilizado juegan un papel fundamental en la susceptibilidad a la infección por *Plasmodium*. Cabe destacar, que la cepa *P. yoelii* 17XL es letal en la mayoría de las cepas de ratón, y particularmente en la cepa

BALB/c utilizada en este estudio. Esto quiere decir que la infección por el helminto modificó algunos parámetros de la respuesta inmune del hospedero, generando un efecto protector a la infección con *P. yoelii* 17XL.

Los ratones infectados con *T. crassiceps* y coinfectados dos u ocho semanas después con *P. yoelii* 17XL tuvieron un retraso en la patología de la enfermedad. Esto fue muy evidente en la pérdida de peso de los ratones coinfectados con *P. yoelii* 17XL en la semana 8 después de la infección por *T. crassiceps*, ya que perdieron poco peso y presentaron menores signos de caquexia (atrofia muscular, debilitamiento, pérdida de peso, anorexia), esto probablemente fue debido a que la infección previa con *T. crassiceps* generó altos niveles de IL-10 e IL-4 y con ello se pudo inhibir las citocinas pro-inflamatorias, como TNF- α e IFN- γ , que se han asociado a caquexia [92, 93].

Además la coinfección tuvo un claro efecto en la anemia generada por la malaria. La infección crónica por el helminto protegió a los ratones de una anemia severa, al disminuir la destrucción de eritrocitos en comparación con los ratones infectados sólo con *P. yoelii* 17XL. Tratando de explicar el posible mecanismo implicado en esta protección se analizaron los niveles de MIF en el suero de los ratones infectados con *P. yoelii* 17XL, y en los coinfectados *T. crassiceps*-*P. yoelii* 17XL, ya que estudios previos señalan que esta molécula participa en inducción de la anemia [110].

Los ratones infectados solo con *P. yoelii* 17XL, que sucumbieron a la infección en forma temprana, tuvieron niveles incrementados de MIF en el suero, lo cual explica la anemia característica de esta infección. De manera interesante, los ratones coinfectados con *P. yoelii* 17XL en las semanas dos u ocho después de la infección por *T. crassiceps* tuvieron niveles más altos de MIF que los infectados con únicamente *P. yoelii* 17XL, aun cuando éstos ratones presentaron un menor efecto patológico en cuanto a los niveles de anemia, sobrevivieron más y tuvieron menor parasitemia. Esta observación inicial parece contraria a lo esperado, por la participación de MIF implicada en la anemia, previamente reportado.

Los niveles incrementados de MIF observados en esta coinfección pueden explicarse si tomamos en cuenta que la infección con *T. crassiceps* promueve la producción de MIF desde la tercera hasta séptima semana después de la infección, para después descender hasta alcanzar niveles significativamente bajos a partir de la novena semana después de la infección por *T. crassiceps*. Así, la pérdida de hemoglobina observada en las co-infecciones probablemente se deba a los niveles incrementados de MIF inducidos por *T. crassiceps* en sinergismos con MIF inducido por la presencia de *P. yoelii* 17XL. Estos niveles incrementados de MIF podrían actuar junto con IFN- γ y TNF- α para, por un lado evitar la replicación del parásito (lo cual explicaría los niveles disminuidos de parásitos y la mayor sobrevida observados), pero por otro lado favoreciendo la eritrofagocitosis, así como una diseritropoyesis, causando la anemia [15, 110].

Estas observaciones sugieren que la mortalidad temprana en la infección por *P. yoelii* 17XL fue independiente de niveles incrementados de MIF, y que la destrucción de los eritrocitos, no parece depender en su totalidad de la presencia de MIF como ha sido sugerido, ya que nosotros observamos niveles muy altos de MIF en suero con niveles regulares de hemoglobina en los ratones coinfectados.

Por otro lado, a través de diversos estudios se ha establecido que MIF induce la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-12 por macrófagos, moléculas esenciales para la resistencia a la malaria en etapas tempranas, además de que aumenta la fagocitosis de los parásitos por los macrófagos [111], de aquí que el aumento en la producción de MIF en las coinfecciones dio como resultado un incremento de la citocinas tipo Th1, que podrían reflejar una efectiva respuesta inmune que limitó de forma parcial la progresión de la infección, controlando el crecimiento parasitario en la etapa aguda de la infección. Además, la presencia *T. crassiceps* probablemente, reguló la respuesta inmune inflamatoria exacerbada que pudo inducir la presencia de MIF [112].

Estudios previos en ratones con infecciones de la mayoría de las especies no letales de *Plasmodium*, han establecido la importancia de una respuesta inmune tipo Th1 (IL-12, TNF- α e IFN- γ) en el pico primario de la parasitemia, para el control en la replicación del parásito [27]. Por lo que analizamos la producción de citocinas proinflamatorias en todos los grupos de ratones infectados con *P. yoelii* 17XL y coinfectados *T. crassiceps*-*P. yoelii* 17XL.

Observamos que la infección previa con *T. crassiceps* incremento la producción de TNF- α en relación con los ratones infectados solo con *P. yoelii* 17XL.

Estudios previos han descrito que TNF- α tiene una función protectora contra el parásito *Plasmodium* [113], se ha sugerido de esta citocina podría estar asociada con la restricción de la replicación del parásito. Sin embargo, no hay que perder de vista que una alta concentración de TNF- α también ha sido asociada con la severidad y muerte del hospedero por diversas patologías [114].

En este estudio nosotros observamos un aumento significativo de TNF- α e IL-12 en los grupos coinfectados, tanto a las de dos semanas como a la de ocho, lo cual nos planteó dos escenarios.

Por un lado, el aumento en estas citocinas explicaría la reducción en la carga parasitaria observada en los grupos coinfectados. Por el otro, no hubo patología asociada al aumento de estas citocinas debido a que la presencia del helminto en la coinfección favoreció la producción de IL-4 e IL-10 que contrarrestó los efectos patológicos del TNF- α e IL-12. Demostrando que la infección por el helminto modificó el curso de la infección por *P. yoelii* 17XL. Mientras que los ratones infectados únicamente con *P. yoelii* 17XL tuvieron niveles disminuidos de IL-10, lo cual pudo favorecer la patología y la mortalidad observada en éste grupo.

