



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO. <sup>2e/</sup>

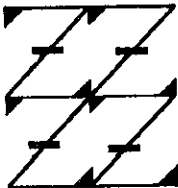
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

ANALISIS DE APOPTOSIS EN *PLASMODIUM* UTILIZANDO UN MODELO EXPERIMENTAL DE PALUDISMO MURINO.

T E S I S.  
PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO.  
P R E S E N T A:  
ROSALBA BARRERA MARTINEZ.

ASESOR: Dra. Martha Legorreta Herrera.

UNAM  
FES  
ZARAGOZA



LO HUMANO EJE  
DE NUESTRA REFLEXIÓN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D.F.

Agosto, 1998.

264479



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO  
DE INMUNOLOGIA L-313.  
FES ZARAGOZA.  
CAMPUS II.  
UNAM.

BAJO LA DIRECCION DE LA  
DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA.

APOYADO POR DGAPA, PROYECTO No. 1N211195.

## **JURADO.**

<b>PRESIDENTE.</b>	Dr. Rubén Marroquín Segura
<b>VOCAL.</b>	Dra Martha Legorreta Herrera.
<b>SECRETARIO.</b>	Q.B.P Gustavo Miranda Contreras
<b>SUPLENTE.</b>	Q.F.B. Rosalinda Escalante Hiego.
<b>SUPLENTE.</b>	Q.F.B Lourdes Vega Navarrete



A DIOS, quien por su inmenso amor me ha permitido vivir y llegar a este momento tan importante, porque siempre está a mi lado.

A mis padres, **ROSA MARTINEZ** y **JACOBO BARRERA**, porque con sus consejos y ejemplo, pero principalmente con su gran amor, me han enseñado a superar los obstáculos y cumplir las metas, por eso esta tesis es el fruto de sus esfuerzos.

A mi hermana, **BEATRIZ BARRERA** porque ser mi mejor amiga, brindadome siempre su confianza, dándome ánimos en todo momento; por eso espero que este logro sea un estímulo para su desarrollo.

A mis abuelos, **MA. DEL PILAR SOLIS** y **JORGE MARTINEZ**, porque han compartido conmigo momentos llenos de amor y de sabios consejos, porque siempre han confiado en mí y por ser mi ejemplo de valor y constancia.

Por ser lo más valiosos que tengo....

Con todo mi amor les dedico este trabajo.

Rosalba.

# AGRADECIMIENTOS

A mis tíos **Lilia Martínez** y **Gerardo Cardoso**, por el enorme apoyo que me ofrecieron para concluir esta meta y principalmente por creer plenamente en mí....infinitamente gracias.

A la **Familia Barrera** y a la **Familia Martínez**, les agradezco profundamente por alentarme a continuar hacia adelante a pesar de las adversidades, por darme toda su confianza pero fundamentalmente por el cariño que siempre me brindan.

A la **Dra. Martha Legorreta**, por todos sus consejos que guiaron esta investigación, por su apoyo y por las oportunidades que me dio para superarme como profesionalista....Gracias.



Expreso un enorme agradecimiento a:

La **Q.F.B. Lourdes Vega**, por contribuir con sus conocimientos al desarrollo de este trabajo, por su ayuda incomparable y esencialmente por su invaluable amistad, pues siempre tuvo una palabra de aliento para conmigo.

Al **M. en C. Pedro Sánchez**, con quien por su valiosísima colaboración comparto parte de este trabajo, así como por sus consejos sinceros y por su gran amistad.

A **Hugo A. Hernández**, porque siempre conté con su apoyo en la mayor parte de mi carrera, porque estuvo junto a mí en los buenos y en los malos momentos, especialmente por creer incondicionalmente en mí...Muchas Gracias.



También doy las gracias a **Alma, Beto, Eunice, Guadalupe** y **Liz**, por acompañarme a lo largo de la realización de esta tesis llenándola de buenos momentos, por su ayuda desinteresada y sobre todo por otorgarme su amistad.

A mis amigas **Auristela, Erika, Hilda** e **Yliana**, porque nuestra amistad es a prueba de todo, pues a pesar del tiempo y la distancia siempre están en el momento oportuno para animarme.

A todos mis compañeros de **Pastoral**, por sus oraciones y sus buenos deseos, especialmente agradezco a **Efigenia Arias** e **Hilario Rivera** por sus consejos, por su apoyo en situaciones difíciles y por ser mis grandes amigos.

Manifiesto un reconocimiento a **Los miembros del jurado**, porque siempre estuvieron dispuestos a transmitir sus valiosos conocimientos para formar mejores profesionistas y por sus comentarios respecto a esta tesis.

A todos los **Profesores del Laboratorio de Inmunología**, por la disposición y cordialidad que siempre mostraron para la realización de esta investigación.

A **Ma. Teresa Maldonado y Jorge Guillen**, por su ayuda y asesoría en técnicas de hibridación, muchas gracias.



Al **Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica** y a la **Escuela Nacional de Ciencias Biológicas**, les agradezco las facilidades prestadas para realizar parte del trabajo experimental de este proyecto.

Y a todas las personas que aportaron una sonrisa o una palabra de aliento en el transcurso de este trabajo, les expreso mi gratitud.

Por último quiero otorgar mi reconocimiento a la **Universidad Nacional Autónoma de México**, en especial a la **Facultad de Estudios Superiores Zaragoza** por seguir formando nuevas generaciones de profesionales capaces y porque a pesar de lo que muchos piensen, es un gran orgullo ser Universitario.

# ABREVIATURAS.

Abs:	Anticuerpos.
Ag:	Antígeno.
APO-1:	Antígeno de superficie celular relacionado con Fas.
bp:	Pares de bases.
BSA:	Albúmina Sérica Bovina.
CD:	Grupo de diferenciación, del inglés "cluster of differentiation"
CD4+:	Marcador de superficie de células T cooperadoras.
CD8+:	Marcador de superficie de células T citotóxicas.
CD45R:	Antígeno de superficie de células B.
CD95:	Ligando Fas.
DNA:	Acido desoxirribonucleico.
dUTP:	2'-desoxi-uridina-5'-trifosfato.
EDTA:	Acido Etilendiamintetracético.
FACS:	Clasificador de células activadas con fluorescencia, del inglés "fluorescence activated cell sorter"
Fas:	Proteína Fas.
HIV:	Virus de inmunodeficiencia adquirida.
ICE:	Enzima interconvertidora de interleucina 1.
IFN- $\gamma$ :	Interferón gamma.
IgG:	Inmunoglobulina isotipo G.
IgG1:	Inmunoglobulina isotipo G clase 1.
IgG2:	Inmunoglobulina isotipo G clase 2.
IgG3:	Inmunoglobulina isotipo G clase 3.
IgM:	Inmunoglobulina isotipo M.
IL-2:	Interleucina 2.
NT:	Traducción de la ruptura <i>in situ</i> , del inglés " <i>in situ</i> nick translation".
PBS:	Amortiguador de fosfatos.
PCD:	Muerte celular programada.
RNAmt.	Acido ribonucleico mensajero
TCR:	Receptor antigénico de células T.
TdT:	Transferasa deoxinucleotidil terminal.
Th1:	Células T cooperadoras inductoras de una respuesta inflamatoria vía activación de macrófagos.
Th2:	Células T cooperadoras en la maduración de células plasmáticas y producción de anticuerpos.
TNF:	Factor de necrosis tumoral.
TNFR1:	Receptor de factor necrótico tumoral tipo 1.
TUNEL:	Marcado en la ruptura final de uridil terminal, del inglés "Terminal Uridyl Nick End Labeling".



# INDICE.

	Página.
INTRODUCCIÓN.	1
FUNDAMENTACION DEL TEMA.	3
1. Paludismo.	3
1.1. Respuesta inmune a Paludismo.	5
2. Apoptosis.	6
2.1 Fases del proceso de apoptosis.	8
2.2 Características morfológicas.	10
2.3 Reguladores de la apoptosis.	13
2.4 Importancia biológica de la apoptosis.	14
3. Detección de apoptosis.	17
3.1 Electroforesis.	17
3.2 Técnica de TUNEL.	17
3.3 Citometría de flujo.	18
4. Marcadores de superficie celular.	19
5. Hibridaciones de DNA.	20
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	23
OBJETIVOS.	24
HIPOTESIS.	25
MATERIAL.	26
METODOS.	29
1. Colección de muestras.	29
2. Aislamiento de DNA.	29
3. Tratamiento con RNAsa.	30
4. Electroforesis.	31
5. Southern blot.	32
6. Hibridación con sonda de DNA.	33
6.1 Marcaje de DNA.	33
6.2 Hibridación de DNA.	34
6.3 Detección.	35
7. Técnica de TUNEL en laminilla.	36
8. Determinación de apoptosis y Ag de superficie simultáneamente.	37

	Página
9. Diseño experimental.	39
RESULTADOS.	40
DISCUSION.	53
CONCLUSIONES.	57
PREPARACION DE SOLUCIONES.	58
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.	65

## INDICE DE FIGURAS.

	Página.
<b>Figura 1.</b> Ciclo Vital de <i>Plasmodium</i> .	4
<b>Figura 2.</b> Fases del Proceso de Apoptosis.	9
<b>Figura 3.</b> Características morfológicas de apoptosis.	12
<b>Figura 4.</b> Técnica de TUNEL.	18
<b>Figura 5.</b> Principio de FACS.	19
<b>Figura 6.</b> Representación esquemática de la técnica de Souther blot.	33
<b>Figura 7.</b> Autorradiografía de hibridación de DNA control y DNA de <i>P. chabaudi</i> .	41
<b>Figura 8.</b> Gel de agarosa al 1% con DNA de <i>P. chabaudi</i> en ratones F1 (experimento 1).	42
<b>Figura 9.</b> Autorradiografía de hibridación de DNA de <i>P. chabaudi</i> del experimento 1 con sonda Pcv5 4.	43
<b>Figura 10.</b> Gel de agarosa al 1% con DNA de <i>P. chabaudi</i> con y sin tratamiento con RNasa I.	44
<b>Figura 11.</b> Autorradiografía de hibridación de DNA de <i>P. chabaudi</i> del experimento 2 con sonda Pcv5 4.	45
<b>Figura 12.</b> Células sanguíneas de ratón CBA/Ca sano sometidas a luz UV y TUNEL.	46
<b>Figura 13.</b> Células sanguíneas de ratón CBA/Ca sano sometidas a TUNEL.	46
<b>Figura 14.</b> Células sanguíneas apoptósicas de ratón CBA/Ca infectado con <i>P. chabaudi</i> sometidas a TUNEL.	47

## INDICE DE TABLAS.

	Página.
<b>Tabla 1.</b> Tipos de muerte celular: Características diferenciales.	7
<b>Tabla 2.</b> Porcentajes de apoptosis en sangre periférica en ratones CBA/Ca.	52

## INDICE DE GRAFICAS.

	Página.
<b>Gráfica 1.</b> Parasitemias de los experimentos.	40
<b>Gráfica 2.</b> Porcentaje de apoptosis de células T en bazo de ratones CBA/Ca sanos e infectados con <i>P. chabaudi</i> .	48
<b>Gráfica 3.</b> Porcentaje de apoptosis de células B en bazo de ratones CBA/Ca sanos e infectados con <i>P. chabaudi</i> .	49
<b>Gráfica 4.</b> Determinación por citometría de flujo de apoptosis en células B de bazo de ratones CBA/Ca.	50
<b>Gráfica 5.</b> Porcentaje de apoptosis en bazo de ratones CBA/Ca sanos e infectados con <i>P. chabaudi</i> .	51

# INTRODUCCION.

El Paludismo es una enfermedad causada por un protozooario intracelular del género *Plasmodium*, infecta a millones de personas en el mundo y provoca en casos severos la muerte. La infección por *P. falciparum* continua siendo la más extendida y prevalente en el mundo. No obstante, en México, predomina *P. vivax* que suele confinarse principalmente al sureste de los estados de Chiapas, Campeche, Quintana Roo y Oaxaca debido al clima tropical de la zona (Abbas, 1995).

La muerte celular programada (PCD) se ha observado como una respuesta a infecciones intracelulares tanto en diversos patógenos como en organismos huésped. El suicidio de una célula infectada puede ser una estrategia de supervivencia por parte del organismo multicelular sin embargo, el patógeno también puede requerir la muerte de la célula, cuando induce apoptosis en macrófagos del huésped para escapar de la acción microbicida del hospedero. Por lo tanto, existe la posibilidad de que el parásito suprima la muerte de las células huésped para prolongar su periodo de multiplicación (Welburn et al., 1997; Williams, 1994b).

La muerte celular programada es un proceso donde un estímulo ambiental, químico, genético o físico activa un programa genético intrínseco en la célula provocando una serie de cambios morfológicos característicos a los que se les conoce como apoptosis. Sin embargo, ambos términos son utilizados como sinónimos (Wyllie et al., 1980; Kroemer et al, 1995).

La razón por la que no se esperaba que la apoptosis tuviera lugar en organismos unicelulares es que podría llevar a la extinción de la especie. Sin embargo, en poblaciones de protozoarios organizados socialmente con asignaciones de tareas específicas es un factor importante en su evolución y supervivencia (Moreira et al., 1996). Así, la variación en las parasitemias de infecciones con protozoarios sobre el sistema sanguíneo de mamíferos, muestra los esfuerzos del sistema inmune del mamífero por controlar la infección y del parásito por regular su propio número (Welburn et al, 1997). En la infección murina por *Plasmodium chabaudi* se presenta ese rápido incremento en el número de parásitos seguido de una disminución súbita, lo que se denomina crisis (Meding y Langhorne, 1991; Taylor-Robinson, 1995).

La observación al microscopio de la cromatina del parásito dañada durante el periodo de crisis permite suponer que el fenómeno de apoptosis esta involucrado en la infección. En este trabajo investigamos la posible participación de la apoptosis primero en el parásito y después en el hospedero durante la infección por *P. chabaudi chabaudi AS* en un modelo murino de paludismo experimental.

El conocimiento más profundo en relación a los mecanismos celulares involucrados en el control de la parasitemia, permitirá un mejor entendimiento de la respuesta inmune en paludismo, así como también será relevante en el diseño de vacunas efectivas contra plasmodio.

# FUNDAMENTACION DEL TEMA.

## 1. PALUDISMO.

El paludismo es una enfermedad febril, con manifestaciones paroxísticas y periódicas, transmisible por la hembra de los mosquitos *Anopheles*, se presenta principalmente en los trópicos y subtropicos, es causada por protozoarios del género *Plasmodium*. En los humanos las especies que causan la enfermedad son: *Plasmodium falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax* y *P. malarie* (Tay, 1994).

El vector y huésped definitivo para *Plasmodium*, es el mosquito. Se presentan dos fases en el ciclo biológico del parásito: la fase sexual, que ocurre en los mosquitos y la fase asexual, que ocurre en el hombre, huésped intermediario (Tay, 1994).

El ciclo vital en el hombre comienza con la introducción de esporozoitos a la sangre desde la saliva del mosquito al picar. En el transcurso de aproximadamente 30 minutos, los esporozoitos se introducen en los hepatocitos. En esta fase denominada "exoeritrocitaria", el parásito se multiplica y se diferencia a merozoito. Los merozoitos abandonan las células hepáticas e infectan a eritrocitos. Durante la fase eritrocítica, el microorganismo se desarrolla a un trofozoito anular, que progresa a una forma ameboidea y luego se diferencia a esquizonte lleno de merozoitos. Después de su liberación, los merozoitos nuevos infectan a otros eritrocitos. Este ciclo en el glóbulo rojo se repite a intervalos regulares típicos para cada especie (Tay, 1994; Clark, 1994) Figura 1.

La fase sexual comienza en el eritrocito humano cuando algunos merozoitos evolucionan a gametocitos masculinos y otros a femeninos. Los eritrocitos que contienen gametocitos son ingeridos por el mosquito y dentro de su intestino se forma un macrogameto femenino y ocho microgametos masculinos semejantes a espermatozoides. Después de la fertilización, el cigoto diploide se diferencia a oocineto móvil que horada la pared intestinal donde crece a oocisto (enquistado) dentro del cual se producen numerosos esporozoitos haploides. Los esporozoitos se liberan y emigran a las glándulas salivales listos para completar el ciclo cuando el mosquito ingiere su siguiente dosis de sangre (Clark, 1994; Stainer et al, 1986).

El paludismo es una enfermedad prevalente en regiones tropicales y subtropicales del mundo. Las zonas palúdicas americanas se encuentran limitadas por México en el norte y Argentina en el sur. Chile es el único país libre de paludismo en forma natural. En México, la zona palúdica comprende el 58% del territorio nacional, más del 95% de los casos de paludismo son causados por *P. vivax*. *P. falciparum* sólo se observa en 1-3 % y los casos por *P. malariae* habitualmente no llegan al 1% (Tay, 1994).



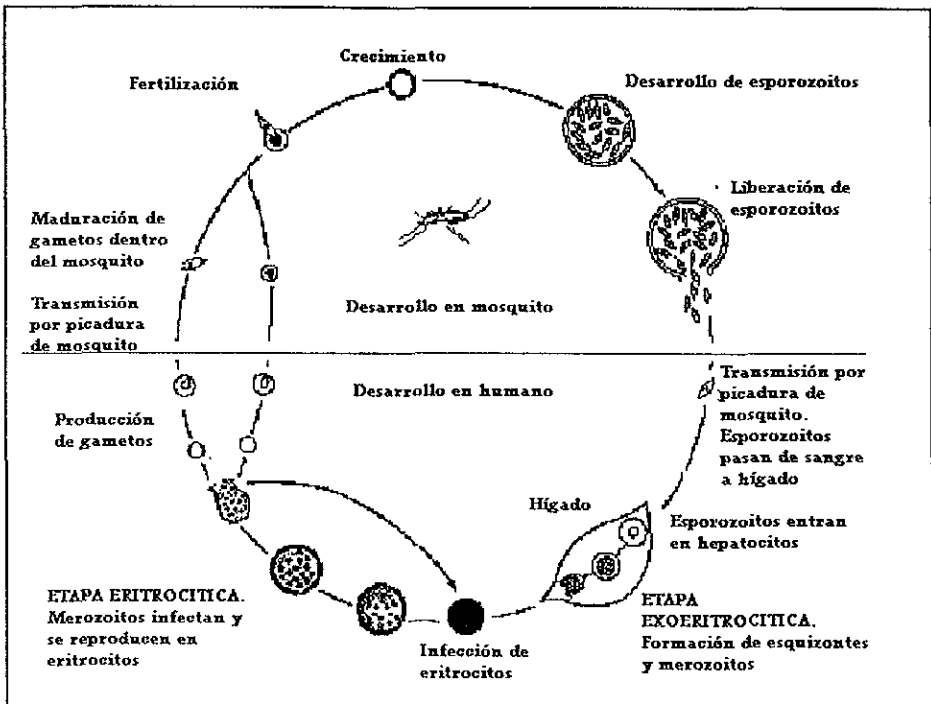


Figura 1. Ciclo vital del *Plasmodium* (Madigan et al, 1997).

