



00377
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES – ZARAGOZA

*PARTICIPACION DEL ÓXIDO NÍTRICO Y LA
APOPTOSIS EN LA REGULACION DE LA
RESPUESTA INMUNE EN MALARIA
MURINA*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

JOSELÍN HERNÁNDEZ RUIZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA

MÉXICO, D.F.

MARZO, 2004



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MEXICO

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 12 de enero de 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) **Hernández Ruíz Joselín**, con número de cuenta 503450801, con la tesis titulada: "**Participación del óxido nítrico y la apoptosis en la regulación de la respuesta inmune en malaria murina**", bajo la dirección del(a) **Dra. Martha Legorreta Herrera**.

Presidente:	Dra. Victoria Chagoya de Sánchez
Vocal:	Dr. Alejandro Zentella Dehesa
Secretario:	Dra. Martha Legorreta Herrera
Suplente:	Dra. María Isabel Soto Cruz
Suplente:	Dra. Ingeborg Becker Fauser

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 08 de marzo de 2004.

Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

...A IRENE

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Josefin Hernández
Ruiz

FECHA: 10-03-04

FIRMA: [Signature]

Agradezco a la Dra. Martha Legorreta Herrera por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, al Dr. Alejandro Zentella Dehesa por su apoyo en el desarrollo de esta investigación, al MSc Jose Luis Ventura por ofrecerme sus conocimientos en citometría de flujo, al grupo de laboratorio de la Dra. Legorreta y del Dr. Zentella por su apoyo y compañía.

Este proyecto fue apoyado por CONACYT y DGEP con Beca para Estudios de Posgrado – Nivel Maestría. El Comité Tutorial estuvo integrado por la Dra. Isabel soto Cruz, el Dr. Alejandro Zentella Dehesa y la Dra. Martha Legorreta Herrera.

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN	6
2. INTRODUCCIÓN	7
3. MARCO TEORICO	12
3.1 ASPECTOS GENERALES DE MALARIA	12
3.1.1 Ciclo biológico de <i>Plasmodium</i> spp.	12
3.1.2 Incidencia de malaria en el mundo	14
3.1.3 Patogénesis.	16
3.1.4 Modelos de investigación en malaria	18
3.2 LA RESPUESTA INMUNE CELULAR EN MALARIA	19
3.2.1 Participación de los linfocitos T CD4+ $\alpha\beta$.	20
3.2.2 Participación de los linfocitos T CD8+.	21
3.2.3 Participación de los linfocitos T $\gamma\delta$.	21
3.2.4 Participación de los linfocitos B.	22
3.2.5 Participación de los macrófagos y células NK.	23
3.2.6 Las células dendríticas en malaria.	24
3.3 ÓXIDO NÍTRICO	25
3.3.1 El óxido nítrico en malaria.	31
3.4 APOPTOSIS	32
3.4.1 Apoptosis en el sistema inmune.	36
3.4.2 Apoptosis en malaria.	38
3.5 ASOCIACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO Y APOPTOSIS	39
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	43
5. HIPOTESIS	45
6. OBJETIVOS	45
6.1 OBJETIVO GENERAL	45
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
7. MATERIALES Y METODOS	46
7.1 DISEÑO EXPERIMENTAL	46
7.2 MATERIAL BIOLÓGICO	47
7.3 MATERIAL DE LABORATORIO	47
7.4 EQUIPO	48
7.5 REACTIVOS	49
7.5.1 Secuencias de los oligonucleótidos iniciadores de los genes: β -actina, IFN γ , TNF α , IL-4 e IL-10.	50

7.6 METODOLOGÍA	51
7.6.1 Infección de ratones.	51
7.6.2 Toma de muestras sanguíneas y evaluación de parasitemia.	52
7.6.3 Cuantificación de NO.	52
7.6.4 Extracción de esplenocitos.	54
7.6.5 Detección de apoptosis.	54
7.6.5.1 Anexina V.	54
7.6.5.2 MC 540.	55
7.6.5.3 TUNEL.	55
7.6.6 Método de tinción con dos colores para apoptosis y marcadores de superficie celular.	56
7.6.7 RT-PCR semicuantitativo.	57
7.6.7.1 Extracción de RNA.	57
7.6.7.2 Hidratación y cuantificación de RNA.	58
7.6.7.3 Retrotranscripción.	58
7.6.7.4 Amplificación de los genes para citocinas por PCR.	59
7.6.7.5 Electroforesis de los productos de PCR.	61
7.6.8 Análisis estadístico.	61
8. RESULTADOS	62
8.1 CURVA DE APOPTOSIS	62
8.2 ASOCIACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO CON LA APOPTOSIS	63
8.3 CITOCINAS DE LA RESPUESTA Th1/Th2	70
9. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	72
10. CONCLUSIONES	78
11. BIBLIOGRAFIA	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> .	13
Figura 2. Mapa global de áreas endémicas de malaria.	14
Figura 3. Distribución de casos de malaria en América Latina en el 2000.	15
Figura 4. Reacción de síntesis de NO.	25
Figura 5. Producción de NO por iNOS en respuesta a las infecciones.	30
Figura 6. Porcentaje de células apoptóticas vs. concentración de ligando.	33
Figura 7. Vías apoptóticas más importantes en células de mamíferos.	34
Figura 8. Reacción de Griess.	52
Figura 9. Comparación de Anexina V, MC540 y TUNEL.	62
Figura 10. Apoptosis evaluada con MC 540.	63
Figura 11. Parasitemia y NO.	64
Figura 12. Apoptosis de ratones infectados con <i>P. chabaudi</i> .	65
Figura 13. Apoptosis de esplenocitos CD4+ en ratones infectados.	66
Figura 14. Apoptosis de esplenocitos CD8+ en ratones infectados.	66
Figura 15. Apoptosis de esplenocitos B220+ en ratones infectados.	67
Figura 16. Apoptosis de esplenocitos CD4+ en ratones infectados y tratados.	67
Figura 17. Apoptosis de esplenocitos CD8+ en ratones infectados y tratados.	68
Figura 18. Apoptosis de esplenocitos B220+ en ratones infectados y tratados.	68
Figura 19. Expresión de citocinas Th1 en bazo de ratones infectados y tratados.	70
Figura 20. Expresión de citocinas Th2 en bazo de ratones infectados y tratados.	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Isoformas de NOS.	27
Tabla 2. Mezcla de retrotranscripción para una muestra (1X).	58
Tabla 3. Mezcla para PCR por muestra.	59

1. RESUMEN

La malaria o paludismo es uno de los principales problemas de salud pública en el mundo; el desarrollo de una vacuna se ve impedido entre otras causas, porque se desconocen los mecanismos precisos de la respuesta inmune celular involucrados. El presente trabajo estudia el papel del óxido nítrico en la respuesta inmune celular durante la infección con *Plasmodium* en un modelo experimental de malaria murina, en particular si está relacionado con la inducción de apoptosis observada en la parasitemia aguda. Se evaluó el porcentaje de apoptosis junto con el fenotipo celular de esplenocitos de ratones CBA/Ca infectados con *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS y tratados con inductor (LPS) o inhibidor (aminoguanidina) de la producción de óxido nítrico, en tres tiempos post infección (4, 11 y 21 días); además se evaluó la expresión de citocinas IFN γ , TNF α , IL-4 e IL-10, por RT-PCR y la concentración de óxido nítrico en suero por el método de Griess. La modificación de la concentración de óxido nítrico a través de tratamientos con aminoguanidina o con LPS, si bien no lograron modificar el porcentaje de parasitemia ni el patrón de citocinas de la respuesta Th1 y Th2, si modificaron el porcentaje de apoptosis de las células T, tanto CD4+ como CD8+. Las células B presentaron el mayor porcentaje de apoptosis, sin embargo los tratamientos no lo afectaron. Esto sugiere que el óxido nítrico participa en la regulación de la respuesta inmune, durante la fase de ascenso de la parasitemia. Nuestros datos proveen de nueva información sobre la compleja regulación de la respuesta inmune para el modelo de malaria murina utilizado.

2. INTRODUCCIÓN

La malaria sigue siendo una de las enfermedades con mayor morbilidad y mortalidad en el mundo, está presente en 102 países. El agente etiológico es un parásito intracelular protozario del género *Plasmodium* que infecta aves, reptiles y mamíferos (Garnham, 1988). Las especies que infectan al ser humano son *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. Malariae* y *P. ovale*; las dos primeras son responsables de más del 95% de los casos reportados (Organización Panamericana de la Salud, 2001). El parásito se transmite a los vertebrados por la picadura de un mosquito hembra infectado; en el caso de las especies de *Plasmodium* que infectan humanos, el mosquito implicado es del género *Anopheles*.

Durante décadas se ha intentado erradicar esta enfermedad a través de medidas de saneamiento básico y control del mosquito vector, sin embargo múltiples problemas de orden técnico, socioeconómico y político han impedido el éxito de los programas de erradicación (Greenwood, 1997). Probablemente la estrategia más importante para el control de la malaria es el diseño de vacunas, sin embargo muchos factores hacen increíblemente difícil el desarrollo de una vacuna, especialmente el complejo ciclo biológico del parásito (figura 1), con diferentes formas (cada una de ellas con un patrón de expresión de antígenos distinto) y en diferentes tejidos del vertebrado y del mosquito. En estas formas variadas, el parásito es susceptible al ataque inmune aunque el tipo de respuesta es muy distinta para cada forma, por lo tanto es necesario utilizar varias estrategias (Good, 2001).

Un segundo factor es la habilidad del parásito para alterar sus antígenos. La variación antigénica y el polimorfismo alélico son obstáculos importantes, dado que muchas de las alteraciones en las proteínas presentadas de *Plasmodium*, ocurren en regiones que son cruciales para el reconocimiento inmunológico. Otros factores que impiden el desarrollo de una vacuna eficaz incluyen: incapacidad inmunológica de ciertos individuos para

responder a proteínas que puedan comprometer una vacuna (Good et al., 1983); delección clonal influenciada por eventos estocásticos y tal vez exposición a antígenos de reactividad cruzada (Good et al., 1993; Ryley, 1996); dificultades encontradas para el apropiado empaquetamiento de las vacunas para mantener sus propiedades inmunogénicas; carencia de adyuvantes potentes y adecuados, necesarios para inducir una respuesta con altos títulos de anticuerpos; y la ausencia de un sistema parásito – animal que modele de manera más profunda la situación con humanos, desde el punto de vista de la patogénesis de la enfermedad y la respuesta inmune (revisado por Good, 2001).

La mayoría de las vacunas para varias enfermedades que se han desarrollado hasta ahora, dependen de la presentación completa del antígeno en la forma de organismos muertos o atenuados (Plotkin & Plotkin, 1988). Este método no es posible en malaria ya que el parásito se desarrolla dentro de eritrocitos, es simplemente impráctico y potencialmente inseguro considerar el desarrollo de una vacuna en eritrocitos para una enfermedad de la cual el 40% de la población mundial está potencialmente en riesgo (Good, 2001).

Ya que el nivel de la parasitemia en general es proporcional a la severidad de la enfermedad (Miller et al., 1994), una vacuna debe limitar el desarrollo del parásito, sin embargo se discute que no es necesario inducir una inmunidad estéril (ningún parásito presente en individuos vacunados), esta idea surge de la evidencia de que la mayoría de adultos de áreas endémicas son clínicamente inmunes (no sufren los síntomas, pero tienen parásitos en su sangre aunque en niveles bajos). El desafío para el desarrollo de una vacuna para malaria es menor si no se requiere la inmunidad estéril, pero hasta que no se comprendan adecuadamente los factores inmunológicos que controlan el desarrollo del parásito, es muy pronto para decir qué tipo de inmunidad debe obtenerse. Para ello es necesario conocer y potenciar los mecanismos efectores de la respuesta

inmune, con el propósito de intervenir en la diferenciación y expansión del parásito en el huésped o en el vector (Good, 2001; Bruce-Chwatt, 1988).