Estas observaciones son congruentes con lo descrito en otros estudios que indican que bajos niveles de IL-10 y niveles incrementados de TNF- α en plasma,

tienen una relación directa con las complicaciones de la enfermedad, incluyendo anemia y malaria cerebral [27, 115]. Sanni y cols. en 2004 describieron que los ratones IL-10^{-/-} infectados con *P. chabaudi* desarrollan una exacerbada patología (edema cerebral, hemorragias, pérdida de peso) y un alto porcentaje de mortalidad en comparación con los ratones silvestres [116]. Además, Li y cols. en 1999 demostraron que la inactivación del IFN- γ ó del TNF- α en ratones IL-10^{-/-} reduce la mortalidad y la patología asociada a la enfermedad [116, 117]. En otros estudios la administración de IL-10 en ratones CBA los protegió contra la malaria cerebral, por el contrario la inactivación de la IL-10 con anticuerpos monoclonales favoreció un incremento significativo en la incidencia de la malaria cerebral en ratones BALB/c [118].

En estudios llevados a cabo en humanos, se ha observado que las concentraciones de IL-10 fueron significativamente bajas en niños con anemia severa en África [119]. Entonces las altas concentraciones en plasma de IL-10 en los ratones con una infección previa de *T. crassiceps*, pudo generar protección contra una inflamación exacerbada provocada por los altos niveles de IFN- γ , TNF- α , e IL-12 evitando la patología severa asociada a la infección por *P. yoelii* 17XL

Cabe hacer notar que los ratones infectados únicamente con *P. yoelii* tuvieron niveles basales de IL-12. Tomando en cuenta que actualmente es claramente aceptado que durante la enfermedad severa por malaria hay una deficiencia en la producción de IL-12, asociada a la patología de la enfermedad, esto incluye una alta carga parasitaria, que suprime las células inmunes productoras de IL-12 [83, 120-122]. Esto explicaría por qué los ratones infectados únicamente con *P. yoelii* 17XL sucumbieron más rápido y en mayor proporción que los coinfectados, puesto que los primeros no produjeron IL-12. Por otro lado, la coinfección de ocho semanas sinérgico la producción de IL12 favoreciendo la protección y supervivencia de los ratones coinfectados.

En relación con los niveles de IL- β se observó que la infección previa con *T. crassiceps* favoreció un aumento en la producción de esta citocina a comparación de aquellos que sólo fueron infectados con *P. yoelii* 17XL. Además, este aumento fue directamente proporcional al tiempo de evolución de la infección con *T. crassiceps*.

Ahora bien, se sabe que una sobreproducción de IL1- β puede causar un aumento de los efectos patogénicos promoviendo la anemia, además de que estudios previos han reportado que existe una elevada circulación de IL1- β en individuos con CM y SMA [123, 124]. No obstante, nuestros resultados demuestran que la infección previa de ocho semanas con *T. crassiceps* redujo la infección por *P. yoelii* 17XL, presentando mayores niveles de Hb, lo cual sugiere que la rápida inducción de IL1- β puede controlar la replicación del parásito. Esta afirmación es congruente con los estudios de Collins Souma y cols, en 2000, que han descrito que una alta producción de IL- β reduce la anemia e induce una moderada protección contra anemia severa por malaria. Mientras que una baja producción IL1- β en individuos infectados por *Plasmodium* incrementa el riesgo de desarrollar SMA. Así ellos hipotetizan que los niveles incrementados de IL1- β durante la malaria cerebral, inducen protección contra SMA, promoviendo el aumento de la eritropoyesis en la médula ósea [97]. Aunque el mecanismo por el cual el aumento en la producción IL1- β protege contra la SMA aún no ha sido determinado, estudios previos *in vitro* muestran que IL-1 β promueve la producción de factores hematopoyéticos, incluyendo el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), entre otros [125, 126]. Por lo cual estos resultados sugieren que en las co-infecciones la presencia de IL-1 β evitó la SMA.

Por otra parte, los niveles séricos de IFN- γ estuvieron incrementados en los ratones infectados solo con *P. yoelii* 17XL, mientras que los ratones coinfectados de 8 semanas tuvieron niveles reducidos de IFN- γ .

Actualmente es ampliamente aceptado que la producción temprana de IFN- γ contribuye a resolver la infección en ratones infectados con distintas especies de *Plasmodium* [31]. Sin embargo nosotros observamos mayor mortalidad asociada a niveles incrementados de IFN- γ en los ratones infectados únicamente con *P. yoelii* 17XL, mientras que en nuestro modelo de coinfección de ocho semana, el IFN- γ disminuido no parece ser el responsable de la reducción de la parasitemia. Por el contrario, bajos niveles de IFN- γ pudieron contribuir a evitar los daños colaterales de una respuesta inflamatoria exacerbada, alargando el tiempo de vida de los ratones coinfectados con ocho semana después de la infección con *T. crassiceps*.

La observación de los niveles disminuidos de IFN- γ , en el grupo de los ratones coinfectados de ocho semana, fue congruente con los niveles elevados de IL-4 observados en los mismos. Los niveles de IL-4 fueron superiores a los detectados en los ratones infectados únicamente por la infección con *T. crassiceps* de ocho semanas de evolución. Éstos niveles incrementados de IL-4 podrían contribuir a la sobrevivencia de los ratones coinfectados de ocho semana por dos vías: al regular el desarrollo de células Th1, y reducir la producción de IFN- γ , al mismo tiempo que participa como factor de crecimiento y diferenciación de los linfocitos B, generando un aumento en la respuesta de anticuerpos que es crucial para controlar el parásito [36]. Esto es consistente con las observaciones de Helmbj y cols. en 1996 quienes señala que la respuesta IgE específica a malaria requiere de varias infecciones con *P. chabaudi*, mientras que la infección con *S. mansoni* requiere de una sola exposición para alcanzar la misma intensidad en la respuesta IgE específica a malaria [127].