En el cuadro clínico de la enfermedad tras un periodo de incubación aproximado de 10 a 17 días, el paciente experimenta síntomas vagos de tipo gripal, con dolor de cabeza y muscular, fotofobia, anorexia, náuseas y vómitos. Conforme progresa la infección, es mayor el número de eritrocitos que al romperse liberan merozoitos, desechos celulares y hemoglobina a la circulación sanguínea; todo ello da lugar al patrón típico de fiebre y escalofríos, que aparecen de manera periódica y avanza el ciclo de infección, replicación y lisis celular. Los paroxismos pueden ser de carácter leve o progresar a ataques graves, con sudoración profusa, escalofríos, temblores y altas temperaturas. En ocasiones, si el paciente no se diagnostica a tiempo puede morir a causa de la enfermedad (Murray et al, 1996).

## 1.1 Respuesta inmune a paludismo.

La inmunidad a paludismo involucra mecanismos de respuesta inmune humorales y celulares. Las células T son esenciales en la cooperación con las células B para la formación de anticuerpos (Troye-Blomberg, 1994).

La infección con plasmodio induce una intensa activación policlonal que se caracteriza por la producción de grandes cantidades de inmunoglobulinas de diferentes especificidades. Con frecuencia se generan autoanticuerpos que contribuyen a la severidad de la enfermedad. Como parte del proceso de activación general, también se producen anticuerpos protectores, de hecho, se ha logrado transferir protección con la administración de suero inmune a los pacientes infectados, lo cual les reduce los síntomas de la enfermedad (Clark, 1994).

En cuanto a la función que podrían estar jugando los anticuerpos en la protección, se ha asociado la presencia de IgG1 e IgG3 en humanos protegidos, mientras que en los individuos no protegidos predominan IgG2 o IgM (Phillips, 1994).

En las poblaciones endémicas, los recién nacidos presentan cierto grado de protección debida a la transferencia pasiva de Abs maternos por la placenta y por la leche. Entre otros factores que podrían conferir inmunidad innata está el grupo sanguíneo Duffy que genera resistencia en la infección ocasionada por *P. falciparum*. Asimismo, personas con hemoglobina fetal persistente (talasemia) o con deficiencia de la enzima glucosa deshidrogenasa 6-fosfato, no permiten el crecimiento de *P. falciparum* dentro de sus eritrocitos (Bellanti, 1986).

El desarrollo de una inmunidad natural a paludismo requiere de una exposición continua con el parásito durante varios años, se logra después de que el individuo se infecta con un gran número de poblaciones de parásitos antigénicamente diferentes. La variación antigénica es un mecanismo de evasión del sistema inmune y contribuye a la cronicidad y ocasionalmente a la recaída típica de la infección. Los mecanismos de variación antigénica no se conocen todavía (Phillips, 1994).

La población de células T CD4+ juega un papel importante en el control de una infección primaria con plasmodio. Este fenómeno se puso en evidencia al lograr obtener clones de linfocitos T capaces de transferir protección en receptores singénicos (Clark, 1994).

Durante una infección primaria con *P. chabaudi* se han logrado identificar patrones de citocinas que permiten caracterizar a la respuesta inmune durante los primeros 10 días como predominantemente Th1, además, se ha observado la capacidad de activar macrófagos y de producir una respuesta inflamatoria. Sin embargo, para que el parásito se pueda eliminar completamente se requiere la participación de la subpoblación de células T CD4+ tipo Th2 (Langhorne, 1994).

Las células T CD8+ se han asociado predominantemente con la respuesta que se presenta en los estadios exoeritrocíticos en el hígado mediante el reconocimiento de

antígenos parasitarios a través de moléculas MHC clase I. También se activan junto con las células T  $\gamma\delta$  al igual que las células  $\alpha\beta$ TCR+ y T CD4+ para controlar al parásito en la misma etapa del ciclo vital (Langhorne, 1994).

Los monocitos/macrófagos son células de importancia para la eliminación del parásito y el IFN- $\gamma$  es un potente activador de esas células (Troye-Blomberg, 1994). Se ha descrito que el óxido nítrico y otros intermediarios del nitrógeno producidos por los macrófagos juegan un papel protector durante una infección primaria (Phillips, 1994).

## 2. APOPTOSIS.

La muerte de las células despertó menor interés que otros procesos celulares básicos como la proliferación y diferenciación. El descuido relativo probablemente es el resultado de una injustificada noción restringida de la muerte celular como un fenómeno degenerativo producido por heridas. Este concepto tiende a desenvolverse en la historia de la Patología y tiende a dominar el pensamiento sobre la incidencia y los mecanismos de muerte celular. Así, los factores de muerte celular ocurren como un evento controlado en animales sanos, pero esto no ganó el reconocimiento general aunque el papel vital de la muerte celular en la morfogénesis del embrión normal estaba claramente definido desde hace más de treinta años. Además, la posibilidad de que “la muerte celular normal” pueda involucrar la destrucción activa de las células por sí mismas se ha ignorado virtualmente (Wyllie et al, 1980).

La clasificación de la muerte celular se basa en criterios morfológicos, bioquímicos o en las circunstancias en las que ocurre (Wyllie et al, 1980), los dos tipos de muerte celular son la necrosis y la apoptosis. Los nombres de “necrosis contraída”, “muerte celular activa” y “suicidio celular” se usaron originalmente en los terrenos morfológicos (Cohen, 1993a; Darzynkiewicz et al, 1994), pero cuando la incidencia se extendió y la cinética fue significativa en sanos y enfermos, se propuso el nombre de “apoptosis”, palabra adoptada del griego *apoptosis* = hacer morir, su pronunciación usual es “*apotosis*” (Cohen, 1993b; Duke et al, 1996; Wyllie et al, 1980). El término apoptosis es una expresión que originalmente definía una apariencia morfológica particular de muerte celular, pero que frecuentemente se utiliza como sinónimo de muerte celular programada (Darzynkiewicz et al, 1994; Kroemer et al, 1995) Tabla 1.

La muerte celular programada (PCD) o apoptosis es un proceso donde el desarrollo o un estímulo ambiental, activan un programa genético para implementar series específicas de eventos que culminan con la muerte y distribución eficiente de una célula. La apoptosis es esencial para el desarrollo normal y para la regulación de los procesos que conducen a diversos fenómenos como lo son: la letalidad embrionaria; la

perturbación específica de tejidos del desarrollo postnatal y una alta susceptibilidad al cáncer (Wyllie et al, 1980).

APOPTOSIS.	NECROSIS.
<i>Criterios Morfológicos.</i>	
<p>Delección de células individuales.</p> <p>Membrana burbujeante, pero sin perder la integridad.</p> <p>Células encogidas, que finalmente forman cuerpos apoptóticos.</p> <p>No hay respuesta inflamatoria.</p> <p>Fagocitosis por células adyacentes y algunos macrófagos.</p> <p>Lisosomas intactos.</p> <p>Compactación de la cromatina en masas uniformemente densas.</p>	<p>Muerte de grupos de células.</p> <p>Pérdida de la integridad de la membrana.</p> <p>Células hinchadas y lisadas.</p> <p>Significativa respuesta inflamatoria.</p> <p>Fagocitosis por macrófagos.</p> <p>Pérdidas lisosomales.</p> <p>Agrupamiento de agregaciones mal definidas de cromatina.</p>
<i>Criterios Bioquímicos.</i>	
<p>Inducida por un estímulo fisiológico.</p> <p>Proceso estrictamente regulado con etapas de síntesis y de activación.</p> <p>Requiere energía.</p> <p>Requiere síntesis de macromoléculas.</p> <p>Transcripción de nuevos genes.</p> <p>Fragmentación oligonucleosomal del DNA no al azar.</p>	<p>Provocada por disturbios no fisiológicos.</p> <p>Pérdida de la regulación del equilibrio iónico.</p> <p>No requiere energía.</p> <p>No requiere de síntesis de proteínas o ácidos nucleicos.</p> <p>No se transcriben nuevos genes.</p> <p>Digestión de DNA al azar.</p>

Tabla 1. Tipos de Muerte Celular: Características Diferenciales (Oncor, Inc.).

Las terapias que modulan la regulación de apoptosis proporcionan una nueva oportunidad para el tratamiento de numerosas enfermedades incluyendo: cáncer, patogénesis viral, degeneración neuronal, linfoproliferación, inflamación e inmunodeficiencias entre otras. En estos procesos la inducción y en algunos casos la inhibición de apoptosis se espera sea benéfica. Por eso, existe la necesidad de entender e identificar tanto los reguladores positivos como los negativos de la apoptosis y las pequeñas moléculas que modulan esa función. Recientemente se han identificado numerosos genes que codifican productos que regulan la apoptosis, los cuales proveen nuevos blancos para el desarrollo de medicamentos que intervienen en procesos de enfermedad. Los elementos bioquímicos básicos involucrados en el control de la apoptosis probablemente son similares entre especies y la información obtenida para un modelo de estudio de la apoptosis puede ser directamente aplicable a otro (White, 1996).

La apoptosis es de especial importancia en el sistema inmune, para la eliminación de linfocitos autorreactivos y no funcionales. Los linfocitos T inmaduros que se encuentran desarrollándose en el timo se seleccionan, a través de la presentación de autoantígenos. En el caso de los linfocitos B, es probable que ocurra un proceso similar de “selección negativa”, donde las células B expresan inmunoglobulinas de superficie con una alta afinidad por antígenos propios (Carson y Ribiero, 1993; Williams, 1994a).

La idea de la muerte celular como un fenómeno estrictamente multicelular se ha modificado significativamente con la observación de muerte celular programada en *Dyctyostelium discoideum*, un organismo con etapas uni y multicelulares en su ciclo de vida. Algunas características de muerte celular programada en *Dyctyostelium* son similares a las presentadas en vertebrados. Recientemente se ha descrito una forma de muerte celular programada en *Escherichia coli* (Welburn et al, 1997).

### *2.1 Fases del proceso de apoptosis.*

Durante la fase de inducción o fase temprana de la PCD, las células reciben una combinación de señales que pueden provocar diferentes respuestas. No hay estímulos fisiológicos que siempre provoquen PCD. Por el contrario, un estímulo inductor de muerte puede iniciar la PCD solamente en un contexto particular (las etapas de diferenciación y activación, la posición con respecto al ciclo celular, la presencia de otras señales, y el ambiente metabólico). Algunos productos de proto-oncogenes y reguladores del ciclo celular ejercen un efecto ambiguo porque capacitan a las células para proliferar o entrar en apoptosis (Kroemer et al, 1995; Vaux y Strasser, 1996) Figura 2.

Algunos autores mencionan una fase anterior a la efectora, que incluye la detección de las señales o estado metabólico y transducción de señales que son las vías mediante las cuales se envían esos mensajes a la maquinaria ejecutora de muerte celular (Vaux y Strasser, 1996).

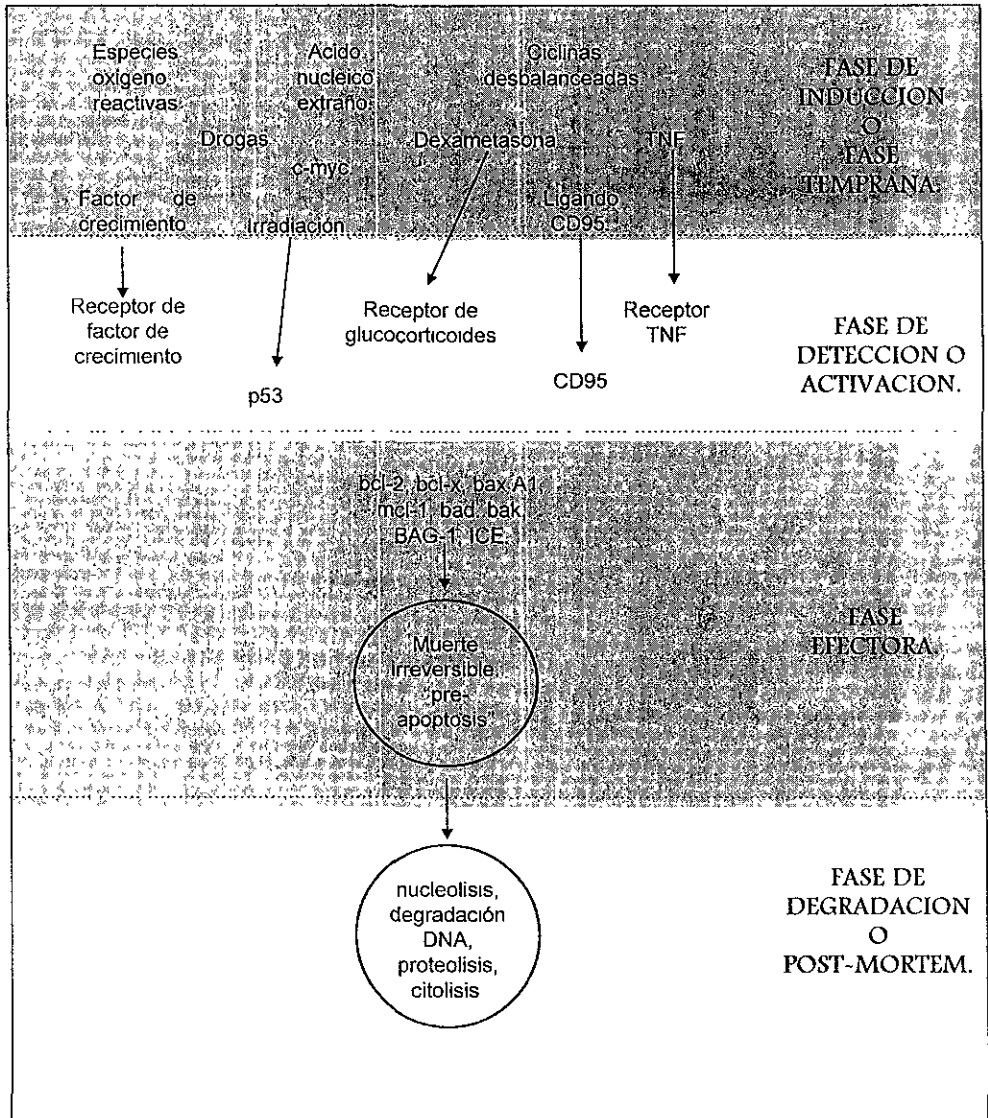


Figura 2. Fases del proceso de apoptosis (Kroemer et al, 1995; Vaux y Strasser, 1996).

Durante la fase efectora de la PCD, existe un umbral de no retorno, cuando se sobrepasa, las células hacen irreversible la programación a la muerte. Diferentes estímulos fisiológicos convergen en pocos iniciadores moleculares en común que determinan el destino de las células. El proceso de decisión entre la vida y la muerte está influenciado por una serie de diferentes proto-oncogenes y genes oncosupresores, entre los cuales los miembros de la familia Bcl-2 (bcl-2, bcl-x en diferentes isoformas, bax A1, Mcl-1, bad, bak, BAG-1) juegan un papel prominente. En suma, las proteasas ICE (enzima convertidora de interleucina 1) así como proteasas antagonistas pueden intervenir durante esta fase. La relación entre esos sistemas reguladores aun se desconoce (Kroemer et al, 1995).

La fase de degradación o fase postmortem de la PCD redondea el proceso presentando las manifestaciones visibles de la apoptosis, donde numerosas estructuras vitales y funciones se destruyen como la condensación de la cromatina y nucleolisis, la degradación enzimática de DNA y por último la citolisis (Kroemer et al, 1995; Vaux y Strasser, 1996).

## *2.2 Características morfológicas.*

La apoptosis tiene la característica de afectar células individuales más que a células contiguas. La etapa temprana se reconoce por la agregación de la cromatina que se observa como una masa granular compacta y larga que termina en la membrana nuclear. El contorno nuclear esta en general contrincado anormalmente, posteriormente se hace grueso, dentado, se presentan fragmentos nucleares discretos. Los nucleolos se agrandan, los gránulos están burdos y espaciados de manera anormal. Se observan masas circulares compactas de finos gránulos de origen desconocido cerca del centro del núcleo en algunas secciones. Los poros nucleares no se han detectado con certeza sobre las masas de cromatina marginal, pero aparecen intactos en partes de la membrana que colinda con la cromatina dispersada. Junto con esos cambios nucleares tempranos, el citoplasma comienza a condensarse, los microvellos (si están presentes) tienden a desaparecer y aparecen protuberancias en la superficie celular. El progreso de la condensación citoplásmica da como resultado organelos marcadamente apretados, los cuales retienen su integridad característica. La compactación del citoplasma se asocia frecuentemente con el desarrollo de vacuolas citoplásmicas translúcidas (Wyllie et al, 1980).

Las posibles nucleasas responsables del fraccionamiento del DNA son DNasa I, DNasa II y una proteína relacionada a la ciclofilina A (White, 1996). La DNasa I es el mejor candidato para ser la endonucleasa que actúa en las células de mamíferos durante la apoptosis, esta enzima existe en la célula en un estado inactivo formando un complejo con actina y es posible que se libere por acción de ICE (Vaux et al, 1994). La supresión de la degradación de DNA retarda la citolisis, pero no previene la muerte celular (Kroemer et al, 1995).

A mitad de tiempo, el núcleo se rompe en discretos fragmentos que son característicos, muestran cromatina condensada en su superficie entera o arreglados en capas crecientes. Algunos de los fragmentos nucleares están rodeados por una doble membrana, aunque puede detectarse falta de membrana en otros. Finalmente, las protuberancias en la superficie celular se separan para producir cuerpos apoptóticos limitados con una membrana de forma esférica u ovoide (Wyllie et al, 1980).

El número, tamaño y composición de los cuerpos apoptóticos derivados de una célula puede variar ampliamente. Algunos contienen uno o mas fragmentos en adición al citoplasma condensado, mientras que otros contienen elementos citoplásmicos solos (Wyllie et al, 1980) Figura 3.

Los cuerpos apoptóticos se limitan por una membrana, se dispersan en los espacios del tejido intracelular, y se expulsan al lumen adyacente. Con frecuencia son fagocitados por células de tejido residentes, pero en ocasiones las células del sistema fagocítico mononuclear los atrapan (Wyllie et al, 1980).

Los neutrofilos no están involucrados en la fagocitosis de cuerpos apoptóticos, al menos no hay evidencia de inflamación similar a la que se presenta en la necrosis. (Wyllie et al, 1980).

El reconocimiento de células apoptóticas involucra al menos 3 tipos de mecanismos, los fagocitos pueden emplear uno o más de una vía de reconocimiento. El primero se fundamenta en los cambios específicos que sufren las células en apoptosis en los carbohidratos de superficie donde existe una disminución de ácido siálico lo que provoca la exposición de N-acetilglucosamina que interacciona con la lecitina de macrófagos (lecitinas fagocíticas); permitiendo su reconocimiento; en el segundo mecanismo, interviene la trombospondina secretada por los mismos macrófagos que forma puentes moleculares con la célula apoptótica y en el tercer caso, las alteraciones de la superficie celular en la apoptosis provocan la exposición al exterior de fosfatidilserina, la cual es reconocida por receptores de macrófagos (Savill et al, 1993).

Los fagosomas que contienen cuerpos apoptóticos adquieren enzimas digestivas por fusión con lisosomas primarios y secundarios. Los cuerpos fagocitados inicialmente, sufren un cambio semejante a la necrosis de células enteras, seguido de una súbita degradación, rápidamente todos los restos de las células suprimidas se convierten en una pequeña cantidad de material no digestible en los lisosomas secundarios de las células ingestoras. Existe evidencia de que la apoptosis extensiva que ocurre en un tejido induce la síntesis de las enzimas lisosomales en las células remanentes viables, pero esto no sugiere que esas lisosomas juegan algún papel en las etapas tempranas de la apoptosis cuando las células están por iniciar su destrucción irreversiblemente (Wyllie et al, 1980).