El estudio de los mecanismos de respuesta inmune en el humano en condiciones experimentales bien definidas está muy limitado, debido tanto a razones éticas como técnicas, sin embargo, se puede analizar críticamente utilizando modelos experimentales de la enfermedad. En este proyecto se utiliza un modelo murino no letal para estudiar los mecanismos de regulación de la respuesta inmune en malaria; corresponde a la fase eritrocítica, el estado causante de todos los síntomas y patología de malaria (Legorreta-Herrera & Sánchez-Cruz, 1998; Good, 2001).

La malaria es una enfermedad en la que ocurre una activación importante del sistema inmunológico, que se evidencia por un incremento en la expresión del receptor de Interleucina - 2 soluble (IL2-Rs), esta activación está involucrada tanto en la eliminación del parásito como en la patología (Riley et al., 1993). Se ha descrito una correlación entre los niveles elevados de IL2-Rs y una disminución de la proliferación de linfocitos, lo que sugiere que las células se podrían estar eliminando de la circulación (Deloron et al., 1989; Jakobsen et al., 1994). Asimismo, se han descrito cambios en diferentes parámetros de la función inmune inducidos por la infección con *Plasmodium falciparum*, estos parámetros incluyen un número reducido de linfocitos T circulantes (Wells et al., 1979; Wyler, 1976) y una disminución de la respuesta proliferativa de linfocitos mononucleares de sangre periférica para antígenos de malaria (Riley et al., 1993; Theander et al., 1986). Toda esta evidencia sugiere que los linfocitos pueden estar sufriendo apoptosis en alto grado.

La apoptosis, una forma de muerte celular programada, juega un papel crucial en la remoción de células dañadas o no requeridas, durante el desarrollo, homeostasis de tejidos, senescencia de organismos multicelulares y selección de repertorio de linfocitos (Vaux & Strasser, 1996). Además la apoptosis se ha reconocido como un importante

mecanismo de defensa contra patógenos virales, bacteriales y parasíticos, actuando tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa (Williams, 1994; Liles, 1997).

A pesar de las complejas interacciones de los parásitos con sus hospederos, se han realizado considerables progresos para entender cómo ciertos parásitos de interés médico interfieren con la apoptosis. Se ha descrito que una variedad de parásitos inducen apoptosis sobre subtipos celulares específicos; *Cryptosporidium parvum* sobre células epiteliales biliares e intestinales, *Leishmania donovani* sobre células T CD4+, *L. braziliensis* sobre células T CD4+ y CD8+, *Toxoplasma gondii* sobre células T y macrófagos, así como *Trypanosoma cruzi* (revisado por Lüder et al., 2001).

Respecto a la infección con *Plasmodium* se ha identificado a los linfocitos como blanco de inducción de apoptosis. Linfocitos B, T CD4+ y T CD8+ en sangre periférica de individuos infectados, muestran un porcentaje mayor de apoptosis que individuos sanos (Toure-Balde et al., 1996); en murinos se ha descrito un fuerte incremento en el porcentaje de apoptosis de linfocitos T y B en bazo durante la infección con *P. chabaudi* (Helmby et al., 2000; Sánchez-Torres et al., 2001), sin embargo existe una polémica frente a la subpoblación más afectada.

Pese a los hallazgos sobre la expresión de apoptosis en bazo debida a una variedad de patógenos (Lüder et al., 2001), no se conocen los mecanismos que la desencadenan. Una posibilidad es que en malaria el óxido nítrico (NO) participe como uno de estos mecanismos, puesto que el pico de su concentración en suero se presenta en los días en que el porcentaje de apoptosis es máximo en bazo, y correlaciona con la máxima parasitemia en sangre (Taylor-Robinson et al., 1996).

El NO es un radical libre simple e inestable bajo condiciones aerobias, producido fisiológicamente por la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS), la NOS tipo 2 o inducible (iNOS) es la isoforma fundamentalmente implicada en la respuesta inmune (Beckman,

1996); el NO es considerado como un mensajero molecular de corta vida con función vasodilatadora y puede actuar también como agente tumoricida y bactericida, sin embargo, el exceso en la producción de NO puede causar diversas alteraciones como choque séptico (Stuehr & Marletta, 1985), enfermedades autoinmunes (Farrel et al., 1992) o diabetes mellitus (Corbett & Mc Daniel, 1992); en estos casos es frecuente encontrar apoptosis mediada por NO (Dimmeler & Zeiher, 1997). Además, se ha demostrado que esta molécula inhibe la respuesta proliferativa de linfocitos *in vitro* a través de un mecanismo dependiente de caspasas (Mahidhara et al., 2003).

En este proyecto se estudia el papel del NO en la regulación de la respuesta inmune celular durante la infección con *Plasmodium* en un modelo experimental de malaria murina, en particular, su participación en la apoptosis observada en la infección por *P. c. chabaudi*. Para ello, inhibimos e inducimos la producción de NO usando aminoguanidina y LPS respectivamente, en ratones infectados, y evaluamos la apoptosis en células de bazo utilizando el método de Merocianina 540 (MC 540). Se ha demostrado que esta sonda es un indicador eficaz de apoptosis capaz de detectarla con la misma eficiencia que el método de marcaje de DNA con yoduro de propidio o el de Anexina V (Frey, 1997; Laakko et al, 2002). Cuando la célula se encuentra en apoptosis, sufre modificaciones en la estructura de membrana que hace a la MC 540 más fluorescente, lo cual permite diferenciar células en apoptosis por citometría de flujo (Schelegel et al., 1993). Utilizando doble marcaje con anticuerpos contra marcadores de fenotipo celular conjugados con FITC, simultáneamente evaluamos el porcentaje en apoptosis de los linfocitos T CD4, T CD8 y B.

Adicionalmente evaluamos el efecto de la modificación de la concentración de NO sobre la expresión de citocinas de la respuesta Th1 / Th2 como son IFN γ , TNF α , IL-4 e IL-10 en células de bazo, medido por RT-PCR semicuantitativo que permite comparar la expresión del RNA mensajero para el gen frente a la expresión del gen constitutivo β -actina.

3. MARCO TEORICO

3.1 ASPECTOS GENERALES DE MALARIA

Malaria (mal aire), fiebre de los pantanos o paludismo, es una parasitosis que se caracteriza por episodios febriles típicos de acuerdo a la especie de *Plasmodium* infectante, precedidos por escalofrío intenso terminando con diaforesis, además de presentarse hepatoesplenomegalia (Tay et al., 1995). Existen cuatro especies de *Plasmodium* que infectan al hombre: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malarie*; otras especies del mismo género también afectan a otros vertebrados (Greenwood, 1997).

3.1.1 Ciclo biológico de *Plasmodium* spp.

La infección comienza a través de la picadura de un mosquito hembra del género *Anopheles*, infectado con *Plasmodium* (figura 1); el mosquito inocula esporozoitos, la forma infectiva del parásito, en el torrente sanguíneo del hospedero y son liberados de la circulación a las dos horas, invadiendo el parénquima hepático; en este momento se inicia el ciclo exoeritrocítico, donde las células hepáticas infectadas se observan multinucleadas, generándose dentro un esquizonte constituido por múltiples merozoitos. Luego de 10 días sufren ruptura, descargando cada una 20,000 merozoitos aproximadamente, los cuales invaden de nuevo células hepáticas o bien eritrocitos, dando lugar al ciclo eritrocítico (Cohen, 1984; Tay et al., 1995).

Al invadir el eritrocito, el merozoito crece, se redondea y le surge una gran vacuola, por lo que el citoplasma y el gránulo de cromatina dan la apariencia de un anillo de sello cuando se realiza tinción con Giemsa; a este estadio se denomina trofozoito joven, el cual al sintetizar proteasas degrada la hemoglobina en aminoácidos para obtener

nutrientes y desarrollarse en trofozoito maduro, para lo cual tarda de 15 a 18 horas y se caracteriza por presentar un citoplasma voluminoso con pseudópodos grandes. El esquizonte es la fase posterior al trofozoito, donde la cromatina se fragmenta, presentándose los merozoitos eritrocíticos. Cuando el esquizonte madura, el eritrocito se rompe y los merozoitos se liberan para invadir eritrocitos no infectados (Good & Doolan, 1999).

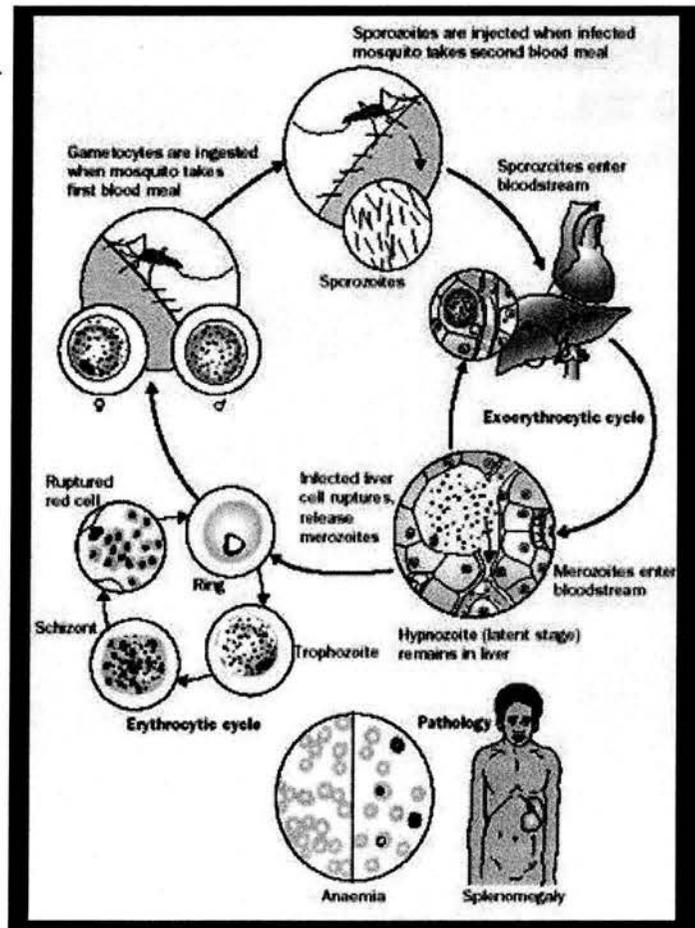


Figura 1. Ciclo de vida de *Plasmodium* (como ejemplo *P. falciparum*). Tomado de Malaguarnera & Musumeci (2002).

Algunos merozoitos haploides se desarrollan en macro o microgametocitos dentro de los eritrocitos, los cuales sufren gametogénesis en el intestino del mosquito cuando son ingeridos por éste; la fusión de gametos produce un cigoto diploide que sufre meiosis y

se diferencia en un oocineto móvil. El oocineto se adelgaza y gracias a su movilidad atraviesa el epitelio del intestino, llegando a la capa serosa donde se convierte en ooquiste. En el ooquiste se forman miles de esporozoitos, los cuales quedan libres al romperse la pared del mismo y emigran hacia las glándulas salivales del mosquito para continuar el ciclo cuando son inoculados al vertebrado (Tay et al., 1995; Ramasamy, 1998; Good & Doolan, 1999).