Además se sabe que IL-4 tiene efectos sobre la producción de anticuerpos: por la inhibición de la producción de IFN- γ , esto reduce la actividad de esta citocina, la cual media el switch de las inmunoglobulinas de la subclase IgG1 y IgG3 hacia la opsonización del parásito por fagocitosis por los monocitos activados [128]. Estudios en la cinética de la infección con *P. yoelii* 17 XNL muestran que existe un aumento de IL-4 a través de la infección mientras que los niveles de IFN- γ regresan a los

niveles normales, indicando que es necesaria una respuesta Th2 [115], por lo tanto la infección previa de ocho semanas genera un aumento de la producción de IL-4 lo cual induce un aumento en la sobrevivencia y reduce la patología. Por lo que la inducción de citocinas antiinflamatorias como IL-4 y IL-10 podría prevenir la patología después de la fase aguda de la infección por malaria.

Los datos obtenidos en este trabajo demuestran que una infección previa de ocho semanas con cisticercos de *T. crassiceps* en ratones con fondo genético BALB/c, tiene un profundo efecto en el sistema inmune el cual puede influir la respuesta inmune contra la malaria y afectar el curso en la infección. En este sentido la diferencia observada en la susceptibilidad y la patología de las coinfecciones fue distinta, debido a que a medida que la infección con *T. crassiceps* se hacía crónica, se observó un cambio gradual de una respuesta tipo Th1 inicial a una respuesta Th2 [60]. Por lo cual, el perfil de citocinas y posiblemente el estado de activación de los M ϕ era distinto entre una coinfección realizada en la semana 2 ó en la semana 8 después de la infección con *T. crassiceps*, lo que podría influir en el curso de la segunda infección.

Este cambio en el estado de activación de los M ϕ se demostró a partir de la obtención de transcritos de mRNA de moléculas marcadores para M ϕ AA como YM1 y FIZZ1. En la coinfección de dos semanas no se detectó expresión de los genes YM1 y FIZZ1, seguramente porque la respuesta inmune generada por ambos parásitos fue tipo Th1 limitando la expresión de dichos genes, de aquí que los macrófagos presentes fueron del tipo clásico M ϕ CA.

Se observaron diferencias en la expresión del gen YM1 en los ratones coinfectados de ocho semanas en relación a los que fueron infectados solo con *P. yoelii* 17XL, por el contrario, si existen diferencias significativas en los transcritos de FIZZ1 en la coinfección de ocho semanas con un incremento significativo a comparación de los ratones infectados solo con *P. yoelii* 17XL (Fig. 13). Lo cual indica que los M ϕ presentes en la coinfección de ocho semanas están

alternativamente activados y se ha atribuido que estos producen bajas cantidades de citocinas proinflamatorias TNF e IL-12 [129], así como un incremento en su capacidad fagocítica.

Por otro lado, se demostró que solo los ratones infectados con *T. crassiceps* de dos semanas expresan el transcrito T-bet (Fig. 14), lo cual suprime la respuesta inmune tipo th2, promoviendo una respuesta Th1 corroborando lo descrito para *Taenia* en cuanto a la respuesta inicial de Th1 en la infección. No se detectó la presencia del transcrito T-bet en los bazo de los ratones infectados con *P. yoelii* 17XL, ni en los de ratones co-infectados, lo cual indica que en los ratones BALB/c infectados con *P. yoelii* 17XL se induce una respuesta inmune tipo Th2, así mismo, se observa la polarización de una respuesta tipo Th2 por la infección crónica con *T. crassiceps*.

Al analizar la expresión del transcrito para el gen GATA-3, se observa que no se detecta en la infección sólo con *P. yoelii* 17XL, mientras que *T. crassiceps* induce la expresión de este transcrito en el bazo de los ratones infectados, induciendo la producción de citocinas Th2, de manera interesante en la coinfección de dos semanas de infección se observa que la expresión de este gen es tres veces mayor, asimismo hay una disminución de la expresión de GATA-3 en la coinfección de ocho semanas comparados con su contraparte. La expresión de GATA-3 promueve la expresión de citocinas antiinflamatorias en el bazo, resulta interesante destacar que los ratones coinfectados presentan la expresión de este gen, mientras que en los ratones que sólo son infectados con *P. yoelii* 17XL no se detecta. Se sabe que el bazo cumple varios roles importantes durante la infección con malaria: primero por remover los pRBCs y los glóbulos dañados de circulación [91], y segundo el bazo es el mayor sitio de eritropoyesis y hematopoyesis [130], tercero la respuesta a patógenos específicos por las células T y B son generados en la pulpa blanca del bazo [18]. Por lo cual la expresión de transcritos de GATA-3 y la producción de citocinas antiinflamatorias protegen a los ratones coinfectados probablemente con la producción de anticuerpos que impida la invasión de RBC y que neutralice una

excesiva producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α e IFN- γ las cuales son conocidas como antagonistas de la hematopoyesis [110] así como estimulan la proliferación de células B que son necesarias para el desarrollo de una inmunidad protectora [36].

Las citocinas son responsables de la severidad de la enfermedad, nuestros resultados demuestran que una excesiva producción IFN- γ , así como una deficiente producción de IL-4, IL-10 y IL-12 fueron responsables de la patología de los ratones infectados solo con *P. yoelii* 17XL, mientras que la infección previa de ocho semanas se produjo una respuesta Th2 con niveles altos de IL-4 y de IL-10 lo cual le dio a los ratones la habilidad de controlar los niveles de circulación de citocinas proinflamatorias, y que estas faciliten la eliminación del parásito, pero no dispensen la patología, de manera interesante la infección crónica con *T. crassiceps* participa en el aumento de la producción de IL-1 β , IL-12, al mismo tiempo que regula la sobreproducción de los niveles de INF- γ , sin afectar la eliminación y el control de la replicación del parásito en la infección aguda. Por lo tanto, la inducción de citocinas antiinflamatorias por la infección previa de ocho semanas con *T. crassiceps* interfiere con la respuesta inflamatoria exacerbada, inhibiendo la patología, y creando un balance que protege a los individuos contra la malaria.