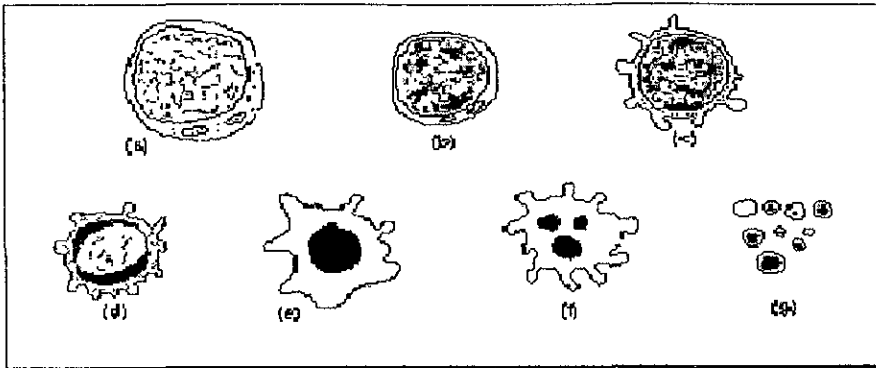


Figura 3. Características Morfológicas de apoptosis. a) Célula normal con citoplasma escaso y cromatina nuclear heterogénea. b) La célula va perdiendo volumen, sus organelos y cromatina están ligeramente empacados. c) Célula en zeiosis. d) La cromatina se colapsa en forma de media luna a lo largo de la envoltura nuclear. e) El núcleo se colapsa. f) El núcleo colapsado se fragmenta. g) Los fragmentos celulares se encuentran dentro de cuerpos apoptóticos (Cohen, 1993).

Aunque los cuerpos apoptóticos dentro de los tejidos sufren una rápida fagocitosis, pueden escapar a la ingestión cuando se dispersan en un fluido, como en los tumores de ascitis. Estos cuerpos que flotan libres eventualmente entran en una degeneración espontánea con hinchamiento y ruptura de membrana, es un proceso morfológicamente similar a la necrosis. Esta “necrosis secundaria” de los cuerpos apoptóticos puede distinguirse de la necrosis celular que ocurre *ab initio* por el pequeño tamaño de la mayoría de los fragmentos celulares, su forma esférica u ovoide y la presencia de fragmentos nucleares de morfología típica en algunos de ellos (Wyllie et al, 1980).

Histológicamente, la apoptosis frecuentemente no puede distinguirse de la necrosis. La condensación (picnosis) y fragmentación nuclear han sido ampliamente aceptadas como criterios histológicos de muerte celular, pero estas características pueden encontrarse en ciertas etapas tanto de la necrosis como de la apoptosis. Los dos procesos no pueden distinguirse con microscopio de luz, pero las diferencias son distinguibles en el microscopio electrónico (Wyllie et al, 1980).

### 2.3 Reguladores de la apoptosis.

La PCD involucra un programa de muerte intrínseca en la célula. Las células reciben señales de muerte o falta de señales de supervivencia que pueden activar un programa genético iniciador de la síntesis de nuevas especies de RNAm y proteínas (Kroemer et al, 1995). La razón por la cual muere la célula difiere de un tipo celular a otro, así como las vías iniciadoras, pero el mecanismo de muerte siempre es el mismo (Cohen, 1993a).

Los factores de supervivencia *in vivo* e *in vitro* promueven la viabilidad celular y son un aspecto crítico del desarrollo anormal. Además, la privación de esos factores puede ser un potente signo apoptótico. Adicionalmente a esta pérdida, la presencia de factores de muerte específicos también producen apoptosis, entre los cuales el ligando Fas, el cual transmite señales por el receptor Fas y TNF- $\alpha$ , que señala por TNFR1, son los más claros ejemplos (White, 1996). Fas es idéntico a la molécula de superficie celular humana APO-1 por lo tanto el sistema Fas/APO-1 es un modelo muy interesante para estudiar no solamente tejido normal sino también la posibilidad de activar la apoptosis como modulador terapéutico (Cohen, 1993a). La apoptosis también se regula por factores ambientales de los cuales el daño al DNA es el ejemplo mejor conocido. Para células que han sustentado niveles irreparables de daño al DNA, la apoptosis es el medio para la eliminación de esas células, su presencia puede dañar al organismo (White, 1996).

La apoptosis en las células tumorales se puede inducir por radiaciones ionizantes, hipertermia, una gran variedad de fármacos anti-tumorales y la privación de factores de crecimiento (Gorczyca et al, 1993).

La apoptosis puede iniciarse por varios inductores patológicos y fisiológicos como corticoides, compuestos de quinona, radiaciones ionizantes, iniciadores de receptores de citocina y privación de factores de crecimiento. En los linfocitos de vida larga, los agentes inhibidores de la síntesis de RNA y proteínas generalmente bloquean la apoptosis (Carson y Ribiero 1993; Schulze- Osthoff et al, 1994). Otros estímulos dañinos asociados con apoptosis incluyen infecciones virales, desregulación del control del crecimiento de las células, daño celular y pérdida de contacto célula-célula o célula-sustrato. Presumiblemente, la apoptosis existe como un seguro para prevenir la persistencia de células dañadas, las cuales pueden ser nocivas a un organismo multicelular (White, 1996).

Los caminos señaladores, factores de transcripción, señales de muerte y supervivencia se propagan directamente vía transducción de señales a la maquinaria de muerte celular o indirectamente por regulación de la transcripción. Hay una clara dependencia de apoptosis en la transcripción en algunos casos (apoptosis mediada por corticoides en timocitos) y no en otros (apoptosis mediada por Fas y TNF). Los

reguladores de transcripción c-myc, p53, E2F y c-fos, entre otros y componentes de las vías de transducción de señales son reguladores de apoptosis (Cotter y McCarthy, 1994; White, 1996).

Uno de los primeros genes involucrados en el control de la apoptosis es el proto-oncogene bcl-2, el cual suprime la apoptosis en una amplia variedad de tipos celulares, desde células mieloides y linfoides hasta neuronas (Williams, 1994a), pero no bajo todas las circunstancias (Cohen, 1993a; Wang et al, 1995) por lo cual su mecanismo de acción no es muy claro. Bcl-2 es una proteína presente en la mitocondria, retículo endoplásmico y membrana nuclear. El gene bhrf1 del virus Epstein-Barr y bcl-x<sub>L</sub>, son supresores de la apoptosis mientras que bax y bcl-x<sub>s</sub> la favorecen aún en presencia de bcl-2. Bcl-x<sub>s</sub> y bax se expresan en timocitos desarrollados como respuesta al reconocimiento del antígeno, de proteínas de histocompatibilidad y a otras proteínas de superficie (Williams, 1994a).

#### *2.4 Importancia biológica de la apoptosis.*

Aunque la función de la apoptosis en el desarrollo embrionario ya se conocía en los años 50's, la importancia de la apoptosis en el mantenimiento diario del organismo maduro se reconoció hasta hace 25 años cuando se publicó que el mismo tipo de muerte celular que ocurre durante el desarrollo se observa en los organismos maduros y durante toda su vida. Estos estudios sugieren que la célula en la necrosis es una víctima pasiva, y en la apoptosis requiere de energía para morir por lo que se denomina como muerte activa (Duke et al, 1996).

Las células del cuerpo generalmente se suicidan para beneficio del organismo, por ejemplo: El cristalino del ojo se forma durante el desarrollo embrionario debido a que las células apoptóticas se han reemplazado por una proteína cristalina; las células de la piel comienzan su vida en las capas más profundas y después van migrando a la superficie, durante el camino sufren apoptosis por lo que las células muertas forman la capa protectora de la piel; las células muertas de la pared del útero que se desechan mediante la menstruación perecen por apoptosis (Duke et al, 1996).

Durante la respuesta inmune, las células B maduras que se encuentran en los centros germinales del nódulo linfático sufren mutación somática en los genes que codifican para inmunoglobulinas, y después interaccionan con una cantidad limitada de antígenos extraños presentes en la superficie de las células presentadoras de antígeno. En esta situación, la interacción producida entre las inmunoglobulinas de superficie y el antígeno específico dispara el proceso de proliferación. Sin embargo si el estímulo no es lo suficientemente poderoso, la célula corre el riesgo de quedarse en un estado anérgico, o incluso programarse para apoptosis (Santos, 1995; Williams, 1994a). A diferencia de lo anterior, cuando se genera el linfocito B en la médula ósea, antes de

abandonarla para dirigirse a otros órganos linfoides todas las clonas autorreactivas son eliminadas por apoptosis o anergia por considerarse potencialmente peligrosas (Regueiro y López Larrea, 1996; Santos, 1995).

El sistema inmune juega un papel muy importante en la eliminación tanto de células infectadas por parásitos intracelulares como de células transformadas y extrañas. La citotoxicidad mediada por el contacto directo entre la célula efectora y la célula blanco presenta una muerte celular con características similares a las de apoptosis que afecta a las células blanco. Sin embargo, la apoptosis en este proceso se considera solo como una parte del mecanismo de citotoxicidad (Williams, 1994a).

La apoptosis se asocia con numerosos aspectos del desarrollo y en situaciones de enfermedad específicas. El fracaso de la apoptosis también se ha demostrado en el desarrollo perturbado y en la contribución a algunas enfermedades. En mariposas y gusanos, la activación e inhibición de la apoptosis se requieren para el desarrollo normal. En mamíferos, los hallazgos han sido básicamente similares aunque más complejos debido al gran número de genes involucrados en la regulación de la muerte celular. Los estudios con ratones transgénicos han puesto en evidencia que la regulación de apoptosis es un aspecto crítico en el desarrollo normal y en la ocurrencia de enfermedades (White, 1996).

Las células sanas no mueren por proceso de autoinmunidad excepto en el caso de las personas infectadas con HIV, donde las células T cooperadoras normales son inducidas al suicidio por otras células inmunitarias. Las reacciones de autoinmunidad suelen autolimitarse pues desaparecen cuando los antígenos que las desencadenan se eliminan. En algunos casos, sin embargo, los linfocitos autorreactivos sobreviven más de lo que deberían y continúan induciendo apoptosis en las células normales. En animales y humanos, se ha observado que existe un exceso de supervivencia de células autorreactivas en al menos dos síndromes de autoinmunidad crónica: el lupus eritematoso sistémico y la artritis reumatoide (Duke et al, 1996).

Un cáncer se desarrolla cuando una célula acumula mutaciones en varios genes que controlan su crecimiento y supervivencia, si la mutación es irreparable, la célula afectada suele autodestruirse antes de volverse peligrosa. Pero si la célula no muere, ella o sus descendientes pueden vivir lo suficiente para acumular mutaciones que la lleven a dividirse sin control y originar metástasis, el daño genético parece impedir la inducción de apoptosis en la célula (Duke et al, 1996).

En contraste con el cáncer, donde ocurre muy poca apoptosis la muerte celular que acompaña a las cardiopatías isquémicas y problemas cerebrovasculares se debe en buena medida, al suicidio celular. En el corazón, las células que sufrieron el bloqueo del flujo sanguíneo mueren por necrosis, pero a los pocos días, las células sobrevivientes que rodean la zona necrótica pueden también morir mediante apoptosis. Algo similar ocurre en los accidentes cerebrovasculares, donde la

inflamación y liberación de agentes químicos provocan necrosis y apoptosis en las células vecinas (Duke et al, 1996).

Se atribuye a la apoptosis la muerte celular que se registra en enfermedades marcadas por la pérdida progresiva de neuronas cerebrales, como las enfermedades de: Alzheimer, Parkinson, Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica o enfermedad de Lou Gehring (Duke et al, 1996).

La apoptosis es parte de la patología de infecciones virales como es el caso de adenovirus, baculovirus, HIV y virus de la influenza. La inhibición de la apoptosis se asocia con infecciones virales persistentes, latentes, o con la producción viral aumentada. Se ha establecido una conexión directa entre la apoptosis y numerosos estados patológicos (White, 1996). La pérdida del control normal del mecanismo de la apoptosis se relaciona con la retinitis pigmentosa y la osteoporosis (Duke et al, 1996).

Por otro lado la muerte celular programada se ha observado como una respuesta a infecciones intracelulares en diversos patógenos y organismos huésped. El suicidio de una célula infectada puede ser una estrategia de supervivencia por parte del organismo multicelular. El patógeno también puede requerir la muerte de la célula, como es el caso de *Shigella flexneri* y *Bordetella pertussis*, ambos que inducen apoptosis en macrófagos del hospedero para escapar a la acción microbicida del mismo. Además, existe la posibilidad de que el parásito suprima la muerte de las células huésped para prolongar su periodo de multiplicación como es el caso de *Leishmania donovani* que suprime la apoptosis de los macrófagos induciéndolos a sintetizar y liberar factores de crecimiento (Welburn, 1997; Williams, 1994b; Zychlinsky et al, 1992).

Fue sorprendente el descubrimiento de muerte celular programada en cultivos de *T. cruzi*, donde los epimastigotes proliferantes experimentan muerte celular apoptótica masiva durante la diferenciación de G0/G1 y la observación de que esa muerte puede acelerarse o prevenirse por modificaciones en las condiciones de cultivo, sugiere que esos tripanosomas están usando señales extracelulares para regular su supervivencia y diferenciación (Welburn et al, 1997).

Los promastigotes de *Leishmania amazonensis* cuando reciben un shock con calor, presentan características moleculares y ultraestructurales de células muertas por apoptosis. Los cambios morfológicos se observan en presencia de calcio y el shock térmico es capaz de inducir la ruptura de DNA. Los resultados indican que la apoptosis no es prerrogativa de organismos multicelulares haciendo surgir preguntas importantes concernientes a la filogénesis de este tipo de muerte celular y su papel en la interacción huésped-parásito (Moreira et al, 1996).

La razón por la que no se esperaba que la apoptosis tuviera lugar en organismos unicelulares es que podría llevar a la extinción de la especie. Sin embargo, en

poblaciones de protozoarios organizados socialmente con asignaciones de tareas específicas es un factor importante en su evolución y supervivencia (Moreira et al, 1996).

### 3. DETECCION DE APOPTOSIS.

Existen varios métodos para detectar apoptosis e identificar a las células apoptóticas por microscopía. Se ha utilizado la observación de los cambios morfológicos que engloban un modelo característico de la condensación de la cromatina y citoplasma. Sin embargo, es difícil distinguir *in situ* las células que están en apoptosis por microscopía de luz, debido a que la apariencia de la célula apoptótica esta limitada a pocos minutos y los cuerpos apoptóticos se observan por pocas horas antes de que sean fagocitados (Gavrieli, 1992; Gorczyca et al, 1993).

La fragmentación del DNA es rápida y común en todas las células que sufren apoptosis (White, 1996), se cuantifica usando DNA marcado con haptenos o radioactividad, tinción con fluorocromos y citometría de flujo (Dolzanskiy y Basch, 1995) o técnica de cometa (Olive y Banáth, 1995).

#### 3.1 Electroforesis.

El DNA fragmentado de células en apoptosis aparece como una serie de bandas, las cuales pueden observarse en geles de agarosa, esta "escalera de DNA" se considera como el sello bioquímico de la apoptosis por lo que el método de electroforesis con frecuencia se utiliza para demostrar esos fragmentos de DNA nucleosomal de aproximadamente 180 pares de bases (bp) (Olive y Banáth, 1995).

#### 3.2 Técnica de TUNEL.

Existen métodos que se basan en la detección de los extremos donde el DNA se rompió por acción de las endonucleasas. El extremo 3'OH terminal del DNA roto se marca con dUTP (2'-desoxi-uridina-5'-trifosfato) biotinilado, que se detecta posteriormente por avidina fluoresceinada en el ensayo transferasa deoxinucleotidil terminal (TdT), por el ensayo NT (del inglés *in situ* Nick Translation) o por la técnica de TUNEL (del inglés Terminal Uridyl Nick End Labeling). En estas técnicas, la transferasa terminal cataliza la adición del trifosfato desoxirribonucleico a las terminales 3- hidroxilo del DNA de simple o doble cadena, con este método se pueden identificar células en

diferentes estadios de la mitosis y medir su cinética de transición (Dolzhanskiy y Basch, 1995). Figura 4.

Las ventajas de estos métodos para estudiar la apoptosis son:

1. Las reacciones se basan en el marcaje directo de los extremos 3-hidroxilo del DNA fragmentado, y se determina una lesión a nivel molecular.
2. La ruptura de DNA ocurre más fácilmente que los cambios morfológicos, por lo que estas técnicas detectan células apoptóticas que no se pueden reconocer con base a los cambios morfológicos.
3. La apoptosis puede relacionarse con la posición en la cual se encuentra la célula en el ciclo celular (Dolzhanskiy y Basch, 1995; Gorczyca et al, 1993; Pellier y Astic, 1994).

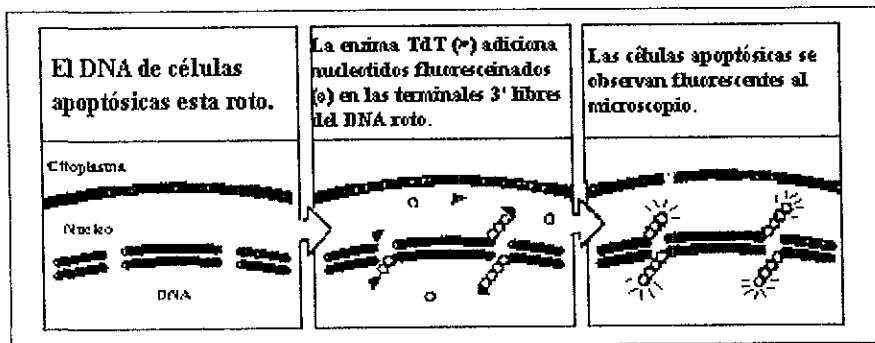


Figura 4. Técnica de TUNEL (Janeway et al, 1997).

### 3.3 Citometría de flujo.

Los métodos de citometría de flujo se basan en la determinación del contenido de DNA celular (Gorczyca et al, 1993). Las células apoptóticas se detectan por tinción con fluorocromos que se unen al DNA (Dolzhanskiy y Basch, 1995).

El clasificador de células activadas con fluorescencia (FACS), se diseñó por Herzenbergs y colaboradores para cuantificar las moléculas de superficie en células blancas (linfocitos) individuales, por su reacción con anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos y usar la señal generada para separar células de una mezcla heterogénea. Figura 5.

En esta máquina, las células fluorescentes forman un flujo que pasa por un rayo láser, la medición cuantitativa de la señal fluorescente se realiza en un tubo fotomultiplicador colocado adecuadamente, se difunde una señal de las células que pueden salir en un goteo simple; las cuales se cargan eléctricamente y se pueden separar en un campo eléctrico. Los límites de detección de células poco comunes por citometría de flujo es de 1 en  $10^4$  teniendo en cuenta tinciones inespecíficas y autofluorescentes (Roitt, 1997).