3.1.2 Incidencia de malaria en el mundo

La malaria sigue siendo uno de los principales problemas de salud pública en el mundo, es la principal causa de morbilidad y mortalidad en muchas de las áreas densamente pobladas del mundo, su prevalencia va en aumento debido a que las medidas tomadas para su control no han sido totalmente efectivas por la resistencia que el vector presenta a los insecticidas utilizados, así como también a los mecanismos de resistencia que han desarrollado los parásitos a la quimioterapia utilizada (Greenwood, 1997).

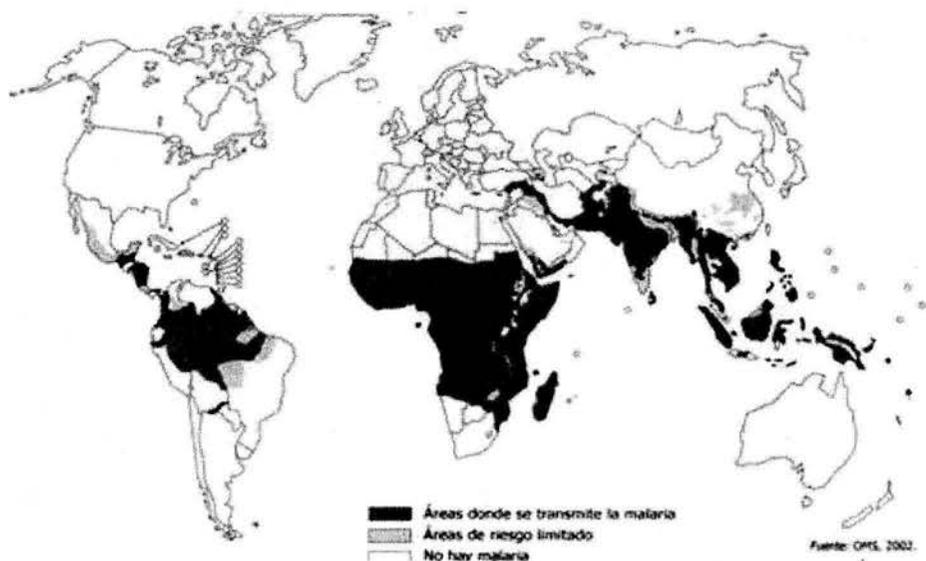


Figura 2. Mapa global de áreas endémicas de malaria. Tomado de Organización Panamericana de la Salud 2002 (www.paho.org).

En la actualidad se calcula que alrededor de 500 millones de personas están expuestas a la malaria endémica en Africa, India, Asia suroriental y América Latina (figura 2), y la Organización Mundial de la Salud estima en 270-300 millones de nuevos casos de malaria cada año (Greenwood, 1997).

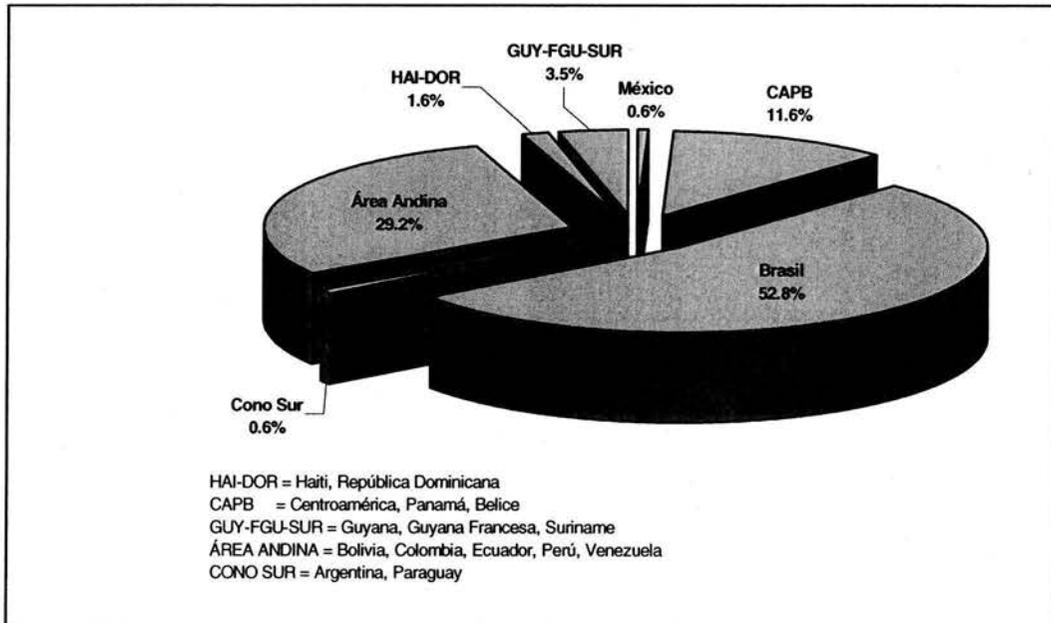


Figura 3. Distribución de casos de malaria en América Latina en el 2000. Tomado de Organización Panamericana de la Salud 2001 (www.paho.org).

Como se observa en la figura 2, existe un alto riesgo de ampliación de las zonas endémicas de malaria en América Latina. Los esfuerzos sanitarios en México lograron disminuir el número de casos de más de 140,000 en 1942, a 30,000 en 1956, sin embargo, en 1985 se alcanzaron cifras similares a las de 1943. Los estados que continúan reportando mayor número de casos son Chiapas, Oaxaca, Sinaloa y Campeche con aproximadamente un 99.5% de *Plasmodium vivax* y el resto de *P. falciparum*; tan solo en Oaxaca se describieron en 1998 más de 10,056 casos. La Organización Panamericana de la Salud (2001) clasificó estas áreas de acuerdo a la intensidad de transmisión, así: a) focos hiperendémicos (la frontera sur con Guatemala, Oaxaca y

Guerrero, y la región noroeste); b) focos hipoendémicos (Nayarit, Sinaloa, Durango, Jalisco y Michoacán). La presencia de malaria es aún más dramática al acercarse a región ecuatorial, Brasil se lleva el 53% de los casos reportados de malaria en el 2000 (figura 3), sin embargo, la enfermedad podría expandirse debido al calentamiento global (Organización Panamericana de la Salud, 2001).

3.1.3 Patogénesis.

La patología que caracteriza la malaria es causada por el estadio eritrocítico (Good, 1992). El paroxismo palúdico es desencadenado por la liberación de metabolitos contenidos en el eritrocito parasitado cuando ocurre su lisis; estos metabolitos se han identificado como proteínas libres, termoestables y solubles denominadas toxinas de malaria, las cuales estimulan la producción de Factor de Necrosis Tumoral Alfa ($TNF\alpha$) por células T y macrófagos. Las partes activas de estas toxinas se han caracterizado como moléculas tipo fosfatidilinositol-glicosiladas. El $TNF\alpha$ a su vez induce la liberación de IL-1, pirógeno endógeno proveniente de macrófagos y fibroblastos (Tay et al., 1995; Rudin et al., 1997; Ramasamy, 1998).

El sistema reticuloendotelial encargado de la eliminación por perlas de filtración reticular (Weiss, 1990) se activa por la ruptura de los eritrocitos infectados y la liberación intravascular de los parásitos, pigmento palúdico (hemozoina, producto de degradación de la hemoglobina) y desechos celulares. El hígado y el bazo se encargan principalmente de la eliminación de estas partículas, pero sufren hiperplasia de las células de Kupffer y macrófagos. Los macrófagos fijos del hígado y bazo fagocitan eritrocitos infectados e inclusive normales, y muestran el pigmento palúdico ingerido. En infecciones crónicas o repetidas, algunos órganos, especialmente el hígado y el bazo, adquieren una tonalidad grisácea debido a la acumulación de hemozoina (Brown & Neva, 1985). Un estudio realizado en un modelo murino revela que la hemozoina en

bazo persiste aún después de la eliminación del parásito, debido quizá a que migra de otros tejidos hasta este órgano, aunado a que los ratones mantengan parasitemias bajas y que más tarde estos parásitos contribuyan a la concentración de hemozoina encontrada (Levesque et al., 1999).

Sin duda el mecanismo patogénico más importante en malaria por *P. falciparum*, que a veces suele observarse con *P. vivax* y *P. malarie*, es la gran adhesividad que muestran los eritrocitos parasitados entre sí y con el endotelio vascular, esta complicación es característica en malaria cerebral donde se observa obstrucción de venas y capilares cerebrales con trofozoitos y esquizontes (Clark & Schofield, 2000). Entre las moléculas de superficie del endotelio que regulan esta citoadherencia están la trombospondinglicoproteína derivada de plaquetas, ICAM-1, CD36, selectina E, VCAM-1 y la condroitin sulfato A. La citoadherencia es considerada como un mecanismo desarrollado por el parásito para evitar la circulación de trofozoitos y esquizontes a través de las perlas de circulación reticular del bazo, donde pueden ser atrapados y destruidos por acción combinada de células T y fagocitos (Ramamamy, 1998; Malaguarnera & Musumeci, 2002).

La anemia en malaria es multifactorial, involucra la destrucción y la producción disminuida de eritrocitos. La destrucción se ve favorecida por la multiplicación intraeritrocítica de merozoitos, lo cual a su vez estimula la fagocitosis de eritrocitos parasitados y no parasitados debido a la unión de componentes del parásito en su superficie. La esplenomegalia también contribuye a la destrucción de eritrocitos a través del mecanismo de filtración. La producción de eritrocitos se ve afectada por la supresión de la síntesis de eritropoyetina, desbalance de citocinas, favoreciendo citocinas proinflamatorias y decremento en la eritropoyesis causado por TNF α que inhibe la diferenciación de células progenitoras eritroides (Rudin et al., 1997; Menéndez et al., 2000).

3.1.4 Modelos de investigación en malaria

Para obtener un conocimiento más profundo de la inmunidad protectora *in vivo*, se han desarrollado varios sistemas de modelos murinos con parásitos aislados de roedores africanos. Estos ofrecen la ventaja de un mantenimiento fácil y económico, comparado con el modelo de primates, además el sistema inmune del ratón está bastante bien caracterizado y pueden ser realizados estudios de intervención y disección a gran escala, no permisibles en humanos o practicables en simios (Taylor-Robinson, 1995).

Especies de *Plasmodium* como *P. berghei* y *P. vinckei*, y algunas cepas de *P. yoelii* y *P. chabaudi*, causan infecciones letales en ratones; mientras otros como *P. yoelii*, *P. chabaudi adami*, *P. chabaudi chabaudi* y *P. vinckei petteri*, causan infecciones que se resuelven luego de una parasitemia inicial por la mayoría de las cepas de ratón, con recrudescencias (*P. chabaudi chabaudi* y *P. vinckei petteri*) o eliminadas completamente (*P. yoelii*, *P. chabaudi adami*) (Revisado por Cox, 1988). Para *P. c. chabaudi* se ha demostrado que el acervo genético del hospedero interviene de manera importante en la predisposición a la infección, resultando en un curso de infección letal o no letal dependiendo de la cepa de ratón (Taylor-Robinson, 1995).

Los modelos no letales se usan para investigar el mecanismo de inmunidad adquirida; muchos grupos han utilizado la cepa de *P. c. chabaudi* AS en ratones, como un modelo animal de la infección por *P. falciparum*. *P. c. chabaudi* es similar a *P. falciparum* en que usualmente infecta eritrocitos maduros (normocitos), sufriendo un secuestro parcial (en el hígado y no en el cerebro); y en cepas de ratones resistentes (BALBc, C57/BL y NIH), la recuperación de la parasitemia aguda es seguida por una o más recrudescencias (Gilks et al., 1990).