Estos resultados demuestran que la respuesta inmune tipo Th2 generada por el helminto es requerida para la protección contra *P. yoelii* 17XL, además de que se encontraron niveles altos de IL-12 e IFN- γ en presencia de citocinas antiinflamatorias lo cual indica que la respuesta Th1 es esencial para el control del parásito. Así la severidad de la enfermedad podría variar dependiendo el nivel y tipo de citocinas producidas después de la infección de malaria. Demostrando que el relativo balance entre citocinas Th1 y Th2 es crucial para las consecuencias de la infección.

Los datos obtenidos en este trabajo son importantes para el diseño de vacunas efectivas contra *Plasmodium*, sin embargo, son necesarios futuros estudios para un mejor entendimiento de los efectos del balance de citocinas pro y antiinflamatorias

en las coinfecciones con helmintos, ya sea para determinar la resolución, o persistencia, o empeoramiento de la infección secundaria.

Los helmintos han coevolucionado con nosotros por millones de años, y es probable que la ausencia o presencia, el tiempo de infección, la dosis o las reinfecciones deberán ser tomados en cuenta en los esquemas de salud y el desarrollo de vacunas para combatir enfermedades inflamatorias ó disminuir la patología, como en el caso de la malaria.

CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos de éste trabajo de tesis se puede concluir lo siguiente:

- La infección con *Plasmodium yoelii* 17XL en ratones BALB/c se caracteriza por niveles incrementados de IFN- γ y niveles bajos de IL-4 e IL-10. Esta condición favorece el estado patológico y la mortalidad de los ratones infectados.
- La presencia del helminto *Taenia crassiceps* tiene un profundo efecto en la respuesta inmune contra el parásito causante de la malaria y afectando el curso de la infección.
- La coinfección con *P. yoelii* 17XL en etapas tempranas, dos semanas después de la infección con *T. crassiceps*, incrementa la sobrevivencia del hospedero y retrasa la proliferación del plasmodio medianamente.
- La coinfección con *P. yoelii* 17XL en etapas tardías, ocho semanas después de la infección con *T. crassiceps*, incrementa significativamente la sobrevivencia del hospedero, retrasa la proliferación del plasmodio y protege a los ratones de una patología severa.
- Los cambios inmunológicos generados por la infección crónica por *T. crassiceps* modifican la respuesta inmune en contra de *P. yoelii* 17XL: la coinfección de ocho semana genera una respuesta inmune específica diferente a la generada en la coinfección de dos semanas, incrementando los niveles de IL-10, IL-4 e IL-12.
- Los mecanismos que generan la sobrevida y disminuyen la patología asociada la malaria en la coinfección tardía no están del todo establecidos, pero parece obvia la participación del microambiente de citocinas pre-establecido: la coexistencia de un perfil mixto de citocinas Th1/Th2 (IL-4, IL-10 e IL-12), junto con macrófagos alternativamente activados que podrían dirigir el curso de la respuesta inmune.
- La principal implicación de estos hallazgos es que las infecciones crónicas por helmintos podrían afectar de manera significativa la capacidad de la respuesta de los individuos en contra de otros parásitos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Janeway, C., *Immunobiology : the immune system in health and disease*. 6th ed. 2005, New York: Garland Science. xxiii, 823 p.
2. Abbas AK, L.A., *Inmunología celular y molecular*. 5ta. ed, ed. Elsevier. 2004, España. 563pp.
3. Kayama, H. and K. Takeda, *The innate immune response to Trypanosoma cruzi infection*. *Microbes Infect*, 2010. **12**(7): p. 511-7.
4. Abbas, A.K., K.M. Murphy, and A. Sher, *Functional diversity of helper T lymphocytes*. *Nature*, 1996. **383**(6603): p. 787-93.
5. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. *J Immunol*, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
6. Singh, V. and J.N. Agrewala, *Regulatory role of pro-Th1 and pro-Th2 cytokines in modulating the activity of Th1 and Th2 cells when B cell and macrophages are used as antigen presenting cells*. *BMC Immunol*, 2006. **7**: p. 17.
7. Helmbly, H., *Helminths and our immune system: friend or foe?* *Parasitol Int*, 2009. **58**(2): p. 121-7.
8. MartIn-Fontecha, A., et al., *Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming*. *J Exp Med*, 2003. **198**(4): p. 615-21.
9. Moser, M. and K.M. Murphy, *Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development*. *Nat Immunol*, 2000. **1**(3): p. 199-205.
10. Gajewski, T.F., et al., *Murine Th1 and Th2 clones proliferate optimally in response to distinct antigen-presenting cell populations*. *J Immunol*, 1991. **146**(6): p. 1750-8.
11. Borkow, G., et al., *Chronic immune activation associated with intestinal helminth infections results in impaired signal transduction and anergy*. *J Clin Invest*, 2000. **106**(8): p. 1053-60.
12. Sacks, D. and A. Sher, *Evasion of innate immunity by parasitic protozoa*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(11): p. 1041-7.
13. Snow, R.W., J.F. Trape, and K. Marsh, *The past, present and future of childhood malaria mortality in Africa*. *Trends Parasitol*, 2001. **17**(12): p. 593-7.
14. Good, M.F., et al., *Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research*. *Annu Rev Immunol*, 2005. **23**: p. 69-99.
15. Martiney, J.A., et al., *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**(4): p. 2259-67.
16. Taylor-Robinson, A.W., *Regulation of immunity to Plasmodium: implications from mouse models for blood stage malaria vaccine design*. *Exp Parasitol*, 2010. **126**(3): p. 406-14.
17. Bogreau, H., et al., *Genetic diversity and structure of African Plasmodium falciparum populations in urban and rural areas*. *Am J Trop Med Hyg*, 2006. **74**(6): p. 953-9.
18. Engwerda, C.R., L. Beattie, and F.H. Amante, *The importance of the spleen in malaria*. *Trends Parasitol*, 2005. **21**(2): p. 75-80.
19. Gonzalez-Ceron, L., et al., *[Efficacy of a rapid test to diagnose Plasmodium vivax in symptomatic patients of Chiapas, Mexico]*. *Salud Publica Mex*, 2005. **47**(4): p. 282-7.