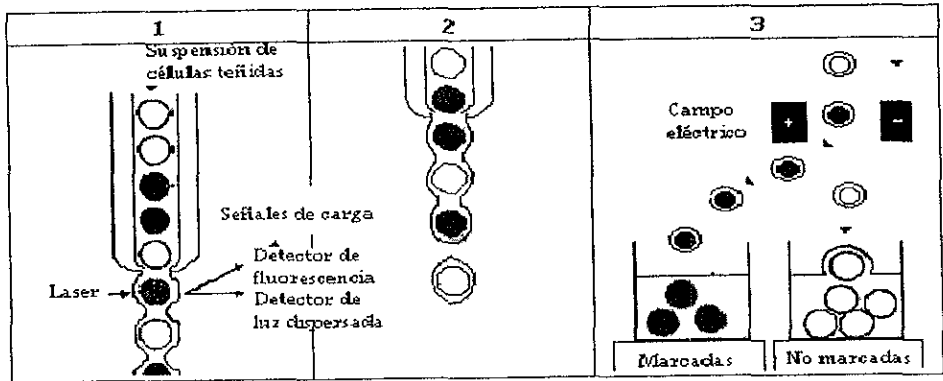


Figura 5. Principio del FACS (Roitt, 1997).

#### 4. MARCADORES DE SUPERFICIE.

Los linfocitos y otros leucocitos, expresan un gran número de diferentes moléculas en su superficie. A estas moléculas de superficie celular reconocidas por anticuerpos monoclonales se les llaman “antígenos”, ya que se pueden desarrollar anticuerpos contra ellos, o “marcadores”, puesto que identifican y discriminan entre poblaciones celulares diferentes “marcas”. Estos marcadores pueden agruparse en varias categorías: algunas son específicas para células de una estirpe o línea de maduración en particular, y la expresión de otras varía de acuerdo al estado de activación o diferenciación de las mismas células (Abbas et al, 1995; Roitt et al, 1991).

Un marcador de superficie que identifica un estadio de diferenciación en particular, que tiene una estructura definida y que es reconocida por un grupo (en inglés, *cluster*) de anticuerpos monoclonales, se denomina grupo de diferenciación (en inglés, “Cluster of Differentiation”). De este modo todos los antígenos de superficie cuya estructura está definida tienen la designación “CD”, los marcadores se



enumeran como CD1, CD2, etc. Este término provino del análisis computarizado de los anticuerpos monoclonales, contra los antígenos leucocitarios humanos llevado a cabo por diferentes laboratorios de todo el mundo, pero en la práctica es común referir la misma designación CD a marcadores homólogos de otras especies y de otras células diferentes (Abbas et al, 1995; Roitt et al, 1991).

Las funciones frecuentemente atribuidas a varios antígenos CD son: 1) promover las interacciones y la adhesión entre células y 2) transmitir las señales que conducen a la activación linfocitaria (Abbas et al, 1995).

Los marcadores se pueden poner de manifiesto por medio de anticuerpos fluoresceinados. En este caso los marcadores de superficie actúan como antígenos. La tecnología de hibridomas para fabricar estos anticuerpos, juntamente con la citometría de flujo han revolucionado los estudios sobre las actividades funcionales de las poblaciones celulares linfoides (Roitt et al, 1991).

El marcador definitivo de la células T es un receptor antigénico (TCR). En la actualidad se conocen dos tipos definitivos de TCR: TCR-2 es un heterodímero de 2 polipéptidos ( $\alpha$  y  $\beta$ ) unidos por puentes disulfuro; TCR-1 es estructuralmente similar, pero sus polipéptidos son distintos ( $\gamma$  y  $\delta$ ). Ambos receptores se asocian al complejo de polipéptidos del CD3. Por lo tanto la célula T se define por TCR-1 ó TCR-2, en asociación con CD3 (Roitt et al, 1991).

Los linfocitos B sufren diversos cambios fenotípicos además de los rearrreglos en los genes de Ig, que permiten reconocerlos. La forma más temprana identificable son las células con fenotipo CD43+ y CD45RB<sup>(débil)</sup>; al iniciarse los arreglos de los genes de Ig transitoriamente se presentan: CD43+, CD45RB<sup>(débil)</sup> Y J11d<sup>(débil)</sup>, que rápidamente cambian a CD43<sup>(débil)</sup>, CD45RB<sup>(débil)</sup> y J11d+. La subpoblación siguiente son los linfocitos pre-B, que son CD43-, CD45RB+ y J11d+. A continuación, cuando se han rearrreglado los genes de cadena ligera y de cadena pesada, el linfocito B expresa IgM de superficie, CD40+ y CD45RB+ (Moreno 1996).

## 5. HIBRIDACIONES DE DNA.

La técnica de Souther blot, se utiliza para caracterizar la organización del DNA que rodea a una secuencia de ácidos nucleicos específica, por ejemplo, un gene particular. En un experimento típico, el DNA genómico se extrae químicamente de los núcleos de las células aisladas o de tejidos completos. En este punto, el DNA estará presente en segmentos extremadamente largos y deben romperse en fragmentos pequeños para su análisis. Estos se consiguen mediante ruptura enzimática con endonucleasas de restricción. Las endonucleasas de restricción rompen la doble cadena de DNA sólo en la posición de determinadas secuencias de nucleótidos. Tales secuencias se denominan

lugares de restricción, y cada lugar se reconoce especialmente por una endonucleasa de restricción particular (Abbas et al, 1995).

Para analizar los fragmentos, el DNA digerido se separa mediante electroforesis. Los fragmentos separados se transfieren desde el gel a una membrana de nitrocelulosa o nylon. Después, cada fragmento se fija a su lugar en la membrana mediante calor o radiación ultravioleta. El resultado neto es que la serie de fragmentos se ordena por tamaños en la membrana (Abbas et al, 1995).

El análisis se completa determinando el tamaño del fragmento de restricción que contiene el gen de interés. Esto se consigue mediante la hibridación del ácido nucleico. El DNA de doble cadena puede desnaturalizarse a DNA de una sola cadena cambiando las condiciones de temperatura y del disolvente. Cuando la temperatura se reduce, el DNA de una cadena se vuelve a complementar para formar un DNA de doble cadena. La velocidad en la que se produce la complementación de una secuencia viene determinada por la concentración de DNA que contiene las secuencias de nucleótidos complementarias presentes en el sistema (Abbas et al, 1995).

Las sondas de ácidos nucleicos son segmentos de DNA o RNA previamente marcados con enzimas, sustratos antigénicos, moléculas quimioluminiscentes o radioisótopos y pueden unirse con alta especificidad a secuencias que sean complementarias de ácido nucleico. Las sondas pueden ser de 20 a mil bases de largo (Persing et al, 1993).

La estringencia o rigurosidad de los lavados se ve afectada por diversas variables, incluyendo la temperatura, la concentración de sales, y el pH de la reacción de hibridación. El aumento de la estringencia de la reacción (como el uso de amortiguadores de baja concentración de sales o por realizar la hibridación a altas temperaturas), lleva a la probable disminución en el apareamiento de los pares de bases para iniciar la formación de una molécula de doble cadena estable (Persing et al, 1993).

En los reactivos de sondas comerciales, la detección de reacciones positivas mediante isótopos radioactivos se han reemplazado por enzimas, marcadores de afinidad y moléculas quimioluminiscentes. El marcaje directo de sondas con enzimas, como la fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano, se introdujo a mediados de los 80's. Los marcadores de afinidad tales como biotina y digoxigenina pueden incorporarse a la sonda por métodos enzimáticos y no enzimáticos, después de que la reacción de hibridación se completa una enzima unida a estreptoavidina o un Abs marcado similarmente es utilizado para detectar la sonda a través del uso de colorimetría o sustratos quimioluminiscentes (Persing et al, 1993).

La reacción Nick-Translation utiliza la habilidad de la DNA pol I para activar una DNA polimerasa dependiente del blanco que actúa en dirección  $5' \rightarrow 3'$  y por su actividad de exonucleasa  $5' \rightarrow 3'$ , para adicionar nucleótidos al extremo  $3'$  terminal

de una muesca de DNA doble, mientras remueve nucleótidos para el extremo adyacente 5' terminal. Las muescas son introducidas de una manera al azar por la acción de la deoxirribonucleasa pancreática I (DNAsa I), así que el efecto neto es producir una población de moléculas marcada uniformemente (Brown, 1994).

En el marcaje Random-Primer, el fragmento Klenow de DNAsa pol I puede utilizarse *in vitro* para copiar una molécula de DNA de cadena simple, iniciando por el extremo 3' terminal de un DNA alineado al blanco. La ausencia de la actividad exonucleasa 5' → 3' previene la degradación del DNA en la región terminal 5' y también asegura que los nucleótidos incorporados no se rompan subsecuentemente (Brown, 1994).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En la infección murina por *Plasmodium chabaudi* se presenta una primera fase que se caracteriza por un rápido incremento del número de parásitos en sangre durante los primeros 10 días de la infección, seguida de una disminución súbita en la parasitemia. Las células T CD4<sup>+</sup> se activan en particular la subpoblación TH1, lo que induce la activación de macrófagos y de una respuesta inflamatoria. Después de aproximadamente 18 días se presenta una disminución en el nivel de parasitemia, en esta segunda fase las células CD4<sup>+</sup> TH2 se activan y se presentan anticuerpos IgG específicos (Meding y Langhorne, 1991; Tay, 1994; Taylor-Robinson, 1995).

La fluctuación en las parasitemias características de infecciones con protozoarios sobre el sistema sanguíneo de mamíferos, refleja no solo los esfuerzos del sistema inmune del mamífero, sino también del parásito por regular su propio número (Welburn et al, 1997). Durante la etapa de crisis de la infección por *Plasmodium* se ha observado que la cromatina del parásito muestra daños y condensaciones muy similares a las descritas en el fenómeno de apoptosis. Este fenómeno podría estar relacionado con algún mecanismo inducido por la propia respuesta inmunológica.

Generalmente, se cree que la apoptosis y otras formas de muerte celular programada están involucradas en la regulación del crecimiento y desarrollo en organismos multicelulares, sin embargo en trabajos recientes se muestra que algunos protozoarios desarrollan un suicidio celular análogo al proceso descrito como apoptosis en metazoarios (Welburn et al, 1997).

Recientemente, se ha descrito muerte celular programada en protozoarios como: *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *T. cruzi* y *Leishmania amazonensis* empleando 3 diferentes sistemas de detección de apoptosis. En estos parásitos, la muerte celular programada sigue el modelo de eventos similar al presentado por células de metazoarios que sufren apoptosis (Welburn et al, 1997). Se ha observado que la apoptosis ocurre en formas procíclicas de *Trypanosoma brucei* y en *Dictyostelium discoideum*, un hongo ameboide que se multiplica como protista unicelular y se desarrolla bajo condiciones especiales a una estructura multicelular (Moreira et al, 1996).

La importancia de estudiar durante una infección de paludismo en que proporción están sufriendo apoptosis las células del sistema inmune, así como la participación de este tipo de muerte celular en los mecanismos que regulan la multiplicación del parásito, es conocer una parte de la respuesta inmune mediante la cual responde el organismo humano en la etapa de crisis, así como conocer con más detalle la relación huésped-parásito en infecciones con *Plasmodium*, que permitan el desarrollo de nuevos tratamientos más eficaces contra el paludismo.

# OBJETIVOS.

## OBJETIVO GENERAL:

- ♣ Determinar si el fenómeno de apoptosis está involucrado en la regulación de la multiplicación de *Plasmodium chabaudi*.

## OBJETIVOS PARTICULARES.

- ♣ Infectar grupos de 5 ratones singénicos CBA/Ca y (BALB/c X C57BL/6)F1 con  $5 \times 10^4$  eritrocitos parasitados con *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS.
- ♣ Evaluar la parasitemia de los ratones por microscopía óptica.
- ♣ Tomar muestras de sangre de los ratones diariamente para obtener el DNA del parásito para posteriormente tratar con RNAsa.
- ♣ Realizar electroforesis del DNA del parásito en agarosa, teñir con bromuro de etidio y observar en luz UV para evaluar el fenómeno de apoptosis.
- ♣ Estandarizar la técnica de Transferencia de DNA a membranas (Southern blot).
- ♣ Estandarizar la técnica de marcaje de sondas de DNA con haptenos.
- ♣ Estandarizar la técnica de hibridación con una sonda específica para DNA del parásito.
- ♣ Evaluar apoptosis mediante la técnica de TUNEL en células B y T mediante citometría de flujo.

## HIPOTESIS.

Durante la infección causada por plasmodio, se presenta un aumento exponencial del número de parásitos en la sangre del huésped, en algunos casos se manifiesta una disminución súbita de la parasitemia justo después de alcanzar su punto máximo, dicha reducción en el número de parásitos, es el resultado de la presión que ejerce el sistema inmunológico sobre el plasmodio por medio de la inducción del fenómeno de apoptosis en el parásito.

# MATERIAL.

## MATERIAL BIOLÓGICO.

- ♣ Ratonés singénicos de la cepa CBA/Ca y (BALB/c X C57BL/6)F<sub>1</sub>, hembras, en condiciones libres de patógenos y de 4-6 semanas de edad.
- ♣ *Plasmodium chabaudi chabaudi* cepa AS.
- ♣ Anticuerpos anti-CD3-R-PE, Gibco BRL.
- ♣ Anticuerpos anti-CD45-R-PE, Gibco BRL.

## EQUIPO.

- ♣ Agitador de plataforma, Bellco glass.
- ♣ Autoclave, Presto Modelo Steele 21 Lt.
- ♣ Balanza analítica, Mettler Modelo H80.
- ♣ Balanza granataria, OHAUS.
- ♣ Baño de agua con control de temperatura, Precision Modelo 253.
- ♣ Bomba para vacío, Feli-Welch Modelo 1410.
- ♣ Cámara de electroforesis.
- ♣ Cámara de Neubauer, SIGMA.
- ♣ Cámara fotográfica, Polaroid Modelo MP4+.
- ♣ Campana de flujo laminar, Veco.
- ♣ Centrifuga clínica, Sol-bat Modelo J-12.
- ♣ Citómetro de flujo, Becton Dickinson.
- ♣ Computadora, Hewlett Packard Vectra.
- ♣ Equipo de disección, SIGMA.
- ♣ Espectrofotómetro, Camspec.
- ♣ Fuente de poder, BIO-RAD Modelo 200/2.0.
- ♣ Gel Doc 1000, BIO-RAD.
- ♣ Horno de microondas, Panasonic.
- ♣ Impresora, Hewlett Packard Deskjet 680C.
- ♣ Incubadora de CO<sub>2</sub>, Lab-line Modelo 427.
- ♣ Microcentrifuga, Eppendorf Modelo 5415C.
- ♣ Micropipetas, Eppendorf.
- ♣ Microscopio óptico, Carl Zeiss.
- ♣ pHmetro, Sargent-Welch Modelo PBL.
- ♣ Transiluminador UV, SIGMA Modelo T1202.
- ♣ Vortex, Genie Modelo K-550-6.

## MATERIAL DE USO COMUN.

- ♣ Bulbos para pipetas Pasteur
- ♣ Bases de vidrio 10x20 y 20x20 cm.
- ♣ Cajas petri de plástico de 5 cm diámetro.
- ♣ Cámara húmeda.
- ♣ Espátulas.
- ♣ Gradillas.
- ♣ Jarra de coplin.
- ♣ Jeringas de insulina.
- ♣ Matraces aforados.
- ♣ Mechero Fischer.
- ♣ Papel absorbente.
- ♣ Papel autoadherible.
- ♣ Papel filtro.
- ♣ Perilla para pipetas.
- ♣ Pinzas para membranas.
- ♣ Pipetas graduadas.
- ♣ Pipetas Pasteur.
- ♣ Probetas.
- ♣ Recipientes de plástico.
- ♣ Termómetro.
- ♣ Tubos de ensayo.
- ♣ Tubos eppendorf.
- ♣ Vasos de precipitados.

## OTROS MATERIALES.

- ♣ Cassette fotográfico, Harmer.
- ♣ Fibra de vidrio.
- ♣ Membrana de nylon Hybond N+, Amersham.
- ♣ Placas fotográficas, Mir-R KODAK.

## REACTIVOS.

- ♣ Acetato de sodio, SIGMA.
- ♣ Acetona,
- ♣ Acido clorhídrico, Baker.
- ♣ Agarosa, Ultra Pure BRL.
- ♣ Albúmina sérica bovina, SIGMA.
- ♣ Alcohol etílico absoluto, Merck.
- ♣ Amortiguador para enzima TdT 5X, GIBCO BRL.
- ♣ Bromuro de etidio, SIGMA.



- ♣ Celulosa.
- ♣ Citrato de sodio, JT Baker.
- ♣ Cloruro de potasio, SIGMA.
- ♣ Cloruro de sodio, Técnica química.
- ♣ Colorante de Giemsa, Técnica química.
- ♣ dATP (100 nM), dNTP's Pharmacia.
- ♣ EDTA (ác. etilendiamintetracético), SIGMA.
- ♣ Enzima Eco R1 (10 000 U), Amersham.
- ♣ Enzima TdT recombinante, GIBCO BRL.
- ♣ Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 25:24:1, SIGMA.
- ♣ FITC-12-dUTP (25 nmol), Boehringer Mannheim.
- ♣ Fosfato de potasio monobásico, USB Amersham.
- ♣ Fosfato de sodio dibásico heptahidratado, USB Amersham.
- ♣ Heparina (177 U), USB Amersham.
- ♣ Kit de detección de apoptosis *in situ* con fluoresceína, ApopTaq Oncor.
- ♣ Kit de detección CDP-Star Gene Images, Amersham.
- ♣ Kit de marcaje Random Prime Gene Images, Amersham.
- ♣ Metanol, J.T. Baker.
- ♣ p- formaldehído, Merck.
- ♣ Pronasa-E
- ♣ RNAsa (82.5 U/mg), USB Amersham.
- ♣ Saponina, SIGMA:
- ♣ SDS ( dodecil sulfato de sodio), SIGMA.
- ♣ Solución fijadora GBX Kodak.
- ♣ Solución reveladora GBX Kodak.
- ♣ Sulfato dextran, USB Amersham.
- ♣ Tris ( Tris[hidroximetil]amino-metano), SIGMA.
- ♣ Tritón X-100, USB Amersham.
- ♣ Tween 20 ( monolaurato polioxietilen-sorbitan), SIGMA.
- ♣ Yoduro de propidio, SIGMA.

# MÉTODOS.

## COLECCION DE MUESTRAS.

1. Se trabajaron 2 grupos de ratones singénicos (BALB/c X C57BL/6)F1 y un grupo de ratones singénicos CBA/Ca, cada grupo se infectó con  $5 \times 10^4$  eritrocitos parasitados con *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS.
2. Diariamente a partir del 3<sup>er</sup> día post-infección se les tomó muestra de sangre para evaluar la parasitemia en frotos sanguíneos teñidos con colorante Giemsa utilizando microscopía óptica.
3. De igual manera se tomaron 10  $\mu$ l de sangre de la cola de cada ratón y se colocaron en 450  $\mu$ l de solución salina de Krebs con heparina, para tener un volumen final de 500  $\mu$ l. Las muestras se mantuvieron en un baño de hielo y se tomaron por duplicado.
4. Una de las muestras se pasó por columna de celulosa, y se eluyó con solución salina de Krebs hasta tener el mismo volumen inicial.
5. A cada tubo de sangre se le adicionó 2  $\mu$ l de saponina al 10%, se agitaron vigorosamente y se centrifugaron a 13000 rpm/ 10 min.
6. Con una pipeta Pasteur de punta fina y la ayuda de la bomba de vacío, se eliminó el sobrenadante evitando tocar el botón celular que se formó en el fondo.
7. Las muestras se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## AISLAMIENTO DE DNA.