La especie *P. chabaudi* fue aislada de la sangre de una rata de matorral en la República de África Central por I. Landau y A. Chabaud en 1965. Dos subespecies han sido

definidas, *P. chabaudi chabaudi* y *P. chabaudi adami*. El parásito fácilmente se desarrolla en ratones y ratas de laboratorio, en los que ha mostrado preferencia por los normocitos. Las infecciones son sincrónicas con una periodicidad de 24 horas. El parásito se puede transmitir en laboratorio por mosquitos de la especie *A. stephensi* o por inoculación intravenosa de eritrocitos infectados (Cox, 1988).

3.2 LA RESPUESTA INMUNE CELULAR EN MALARIA

La inmunidad a malaria se genera bajo condiciones naturales de forma muy lenta, requiere múltiples infecciones, toma años desarrollarla y puede no ser absoluta ya que la parasitemia persiste en ausencia de enfermedad clínica, lo que se traduce como una fuente potencial de transmisión (Legorreta-Herrera et al., 1994). No se conoce con certeza como el parásito constituye relaciones estables con sus hospederos ni como la respuesta protectora elimina al parásito de los tejidos o previene su crecimiento descontrolado (Good & Doolan, 1999). Además, esta inmunidad requiere una continua exposición al parásito y puede generar fenómenos de inmunosupresión y de autoinmunidad. Este particular estado de inmunidad, refleja la compleja interacción entre el parásito y el hospedero en la cual la biodiversidad (genotípica y fenotípica del parásito) y los mecanismos que regulan la respuesta inmune del hospedero son de singular importancia (Taylor-Robinson, 1995).

La adquisición y mantenimiento de la inmunidad protectora contra malaria depende de los linfocitos T. Estos desempeñan una función primordial en la producción de anticuerpos y en el establecimiento de una respuesta inmune celular contra el plasmodio (Fossati et al., 1990; Legorreta-Herrera & Sánchez-Cruz, 1998). La infección por el *Plasmodium* es capaz de estimular a los linfocitos T CD4+ y CD8+, células NK y macrófagos. Es necesaria la participación de los linfocitos T CD4+ en el establecimiento de la inmunidad protectora contra el estadio eritrocítico asexual del parásito. Los linfocitos T CD8+ son importantes en

la fase hepática de la infección, mientras que los macrófagos y las células NK desempeñan un papel central en el inicio de la infección (Smith et al., 1998).

3.2.1 Participación de los linfocitos T CD4+ $\alpha\beta$.

En la inmunidad contra malaria están involucrados factores humorales y celulares. Los mecanismos que proporcionan mayor protección inmune para los estados sanguíneos de la malaria aguda están mediados por los linfocitos T CD4⁺.

La importancia de las células T CD4⁺ en la resolución de la infección por estados sanguíneos de *Plasmodium chabaudi* AS se ha establecido con base en la incapacidad para eliminar y resolver la infección de los ratones desnudos, de los ratones SCID (inmunodeficiencia severa combinada) y de los ratones a los que se les destruyeron sus linfocitos T CD4⁺ con el empleo de anticuerpos monoclonales anti-CD4. Además, la transferencia adoptiva de células T inmunes o de clonas de linfocitos T confiere protección contra diversos plasmodios murinos, incluyendo a *Plasmodium chabaudi*. (Cavacini et al., 1986; Favila-Castillo et al., 1990).

Las células T CD4⁺ pueden dividirse en dos subpoblaciones mayores, Th1 y Th2, con base en el patrón de citocinas secretadas posterior a la estimulación (Taylor-Robinson et al., 1993; Janeway et al., 1999); los distintos perfiles de citocinas que se expresan indican su función. Las células Th1 producen IL-2, Interferón Gamma (IFN- γ) y Factor de Necrosis Tumoral Beta (TNF- β), a través de estas moléculas se activan los macrófagos. Las células Th2 producen: IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, lo que proporciona cooperación con las células B productoras de anticuerpo. Por lo tanto, las células Th1 y Th2 median cualitativamente distintas respuestas inmunes (Troye-Blomberg, 1994; Janeway et al., 1999). Una de las características de la infección con *P. c. chabaudi* es que los ratones responden con células T CD4⁺ de ambos tipos Th1 y Th2. La contribución de estas dos subpoblaciones cambia durante el curso de la infección; las

células Th1 predominan durante la fase aguda, y las células Th2 durante la fase tardía de la infección. (Langhorne et al., 1989; Taylor-Robinson & Phillips, 1994).

Se desconocen los factores que regulan la diferenciación de las células precursoras Th0 al fenotipo Th1 o al Th2 posterior a la activación, y por lo tanto el control secuencial que aparece durante la infección de *P. c. chabaudi* no está comprendido claramente. Estos factores probablemente incluyen secreción de citocinas, la naturaleza de las células presentadoras de antígeno y el procesamiento del antígeno para la presentación a las células T (Taylor-Robinson y Phillips, 1994).

3.2.2 Participación de los linfocitos T CD8+.

En la malaria murina los linfocitos T CD8+ citotóxicos tienen una función importante en el control de la infección de células hepáticas. Sin embargo, se ha cuestionado su participación en la fase eritrocítica de la infección, dado que los eritrocitos no tienen la capacidad de procesar antígenos del parásito para que sean reconocidos por las células T CD8+. No obstante existen evidencias de su participación para eliminar al parásito durante la etapa final de la infección evitando la cronicidad de la parasitemia (White et al., 1996).

En la infección en humanos los linfocitos T CD8+ no tienen actividad citotóxica contra las células hepáticas infectadas por el plasmodio; sin embargo, se considera que esta subpoblación celular participa en el control de la enfermedad, regulando la respuesta inmune debido a la producción de citocinas (Fell et al., 1994).

3.2.3 Participación de los linfocitos T $\gamma\delta$.

Existe otra población de linfocitos que rearreglan las cadenas $\gamma\delta$ de su receptor. Estos linfocitos se incrementan hasta 40 veces o más en la sangre de individuos con infección

aguda por *P. falciparum*, además, dicha elevación se mantiene por varias semanas durante la convalecencia (Langhorne et al., 1992). Este incremento sugiere la participación de estas células en el control de la infección. En experimentos utilizando ratones que carecen de dicha subpoblación celular, se han descrito resultados contradictorios. Los ratones infectados con *P. c. adami* requieren a la población $\gamma\delta$ para controlar la infección (van der Heide et al., 1995). Además, las células T $\gamma\delta$ evitan el desarrollo de *P. yoelii* en el hígado de ratones sin células T $\alpha\beta$ (Tsuji, 1994), mientras que en los ratones infectados con *P. chabaudi chabaudi*, las células $\gamma\delta$ parecieran no tener alguna función importante (Langhorne et al., 1992; Sayles & Rakhmievich, 1996). Es probable que la participación de estas células dependa específicamente de la especie de parásito. Por otro lado, los ratones que carecen de los linfocitos T $\alpha\beta$ (CD4+ y CD8+) no controlan la infección y mueren rápidamente (Sayles & Rakhmievich, 1996).

Las células $\gamma\delta$ pueden influenciar la naturaleza de la respuesta de las células CD4+ durante la infección con *Plasmodium* puesto que en su ausencia es mas pronunciada la respuesta tipo Th2, aumenta la producción de IL-4 y la cooperación para la formación de anticuerpos específicos a malaria es mas eficiente. Esta alteración en las células CD4+ se refleja en un incremento mayor y más rápido en los niveles de anticuerpos tipo IgG1 e IgG3 (Seixas et al., 2002).

3.2.4 Participación de los linfocitos B.

Los linfocitos B son las células que producen los anticuerpos. En el caso de la infección con *Plasmodium*, el papel protector de los anticuerpos se ha demostrado por experimentos de transferencia pasiva con suero inmune, proveniente de animales con un título alto de anticuerpos IgG. Este suero es específico de especie y cepa de plasmodio (Jarra & Brown, 1985). La recuperación de la primer parasitemia aguda esta acompañada por la producción

de anticuerpos de tipo IgM e IgG2a, los cuales alcanzan los títulos máximos 1 ó 2 días después del pico de la parasitemia (Taylor-Robinson & Phillips, 1994).

El tratamiento a los ratones con el anticuerpo anti- μ elimina totalmente a los linfocitos B. La eliminación de las células B de los ratones NIH permite que puedan reducir la primer parasitemia aguda, sin embargo, desarrollan una parasitemia crónica, lo que sugiere que las células B no se necesitan en el control de la fase aguda de la infección pero son necesarias para la eliminación final del parásito (Langhorne et al., 1998).

3.2.5 Participación de los macrófagos y células NK.

Los macrófagos junto con las células NK funcionan como una primera línea de defensa contra la infección por *Plasmodium*. Ambos tipos de células son los responsables de la secreción inicial de citocinas. Los macrófagos producen IL-12 que activa a las células NK, fuente inicial de IFN- γ y TNF- α , ambas citocinas junto con la IL-12, favorecen el establecimiento de la respuesta inmune celular. Las células NK a través de la secreción de citocinas y no por su actividad citolítica, tienen una participación importante sirviendo de puente entre los mecanismos de resistencia innata y la inmunidad adaptativa durante el estadio eritrocítico de la infección (Mohan et al., 1997; Stevenson et al., 1989); aunque existe nueva evidencia que señala su participación a través de actividad citolítica mediada por Fas y GrB (Mavoungou et al., 2003).

El hospedero responde inespecíficamente a la infección por incremento del número de monocitos en sangre periférica y por acumulación de macrófagos en el bazo y el hígado. Los macrófagos ayudan al control de la infección a través de fagocitosis de eritrocitos parasitados, secreción de citocinas (IL-12, IL-1 y TNF- α), metabolitos reactivos de oxígeno y óxido nítrico. Aunque los macrófagos no pueden evitar el incremento de la parasitemia durante la fase inicial de la infección, durante la fase de crisis tienen una participación

fundamental en la eliminación de eritrocitos parasitados (Stevenson et al., 1989; Smith et al., 2002; Jaramillo et al., 2003).

3.2.6 Las células dendríticas en malaria.

Las células dendríticas (DC) son importantes en la orquestación de varias formas de inmunidad y tolerancia. Su papel inmunoregulatorio recae en la unión a receptores específicos que inician y modulan la maduración de las DC, lo que resulta en el desarrollo de subpoblaciones de DC efectoras funcionalmente diferentes, las cuales promueven selectivamente las respuestas de las células T cooperadoras tipo Th1, o reguladores tipo Th2 (Perri et al., 2004; Bruna-Romero et al., 2003). La participación de las células dendríticas en malaria se ha estudiado recientemente y los resultados aún son muy controvertidos.

Por un lado, el paludismo se ha asociado con una respuesta disminuida de células T *in vivo* e *in vitro*. La supresión de las respuestas proliferativas durante la infección con malaria se ha atribuido a los macrófagos. Sin embargo, las células dendríticas han ganado atención en el fenómeno puesto que varios estudios sugieren que la maduración de las células dendríticas se inhibe *in vitro* por la presencia de eritrocitos infectados, además de inhibir la capacidad para iniciar una respuesta inmune invirtiendo el patrón de interleucinas IL-12 / IL-10. La interacción de parásitos sanguíneos con las células dendríticas induce la secreción de factores solubles que inhiben la activación de células T CD8+ *in vitro* y en el estadio hepático *in vivo*. Este mecanismo de evasión podría dejar al hospedero desprotegido contra la reinfección inhibiendo la respuesta inmune contra el estadio hepático inicial de la enfermedad (Ocana-Morgner et al., 2003).