20. Contreras-Ochoa, C. and J.M. Ramsey, [*Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* gametocyte stages are neglected in vaccine development]. *Salud Publica Mex*, 2004. **46**(1): p. 64-70.
21. Segura, C. and S. Blair, [*Mitochondria in the Plasmodium genera*]. *Biomedica*, 2003. **23**(3): p. 351-63.
22. Amante, F.H., et al., *A role for natural regulatory T cells in the pathogenesis of experimental cerebral malaria*. *Am J Pathol*, 2007. **171**(2): p. 548-59.
23. Castro, R.I. and G.M.C. Rodriguez, [*Proteomic analysis of Plasmodium, the causal agent of Malaria*]. *Salud Publica Mex*, 2009. **51 Suppl 3**: p. S395-402.
24. Hay, S.I., et al., *A world malaria map: Plasmodium falciparum endemicity in 2007*. *PLoS Med*, 2009. **6**(3): p. e1000048.
25. Hunt, N.H. and G.E. Grau, *Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria*. *Trends Immunol*, 2003. **24**(9): p. 491-9.
26. Stevenson, M.M. and E.M. Riley, *Innate immunity to malaria*. *Nat Rev Immunol*, 2004. **4**(3): p. 169-80.
27. Langhorne, J., et al., *Dendritic cells, pro-inflammatory responses, and antigen presentation in a rodent malaria infection*. *Immunol Rev*, 2004. **201**: p. 35-47.
28. Hartgers, F.C. and M. Yazdanbakhsh, *Co-infection of helminths and malaria: modulation of the immune responses to malaria*. *Parasite Immunol*, 2006. **28**(10): p. 497-506.
29. Langhorne, J., et al., *Immunity to malaria: more questions than answers*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(7): p. 725-32.
30. Imai, T., et al., *Involvement of CD8+ T cells in protective immunity against murine blood-stage infection with Plasmodium yoelii 17XL strain*. *Eur J Immunol*, 2010. **40**(4): p. 1053-61.
31. Mohan, K., P. Moulin, and M.M. Stevenson, *Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage Plasmodium chabaudi AS infection*. *J Immunol*, 1997. **159**(10): p. 4990-8.
32. Fortin, A., M.M. Stevenson, and P. Gros, *Susceptibility to malaria as a complex trait: big pressure from a tiny creature*. *Hum Mol Genet*, 2002. **11**(20): p. 2469-78.
33. Pichyangkul, S., et al., *Malaria blood stage parasites activate human plasmacytoid dendritic cells and murine dendritic cells through a Toll-like receptor 9-dependent pathway*. *J Immunol*, 2004. **172**(8): p. 4926-33.
34. Coban, C., et al., *Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin*. *J Exp Med*, 2005. **201**(1): p. 19-25.
35. Troye-Blomberg, M. and K. Berzins, *Immune interactions in malaria co-infections with other endemic infectious diseases: implications for the development of improved disease interventions*. *Microbes Infect*, 2008. **10**(9): p. 948-52.
36. von der Weid, T., N. Honarvar, and J. Langhorne, *Gene-targeted mice lacking B cells are unable to eliminate a blood stage malaria infection*. *J Immunol*, 1996. **156**(7): p. 2510-6.
37. Langhorne, J., et al., *A role for B cells in the development of T cell helper function in a malaria infection in mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(4): p. 1730-4.
38. Stevenson, M.M. and B.C. Urban, *Antigen presentation and dendritic cell biology in malaria*. *Parasite Immunol*, 2006. **28**(1-2): p. 5-14.
39. Wykes, M.N., et al., *Plasmodium strain determines dendritic cell function essential for survival from malaria*. *PLoS Pathog*, 2007. **3**(7): p. e96.

40. Wykes, M.N., et al., *Systemic tumor necrosis factor generated during lethal Plasmodium infections impairs dendritic cell function*. J Immunol, 2007. **179**(6): p. 3982-7.
41. Hisaeda, H., et al., *Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4+ CD25+ regulatory T cells*. Nat Med, 2004. **10**(1): p. 29-30.
42. Omer, F.M., J.B. de Souza, and E.M. Riley, *Differential induction of TGF-beta regulates proinflammatory cytokine production and determines the outcome of lethal and nonlethal Plasmodium yoelii infections*. J Immunol, 2003. **171**(10): p. 5430-6.
43. Walther, M., et al., *Upregulation of TGF-beta, FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection*. Immunity, 2005. **23**(3): p. 287-96.
44. Moreau, E. and A. Chauvin, *Immunity against helminths: interactions with the host and the intercurrent infections*. J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: p. 428593.
45. Mooney, K.A., et al., *Immune destruction of larval taenia crassiceps in mice*. Infect Immun, 2000. **68**(5): p. 2393-401.
46. Flisser, A., R. Rodriguez-Canul, and A.L. Willingham, 3rd, *Control of the taeniosis/cysticercosis complex: future developments*. Vet Parasitol, 2006. **139**(4): p. 283-92.
47. Pawlowski, Z., J. Allan, and E. Sarti, *Control of Taenia solium taeniasis/cysticercosis: from research towards implementation*. Int J Parasitol, 2005. **35**(11-12): p. 1221-32.
48. Zepeda, N., et al., *Decrease of peritoneal inflammatory CD4(+), CD8(+), CD19(+) lymphocytes and apoptosis of eosinophils in a murine Taenia crassiceps infection*. Parasitol Res, 2010. **107**(5): p. 1129-35.
49. Ostoa-Saloma, P., et al., *Budding of Taenia crassiceps cysticerci in vitro is promoted by crowding in addition to hormonal, stress, and energy-related signals*. J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: p. 510978.
50. Willms, K. and R. Zurabian, *Taenia crassiceps: in vivo and in vitro models*. Parasitology, 2010. **137**(3): p. 335-46.
51. Heldwein, K., et al., *Subcutaneous Taenia crassiceps infection in a patient with non-Hodgkin's lymphoma*. Am J Trop Med Hyg, 2006. **75**(1): p. 108-11.
52. Chuck, R.S., et al., *Surgical removal of a subretinal proliferating cysticercus of taeniaeformis crassiceps*. Arch Ophthalmol, 1997. **115**(4): p. 562-3.
53. Suzuki, L.A., et al., *Evaluation of Taenia solium and Taenia crassiceps cysticercal antigens for immunodiagnosis of neurocysticercosis using ELISA on cerebrospinal fluid samples*. Rev Soc Bras Med Trop, 2007. **40**(2): p. 152-5.
54. Sciutto, E., et al., *Depressed T-cell proliferation associated with susceptibility to experimental Taenia crassiceps infection*. Infect Immun, 1995. **63**(6): p. 2277-81.
55. Maizels, R.M. and M. Yazdanbakhsh, *Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(9): p. 733-44.
56. Taylor, M.D., et al., *Removal of regulatory T cell activity reverses hyporesponsiveness and leads to filarial parasite clearance in vivo*. J Immunol, 2005. **174**(8): p. 4924-33.
57. Sciutto, E., et al., *Murine Taenia crassiceps cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility*. Parasitol Res, 1991. **77**(3): p. 243-6.
58. Fragoso, G., et al., *Preferential growth of Taenia crassiceps cysticerci in female mice holds across several laboratory mice strains and parasite lines*. J Parasitol, 2008. **94**(2): p. 551-3.