1. A cada botón se le resuspendió con 80  $\mu$ l de amortiguador de lisis en condiciones estériles y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}/1$  hr.
2. Se llevó a un volumen de 400  $\mu$ l ( adicionar 320  $\mu$ l en condiciones estériles ) con acetato de sodio 375 mM, pH 5.5 (concentración final 0.3 M), se mezcló e incubó a  $37^{\circ}\text{C}/1$  hr.
3. Se adicionaron 480  $\mu$ l de la mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico.
4. Se agitó vigorosamente en vortex por lo menos 5 minutos y se centrifugó a 13000 rpm/5 min a temperatura ambiente.
5. Se transfirió la fase acuosa con la ayuda de una pipeta Pasteur a un tubo limpio y estéril.

6. Se adicionaron 800  $\mu$ l de alcohol etílico absoluto frío y se mezcló.
7. Para precipitar el DNA, se colocaron los tubos en nitrógeno líquido durante 5 minutos y se centrifugó a 13000 rpm/10 min.
8. Se removió el sobrenadante y se adicionaron 900  $\mu$ l de etanol al 70%.
9. Nuevamente se colocaron los tubos en nitrógeno líquido durante 5 minutos y se centrifugaron a 13000 rpm/ 10 min.
10. Las muestras se secaron brevemente al vacío, se resuspendieron en 50  $\mu$ l de TE y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### TRATAMIENTO CON RNAsa.

1. Las muestras de DNA se descongelaron y a cada botón se le agregó 2.2  $\mu$ l de RNAsa libre de DNAsa para tener una concentración de 1.8 U/ml.
2. Se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora.
3. A cada tubo se les adicionaron 8.8  $\mu$ l de acetato de sodio 375 mM y se incubó nuevamente a  $37^{\circ}\text{C}$ /1 hr.
4. Se extrajo nuevamente el DNA, adicionando 480  $\mu$ l de la mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico
5. Se agitó vigorosamente en vortex por lo menos 5 minutos y se centrifugó a 13000 rpm/5 min a temperatura ambiente.
6. Se transfirió la fase acuosa con la ayuda de una pipeta Pasteur a un tubo limpio y estéril.
7. Se adicionaron 800  $\mu$ l de alcohol etílico absoluto frío y se mezcló.
8. Para precipitar el DNA, se colocaron los tubos en nitrógeno líquido durante 5 minutos y se centrifugó a 13000 rpm/10 min.
9. Se removió el sobrenadante y se adicionaron 900  $\mu$ l de etanol al 70%.
10. Nuevamente se colocaron los tubos en nitrógeno líquido durante 5 minutos y se centrifugaron a 13000 rpm/ 10 min.
11. Las muestras se secaron brevemente al vacío, se resuspendieron en 50  $\mu$ l de TE y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## DIGESTION DE DNA.

1. Las muestras de DNA se descongelaron, se mezclaron con vortex y se centrifugaron brevemente.
2. Se colocó la solución de DNA necesaria (2 µg) en un tubo de microcentrifuga estéril y se mezcló con suficiente agua estéril para obtener un volumen final de 18 µl .
3. Se adicionaron 2 µl de amortiguador de digestión para la enzima de restricción 10x y los componentes se mezclaron por inversión.
4. Se adicionaron 10 unidades de enzima de restricción EcoRI (0.2 µl) y se mezcló por inversión del tubo.
5. Se incubó la mezcla a 37°C/3hrs (o durante toda la noche).
6. Para detener la reacción, se adicionó 0.41 µl de EDTA 0.5 M, pH 8.0 para dar una concentración final de 10 mM.

## ELECTROFORESIS.

1. A cada muestra se le adicionaron 5 µl de amortiguador de carga, se mezcló en vortex y se centrifugó brevemente.
2. Se depositaron las muestras en un gel de agarosa al 1%, se corrió en amortiguador TAE (E) 1x. Inicialmente se aplicaron 80 V por 10min para asegurar que las muestras entrarán dentro del agar, después se disminuyó el voltaje a 33 V por aproximadamente 16 horas (toda la noche).
3. En un recipiente se colocaron 200 ml de amortiguador TAE (E) 1x, se adicionaron 30 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml), se mezcló y se depositó el gel. Se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos con agitación suave.
4. Se eliminó la solución y se procedió a desteñir el gel adicionándole 200 ml de amortiguador TAE (E) 1x, se incubó a temperatura ambiente durante 15 min con agitación suave.
5. El gel se observó con luz UV, se cortó en el extremo derecho (como referencia) y se fotografió.

## SOUTHERN BLOT.

1. El gel se invirtió y se le adicionaron 200 ml. de solución de desnaturalización, se agitó suavemente durante 15 min.
2. Se cambió la solución de desnaturalización cada 15 minutos aproximadamente hasta completar 3 cambios.
3. Se removió la solución de desnaturalización y se reemplazó por 500 ml. de agua destilada para lavar el gel. El agua se desechó inmediatamente.
4. Se adicionaron 200 ml de solución de neutralización, se agitó suavemente durante 15 min, se eliminó la solución y se reemplazó con 200 ml de solución de neutralización, se incubó con agitación suave durante 15 min, esta operación se repitió hasta completar 3 cambios.
5. Se cortó una pieza de membrana de nylon del tamaño del gel, ésta se activó primero con metanol y después se humedeció con solución 2x SSC aproximadamente 5 minutos, posteriormente se cambió a una solución 20x SSC.
6. Para montar la técnica se muestra en la **figura 6** el uso de un recipiente de plástico donde se colocó la base de vidrio y sobre ella 3 capas de papel filtro humedecidos en solución 10x SSC, se alisó el papel para remover las burbujas de aire. El gel se colocó sobre el filtro de tal manera que las muestras de DNA se encontraran hacia arriba, se eliminaron las burbujas de aire atrapadas entre el gel y el papel, se colocó la membrana de nylon húmeda encima del gel y nuevamente se eliminaron las burbujas de aire. Se depositaron 3 capas de papel filtro cortadas al mismo tamaño que la membrana de nylon, se apilaron toallas de papel absorbente arriba del papel filtro, y se colocó una placa de vidrio o plástico junto con un peso (0.5-1.0 Kg) para comprimir el sandwich de papel.

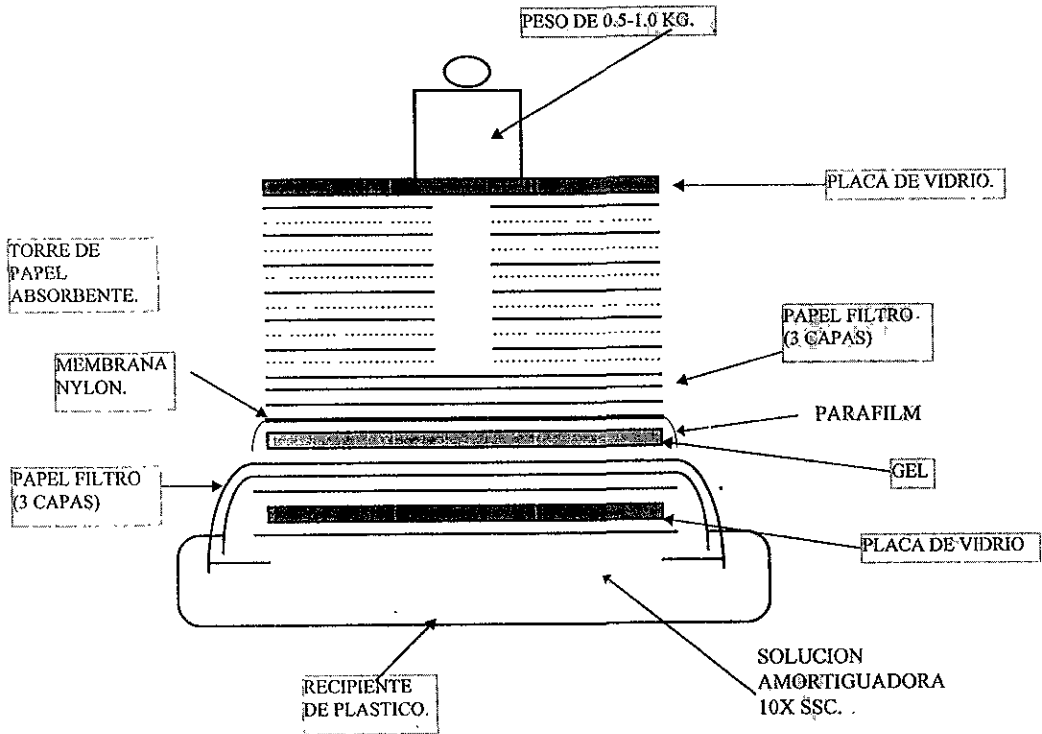


Figura 6. Representación esquemática de la técnica de Southern blot (Hames y Higgins, 1990).

## HIBRIDACION CON SONDA DE DNA.

### Marcaje de DNA.

1. Se colocaron en un baño de hielo los siguientes reactivos del kit de marcaje:

- Mezcla de nucleótidos.
- Oligonucleótidos.
- Agua.
- Enzima ( Debe conservarse de  $-15^{\circ}\text{C}$  a  $-30^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su uso).

2. Simultáneamente se desnaturalizaron 50 ng del DNA calentando a 100°C por 5 minutos, inmediatamente se sumergieron en el baño de hielo
3. Se colocó un tubo eppendorf (1.5 ml) en el baño de hielo para adicionarle el volumen de cada reactivo en el siguiente orden:
  - Agua cbp. 50  $\mu$ l
  - Mezcla de nucleótidos 10  $\mu$ l.
  - Oligonucleótidos 5  $\mu$ l.
  - DNA desnaturalizado. 50 ng.
  - Enzima. 1  $\mu$ l.
4. Se mezcló suavemente por pipeteo, y se centrifugó brevemente para conjuntar el contenido (una agitación vigorosa disminuye la actividad enzimática).
5. Se incubó la reacción a 37°C por 2-3 hrs.
6. La reacción se detuvo adicionando 2  $\mu$ l de EDTA 0.5 M (pH 8.0), para tener una concentración final de 20 mM. La sonda se almacenó a 4°C.
7. El rendimiento de la sonda después del marcaje es de aproximadamente 7 ng/ml.

#### *Hibridación de DNA.*

1. El amortiguador de hibridación se preparó como se indica en el anexo (0.3 ml/cm<sup>2</sup> de membrana) y se precalentó a 60°C en un recipiente de plástico, se colocó la membrana a prehibridizar durante 1 hr con agitación constante, a la misma temperatura.
2. Se removió la cantidad de sonda necesaria para tener una concentración de 7-10 ng/ml de amortiguador de hibridación, y se vertió en un tubo eppendorf de pared delgada para desnaturalizarla por calentamiento a 100°C durante 5 minutos, se colocó inmediatamente en un baño de hielo.
3. La sonda desnaturalizada se centrifugó brevemente. Se adicionaron 5  $\mu$ l de amortiguador de hibridación a la sonda, se mezcló suavemente y se agregó al resto del amortiguador de hibridación evitando la superficie de la membrana, se mezcló sin formar burbujas.
4. La hibridación se realizó a 60°C durante toda la noche, con agitación constante (se selló perfectamente el recipiente de plástico para evitar contaminación).

5. La membrana se lavó con solución 1xSSC, SDS 0.1% a 60°C en un volumen de 2-5 ml/cm<sup>2</sup> durante 15 minutos con agitación suave (esta solución se precalentó a 60°C).
6. Después se lavó la membrana con solución 0.5xSSC, SDS 0.1% a 60°C en el mismo volumen que el lavado anterior, durante 15 minutos con agitación suave.
7. La membrana se incubó en agente bloqueador diluido 1:10 en amortiguador A (0.75-1.0 ml/cm<sup>2</sup>), durante 1 hora, a temperatura ambiente y con agitación suave.
8. El conjugado anti-fluoresceína-AP se diluyó 1:3000 en albúmina sérica bovina al 0.5% (P/V) recién preparada en amortiguador A.
9. La membrana se incubó en 0.3 ml/cm<sup>2</sup> del conjugado diluido, durante 1 1/2 horas, a temperatura ambiente y agitación suave.
10. Se realizaron 3 lavados a la membrana de 10 minutos c/u en tween 20 al 0.3% preparado con amortiguador A (2 ml/cm<sup>2</sup> por cada lavado), a temperatura ambiente y agitación constante

#### *Detección.*

*IMPORTANTE: Se utilizaron guantes libres de polvo y se limpió el área de trabajo con etanol al 70%.*

11. Se eliminó de la membrana el exceso de líquido del último lavado y se colocó con el DNA hacia arriba sobre una hoja de papel autoadherible.
12. Se adicionaron directamente a la membrana 30 ml/cm<sup>2</sup> de reactivo de detección y se dejó en contacto por 5 minutos (La alícuota del reactivo de detección se removió en la campana de flujo laminar).
13. Se retiró el exceso de reactivo de detección y la membrana se lavó brevemente en tween 20 al 0.3% preparado con amortiguador A.
14. Se eliminó el exceso de amortiguador y la membrana se colocó dentro de una bolsa o sobre de papel autoadherible, se deslizó una pipeta para eliminar todo el líquido y así evitar la formación de burbujas de aire.
15. La membrana con el DNA hacia arriba se depositó dentro de un cassette fotográfico (fijando con masking tape las orillas). En el cuarto oscuro, se puso una hoja de película para radiografía sobre la membrana.
16. La exposición duró 2 horas 15 minutos.



17. La película se reveló utilizando las siguientes soluciones con sus respectivos tiempos:

- Revelador diluido (1:5). 15 minutos.
- Acido acético 30% 30 segundos.
- Fijador diluido (1:5). 5 minutos.
- Agua. 30 segundos.

### TECNICA DE TUNEL EN LAMINILLA.

1. Se realizaron frotos sanguíneos de cada ratón a partir del 3er día post-infección y se fijaron con acetona.
2. Se aplicaron 2 gotas de amortiguador equilibrante 1X (S71 10-1) a cada frote, se le colocó una cubierta de plástico para favorecer el contacto y se incubó en una cámara húmeda por 1-5 minutos a temperatura ambiente.
3. Se quitó la cubierta plástica y se adicionaron inmediatamente 54  $\mu$ l de enzima TdT diluida (1:2). Nuevamente se colocaron las cubiertas y se incubó a 37°C en condiciones húmedas por 1 hr.
4. Se removieron las cubiertas de plástico y los frotos se colocaron en una jarra de coplin que contenía amortiguador de paro/lavado diluido, para incubarlos a 37°C por 1 hr.
5. Se eliminó el exceso de líquido de los frotos y se lavaron 3 veces con PBS durante 3 minutos cada lavado.
6. A cada frote se le aplicaron 52  $\mu$ l de Abs anti-digoxigenina-fluoresceína diluido (1:2.14), se taparon con la cubierta y se incubaron en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante 30 minutos.
7. Después de remover las cubiertas, se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno, en una jarra de coplin, a temperatura ambiente.
8. Se cubrieron los frotos con solución de yoduro de propidio (5  $\mu$ g/ml), se les colocó un cubreobjetos, se sellaron las orillas y se guardaron en la oscuridad a temperatura ambiente por 15 min.
9. Los frotos se observaron en microscopio de fluorescencia.

## DETERMINACION DE APOPTOSIS Y Ag DE SUPERFICIE SIMULTANEAMENTE.

Esta determinación se realizó a los días 5, 8, 11, 14 y 18 post-infección.

1. A grupo de ratones CBA/Ca sanos e infectados con *Plasmodium* se les extrajo sangre de la zona retro-orbital con una pipeta Pasteur impregnada con heparina, y se colocó en un tubo eppendorf lavado con heparina.
2. Después se sacrificaron los ratones por dislocación cervical y se extrajo el bazo, el cual se colocó en una cajita de petri con PBS-BSA 1%.
3. En otra cajita Petri cada bazo se maceró sobre una malla fina con ayuda de un tubo de ensayo, enjuagando con 500 µl de PBS-BSA 1% para obtener la suspensión celular.
4. Se prepararon y etiquetaron los siguientes tubos:

Tubo		Células	CD3+ Ficoeritrina	CD45+ Ficoeritrina	Tunel	PBS-BSA 1%
1	control	10 <sup>6</sup> bazo	-	-	-	20 µl
2	muestra	10 <sup>6</sup> bazo	2 µl	-	-	18 µl
3	muestra	10 <sup>6</sup> bazo	-	2 µl	-	18 µl
4	muestra	10 <sup>6</sup> bazo	-	-	*	20 µl
5	control	100 µl sangre	-	-	-	20 µl
6	muestra	100 µl sangre	2 µl	-	-	18 µl
7	muestra	100 µl sangre	-	2 µl	-	18 µl
8	muestra	100 µl sangre	-	-	*	20 µl

\* Muestras procesadas posteriormente.

5. Todos los tubos a excepción de los indicados (\*), se agitaron e incubaron a 4°C por 30 minutos.
6. Se les adicionó 1 ml de amortiguador de lisis de eritrocitos, se agitaron e incubaron durante 12 minutos a temperatura ambiente.
7. Se centrifugó a 2000 rpm durante 15 minutos, se eliminó el sobrenadante y se realizaron 2 lavados con PBS-BSA 1%.
8. En este paso a todos los tubos incluyendo los marcados (\*), se les adicionaron 100 µl de tritón X-100 0.1%-citrato de sodio 0.1% y se incubaron exactamente 2 minutos a 4°C.
9. Se llevaron a cabo 2 lavados con PBS-BSA 1%. y se centrifugó a 2000 rpm, desechando el sobrenadante.