Sin embargo, otros investigadores (Seixas et al., 2001) utilizaron cultivos *in vitro* de células dendríticas con esquizontes de *P. chabaudi* y LPS, el resultado fue un

incremento de moléculas MHC clase II, CD86, pero no de CD80, por lo que concluyeron que los estadios eritrocíticos de *P. chabaudi* son capaces de activar directamente a las células dendríticas; las consecuencias de esta interacción podrían ser la activación rápida de células Th1 y la inducción de inmunidad. Otro hallazgo concordante con éste último es que al examinar las células dendríticas de ratones infectados con malaria, encontraron que expresaban moléculas coestimuladoras clase II en niveles elevados, lo que activa a los linfocitos T para que produzcan IL-2 de forma tan eficiente como en los ratones no infectados, además de generar IFN γ a través de mecanismos dependientes de IL-12. Esas mismas células dendríticas presentan antígeno a hibridomas de células T específicos para malaria. Este hallazgo demuestra que las células dendríticas participan en la generación de inmunidad antígeno-específica durante la infección (Perry et al., 2004).

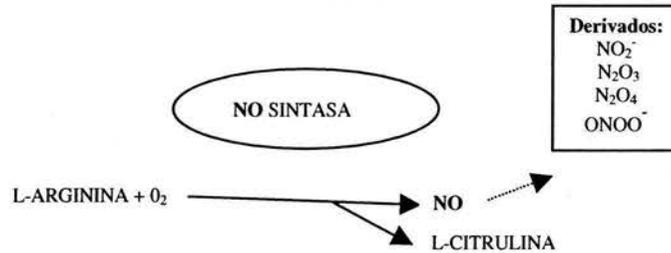
3.3 ÓXIDO NÍTRICO

El monóxido de nitrógeno, más comúnmente llamado óxido nítrico o simplemente NO, es considerado funcionalmente como un radical libre, aunque su estructura electrónica no corresponde a la de estos elementos. Este hecho se debe a sus propiedades y especialmente a los derivados que surgen en su metabolismo, todos ellos con estructura y función de radical libre.

Es una pequeña molécula (30 Da) difusible en líquidos y tejidos corporales, con una vida media muy corta (de pocos segundos a algún minuto), es generada en los tejidos por sintasas específicas del óxido nítrico (NOS) que metabolizan arginina y oxígeno molecular en citrulina y óxido nítrico (figura 4). En presencia de oxígeno molecular y catalizado por la enzima NOS, el nitrógeno guanidino de la arginina sufre una oxidación de cinco electrones para producir el radical libre gaseoso, NO, además de citrulina, en concentraciones equimolares. Para esta reacción es esencial la presencia de los

cofactores NADPH, mononucleótido de flavina, dinucleótido de flavina y adenina, el grupo hemo de la protoporfirina IX, tetrahidrobiopterina (BH4) y dependiendo del tipo de NOS, calmodulina. Aparentemente, las flavinas depositan y donan electrones al grupo hemo, el que cataliza el proceso de oxidación. La BH4 parece ser importante en mantener la enzima en su forma dimérica activa (Moncada & Higgs, 1993).

Figura 4. Reacción de síntesis de NO.



El NO también es considerado como un transmisor químico, el cual puede difundir libremente a través de las membranas. La molécula posee un momento bipolar pequeño debido a la similar electronegatividad entre el oxígeno y el nitrógeno, haciéndola esencialmente hidrofóbica. Su reactividad es debida al electrón desapareado en el último nivel de energía del oxígeno. La reactividad del NO como radical libre es baja comparada con otros radicales del oxígeno; éste se descompone en segundos luego de su síntesis cuando se encuentra en solución ya que reacciona con oxígeno molecular o superóxido (Beckman, 1996).

Inicialmente, el NO se reconoció como un mediador endógeno liberado desde las células endoteliales con efecto en la relajación vascular (Palmer et al., 1987) y como un inhibidor de la agregación plaquetaria y adhesión de los neutrófilos (Kubes et al., 1991). Uno de sus efectos celulares más destacados es la activación de la proteína guanilato ciclasa citoplasmática soluble, esta enzima cataliza la siguiente reacción:



El GMP cíclico es una molécula de señalización similar a cAMP que activa PKGs (proteínas dependientes de cGMP). Otras proteínas blanco son las metaloenzimas, donde el NO se une a regiones Fe-S. Enzimas como la aconitasa y la citocromo oxidasa, son inactivadas por el NO, lo cual genera un efecto inhibitorio sobre la fosforilación oxidativa bloqueando la cadena de transporte de electrones y controlando los niveles de citrato en el ciclo de Krebs; esencialmente bloquea la degradación oxidativa de acetil-CoA (Moncada & Higgs, 1995).

Se han caracterizado tres diferentes isoformas de la enzima NOS de acuerdo al origen celular y características bioquímicas (Tabla 1). Dos enzimas constitutivas (cNOS): una de origen neuronal (nNOS) o tipo 1 y otra endotelial (eNOS) o tipo 3, y una tercera inducible (iNOS) o tipo 2. Las dos primeras son calcio/calmodulina dependientes y la última es independiente de la presencia de este elemento. Estas isoenzimas son codificadas por tres genes diferentes, y por lo tanto tienen características distintas (Forstermann & Kleinert, 1995).

NOS humana	Expresión de RNA y proteína	DNAc (kb)	Tamaño de la proteína	Actividad enzimática
NOS-1, nNOS	Constitutiva	10	1433 aa, 161 kD	Ca ⁺⁺ - dependiente
NOS-2, iNOS	Inducible	4.4	1203 aa, 131 kD	Ca ⁺⁺ - independiente
NOS-3, eNOS	Constitutiva	4.1	1153 aa, 133 kD	Ca ⁺⁺ - dependiente

Tabla 1. Isoformas de la NOS.

La síntesis de NO por las células endoteliales se produce cuando se incrementa el calcio intracelular, éste se une a la proteína calmodulina formando un complejo que se une a su vez a la enzima eNOS. Esta síntesis constitutiva genera pequeñas cantidades de NO el cual participa en procesos fisiológicos celulares junto con el GMPc (Moncada et al.,

1991). Se ha descrito que el estrés y los estrógenos son reguladores de la acción de la eNOS de forma independiente del calcio (Dimmeler et al., 1999).

En las neuronas sucede algo similar, la llegada de un potencial de acción a una neurona activa los canales de calcio en el neurolema permitiendo la entrada de este ión dentro de la célula, su unión a la calmodulina y posteriormente a la nNOS. Aunque la enzima es considerada como constitutiva, en situaciones de lesión nerviosa puede modularse su actividad (Steel et al., 1994).

En contraste a las dos isoformas constitutivas, la iNOS es calcio-independiente. En situación fisiológica la actividad de esta enzima es muy baja o ausente; sin embargo, cuando es inducida genera grandes cantidades de NO de forma mantenida interviniendo en múltiples acciones como infección o inflamación (Moncada et al., 1991). La actividad de iNOS se incrementa en respuesta al lipopolisacárido bacteriano (LPS), IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF- α , factor de crecimiento plaquetario, factor de crecimiento de fibroblasto, agentes estimulantes de la protein-kinasa-C y del AMPc. Existen otros factores que la inhiben como son la IL-4 y la IL-8 entre otros (revisado por Brunet, 2001).

La inhibición de la NOS puede realizarse mediante sustancias que eliminen o contrarresten a la calmodulina, flavoproteínas, grupos hemo y tetrahidrobiopterina; sin embargo, los más usados son los análogos a la L-arginina como son NG-metil-L-arginina (L-NMMA), NG-nitro-L-arginina (L-NNA) y NG-nitro-L-arginina-metilester (L-NAME) que inhiben a las tres isoenzimas con diferente intensidad. Actualmente se busca una inhibición selectiva y se tiene para la nNOS: el 7-nitroindazol, y para la iNOS: la aminoguanidina, L-N6-(1-iminoetil) lisina y derivados de la isotiourea (Hobbs et al., 1999; Ruetten & Thiernemann, 1996).

La mayor parte de las células del organismo son capaces de producir NO en un momento determinado, ya sea de forma constitutiva o a consecuencia de una agresión. Esta multiplicidad de orígenes hace que varíen sus funciones fisiológicas. Por sistemas, a nivel vascular participa en la regulación de la circulación sanguínea, en el control de la presión arterial, inhibe la agregación plaquetaria así como la adhesión de los neutrófilos. En el sistema nervioso central participa en la coordinación entre la actividad neuronal y el débito sanguíneo así como en la modulación del dolor. En el sistema nervioso periférico es un neurotransmisor sináptico no adrenérgico no colinérgico. En las mucosas incrementa la vascularización y la producción de moco, por lo tanto, en la integridad de la misma. En el pulmón su acción varía y en algunos casos es perjudicial, el NO de origen endotelial regula la circulación pulmonar, el neuronal tiene acciones broncodilatadoras y el producido por la iNOS puede provocar asma, bronquiectasia y fibrosis alveolar (Calatayud et al., 2001; Kubes et al., 1991).

En términos generales se ha señalado que a bajas concentraciones el NO es pro-inflamatorio favoreciendo la vasodilatación y el reclutamiento de neutrófilos mientras que a concentraciones elevadas disminuye la capacidad de adhesión celular e induce apoptosis de las células inflamatorias (Ross & Reske-Kuntz, 2001).

En el sistema inmunológico, el NO participa de diversas formas con acciones tan diversas como agente tóxico frente a organismos infecciosos (Hibbs et al., 1987), inductor o supresor de la apoptosis (Krvncke et al., 2001) o inmunorregulador (Wei et al., 1995). Debido a las características del sistema inmunológico cuya capacidad de reacción se prolonga de días a semanas, la producción de NO debe realizarse de forma intensa y continua, y es la isoforma iNOS la que funciona en esta situación (Coleman, 2001).

Muchos tipos de células inflamatorias e inmunes expresan actividad iNOS incluyendo monocitos/macrófagos (Stuehr & Marletta, 1985), células presentadoras de antígenos

(van der Veen, 2001) y células “asesinas” o “natural killer” (células NK) (Cifone et al., 2001). En otros tipos celulares como neutrófilos, mastocitos o linfocitos T se cuestiona su presencia (van der Veen et al., 2001; Forsythe et al., 2001). A nivel experimental el NO de origen macrófagico presentó en cultivo una inhibición de la proliferación de los linfocitos T (van der Veen et al., 2001). Otros estudios en ratones han mostrado que el NO inhibe selectivamente a los linfocitos Th1 y de una manera autocrina promueve la respuesta de los Th2 conduciendo de esta manera a la producción de IgE (Barnes & Liew, 1995). No obstante, estos estudios se han cuestionado por otros autores y en el ser humano se han descrito incluso inhibiciones de ambas estirpes celulares por el NO (Bauer et al., 1997).

Durante las infecciones parasíticas, el NO es una molécula que comúnmente se sintetiza como respuesta del hospedero (figura 5). En el caso de las infecciones por protozoos, los macrófagos se activan con el IFN- γ derivado de células T específicas contra el parásito, y son capaces de destruir parásitos intracelulares a través de la producción de muchos mediadores, principalmente NO (Hibbs et al., 1987). Este incremento en la producción de NO es mediado por la expresión controlada de la iNOS en respuesta a la secreción de citocinas proinflamatorias durante la infección o exposición a agentes antigénicos del parásito (Brunet, 2001). Las citocinas inducidas por el parásito como: IFN- γ , TNF- α , y IL-1 β , y productos del patógeno como glicofosfatidilinosítoles, pueden estimular la expresión de iNOS en hospederos infectados (Almeida et al., 2000; Tachado et al., 1997).