59. Reyes, J.L., et al., *Differential response of antigen presenting cells from susceptible and resistant strains of mice to Taenia crassiceps infection*. Infect Genet Evol, 2009. **9**(6): p. 1115-27.
60. Terrazas, L.I., et al., *Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (Taenia crassiceps)*. J Parasitol, 1998. **84**(1): p. 74-81.
61. Rodriguez-Sosa, M., et al., *Cutting edge: susceptibility to the larval stage of the helminth parasite Taenia crassiceps is mediated by Th2 response induced via STAT6 signaling*. J Immunol, 2002. **168**(7): p. 3135-9.
62. Rodriguez-Sosa, M., et al., *A STAT4-dependent Th1 response is required for resistance to the helminth parasite Taenia crassiceps*. Infect Immun, 2004. **72**(8): p. 4552-60.
63. Telfer, S., et al., *Species interactions in a parasite community drive infection risk in a wildlife population*. Science. **330**(6001): p. 243-6.
64. Druilhe, P., A. Tall, and C. Sokhna, *Worms can worsen malaria: towards a new means to roll back malaria?* Trends Parasitol, 2005. **21**(8): p. 359-62.
65. Borkow, G. and Z. Bentwich, *HIV and helminth co-infection: is deworming necessary?* Parasite Immunol, 2006. **28**(11): p. 605-12.
66. Maizels, R.M., et al., *Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations*. Nature, 1993. **365**(6449): p. 797-805.
67. Reiner, S.L. and R.M. Locksley, *The regulation of immunity to Leishmania major*. Annu Rev Immunol, 1995. **13**: p. 151-77.
68. Hermanek, J., P.K. Goyal, and D. Wakelin, *Lymphocyte, antibody and cytokine responses during concurrent infections between helminths that selectively promote T-helper-1 or T-helper-2 activity*. Parasite Immunol, 1994. **16**(2): p. 111-7.
69. Pearce, E.J. and S.L. Reiner, *Induction of Th2 responses in infectious diseases*. Curr Opin Immunol, 1995. **7**(4): p. 497-504.
70. Svetic, A., et al., *A primary intestinal helminthic infection rapidly induces a gut-associated elevation of Th2-associated cytokines and IL-3*. J Immunol, 1993. **150**(8 Pt 1): p. 3434-41.
71. Lawrence, R.A., et al., *Infection of IL-4-deficient mice with the parasitic nematode Brugia malayi demonstrates that host resistance is not dependent on a T helper 2-dominated immune response*. J Immunol, 1995. **154**(11): p. 5995-6001.
72. Kullberg, M.C., et al., *Infection with Schistosoma mansoni alters Th1/Th2 cytokine responses to a non-parasite antigen*. J Immunol, 1992. **148**(10): p. 3264-70.
73. Actor, J.K., et al., *Helminth infection results in decreased virus-specific CD8+ cytotoxic T-cell and Th1 cytokine responses as well as delayed virus clearance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(3): p. 948-52.
74. Curry, A.J., et al., *Evidence that cytokine-mediated immune interactions induced by Schistosoma mansoni alter disease outcome in mice concurrently infected with Trichuris muris*. J Exp Med, 1995. **181**(2): p. 769-74.
75. Lewinsohn, R., *Anaemia in mice with concomitant Schistosoma mansoni and Plasmodium berghei yoelii infection*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1975. **69**(1): p. 51-6.
76. Legesse, M., B. Erko, and F. Balcha, *Increased parasitaemia and delayed parasite clearance in Schistosoma mansoni and Plasmodium berghei co-infected mice*. Acta Trop, 2004. **91**(2): p. 161-6.