10. Para realizar la reacción de TUNEL, se agregaron los siguientes reactivos:

- FITC-12-dUTP (Boehringer Mannheim) 0.3  $\mu$ l
- dATP diluido (1:33) 1.0  $\mu$ l
- Enzima TdT (GIBCO BRL) 0.5  $\mu$ l
- Amortiguador para enzima TdT (GIBCO BRL) 10.0  $\mu$ l
- Agua millipore estéril. 38.2  $\mu$ l

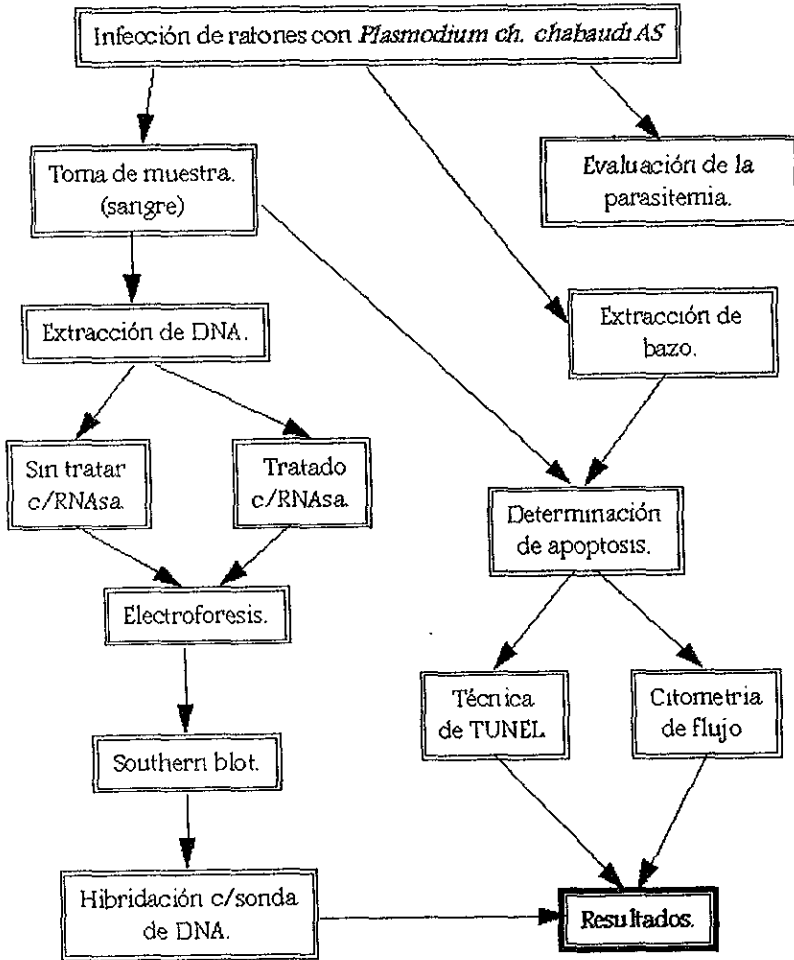
11. Se incubaron los tubos por 1 hr a 37°C.

12. Para detener la reacción se agregaron 2  $\mu$ l de EDTA 0.5 M a cada tubo.

13. Las células se lavaron con PBS-BSA 1% y se conservaron en 1 ml de paraformaldehído al 1%, a 4°C hasta el momento del análisis.

14. Se analizaron las muestras por citometría de flujo.

# DISEÑO EXPERIMENTAL.



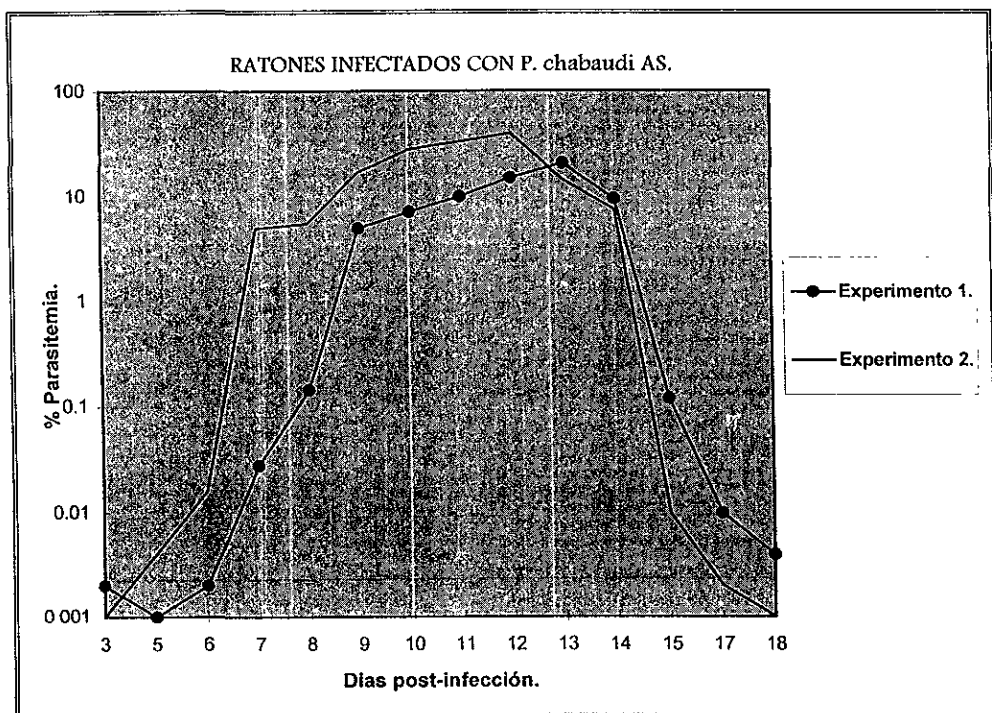
ESTÁ TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

# RESULTADOS.

## EVALUACION DE LA PARASITEMIA.

Después de infectar a los ratones con  $5 \times 10^4$  eritrocitos parasitados con *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS (día 0), al 3er día se inició la toma de muestra y realización de frotis sanguíneos, concluyendo el día 21 post-infección. Los frotis se tiñeron con colorante Giemsa y se contaron los eritrocitos parasitados en 50 campos (cuando hay <de 2 eritrocitos parasitados por campo) o 200 eritrocitos (cuando >2 eritrocitos parasitados por campo), graficando en % de parasitemia (promedio de 5 ratones) Gráfica 1.

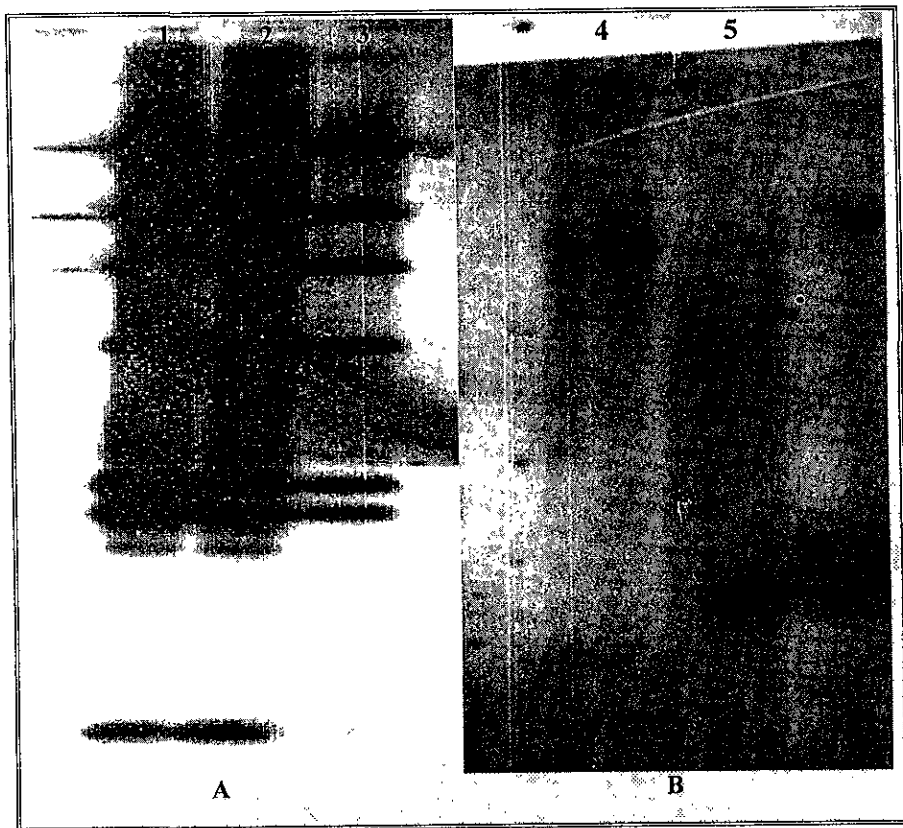
Se observa que la parasitemia aumenta progresivamente hasta alcanzar su punto máximo (39.75%) el día 12 post-infección, disminuyendo súbitamente (periodo de crisis) hasta alcanzar resolver la parasitemia con un 0.001%.



Gráfica 1. Parasitemias de los experimentos.

## ESTANDARIZACION DE SOUTHER BLOT, MARCAJE E HIBRIDACION DE DNA.

Para estandarizar las técnicas de Souther blot , marcaje de sondas e hibridación de DNA, se probaron distintos tipos de membrana : de nitrocelulosa, de nylon y de nylon cargada positivamente, siendo esta última la que mejor favoreció la transferencia. En relación a la hibridación, se usaron varias concentraciones de sonda siguiendo lo descrito en la metodología se empleó un gel de agarosa al 1% donde se colocó 10  $\mu$ l DNA control (contenido en el equipo de marcaje comercial) diluido 1:12.5, 1:20 y 1:50 en agua millipore estéril, así como DNA de *P. c. chabaudi*. Se efectuó la transferencia a membrana de nylon como se describe en la figura 5 y se procedió a la hibridación con DNA control y con la sonda Pcsv 4.1 previamente marcados. Los resultados se muestran en la **figura 7**

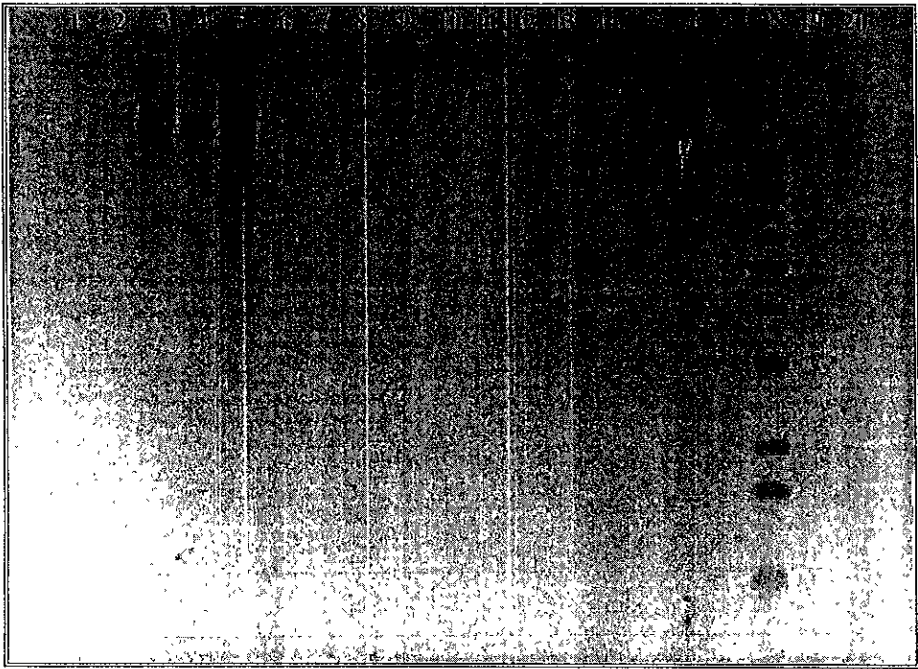


**Figura 7.** Autorradiografía correspondiente a la hibridación de DNA control diluido 1:12.5 (carril 1), 1:20 (carril 2), 1:50 (carril 3) con sonda control (A) y de DNA de *P. chabaudi* tratado con RNasa (carril 5) y sin tratamiento (carril 4) con sonda Pcsv 4.1 (B).

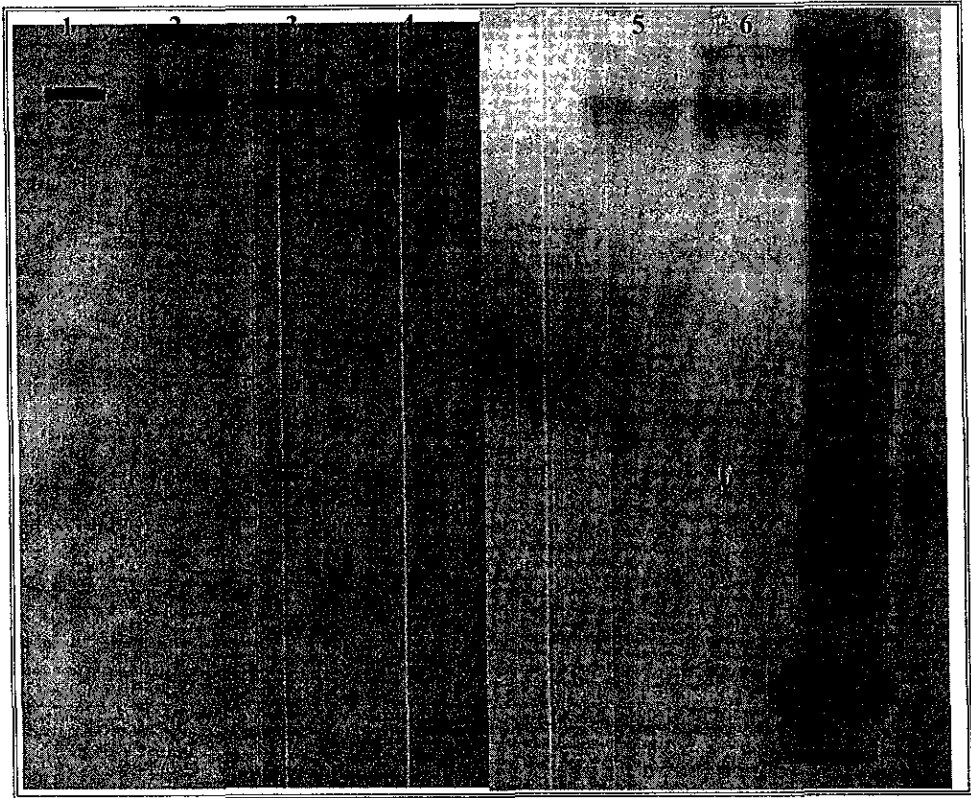
La visualización de bandas bien definidas en la placa autorradiográfica, confirman que las condiciones de las técnicas son óptimas para utilizarse subsecuentemente.

## ELECTROFORESIS.

Se infectó un grupo de 5 ratones (C57BR/6xBALB/c) F1 con  $5 \times 10^4$  GRP con *P. c. chabaudi* AS, se tomaron muestras de sangre correspondiente a los días 7-18 post infección, se extrajo el DNA, con el cual se cargo un gel de agarosa al 1%, la electroforesis se efectuó durante toda la noche a 80 Volts en amortiguador TAE 1X y posteriormente se tiñió con bromuro de etidio ( $1.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  de amortiguador) por 40 minutos, para hacer visible el DNA degradado por endonucleasas, se destiñó con amortiguador TAE 1X por 15 minutos (Figura 8).



**Figura 8.** Gel de agarosa al 1%, con muestras de DNA de parásito del día 7-13 post-infección (carril 2-8) de ratones F1 (experimento 1), DNA *P. chabaudi* tratado con RNasa I (carril 15) y sin tratamiento (carril 16), sonda Pevs 4 (carril 17) y marcador de peso molecular (carril 18).

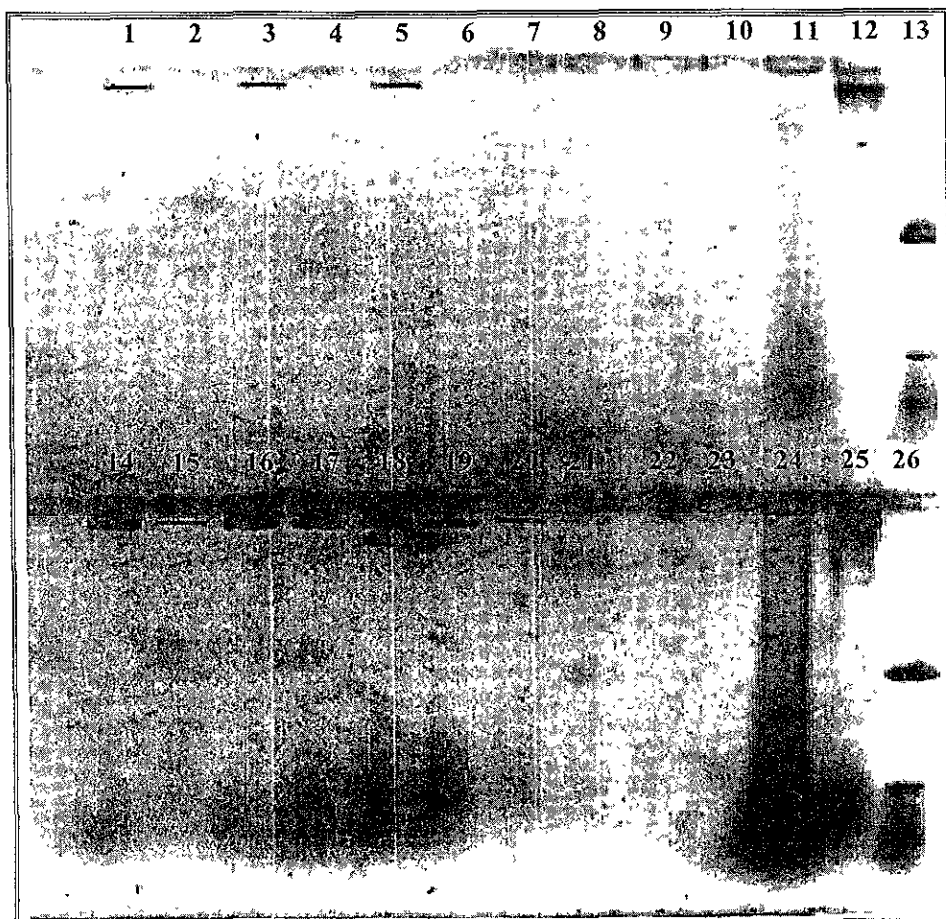


**Figura 9.** Autorradiografía obtenida de la hibridación del DNA colocado en el gel de la figura 8 con sonda Pcv5 4. El carril 1-4 corresponden al 7-10 días post-infección respectivamente; el carril 5 a *P. chabaudi* tratado con RNAsa I; carril 6, *P. chabaudi* sin tratamiento y carril 7 a la sonda Pcv5 4.

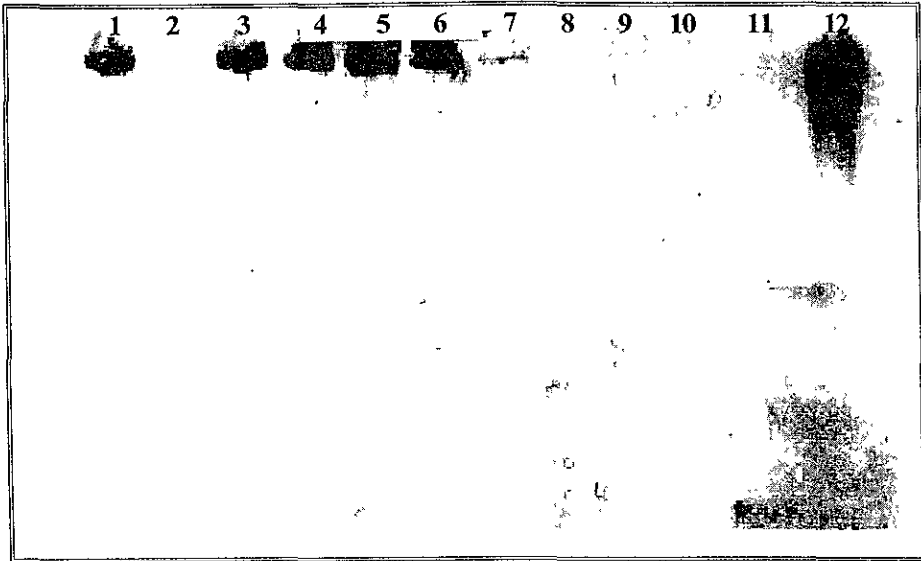
Posteriormente en un segundo grupo de 5 ratones CBA/Ca, se les infectó de la forma antes descrita con *P. chabaudi* y se obtuvieron las muestras de sangre para observar la parasitemia y para extraer el DNA. Se realizó el tratamiento del DNA del día 3 al 19 post-infección con RNAsa I para eliminar la posibilidad de que la presencia de RNA fuera una causa del efecto de “barrido” que atribuimos a apoptosis. Se utilizó DNA con tratamiento y otro sin tratamiento de la misma muestra, se colocaron en un gel de agarosa al 1%, se sometieron a electroforesis y se procedió a la tinción (**Figura 10**).