El NO se reconoce como una molécula protectora del hospedero, sin embargo, tiene un lado oscuro, ya que cuando se produce en cantidad excesiva, es citotóxico no solo para el parásito sino también para las propias células del hospedero (Brunet, 2001). Un incremento en el nivel de NO puede inhibir enzimas directamente, y en reacciones con aniones superóxido genera potentes agentes oxidantes como el peroxinitrito. También

puede desaminar las bases del DNA generando mutaciones y rompimiento de la hebra (Brunet, 2001). Esta capacidad le permite intervenir en procesos fisiológicos tan importantes como la apoptosis, en donde se ha vinculado como inductor y como supresor (Krvncke et al., 2001). Por lo tanto, el NO debe requerir de una fuerte regulación para prevenir efectos laterales no deseados de este potente mediador inmunológico.

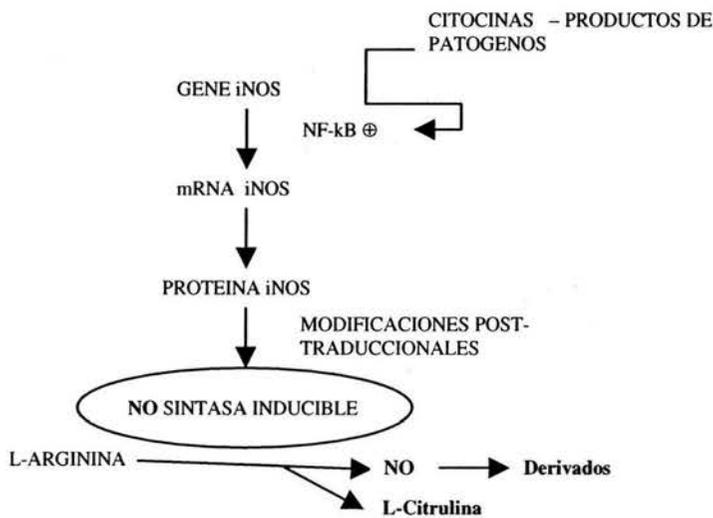


Figura 5. Producción de NO por iNOS en respuesta a las infecciones (adaptado de Brunet, 2001).

3.3.1 El óxido nítrico en malaria.

Los macrófagos activados liberan intermediarios reactivos del nitrógeno tales como el NO (James & Hibbs, 1990) y por lo tanto son candidatos para realizar funciones de muerte del parásito; de hecho, se ha descrito que el NO inhibe el desarrollo de estadios exoeritrocíticos de *P. berghei* (Mellouk et al., 1991) y de *P. yoelii* (Nussler et al., 1991) *in vitro*, además los derivados del NO pueden destruir estadios eritrocíticos de *P. falciparum* (Rockett et al., 1991).

Al cuantificar el nitrato sérico como medida de la producción de NO *in vivo*, se demostró que durante la fase aguda de la parasitemia primaria, se presenta una producción muy marcada de NO alrededor del pico de la parasitemia, diez días después de la infección, el cual tiene un periodo de vida media muy corto, la concentración de NO baja a los niveles de fondo en 24 hrs (Taylor-Robinson et al., 1996). Estudios en ratones deficientes en las vías de activación de iNOS sugieren que el NO contribuye de forma importante pero no es esencial para el control de la fase aguda de la infección con *P. chabaudi* (Favre et al., 1997; Su & Stevenson, 2000) Sin embargo, probablemente la función más importante del NO en la infección con *Plasmodium* no es la de citotoxicidad directa sobre los parásitos, sino la de regulador de la respuesta inmune ya sea por la inducción o supresión de apoptosis en las células T activadas (Ahvazi et al., 1995).

El NO pudiera estar involucrado en el “switch” de una respuesta Th1 a Th2. Se ha asumido que la producción de NO por los macrófagos es indirecta, seguido de la activación por IFN- γ o LT- α , además, el NO pudiera tener una función reguladora sobre las células Th1 e inhibir la secreción de IL-2 e IFN- γ (Yamada et al., 1993; Taylor-Robinson et al., 1994). Sin embargo, el fenómeno contrario también se ha descrito puesto que el NO produce un efecto inhibitor sobre la activación de células T y la producción de citocinas en células Th2 podrían ser mas susceptibles a NO que las células Th1 (Nukaya et al, 1995).

3.4 APOPTOSIS

Existen dos tipos fundamentales de muerte celular, apoptosis y necrosis, las cuales han sido definidas morfológica y químicamente. Apoptosis es una palabra derivada del griego y se refiere a la caída de las hojas de los árboles. El término fue introducido en 1972 por Kerr y colaboradores para definir el fenómeno observado morfológicamente por condensación de la cromatina, fragmentación del DNA en piezas de tamaño

oligonucleosomal, hinchazón y degradación progresiva de la célula. Finalmente los fragmentos celulares dentro de cuerpos apoptóticos rodeados por membrana son ingeridos por células fagocíticas vecinas. Este proceso requiere tiempo para tomar lugar luego del daño inicial. En contraste, la necrosis no presenta ninguno de los cambios morfológicos característicos de la apoptosis y ocurre rápidamente luego del daño inicial (Kiechle & Zhang, 98). Otros autores, incluyendo a Rudolf Virchow en 1858, han hecho una distinción entre necrosis y un tipo fisiológico espontáneo de muerte celular (Geske and Gerschenson, 2001).

En la mayoría de los casos la apoptosis tiene un significado biológico, principalmente una función homeostática en el desarrollo y regulación del crecimiento. La apoptosis en algunas situaciones es un mecanismo protector contra enfermedades puesto que elimina células no requeridas, dañadas, precancerosas o viejas (Arends & Wyllie, 1991). No obstante, la apoptosis también está relacionada con procesos patológicos y enfermedades (Carson y Ribeiro, 1993).

La apoptosis, o muerte celular programada, tiene muchos elementos comunes sin tener en cuenta las últimas vías bioquímicas utilizadas. Primero, un sensor celular detecta la presencia de una señal inductora de muerte, la cual activa una vía de transducción de señales; este proceso inicia la ejecución de las reacciones requeridas para completar el proceso de muerte celular. Segundo, la apoptosis en respuesta a la dosis exhibe una relación bifásica resultando en una respuesta en relación a la dosis en forma de U o de U invertida (Figura 6).

Aunque el mecanismo exacto por el cual la apoptosis es iniciada *in vivo* no es claro aún, se sabe que la respuesta depende del disparo de cascadas de reacciones y es específica del tipo celular estudiado. La transducción de la señal puede ocurrir por dos distintas vías: 1) extrínseca, o mediada por receptor; 2) intrínseca, o mediada por la mitocondria (Figura 7) (revisado por Kiechle & Zhang, 2002).

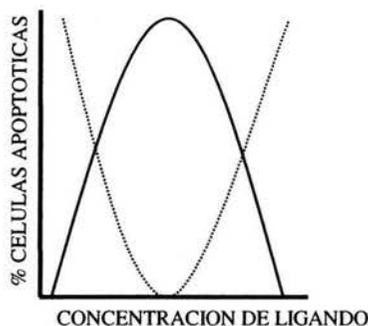


Figura 6. Porcentaje de células apoptóticas vs. concentración de ligando. Se observan dos tipos de respuesta, una tipo campana de Gauss (línea continua) y otra con máximos en los extremos (línea punteada) (Adaptado de Kiechle & Zhang, 2002).

La vía mediada por receptor, o extrínseca, requiere de la unión de un ligando a un receptor de muerte en la superficie celular. Por ejemplo, la molécula FasL/CD95L se une al receptor de muerte Fas/CD95, el cual recluta dos moléculas transductoras de la señal: TRADD (TNF R 1- Associated Death Domain protein) y FADD (Fas-Associated protein with Death Domain). Este complejo denominado DISC luego se une a procaspasa 8 para activar caspasa 8, la cual inicia una cascada de proteasas que generan la apoptosis (revisado por Kiechle & Zhang, 2002).

La vía intrínseca es mediada por la liberación mitocondrial de citocromo c (Kiechle & Zhang, 98). Esta vía puede ser activada si el DNA dañado no es percibido y reparado por los genes de control. El inicio de la apoptosis puede ocurrir inmediatamente o de manera retardada luego del daño en el DNA. La respuesta puede o no ser dependiente de la presencia del factor de transcripción nuclear, p53, la cual es activada por fosforilación en Ser-46 por la proteína cinasa-2 de interacción con homodominios. Los genes inducidos por p53 incluyen Bax, una proteína homóloga de Bcl-2 (familia de proteínas pro- y anti-apoptóticas), que puede oligomerizar y formar poros en la membrana mitocondrial externa, resultando en un decremento del potencial mitocondrial interno o en apertura del canal de aniones dependiente de voltaje liberando el citocromo c del espacio

intermembranal. Ya en el citosol, el citocromo c induce la formación del apoptosoma, compuesto de factor 1 de activación de proteasas apoptóticas, Apaf-1, procaspasa 9, ATP y dATP. Posteriormente la caspasa 3 es reclutada y activada para luego mediar la cascada apoptótica (revisado por Kiechle & Zhang, 2002; Hengartner, 2000).

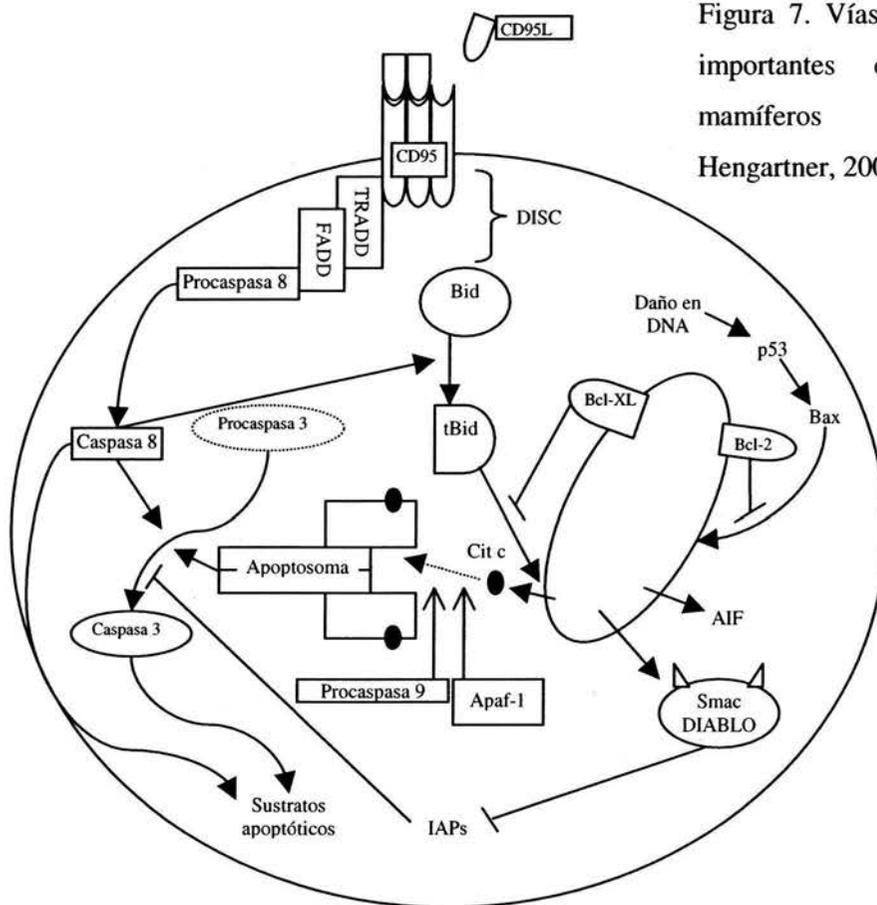


Figura 7. Vías apoptóticas más importantes en células de mamíferos (adaptado de Hengartner, 2000).