77. Helmbj, H., M. Kullberg, and M. Troye-Blomberg, *Altered immune responses in mice with concomitant Schistosoma mansoni and Plasmodium chabaudi infections*. Infect Immun, 1998. **66**(11): p. 5167-74.
78. Yoshida, A., et al., *Schistosoma mansoni infection cancels the susceptibility to Plasmodium chabaudi through induction of type 1 immune responses in A/J mice*. Int Immunol, 2000. **12**(8): p. 1117-25.
79. Graham, A.L., et al., *Malaria-filaria coinfection in mice makes malarial disease more severe unless filarial infection achieves patency*. J Infect Dis, 2005. **191**(3): p. 410-21.
80. Yan, Y., et al., *Down-regulation of murine susceptibility to cerebral malaria by inoculation with third-stage larvae of the filarial nematode Brugia pahangi*. Parasitology, 1997. **114 (Pt 4)**: p. 333-8.
81. Su, Z., et al., *Impairment of protective immunity to blood-stage malaria by concurrent nematode infection*. Infect Immun, 2005. **73**(6): p. 3531-9.
82. Coleman, R.M., A. Bruce, and N.J. Rencricca, *Malaria: macrophage migration inhibition factor (MIF)*. J Parasitol, 1976. **62**(1): p. 137-8.
83. Chaiyaroj, S.C., et al., *Reduced levels of transforming growth factor-beta1, interleukin-12 and increased migration inhibitory factor are associated with severe malaria*. Acta Trop, 2004. **89**(3): p. 319-27.
84. Awandare, G.A., et al., *Decreased circulating macrophage migration inhibitory factor (MIF) protein and blood mononuclear cell MIF transcripts in children with Plasmodium falciparum malaria*. Clin Immunol, 2006. **119**(2): p. 219-25.
85. Juttner, S., et al., *Migration inhibitory factor induces killing of Leishmania major by macrophages: dependence on reactive nitrogen intermediates and endogenous TNF-alpha*. J Immunol, 1998. **161**(5): p. 2383-90.
86. Sikasunge, C.S., et al., *Risk factors associated with porcine cysticercosis in selected districts of Eastern and Southern provinces of Zambia*. Vet Parasitol, 2007. **143**(1): p. 59-66.
87. Sciutto, E., et al., *Taenia solium disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions*. Microbes Infect, 2000. **2**(15): p. 1875-90.
88. Bobes, R.J., et al., *Genetic diversity of Taenia solium cysticerci from naturally infected pigs of central Mexico*. Vet Parasitol. **168**(1-2): p. 130-5.
89. Legorreta-Herrera, M., et al., *Early treatment during a primary malaria infection modifies the development of cross immunity*. Parasite Immunol, 2004. **26**(1): p. 7-17.
90. Shear, H.L., et al., *Correlation of increased expression of intercellular adhesion molecule-1, but not high levels of tumor necrosis factor-alpha, with lethality of Plasmodium yoelii 17XL, a rodent model of cerebral malaria*. Am J Trop Med Hyg, 1998. **59**(6): p. 852-8.
91. Weiss, L., *Mechanisms of splenic control of murine malaria: cellular reactions of the spleen in lethal (strain 17XL) Plasmodium yoelii malaria in BALB/c mice, and the consequences of pre-infective splenectomy*. Am J Trop Med Hyg, 1989. **41**(2): p. 144-60.
92. Remels, A.H., et al., *TNF-alpha impairs regulation of muscle oxidative phenotype: implications for cachexia?* FASEB J, 2010. **24**(12): p. 5052-62.
93. Cannon, T., et al., *Comparison of animal models for head and neck cancer cachexia*. Laryngoscope, 2007. **117**(12): p. 2152-8.

94. McDevitt, M.A., et al., *A critical role for the host mediator macrophage migration inhibitory factor in the pathogenesis of malarial anemia*. The Journal of experimental medicine, 2006. **203**(5): p. 1185-96.
95. Shaffer, N., et al., *Tumor necrosis factor and severe malaria*. J Infect Dis, 1991. **163**(1): p. 96-101.
96. Kwiatkowski, D., et al., *TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated Plasmodium falciparum malaria*. Lancet, 1990. **336**(8725): p. 1201-4.
97. Ouma, C., et al., *Polymorphic variability in the interleukin (IL)-1beta promoter conditions susceptibility to severe malarial anemia and functional changes in IL-1beta production*. J Infect Dis, 2008. **198**(8): p. 1219-26.
98. Stevenson, M.M., et al., *IL-12-induced protection against blood-stage Plasmodium chabaudi AS requires IFN-gamma and TNF-alpha and occurs via a nitric oxide-dependent mechanism*. J Immunol, 1995. **155**(5): p. 2545-56.
99. Ho, M., et al., *Endogenous interleukin-10 modulates proinflammatory response in Plasmodium falciparum malaria*. J Infect Dis, 1998. **178**(2): p. 520-5.
100. Day, N.P., et al., *The prognostic and pathophysiologic role of pro- and antiinflammatory cytokines in severe malaria*. J Infect Dis, 1999. **180**(4): p. 1288-97.
101. Maizels, R.M., et al., *Helminth parasites--masters of regulation*. Immunol Rev, 2004. **201**: p. 89-116.
102. Summers, R.W., et al., *Trichuris suis therapy in Crohn's disease*. Gut, 2005. **54**(1): p. 87-90.
103. Summers, R.W., et al., *Trichuris suis therapy for active ulcerative colitis: a randomized controlled trial*. Gastroenterology, 2005. **128**(4): p. 825-32.
104. Reyes, J.L., et al., *Taenia crassiceps infection abrogates experimental autoimmune encephalomyelitis*. Cell Immunol, 2011. **267**(2): p. 77-87.
105. Gruden-Movsesijan, A., et al., *Trichinella spiralis: modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis in DA rats*. Exp Parasitol, 2008. **118**(4): p. 641-7.
106. Rocha, F.A., et al., *Protective effect of an extract from Ascaris suum in experimental arthritis models*. Infect Immun, 2008. **76**(6): p. 2736-45.
107. Rodriguez-Sosa, M., et al., *Acute cysticercosis favours rapid and more severe lesions caused by Leishmania major and Leishmania mexicana infection, a role for alternatively activated macrophages*. Cell Immunol, 2006. **242**(2): p. 61-71.
108. Rodriguez, M., et al., *Susceptibility to Trypanosoma cruzi is modified by a previous non-related infection*. Parasite Immunol, 1999. **21**(4): p. 177-85.
109. Lwin, M., et al., *Infection of mice concurrently with Schistosoma mansoni and rodent malarial parasites: contrasting effects of patent S. mansoni infections on Plasmodium chabaudi, P. yoelii and P. berghei*. Ann Trop Med Parasitol, 1982. **76**(3): p. 265-73.
110. McDevitt, M.A., et al., *A critical role for the host mediator macrophage migration inhibitory factor in the pathogenesis of malarial anemia*. J Exp Med, 2006. **203**(5): p. 1185-96.
111. Bacher, M., et al., *An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(15): p. 7849-54.
112. Flores, M., et al., *Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is critical for the host resistance against Toxoplasma gondii*. FASEB J, 2008. **22**(10): p. 3661-71.
113. Eisenhut, M., *Differentiation of viral and bacterial pneumonia in influenza*. Int J Antimicrob Agents, 2010. **35**(4): p. 415-6.