Se puede observar que el barrido relacionado con el fenómeno de apoptosis no es visible en las muestras tratadas con RNAsa I.



**Figura 10.** Gel de agarosa al 1% con muestras de DNA de *Plasmodium chabaudi* de los días 10-14 post-infección (carril 1-5) sin tratamiento con RNAsa I y DNA de los días 10-16 post-infección (carril 14-20) con tratamiento (**experimento 2**), DNA de ratón sano (carril 11 y 24), DNA de *P. chabaudi* (carril 12 y 25), y marcador de peso molecular (carril 13 y 26).



**Figura 11.** Autorradiografía obtenida al hibridar el DNA de los días 10-16 post-infección (carril 1-7) del gel de agarosa correspondiente al segundo experimento (figura 9) con sonda Pcv5 4.

#### TECNICA DE TUNEL EN LAMINILLA.

Las observaciones realizadas mediante microscopía de fluorescencia, solamente permiten distinguir células apoptóticas de las no apoptóticas, es difícil determinar el tipo celular del que se trata puesto que no se llevo al cabo otro tipo de tinción para identificar de forma diferencial las células. Sin embargo son evidencia importante del fenómeno de apoptosis en paludismo causado por *P. chabaudi*.

Además de sangre de ratones infectados, se utilizó sangre de ratón sano (testigo negativo) y sangre sometida a radiación UV por 5 minutos, con el fin de inducir apoptosis (testigo positivo). En el primer caso, se observaron artefactos visuales y algunas células apoptóticas que en comparación con el positivo son mucho menores en número (Figura 12 y 13).

En las laminillas de ratones infectados con plasmodio, se encontraron células en apoptosis a partir del día 10 post-infección (Figura 14). Como ya se mencionó, no se puede determinar el tipo de célula que esta en apoptosis con una simple tinción de fluorescencia, por lo que se recurrió a el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra los marcadores de superficie con el fin de identificar a las células que sufren apoptosis.



**Figura 12.** Células sanguíneas sometidas a luz UV y tratadas con la técnica de TUNEL (testigo positivo).



**Figura 13.** Células sanguíneas de ratón CBA/Ca sano sometidas a la reacción de TUNEL.



**Figura 14.** Células sanguíneas apoptóticas obtenidas de ratón CBA/Ca parasitado con *P. chabaudi*, al día 11 post-infección y sometidas a TUNEL.

#### DETERMINACION DE APOPTOSIS POR CITOMETRIA DE FLUJO.

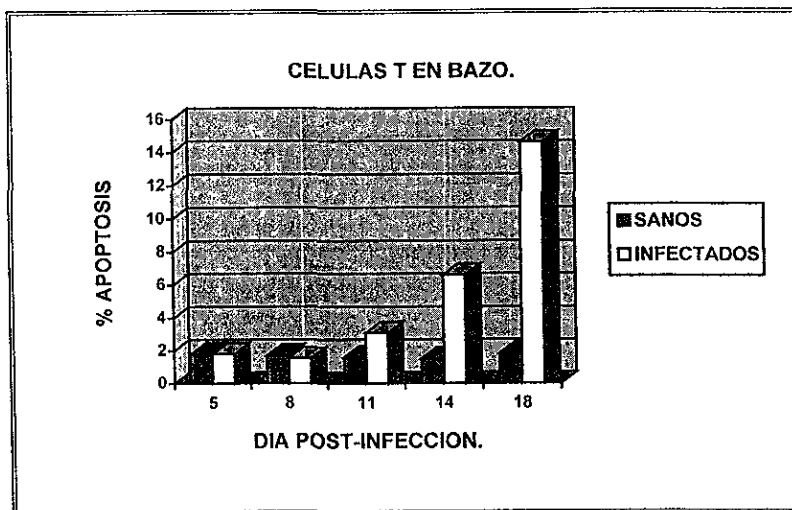
Para evaluar el fenómeno de apoptosis en las células del sistema inmune del huésped en el modelo de paludismo murino, se tomaron muestras sanguíneas y se extrajo el bazo tanto de ratones sanos como de ratones infectados con *P. chabaudi* durante los días 5, 8, 11, 14 y 18 post-infección. Todas las muestras fueron analizadas por citometría de flujo.

La presencia de CD3<sup>+</sup> en linfocitos T y de CD45<sup>+</sup> en linfocitos B, permitió la separación de ambos tipos celulares y adicionalmente se estimó la apoptosis total cuando no se utilizó anticuerpo monoclonal previo a la reacción TUNEL.

### Apoptosis en bazo.

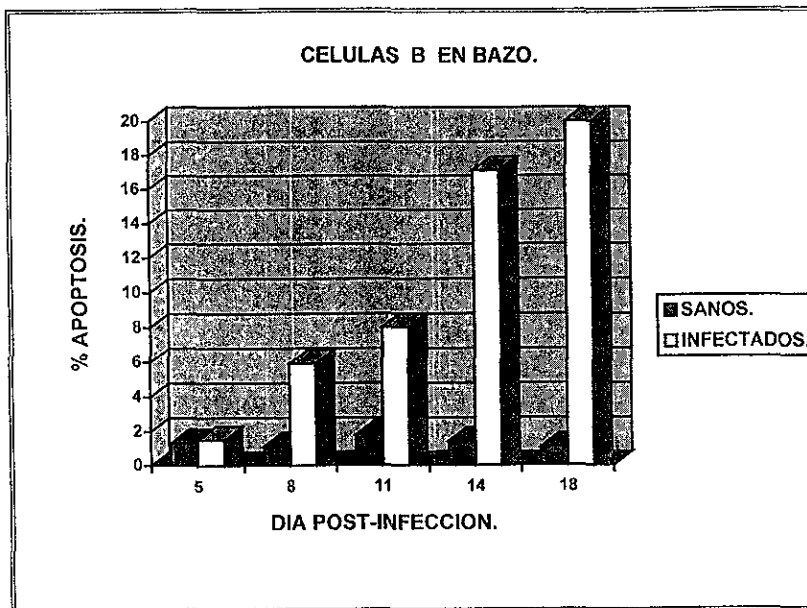
Se decidió estimar el porcentaje de células T y B en bazo, debido a que se ha demostrado que el bazo es un órgano linfoide que se requiere para la eliminación de *Plasmodium*.

Se observó un aumento del porcentaje de células T en apoptosis en el bazo de ratones infectados con plasmodio, en relación a ratones sanos, los valores van desde 1.61% (sanos) hasta un 3.1% (infectados) en el día 11 post infección alcanzando un máximo de 14.6% en el día 18. (Gráfica 2).



Gráfica 2. Porcentaje de apoptosis en células T de ratones CBA/Ca sanos e infectados con *P. chabaudi*.

Es importante hacer notar que en este tipo celular el evento de apoptosis se inicia después de la crisis en la parasitemia, a diferencia de las células B que vemos a continuación y que el número de células apoptóticas de ratones infectados comparado con ratones sanos es hasta 7 veces mayor.

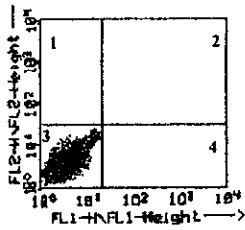


**Gráfica 3.** Porcentaje de apoptosis en linfocitos B de ratones CBA/Ca sanos e infectados con *P. chabaudi*.

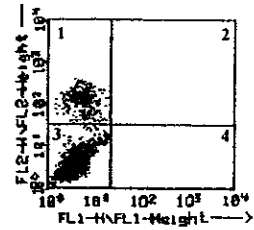
En el caso de linfocitos B, el proceso de apoptosis se presenta desde el día 8 post-infección con un porcentaje del 5.92%, superior al mostrado por las células T ese mismo día y al del día 18 con un 20% de células B contra un 14.6% de células T, como ya se mencionó la apoptosis en células B se presenta días antes de la eliminación del parásito. (Gráfica 3 y 4).

La apoptosis total (linfocitos T, B y otras células como macrófagos, NK) en el bazo, empieza a aumentar en el día 8 post-infección con un 2.95% de apoptosis y se eleva rápidamente hasta un 18% en el día 18 post-infección (Gráfica 5). Este comportamiento es similar al de las células B apoptósicas

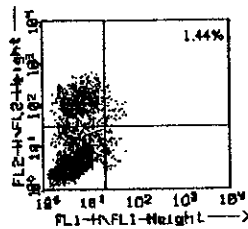
A



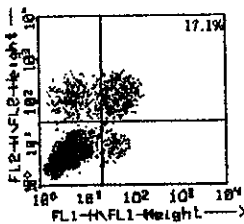
B



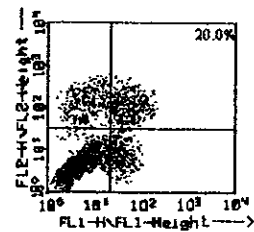
C



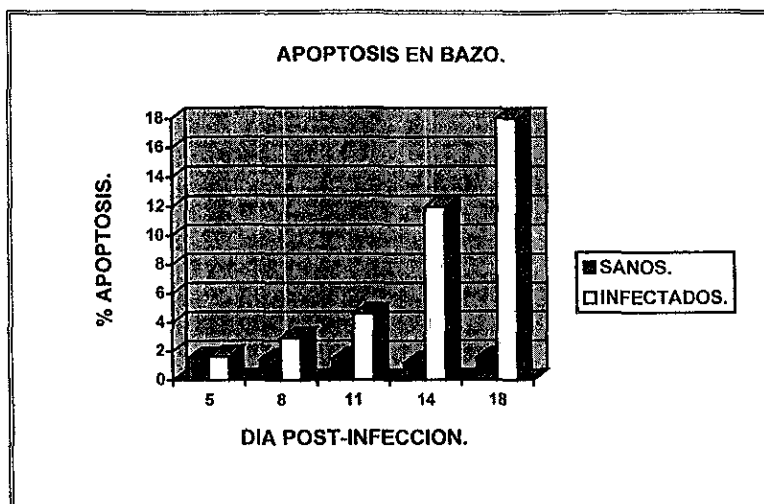
D



E



Gráfica 4. Determinación por citometría de flujo de apoptosis en células B de bazo de ratones CBA/Ca. FL1= fluorescencia de fluoresceína, FL2= fluorescencia de ficoeritrina. 1er. cuadrante= células con marcador de superficie (B), 2o. cuadrante= células c/marcador de superficie y apoptóticas, 3er. cuadrante= blanco de células s/marcar (A) y 4o. cuadrante= células apoptóticas. Células de bazo de ratón sano (C), células de ratón infectado con *Plasmodium chabaudi* de los días 11 (D) y 14 post-infección (E).



**Gráfica 5.** Porcentaje de apoptosis en bazo de ratones CBA/Ca sanos e infectados con plasmodio.

El ensayo donde no se utilizó un anticuerpo monoclonal para marcar el antígeno de superficie correspondiente a células T o B antes de la técnica de TUNEL, permitió evaluar el evento de apoptosis en todas las células inmunes presentes en el bazo dando un panorama general del comportamiento del sistema inmune ante la presencia de plasmodio.

### *APOPTOSIS EN SANGRE.*

Al igual que en bazo, se estimaron los porcentajes de células T y B apoptósicas en sangre periférica de ratones CBA/Ca infectados con *P. chabaudi* y se compararon con ratones sanos de la misma cepa. El proceso de fijación fue similar para células de bazo y de sangre, sin embargo en este último caso en algunas muestras, las células se lisaron, haciendo imposible diferenciar las diversas poblaciones marcadas.

En la **tabla 2** se muestra, solamente los datos de linfocitos T y B correspondientes al día 8 post-infección y los porcentajes de apoptosis total del día 8 y 11 post-infección. En el caso de las células T observamos un porcentaje mayor de apoptosis (0.42%) en ratones sanos que en infectados (0.22%), caso muy diferente es el de las células B, donde en el mismo día se obtuvo un aumento de apoptosis en ratones enfermos con



respecto a los sanos, de manera similar a lo que ocurre en bazo. Se analizó la apoptosis total en sangre periférica, se observó que en el día 8 post-infección, los ratones parasitados tienen un 3.16% de apoptosis superando en 5 veces a los sanos y en el día 11 el aumento es más considerable (15.62%).

	DIA POST INFECCION.	SANOS.	INFECTADOS.
LINFOCITOS T.	8	0.42%	0.22%
LINFOCITOS B.	8	0.62%	11.28%
APOPTOSIS TOTAL.	8	0.62%	3.16%
	11	0.06%	15.62%

Tabla 2. Porcentaje de apoptosis en sangre periférica de ratones CBA/Ca sanos e infectados.

## DISCUSION.

El objetivo principal del presente estudio fue comprobar la participación del fenómeno de apoptosis en la regulación de la multiplicación de *Plasmodium chabaudi*, para lo cual se estandarizaron las técnicas a utilizar, considerando las condiciones de trabajo del lugar, que permitieran que los experimentos fuesen reproducibles por cualquier investigador y que los resultados obtenidos sean confiables. La utilización de hibridaciones con sondas de DNA específicas es un método muy confiable si el procedimiento requiere reproducibilidad con base en que el DNA de la sonda solamente podrá aparearse con su DNA complementario y no con algún otro.

Las técnicas de Souther blot, marcaje de sondas de DNA e hibridación son un proceso continuo, como consecuencia cualquier error en alguno de los pasos causa desastres en el resultado final, para la estandarización se utilizó primero el DNA control contenido en el reactivo comercial, tanto como una muestra problema que se colocó en el gel de agarosa y se transfirió a la membrana de nylon para realizar la hibridación aprovechando la certeza en la complementariedad de bases del material genético. Se observó que el sistema funcionó perfectamente, se procedió a probarlo con DNA de *P. chabaudi chabaudi* AS y sonda Pcsv 4.1 (específica para *Plasmodium* obteniéndose un patrón de bandas determinado por especie), la autorradiografía indica que la hibridación fue específica para el DNA que se buscaba poner en evidencia (Figura 9).

El primer experimento consistió en infectar a 5 ratones F1 con *P. chabaudi chabaudi* AS, valorar el porcentaje de parasitemia y tomar muestras sanguíneas, pasarlas por columnas de celulosa y subsecuentemente se extrajo DNA para someterlo a electroforesis. El segundo experimento solamente se modificó en el tratamiento con RNasa I que se aplicó al DNA separado con el fin de eliminar RNA contaminante que pudiera ser el causante del barrido obtenido en el primer caso.

En la electroforesis de las muestras de DNA del primer experimento, se observó inicialmente un patrón de bandas similar al que se presenta en apoptosis (Figura 7), dato que con anterioridad nos llevó a pensar que el proceso de apoptosis estaba ocurriendo en el parásito como efecto de la respuesta inmune del hospedero. Sin embargo, cuando previo a la electroforesis se realizó un tratamiento con RNAasa I, las bandas no se identificaron claramente como en el primer caso, por lo que el barrido que se observó se debía a la presencia de RNA (Figura 10).

Para establecer que el DNA provenía del parásito y no del ratón, la sangre de los dos experimentos se pasó a través de una columna de celulosa que permite eliminar una gran cantidad de leucocitos de ratón, conservando a los eritrocitos cuyo contenido de DNA pertenece principalmente al parásito. El material genético se aisló, se trató con

RNasa I (solo en el segundo experimento) y se hibridó con la sonda Pcsv 4 (específica para DNA de plasmodio). Los resultados obtenidos en la autorradiografía muestran que el DNA observado en el gel, corresponde al parásito, porque solo se observaron bandas donde se ubicó el material genético del parásito y no en el DNA del ratón (que se localizó comparando el corrimiento del DNA obtenido de un pedazo de cola del ratón mediante un tratamiento previo con proteinasa K).

No obstante a los resultados encontrados en el gel de agarosa después del tratamiento con RNasa I, en la prueba de TUNEL realizada en laminilla, se obtuvieron imágenes correspondientes a células que mueren por apoptosis (Figura 14), se observó un mayor número de células apoptóticas en frotos de ratones infectados que en los correspondientes a ratones no infectados. La tinción con fluorescencia tiene la limitación de determinar células positivas o bien negativas para la reacción de TUNEL, considerando que la manera de realizar el frote sanguíneo es la misma que se utilizó para evaluar la parasitemia de los ratones, casi la totalidad de la superficie del frote esta cubierta de eritrocitos, por lo tanto esas células fluorescentes podrían ser eritrocitos parasitados, pues son los únicos que pueden presentar DNA.

Dado que la aseveración anterior respecto a apoptosis en el parásito puede considerarse subjetiva, para asegurar lo dicho y evaluar el proceso de muerte programada también en las células del sistema inmune del huésped, se procedió a realizar FACS, técnica que permite clasificar tipos celulares con ayuda de anticuerpos monoclonales marcados con compuestos fluorescentes que van dirigidos a moléculas de superficie celular, así como aprovechar el fundamento del aparato para separar células considerando tamaño y granularidad y distinguir entre eritrocitos de linfocitos.

En los ensayos de evaluación de apoptosis en eritrocitos mediante FACS, no fue posible mantener la integridad de las células hasta el momento de las lecturas en el citómetro de flujo por lo que no tenemos resultados al respecto, quedando sin confirmar la presencia del fenómeno de muerte celular programada en *Plasmodium*. Ante lo cual se sugiere la utilización de otro fijador menos agresivo para el eritrocito, un tratamiento distinto de la muestra o el uso de microscopía electrónica.

En cuanto a las células del sistema inmune del huésped, obtuvimos resultados interesantes en bazo, primero porque los linfocitos T presentan el fenómeno apoptótico en el modelo de paludismo en una etapa posterior a la crisis o al inicio de la súbita disminución de la cantidad de parásito, sugiriendo que la causa de que las células T están muriendo de una manera muy rápida se debe a una auto-regulación del sistema inmune para volver a equilibrar la población celular y evitar daños al mismo hospedero (Gráfica 2).

Los linfocitos B presentan un comportamiento distinto a los linfocitos T, puesto que la presencia de apoptosis se detectó desde el día 8 post-infección, fecha anterior al inicio de la crisis, por lo tanto en este caso la presencia del parásito puede ser que la misma activación de las células B, las torne más susceptibles a la muerte por apoptosis como mecanismo regulador de la respuesta inmune. También en los días posteriores (días 14 y 18) se detectaron porcentajes altos de apoptosis al igual que con los linfocitos T, la causa de la muerte celular podría ser el propio sistema inmunológico con una finalidad regulatoria (**Gráfica 3**). Sería interesante medir los títulos de anticuerpos específicos durante la infección.