La vía extrínseca también puede utilizar liberación de citocromo c. En algunas situaciones la caspasa 8 puede romper a Bid, un subgrupo de la familia Bcl-2, a una forma truncada tBid, la cual se une a Bak, otra proteína relacionada con Bax, para liberar el citocromo c. La liberación del citocromo c de la mitocondria ocurre luego de un decremento en el potencial transmembranal. Otros contenidos mitocondriales también

son liberados, incluyendo Smac/DIABLO (un inhibidor de inhibidores de caspasa 3) y factor de inducción de apoptosis AIF (Zimmerman et al., 2002).

Luego es detectada la activación de la caspasa 3 siguiendo la formación del apoptosoma; tanto la activación de la caspasa 3 como su actividad es antagonica a las proteínas IAP, que a su vez puede ser inhibida por Smac/DIABLO. Este paso es continuado por la traslocación de la fosfatidilserina desde la cara interna de la membrana plasmática hasta la externa; este arreglo es detectado por citometría de flujo usando anexina V la cual se une a la fosfatidilserina expuesta. La traslocación facilita el reconocimiento de las células apoptóticas por los macrófagos (Hanayama et al., 2002).

Finalmente es iniciada la fragmentación del DNA en fragmentos de entre 180-200 pares de bases por la desoxirribonucleasa activada por la caspasa 3, la cual remueve su inhibidor (revisado por Kiechle & Zhang, 2002).

3.4.1 Apoptosis en el sistema inmune.

La apoptosis juega un papel importante en la delección clonal de las células T en el desarrollo y la eliminación de células T activadas en la periferia (Gravestain & Borst, 1998). La apoptosis de células T se caracteriza por la expresión de moléculas asociadas con muerte celular como FasL y TNF, y sus correspondientes receptores (Wallach et al., 1999). Probablemente la exposición a una activación persistente pudiera llevar a una disfunción inmune y a la pérdida de la capacidad para responder a un antígeno (anergia) o inducción de un programa anormal de muerte celular (Ameisen y Capron, 1991; Groux et al, 1992).

La activación del receptor de Fas en las células del sistema inmune y otros diversos tejidos, resulta en muerte celular (Nagata et al., 1999). Fas-R es una proteína membranal

tipo I, cuenta con un dominio de muerte (DD) en la región citoplásmica, a través del cual se une a FADD (Chinnaiyan et al., 1995). A su vez, FADD activa la cascada de caspasas, generándose múltiples reacciones proteolíticas características de la apoptosis (Gravestain & Borst, 1998; Nagata et al., 1999; Wallach et al., 1999). También se ha demostrado que Fas-R induce apoptosis a través de una vía independiente de Fas, activando la vía de la proteína cinasa Jun N-terminal a través de DAXX (Yang et al., 1997). Fas también actúa de manera sinérgica con el receptor de señalización de células T en la inducción de apoptosis (Wong et al., 1997). El papel de Fas *in vivo* ha sido documentado a través de la caracterización de ratones deficientes en Fas (Adachi et al., 1995; Cohen & Eisenberg, 1991; Cohen & Duke, 1992); estos ratones exhiben linfadenopatía, esplenomegalia y linfocitosis en tejidos del sistema inmune, también infiltración de linfocitos en tejidos de pulmón e hígado. Aunque ha sido bien documentado el mecanismo y significado fisiológico de la apoptosis mediada por Fas, comparativamente es poco lo que se conoce sobre la regulación de la expresión génica de Fas (Jaerang et al., 2001).

Adicionalmente, la apoptosis se ha reconocido como un importante mecanismo de defensa contra diversos parásitos desde virus hasta nemátodos, durante la inmunidad innata y adaptativa (Williams, 1994; Liles, 1997) ya que en algunos casos el sacrificio de células del hospedero infectadas puede facilitar la sobrevivencia del organismo disminuyendo la producción de parásitos viables. Evidencia reciente también señala que la apoptosis en distintas poblaciones celulares específicamente contribuye a la regulación de la respuesta inmune inducida por patógenos, sin embargo algunos virus, bacterias y protozoos exhiben una variedad de estrategias para modular la apoptosis de células de hospedero (Lüder et al., 2001) inhibiendo o modulando la respuesta inmune del hospedero, o facilitando la sobrevivencia intracelular del parásito.

3.4.2 Apoptosis en malaria.

Existen varios fenómenos en malaria en los cuales podría estar involucrada la apoptosis de células linfoides. Por un lado se ha descrito una intensa proliferación de linfocitos junto con esplenomegalia severa (Freeman & Parish, 1978; Jayawardena et al., 1975), eventos que se disipan cuando la parasitemia es controlada. En ambos casos la apoptosis podría ser parte de un mecanismo normal para reducir el número de células linfoides y como consecuencia, el tamaño del bazo. Por otro lado, la inmunosupresión generalizada que se ha descrito en humanos, diferentes modelos murinos y otros modelos animales donde la infección es crónica, también podría ser consecuencia de apoptosis de linfocitos.

En las zonas endémicas los individuos infectados con malaria, muestran un mayor porcentaje de células que sufren apoptosis espontánea que en los controles sanos de la misma edad y sexo; además, las infecciones agudas y crónicas asintomáticas con *P. falciparum* se asociaron con un marcado incremento en la apoptosis de células T CD4+, células TCD8+, y linfocitos B, este proceso podría estar implicado en las alteraciones de las respuestas proliferativas de las células T en las regiones donde la malaria es endémica (Toure-Balde et al., 1996; Baldé et al., 1995).

La apoptosis asociada a malaria se ha estudiado en el modelo con *P. c. chabaudi* AS en ratones. Helmby y colaboradores (2000) encontraron significativamente incrementadas las frecuencias y el número absoluto de células apoptóticas en bazo de ratones BALB/c infectados, e incluyeron células T, B y macrófagos, presentándose las células B como las más afectadas. Estos datos contrastan con el trabajo de Sánchez-Torres y colaboradores (2001) quienes encuentran a las células T CD4+ como el fenotipo más influenciado por la apoptosis en bazo de ratones tanto BALB/c como CB6F1. Las diferencias encontradas pueden ser atribuidas al método utilizado para seleccionar a los subtipos celulares; en el primer estudio se marcaron las células de bazo usando Anexina V conjugada con FITC

junto con anticuerpos conjugados con PE, de esta forma determinaron el porcentaje de células CD4+, CD8+ o B220+, de las células apoptóticas. En el segundo estudio purificaron una particular subpoblación de linfocitos y luego determinaron el porcentaje de células apoptóticas dentro de la subpoblación purificada.

Adicionalmente la apoptosis observada se relacionó con la expresión de Fas y FasL, sin embargo experimentos realizados con ratones deficientes en Fas muestran que no solo Fas estaría implicado, ya que estos ratones exhiben un decremento parcial del porcentaje de apoptosis de ratones control, por lo que se ha sugerido que otros mecanismos podrían estar involucrados, como TNF α , NO o especies reactivas del oxígeno (Helmby et al., 2000), todos presentes en alta concentración en el bazo de ratones infectados con *P. chabaudi* durante la infección aguda.

3.5 ASOCIACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO Y APOPTOSIS

Si bien el NO regula la respuesta inflamatoria y actúa como una molécula efectora de la citotoxicidad del macrófago en contra de los parásitos invasores, al mismo tiempo es citotóxico en concentraciones elevadas (Brunet, 2001). Se piensa que el NO contribuye a la patogénesis durante la infección generada por *P. falciparum* con efectos tóxicos y disruptivos (Jeffrey & Snyder, 1995; Malaguarnera & Musumeci, 2002).

Se han descrito efectos contradictorios en la regulación de la apoptosis mediada por NO, ya que se han demostrado efectos tanto pro- como anti-apoptóticos. Los efectos proapoptóticos probablemente están asociados con condiciones patofisiológicas, en donde la enzima iNOS, produce una gran cantidad de NO, el cual generaría daño celular evocando apoptosis intrínseca, o estaría regulando la expresión de receptores de muerte. Por el contrario, el NO se ha asociado con la inducción de HSP70 antiapoptóticas, con

modulación de los sistemas antioxidantes intracelulares y con la regulación de múltiples procaspasas (revisado por Kiechle & Zhang, 2002).

Existen diversos sistemas en los que se ha descrito la asociación de la apoptosis con la producción de óxido nítrico, como en la nefritis que se presenta en el Lupus (Wang et al., 1997); además, la generación masiva de NO endógeno derivado de la sobreexpresión de iNOS, conduce a una marcada apoptosis en las células vasculares del músculo liso (Iwashina et al., 1998). Una evidencia adicional es que el óxido nítrico es capaz de inducir apoptosis en células T de ratón y este fenómeno puede revertirse inhibiendo la síntesis de NO (Fehsel et al., 1995).

El NO posee efectos citotóxicos incluyendo reacciones con proteínas y ácidos nucleicos. En el núcleo el NO puede causar mutación en los genes (Juedes y Wogan, 1996) e inhibición de las enzimas que reparan el DNA, así como provocar rompimientos de la cadena de DNA en ciertos tipos de células incluyendo macrófagos, condrocitos, neuronas e islotes β (Fehel et al., 1983; Albina et al., 1993; Kaneto et al., 1995, Gotoh & Mori, 1999).

Se requiere de la estimulación y de la inhibición de diferentes genes para estimular apoptosis. Se sabe que el NO modula la expresión de los miembros de la familia de bcl-2, p53, enzima convertidora de IL-1 β y Fas, por lo que se cree que el NO induce muerte celular vía apoptosis en una variedad de diversos tipos celulares (Brune et al., 1998).

Por el contrario, existen evidencias que señalan al óxido nítrico como un potente inhibidor de apoptosis en diversos tipos de células. El NO puede suprimir el procesamiento proteolítico y la activación de múltiples pro-caspasas en células intactas, incluyendo caspasa 3 y caspasa 8. En las células que se tratan con TNF- α , un inductor de apoptosis vía activación de caspasas, el NO es capaz de inhibir la activación de las

caspasas y a las caspasas activas (Li et al., 1999). Finalmente, si las células endoteliales de las arterias pulmonares se tratan con lipopolisacáridos, se induce apoptosis la cual se inhibe con la síntesis de NO (Ceneviva et al., 1998).

Se desconocen los factores que regulan la actividad del NO durante la infección con *Plasmodium*, no obstante, su producción esta controlada de forma muy estricta ya que el pico de la concentración del NO coincide con el pico de la parasitemia, posteriormente continua un prolongado periodo de tolerancia inmunológica durante el cual los niveles de nitrato permanecen bajos aún en una infección secundaria. Este periodo de tolerancia desaparece después de varios meses luego de la infección inicial cuando la actividad de óxido nítrico en la reinfección correlaciona con la cantidad de parásitos y la presencia de una parasitemia evidente (Taylor-Robinson et al., 1996).

Las infecciones parasitarias frecuentemente se acompañan de supresión de la inmunidad celular. Esta regulación podría atribuirse a citocinas inhibitorias producidas tanto por linfocitos T como por otras células, o bien al NO. Las citocinas involucradas en efectos inhibitorios son IL-4, IL-10 y TGF- β , que pueden inhibir la capacidad del IFN- γ para activar a los macrófagos, que a su vez destruyen los parásitos intra y extracelulares. Además las citocinas inhibitorias también inhiben la producción de óxido nítrico, que constituye un mecanismo efector importante en la muerte de parásitos intracelulares por los macrófagos activados. En el caso de IL-10, la supresión de la producción de NO pareciera estar asociada a la inhibición de la síntesis de TNF- α (Taylor-Robinson, 1995).

La infección aguda con *P. chabaudi* y con *P. yoelii* está asociada con una marcada depresión de la respuesta de las células T de bazo (Ahuazí et al., 1995) y la supresión más severa ocurre durante los primeros 14 días postinfección. Esto corresponde a la fase

aguda de la infección, lo que coincide con un incremento en la producción de NO (Taylor-Robinson et al., 1994).