114. Ward, F.T. and R.B. Weiss, *Lymphoma and pregnancy*. Semin Oncol, 1989. **16**(5): p. 397-409.
115. Bakir, H.Y., C. Tomiyama, and T. Abo, *Cytokine profile of murine malaria: stage-related production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines*. Biomed Res, 2011. **32**(3): p. 203-8.
116. Sanni, L.A., et al., *Cerebral edema and cerebral hemorrhages in interleukin-10-deficient mice infected with Plasmodium chabaudi*. Infect Immun, 2004. **72**(5): p. 3054-8.
117. Li, C., I. Corraliza, and J. Langhorne, *A defect in interleukin-10 leads to enhanced malarial disease in Plasmodium chabaudi chabaudi infection in mice*. Infect Immun, 1999. **67**(9): p. 4435-42.
118. Kossodo, S., et al., *Interleukin-10 modulates susceptibility in experimental cerebral malaria*. Immunology, 1997. **91**(4): p. 536-40.
119. Kurtzhals, J.A., et al., *Low plasma concentrations of interleukin 10 in severe malarial anaemia compared with cerebral and uncomplicated malaria*. Lancet, 1998. **351**(9118): p. 1768-72.
120. Ocana-Morgner, C., M.M. Mota, and A. Rodriguez, *Malaria blood stage suppression of liver stage immunity by dendritic cells*. J Exp Med, 2003. **197**(2): p. 143-51.
121. Luty, A.J., et al., *Low interleukin-12 activity in severe Plasmodium falciparum malaria*. Infect Immun, 2000. **68**(7): p. 3909-15.
122. Perkins, D.J., J.B. Weinberg, and P.G. Kremsner, *Reduced interleukin-12 and transforming growth factor-beta1 in severe childhood malaria: relationship of cytokine balance with disease severity*. J Infect Dis, 2000. **182**(3): p. 988-92.
123. Vogetseder, A., et al., *Time course of coagulation parameters, cytokines and adhesion molecules in Plasmodium falciparum malaria*. Trop Med Int Health, 2004. **9**(7): p. 767-73.
124. Prakash, D., et al., *Clusters of cytokines determine malaria severity in Plasmodium falciparum-infected patients from endemic areas of Central India*. J Infect Dis, 2006. **194**(2): p. 198-207.
125. Fibbe, W.E., et al., *Human fibroblasts produce granulocyte-CSF, macrophage-CSF, and granulocyte-macrophage-CSF following stimulation by interleukin-1 and poly(rI).poly(rC)*. Blood, 1988. **72**(3): p. 860-6.
126. Bagby, G.C., Jr., *Interleukin-1 and hematopoiesis*. Blood Rev, 1989. **3**(3): p. 152-61.
127. Helmbly, H., et al., *Immunoglobulin E elevation in Plasmodium chabaudi malaria*. Infect Immun, 1996. **64**(4): p. 1432-3.
128. Eisenhut, M., *The role of interleukin-4 in the immune response to Plasmodium falciparum*. Parasite Immunol, 2010. **32**(6): p. 470-1.
129. Zhang, L. and R.L. Tarleton, *Characterization of cytokine production in murine Trypanosoma cruzi infection by in situ immunocytochemistry: lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production*. Eur J Immunol, 1996. **26**(1): p. 102-9.
130. Weiss, L., J. Johnson, and W. Weidanz, *Mechanisms of splenic control of murine malaria: tissue culture studies of the erythropoietic interplay of spleen, bone marrow, and blood in lethal (strain 17XL) Plasmodium yoelii malaria in BALB/c mice*. Am J Trop Med Hyg, 1989. **41**(2): p. 135-43.

APÉNDICE

- Buffer de solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) para 10 L, con un pH de 7.4

80 gr NaCl	(J.T. Baker)	
11.6 gr Na ₂ HPO ₄	(J.T. Baker)	
2 gr KH ₂ PO ₄	(J.T. Baker)	
2 gr KCl	(ICN Biomedicals Inc.)	

- Buffer TBE 10x

Tris base	(890mM)	(Sigma Chemicals)
Ácido Bórico	(890mM)	(J.T. Baker)
40ml. De 0.5M	Ácido	Etilenediaminatetraacetico (EDTA)
	dísodico	(J.T. Baker)

Esta mezcla se ajusta a pH 8 y se afora a 500 ml. con agua destilada

- Buffer de pegado (ELISA)

0.1 M de NA₂HPO₄ (J.T. Baker)

para 1 lt con agua destilada.

- Solución de lavado (ELISA)

1000 mL de PBS más 0.5% de Tween 20 (Promega co.)

- Solución de bloqueo (ELISA)

100 ml de PBS más 1% de Albumina serica bovina (ICN Biochemicals)

- Sustrato ABTS para revelado (ELISA)

Adicionar 150 mg de ABTS (ICN Biomedicals) en 500 ml de 0.1 M de ácido cítrico (tecsiquim) en agua destilada y con NaOH (Monterrey) llevar a un pH de 4.35, posteriormente se hicieron alícuotas de 11ml en tubos y se congelaron hasta su uso a -70°C.

- Bromuro de Etidio

Stock 1000 X solución 0.5 mg/ml.

50 mg de Bromuro de etidio

100 ml de agua

Diluir 1:1000 para teñir geles. Se debe proteger de la luz.