La actividad en la respuesta inmune del bazo ante plasmodio es importante pues este órgano linfoide secundario está involucrado en la eliminación del plasmodio, como lo demuestran los experimentos donde al eliminar el bazo de ratones infectados, estos no resuelven la parasitemia (Smith et al., 1997). Dado que el fenómeno de apoptosis presente en las células encargadas de la respuesta inmune puede estar provocado por algún efecto del parásito, estimar apoptosis en bazo proporcionó datos relevantes, como el hecho de que el comportamiento de los resultados de apoptosis total (**Gráfica 5**) sigue la misma tendencia que las células B, es decir inicia antes de la crisis sugiriendo que el parásito tiene un mecanismo para provocar apoptosis en las células de bazo y va en aumento hasta el día 18 post-infección, al parecer como un evento homeostático.

Respecto a los resultados de apoptosis en sangre periférica (**tabla 2**), las células B y otras células del sistema inmune presentan un aumento de apoptosis cuando esta presente el parásito en el día 8 post-infección, comportamiento que se asemeja al observado en bazo para las mismas células, por lo que plasmodio está regulando el número celular de tipo B y de otros (macrófagos, NK) durante la infección. Por el contrario, los linfocitos T se muestran más apoptóticos en ratones sanos que en infectados, para este caso puede pensarse que la regulación es negativa, es decir, evitando la apoptosis de las células T.

Resulta interesante estudiar el porcentaje de células en apoptosis en bazo a partir de los días subsecuentes al día 18 post-infección y registrar el comportamiento de linfocitos T y B, así como de otros tipos celulares como macrófagos. También confirmar la muerte celular de *Plasmodium* y con base en esos resultados diseñar experimentos que se enfoquen en las señales efectoras que están provocando la apoptosis.

La evaluación de la parasitemia en los experimentos permite conocer la evolución de la enfermedad y la cantidad de parásito presente en el transcurso del ensayo, de esta manera se conoce el comportamiento del parásito en cada determinación realizada y es un apoyo en el análisis resultados (**Gráfica 1**).

Este trabajo presenta resultados que demuestran que la muerte celular por apoptosis está moderando la respuesta inmune del huésped contra *Plasmodium*, pero su participación en la regulación del número de parásitos en la infección, no está perfectamente esclarecida, sin embargo existe la evidencia de apoptosis en plasmodio (Figura 14). La metodología empleada en este experimento puede usarse en nuevos casos donde se requiera de una identificación precisa del parásito, mediante la técnica de hibridación con la sonda Pcsv 4 o de una evaluación simultánea del proceso de apoptosis y Ags de superficie de las células en estudio, además de medir apoptosis utilizando la tinción con bromuro de etidio.

## CONCLUSIONES.

- ♣ Los resultados obtenidos por la técnica de TUNEL indican que *Plasmodium* probablemente sufre un proceso similar al de apoptosis alrededor del día 11 post-infección, tal vez por presión del sistema inmune.
- ♣ La infección por *Plasmodium* induce un incremento en células apoptóticas en el bazo durante una infección primaria, iniciando con un 2.9% de apoptosis en el día 8 post-infección hasta el día 18 con un 18%. La técnica de doble tinción utilizando anticuerpos monoclonales para los marcadores de superficie y TUNEL apoyan los resultados.
- ♣ Las células T sufren apoptosis en la etapa de eliminación del parásito (con un máximo de 14.6% de apoptosis) posiblemente a causa de una regulación homeostática por parte propio sistema inmune.
- ♣ Las células B mueren por apoptosis desde el día 8 post-infección, previo a la crisis de la infección por lo tanto en un inicio existe la posibilidad de que el parásito esté provocando la muerte celular como mecanismo de defensa a la respuesta inmune y posteriormente se trata de un proceso homeostático el que se presenta por parte del huésped.

# PREPARACION DE SOLUCIONES Y REACTIVOS.

## SOLUCIONES PARA COLECCION DE MUESTRAS.

### 1. Colorante Giemsa.

Pesar 1 g de colorante giemsa, disolver en 66 ml de glicerol e incubar de 1 1/2 a 2 hrs a 55°C. Después adicionar 66 ml de metanol y dejar reposar por 2 semanas a temperatura ambiente o por 2 días a 37°C.

### 2. Solución Salina de Krebs.

• NaCl	0.15M.	100 partes.
• KCl	0.15 M.	4 partes.
• Amortiguador de fosfatos (PBS).		12 partes.
• Sulfato de magnesio heptahidratado MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.15 M.	1 parte.
• CaCl <sub>2</sub>	0.11 M <sup>♣</sup> .	1 parte.

♣ Adicionar lentamente para evitar su precipitación.

Se recomienda esterilizar cada solución independientemente y mezclarlas en condiciones estériles.

### 3. Amortiguador de Fosfatos (PBS)\*.

• NaCl	40.00 g.
• KCl	1.00 g.
• Fosfato de sodio Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anh.	5.75 g.
• Fosfato de potasio KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> anh.	1.00 g.

Pesar todos los reactivos, disolver en agua bidestilada, ajustar el pH a 7.2 con NaOH y aforar a 1000 ml.

\* Esterilizar a 121 °C y 15 libras durante 15 minutos.

#### 4. Saponina al 10%.

Pesar 0.10 g de saponina y disolver en 1 ml de agua bidestilada estéril. Guardar a -20°C.

### SOLUCIONES PARA AISLAMIENTO DE DNA.

#### 1. Amortiguador de Lisis\*.

• Tris, pH 8.0	2 M.	2 ml.
• EDTA, pH 8.0	0.5 M.	16 ml.
• SDS	10 %	5 ml.

Mezclar todos los reactivos y aforar a 100 ml.

Cuando se requiera utilizar el amortiguador, adicionar 20 µl de pronasa E (0.5 mg/ml) por cada 800 µl de amortiguador.

#### 2. Acetato de Sodio 375 mM\*.

Preparar una solución stock de acetato de sodio a una concentración de 3 M, pesando 61.52 g de acetato de sodio anhidro, disolviéndolo en agua bidestilada, ajustar el pH a 5.5 con ácido acético y aforar a 250 ml.

Tomar un alicuota de 12.5 ml de la solución stock y llevar a un volumen de 250 ml.

#### 3. Amortiguador TE\*.

• Tris, pH:8.0	2 M.	1.25 ml.
• EDTA, pH:8.0	0.5 M.	0.5 ml.

Aforar con agua bidestilada a 250 ml.

#### 4. Tris 2 M, pH 8.0\*.

Pesar 242.28 g de Tris (Tris[hidroximetil]amino-metano) y disolver en agua bidestilada, ajustar el pH a 8.0 con HCl y aforar a 1000 ml.

\* Esterilizar a 121 °C y 15 libras durante 15 minutos.



### 5. EDTA 0.5 M, pH 8.0\*

Pesar 146.10 g de EDTA (ácido etilendiamintetracético), adicionar 500 ml de agua bidestilada y ajustar el pH a 8.0 con HCl, agitar hasta que el reactivo se disuelva y entonces aforar a 1000 ml.

### 6. SDS 10 %\*

Pesar 25 g de SDS (dodecil sulfato de sodio) y disolver en 250 ml de agua bidestilada.

### 7. RNAsa libre de DNAasa.

Disolver 10 mg de RNAsa en 1 ml de acetato de sodio 0.01 M, pH 5.2. Calentar a 100°C durante 15 minutos, dejar enfriar lentamente a temperatura ambiente. Ajustar el pH por adición de 0.1 volúmenes de Tris 1 M, pH 7.4. Guardar en alíquotas a -20°C.

## SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS.

### 1. Amortiguador de Carga 5X.

- Tris, pH 8.0 50 mM.
  - EDTA, pH 8.0 75 mM.
  - SDS. 0.5 %.
  - Ficoll. 10 %.
  - Sacarosa. 30 %.
  - Azul de Bromofenol o Cianol Xileno 0.2 %.
- FF

Mezclar en agua bidestilada y guardar a temperatura ambiente.

### 2. Bromuro de Etidio (10 mg/ml).

Adicionar 1 g. de bromuro de etidio a 100 ml de agua bidestilada. Agitar con barra magnética durante varias horas hasta que el colorante se disuelva. Guardar en envase oscuro y a temperatura ambiente.

\* Esterilizar a 121 °C y 15 libras durante 15 minutos.

3. *Amortiguador TAE (E) 50X\**.

- Tris. 242.0 g.
- EDTA 0.5 M, pH:8.0. 100.0 ml.
- Acido acético glacial. 57.1 ml.

Aforar a 1000 ml con agua bidestilada.

SOLUCIONES PARA SOUTHERN BLOT.

1. *Solución de Desnaturalización.*

- NaCl. 87.66 g.
- NaOH. 20.00 g.

Disolver en agua bidestilada y aforar a 1000 ml.

2. *Solución de Neutralización\*.*

- NaCl. 87.66 g.
- Tris. 121.14 g.

Disolver en agua bidestilada, ajustar el pH a 7.5-8.0 con HCl y aforar a 1000 ml.

3. *Solución 20XSSC\*.*

- Citrato de Sodio. 88.20 g.
- NaCl. 175.30 g.

Disolver en agua bidestilada, ajustar el pH a 7.0 y aforar a 1000 ml.

\* Esterilizar a 121 °C y 15 libras durante 15 minutos.

## SOLUCIONES PARA HIBRIDACION DE DNA.

### 1. Amortiguador de Hibridación.

- 20XSSC 25 ml.
- SDS. 10 %. 1 ml.
- Sulfato dextran. 5 g.
- Líquido bloqueador 5 ml.

(Kit de marcaje, Amersham).

Mezclar y aforar a 100 ml con agua millipore estéril.

### 2. Solución 1XSSC, SDS 0.1%\*.

- 20XSSC. 50 ml.
- SDS. 10 %. 10 ml.

Aforar a 1000 ml con agua bidestilada.

### 3. Solución 0.5XSSC, SDS 0.1%\*.

- 20XSSC. 25 ml.
- SDS. 10 % 10 ml.

Aforar a 1000 ml con agua bidestilada.

### 4. Amortiguador A\*.

- Tris, 2 M. 50 ml.
- NaCl. 60 ml.

Aforar con agua bidestilada a 1000 ml.

\* Esterilizar a 121 °C y 15 libras durante 15 minutos.

### *5. Conjugado anti-fluoresceína-AP diluido.*

Pesar 0.1 g. de albúmina sérica bovina (BSA) y disolver en 18 ml de amortiguador A, adicionar 40  $\mu$ l de conjugado anti-fluoresceína-AP (kit de detección, Amersham), mezclar suavemente y llevar a un volumen total de 20 ml con amortiguador A.

Este conjugado debe prepararse poco tiempo antes de utilizarlo.

### *6. Tween 20, 0.3%\*.*

Tomar una alícuota de 3 ml de tween 20 y mezclarla con amortiguador A hasta obtener un volumen de 1000 ml.

## SOLUCIONES PARA LA TECNICA DE TUNEL EN LAMINILLA.

### *1. Enzima TdT diluida.*

Para 2 laminillas:

Mezclar 2 gotas (76  $\mu$ l) de amortiguador de reacción (kit de apoptosis, Oncor) y 1 gota de enzima TdT (kit de apoptosis, Oncor). Almacenar en hielo hasta por 6 horas.

### *2. Amortiguador de Paro/Lavado diluido.*

Adicionar 1 ml de amortiguador paro/lavado (kit de apoptosis, Oncor) a 34 ml de agua bidestilada estéril. Guardarse a 4°C.

### *3. Abs anti-digoxigenina-fluoresceína diluido.*

Mezclar 2 gotas (56  $\mu$ l) de solución bloqueadora (kit de apoptosis, Oncor) y 49  $\mu$ l de Abs anti-digoxigenina-fluoresceína (kit de apoptosis, Oncor). Almacenar en hielo por no más tiempo de 3 horas.

\* Esterilizar a 121 °C y 15 libras durante 15 minutos.

#### 4. Solución de Yoduro de Propidio.

- Yoduro de propidio. 50 µg.
- RNAsa. 0.5 mg.
- Amortiguador de fosfatos (PBS). 10 ml.

Prepararse el mismo día y almacenar en hielo hasta su uso.

### SOLUCIONES PARA CITOMETRIA DE FLUJO.

#### 1. Solución PBS-BSA 1%.

Pesar 10 g. de albúmina sérica bovina (BSA) y disolverla en 1000 ml de amortiguador de fosfatos (PBS) 1X estéril. Guardar a 4°C.

#### 2. Amortiguador de Lisis de Eritrocitos.

- Cloruro de amonio  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . 8.29 g.
- Bicarbonato de potasio  $\text{KHCO}_3$ . 1.00 g.
- EDTA- $\text{Na}_2$ . 37.20 mg.

Disolver en agua bidestilada, ajustar el pH a 7.2-7.4 con HCl o NaOH y aforar a 1000 ml. Preparar momentos antes de su uso.

#### 3. Tritón X-100, 0.1%-Citrato de sodio, 0.1%.

Pesar 0.1 g. de citrato de sodio, disolverlo en agua bidestilada y después adicionar 100 µl de tritón X-100. Aforar a 100 ml con agua bidestilada.

#### 4. p-Formaldehído 1 %.

Disolver 1 g. de p-formaldehído en 100 ml de PBS.

\* Esterilizar a 121 °C y 15 libras durante 15 minutos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Inmunología celular y molecular*. 2a. ed. México: MacGraw Hill, 1995: 73.
2. Brown TA, comp. *Essential molecular biology*. Gran Bretaña: IRL Press, 1994: vol.2: 73-77, 97.
3. Carson DA, Ribiero JM. Apoptosis and disease. *Lancet* 1993; 341: 1251-1254.
4. Clark WR. The experimental of modern immunology. Singapur: Chong Offset Printing Pte.: 374-375.
5. Cohen JJ. Programmed cell death and apoptosis in lymphocyte development and function. *Chest* 1993; 103: 995-1015.
6. Darzynkiewicz Z, Li X, Gong J. Assay of Cell Viability: Discrimination of cells dying by apoptosis. Er: Darzynkiewicz Z y Crissman HA, comp. *Methods in cell biology*. EUA: Academic Press, 1994: vol. 41: 16-17.
7. Dolzhanskiy A, Basch RS. Flow cytometric determination of apoptosis in heterogeneous cell populations. *J Immunol Methods* 1995; 180: 131-140.
8. Duke RC, Ojcius DM, Ding-E-Young J. Suicidio celular, en la salud y en la enfermedad. *Investigación y Ciencia* 1997; 2: 44-52.
9. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119: 493-501.
10. Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the *in situ* terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res* 1993; 53: 1945-1951.
11. Janeway CA, Travers P, Hunt, S, Walport M. *Immunobiology*. 3a.ed. Singapore: Current Biology-Garland Publishing. 1997: 2.32.
12. Jarra W, Brown KN. Protective immunity to malaria: studies with cloned lines of *Plasmodium chabaudi* and *P. berghei* in CBA/Ca mice. I. The effectiveness and inter- and intra-species specificity of immunity induced by infection. *Parasite Immunol*. 1985; 7: 595-606.

13. Kroemcr G, Petit P, Zamzami N, Vayssi re JL, Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death. *FASEB* 1995; 9: 1277-1287.
14. Langhorne J. The immune response to the blood stages of *Plasmodium* in animal models. *Immunol.Letters* 1994; 41: 99-102.
15. Meding SJ, Langhorne J. CD4+ T cells and B cells are necessary for the transfer of protective immunity to *Plasmodium chabaudi chabaudi*. *Eur J Immunol* 1991; 21: 1433-1438.
16. Miller LH, Good MF, Kaslow DC. The need for assays predictive of protection in development of malaria bloodstage vaccines. *Parasitology Today* 1997, 13: 46-47.
17. Murray PR, Drew WL, Kobayashi GS, Thompson JH. *Microbiologia m dica*. Madrid: Ediciones Mosby, 1996: 369-371.
18. Oncor Inc. ApopTag *in situ* apoptosis detection kit fluorescein 1995: 2.
19. Pellier V, Astic L. Detection of apoptosis by electron microscopy and *in situ* labelling in the rat olfactory pit. *Neuroreport* 1994; 5: 1429-1432.
20. Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ. *Diagnostic molecular microbiology. Principles and applications*. EUA: American Society for Microbiology, 1993: 3-6.
21. Phillips S. Effector mechanisms against asexual erythrocytic stages of *Plasmodium*. *Immunol.Letters* 1994; 41: 109-114.
22. Roitt I. *Essential immunology*. 9a. ed. EUA: Blackwell Science, 1997: 133,137.
23. Roitt IM, Brostoff J, Male DK. *Inmunología*. 2a. ed. México: Salvat Editores, 1991: 32-33.
24. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning*. 2a. ed. EUA: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989: vol. 1,3: 6.12, B.11.
25. Santos AL. Vida y muerte del linfocito B. *Ciencia y desarrollo* 1995; 21: 23-28.
26. Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C. Phagocyte recognition of cell undergoing apoptosis. *Immunology Today* 1993; 14: 131-136.
27. Sgonc R, Boeck G, Dietrich H, Gruber J, Recheis H, Wick G. Simultaneous determination of cell surface antigens and apoptosis. *TIG* 1994; 10: 41-42.
28. Shulze-Osthoff K, Walczak H, Droge W, Krammer PM. Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *J.Cell Biology* 1994; 127: 15-20.

29. Smith NC, Favila-Castillo L, Monroy-Ostria A, Hirunpetcharat C, Good MF. The spleen, IgG antibody subsets and immunity to *Plasmodium berghei* in rats. *Immunol Cell Biol* 1997; 75: 318-323.
30. Snounou G, Jarra W, Virijakosol S, Wood JC, Brown KN. Use of a DNA probe to analyse the dynamics of infection with rodent malaria parasites confirms that parasite clearance during crisis is predominantly strain- and species-specific. *Mol. Biochem. Parasitol* 1989; 37: 37-46.
31. Tay ZJ, comp. *Microbiología y parasitología médicas*. 2a ed. México: Mendez editores, 1994: 3.74, 3.80-3.83.
32. Taylor-Robinson AW. Regulation of Immunity to Malaria: valuable lessons learned from murine models. *Parasitology Today* 1995; 11: 334-341.
33. Touré BA, Sarthou JL, Roussilhon C. Acute *Plasmodium falciparum* infection is associated with increased percentages of apoptotic cells. *Immunol. Letters* 1995; 46: 59-62.
34. Troye-Blomberg M. Human T-cell response to blood stage antigens in *Plasmodium falciparum* malaria. *Immunol.Letters* 1994; 41: 103-107.
35. Vaux DL, Haecker G, Strasser a. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 1994; 76: 777-779.
36. Vaux DL, Strasser A. The molecular biology of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996; 93:2239-2244.
37. Welburn SC, Barcinski MA, Williams GT. Programmed cell death in trypanosomatids. *Parasitology Today* 1997; 13: 22-25.
38. Wells RA, Pavanand K, Zolyomi S, Permpnich B, Macdermott RP. Loss of circulating T lymphocytes with normal levels of B and "null" lymphocytes in Thai adults with malaria. *Clin.Exp.Immunol* 1979; 35: 202-209.
39. White E. Overview of apoptosis. *Inglaterra: Amersham life science*, 1996: 8-15.
40. Williams GT. Apoptosis in the immune system. *J. Pathol* 1994a; 173: 1-4.
41. Williams GT. Programmed cell death: a fundamental protective response to pathogens. *Trends Microbiol* 1994b; 12: 463-464.
42. Wyllie AH, Kerr JFR, Curr AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol* 1980; 68: 251-306.