En el parásito intracelular *Trypanosoma cruzi*, que comparte diversas características inmunológicas con *Plasmodium*, se ha demostrado que el óxido nítrico esta involucrado en la inmunosupresión donde interviene la apoptosis de células T (Martins et al., 1999); asociado a la presencia de NO, también se ha observado una marcada fragmentación del DNA nuclear en las células T de animales infectados con *Trypanosoma* (Ridgley et al., 1999) lo cual es un fenómeno característico de la apoptosis.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Un propósito fundamental en el intento por controlar la expansión de malaria, es el diseño de una vacuna. Sin embargo, las vacunas generadas empleando biología molecular no son 100% efectivas debido a que se desconocen los mecanismos de respuesta celular precisos para eliminar al plasmodio (Good, 2001).

Se ha demostrado que los ratones infectados con *Plasmodium*, sufren de una marcada activación policlonal de linfocitos, producción de autoanticuerpos e inmunosupresión. Los mismos fenómenos se han observado con otro parásito intracelular, *Trypanosoma* (Verinaud et al, 1998). En este parásito se ha demostrado que la apoptosis es un mecanismo de regulación de la respuesta inmune, de hecho, la infección de ratones BALB/c con *Trypanosoma cruzi* genera un aumento en la expresión de Fas y de su ligando (FasL) en las células T CD4+ de bazo. Dicha activación conduce a la muerte programada de los linfocitos T CD4+ y en citotoxicidad mediada por el ligando de Fas (FasL). Lo anterior explica la inmunosupresión observada después de la infección con *Trypanosoma cruzi* (Martins et al., 1999; Lopes et al., 1999; Lopes & DosReis, 1995). Dadas las semejanzas con los fenómenos provocados por la infección entre *Plasmodium* y *Trypanosoma*, es posible que un evento similar esté sucediendo en la infección con *P. chabaudi*.

Por otro lado, la evidencia sugiere que el NO cumple un papel crucial en la respuesta a *Plasmodium*, ya que el pico de su concentración en suero sucede alrededor del pico de la parasitemia (Taylor-Robinson et al., 1996) y que además coincide con altos porcentajes de apoptosis en bazo (Helmbly et al., 2000; Sánchez-Torres et al., 2001). Este papel tal vez se relaciona con la regulación de la respuesta inmune, específicamente de células T, ya que se ha demostrado efectos antiproliferativos y apoptóticos sobre esta estirpe celular (Mahidhara et al., 2003).

Por lo anterior, este trabajo investiga si el óxido nítrico está involucrado en la regulación de la respuesta inmune mediada por el proceso de apoptosis, para lo cual inducimos e inhibimos la producción *in vivo* de óxido nítrico en ratones CBA/Ca infectados con *P. chabaudi* AS y evaluamos la apoptosis en linfocitos T CD4, T CD8 y B, en bazo, así como la expresión de los genes para IFN γ , TNF α , IL-10 e IL-4: Estas citocinas están directamente involucradas en la regulación de la respuesta inmune de tipo inflamatorio y han sido señaladas como cruciales durante la parasitemia aguda en malaria (Taylor-Robinson, 1995).

El análisis de la apoptosis presentada por la infección de *Plasmodium* en nuestro modelo experimental y su posible vinculación con el óxido nítrico, contribuye al conocimiento de los mecanismos celulares involucrados en la protección, en la supresión, y finalmente en los mecanismos de regulación de la respuesta inmune mediada por el proceso de apoptosis.

5. HIPOTESIS

En malaria el óxido nítrico está involucrado en la inducción de apoptosis de las células T durante la parasitemia aguda y es de esta forma que se regula la eliminación de linfocitos T activados contra *Plasmodium*.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar si el óxido nítrico está involucrado en la inducción de apoptosis en la fase aguda de la infección con *P. chabaudi* AS en ratones CBA/Ca.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A) Estudiar si el NO modifica la parasitemia.
- B) Estudiar si el NO modifica la inducción de apoptosis en la infección.
- C) Identificar el fenotipo de las células en apoptosis.
- D) Establecer si el NO modifica la expresión de las citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-4 en el bazo de ratones infectados.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó un modelo experimental de malaria murina. Los parásitos de la cepa *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS se prepararon a partir de estabilizados criopreservados de líneas clonadas de esos parásitos de la forma descrita por Jarra & Brown (1985). Se utilizaron ratones singénicos CBA/Ca machos, entre 8 - 16 semanas de edad, que originalmente habían sido donados por el National Institute for Medical Research (Londres, Inglaterra). Los ratones fueron aislados de las demás cepas singénicas de ratón, con aire, agua y cama estéril, temperatura, humedad y ciclos luz/obscuridad controlados automáticamente.

Inicialmente se identificó el día post infección en que la apoptosis fuese máxima, para lo cual se infectó un grupo de 24 ratones que se sacrificaron en los días 4, 8, 9, 10, 11, 12, 14 y 15 post infección. Se utilizaron 3 ratones por día más un ratón control para medir la apoptosis en las células del bazo por los métodos de Anexina V, MC 540 y TUNEL, además de medir la parasitemia en sangre.

Posteriormente se realizaron infecciones en tres grupos de ratones (de 3 a 5 ratones por grupo), al primero se le suministró LPS como inductor de iNOS (1mg/kg intraperitoneal, tres aplicaciones cada 24h); al segundo, el inhibidor selectivo para iNOS, aminoguanidina hemisulfato (300 mg/kg intraperitoneal, cinco aplicaciones cada 12h); el tercero se mantuvo como control. Adicionalmente se contó con un cuarto grupo control sin infección. Estos tratamientos fueron calibrados por Villagrán (2003) para interferir con la producción de óxido nítrico durante la infección con *P. chabaudi*.

Se sacrificaron ratones de los tres grupos infectados en tres tiempos diferentes, al inicio de la parasitemia (día 4), en el día pico de la apoptosis (día 11) y cuando la parasitemia se había controlado (día 21). También se sacrificaron ratones sin infección en los mismos días. De estos ratones se evaluó el porcentaje de células de bazo en apoptosis más determinación del fenotipo por citometría de flujo, acompañado de evaluación de parasitemia y la concentración de NO en suero. Además se realizó el análisis de la expresión de IFN- γ , TNF- α , IL-10 y IL-4 por análisis densitométrico del producto de RT-PCR en relación a la expresión del gene constitutivo β -actina.

7.2 MATERIAL BIOLÓGICO

Ratones singénicos CBA/Ca.

Eritrocitos de ratón parasitados con *P. chabaudi* AS, criopreservados.

Suero normal de ratón CBA/Ca.

7.3 MATERIAL DE LABORATORIO

1. Algodón.
2. Cajas de Petri de 4 cm de diámetro Nunc estériles.
3. Cubrebocas.
4. Gorros y botas de trabajo en áreas limpias.
5. Gradillas para tubos Eppendorf.
6. Gradillas para tubos Falcon.
7. Guantes de látex.
8. Jeringas para insulina.
9. Agujas de jeringa 21G.
10. Pinzas de disección

11. Pipetas Pasteur de vidrio
12. Portaobjetos.
13. Puntas para micropipetas: 2.5 μ l, 10 μ l, 250 μ l, 1000 μ l, nuevas y estériles.
14. Tijeras de disección
15. Tubos eppendorf: 250 μ l, 1.5 ml, nuevos y estériles.
16. Tubos Falcon: 15 ml, 50 ml, nuevos y estériles.
17. Tubos Falcon de 5 ml fondo redondo de poliestireno para citometría de flujo, Becton Dickinson.

7.4 EQUIPO

1. Agitador, Scientific Industries, INC.
2. Analizador de geles GEL-DOC 1000, BIO-RAD.
3. Autoclave Brinkmann 2540M.
4. Balanza analítica, Mettler H80.
5. Balanza granataria, Ohaus.
6. Cámara de electroforesis BIO-RAD, PROTEAN II xi Cell, 16 cm.
7. Cámara de flujo laminar, Veco.
8. Centrífuga Eppendorf 5804R.
9. Citómetro de flujo FASCan Becton & Dickinson.
10. Espectrofotómetro UV, WPA.
11. Espectrofotómetro de placas Stat Fax 2100, AWARENESS Technology INC.
12. Fuente de energía BIO-RAD 200/2.0.
13. Microcentrífuga Eppendorf 5415C.
14. Micropipetas Eppendorf 2.5 μ l, 10 μ l, 20 μ l, 100 μ l, 1000 μ l.
15. Micropipetas Gilson p20, p200, p1000.
16. Microscopio óptico Standard 25, Carl Zeiss.
17. Refrigerador, MayTag.

18. Tanque de nitrógeno líquido 34XT, Taylor-Wharton.
19. Termociclador Mastercycler, Eppendorf.
20. Termociclador MJ Research.
21. Vortex Genie 2, Daigger.

7.5 REACTIVOS

1. Aceite mineral, Sigma.
2. Acido Bórico, Sigma.
3. Acrilamida, USB/Amersham.
4. Agua bidestilada, Hidropura.
5. Aminoguanidina, sal de hemisulfato, Sigma.
6. Amortiguador para retrotranscripción 5X, Gibco BRL.
7. Anexina V conjugada con FITC, Roche.
8. Azul de bromofenol, Sigma.
9. Bromuro de etidio, Sigma.
10. Colorante de Giemsa, Sigma.
11. Dexametasona 4mg/ml Alin, Chinoin.
12. Dietilpirocarbonato (DEPC), Sigma.
13. dNTP's (doxirribonucleótidos trifosfato), Pharmacia.
14. 12-dUTP conjugado con FITC, Boehringer Mannheim.
15. Ditioeritritol (dTT), Gibco BRL.
16. EDTA, Sigma.
17. Etanol absoluto, MERCK.
18. Eter, JT Backer.
19. Heparina de Sodio, Sigma.
20. Inhibidor de RNA'sa, Gibco BRL.
21. Ioduro de propidio, Sigma

22. Lipopolisacárido *E. coli*, Sigma.
23. Medio de cultivo RPMI, Gibco.
24. NADPH (sal de tetrasodio) 98%, Roche.
25. NED (N-1-Naphthyle Thylenediamine Dihydrochloride), Baker Analysed Reagent.
26. Nitrato Reductasa 20 U, Roche.
27. Transcriptasa reversa, Promega.
28. Transferasa terminal de deoxinucleótidos, Invitrogen,
29. Marcador de peso molecular 100 pb, Gibco BRL.
30. MC 540, Sigma.
31. Metanol, JT Becker.
32. Oligo dT₁₂₋₁₈, Gibco BRL.
33. SDS, Sigma.
34. Suero fetal bovino (SFB) Qualified, Gibco BRL.
35. Taq polimerasa, Applied Biosystems.
36. TEMED, Sigma.
37. Tris base, Sigma.
38. Triton x-100, Sigma.
39. Trizol, Invitrogen.

7.5.1 Secuencias de los oligonucleótidos iniciadores de los genes: β -actina, IFN γ , TNF α , IL-4 e IL-10.

1. β -actina (Gibco BRL)

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

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

2. IFN γ (Gibco BRL)

3'TGG ACC TGT GGG TTG TTG ACC TCA TTG GC
5'TGC ATC TTG GCT TTG CAG CTC TTC CTC ATG

3. TNF α (Gibco BRL)

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

4. IL-4 (Gibco BRL)

3'GCT CTT TAG GCT TTC CAG GAA GTC
5'ATG GGT CTC AAC CCC CAG CTA GT

5. IL-10 (Gibco BRL)

3' ATT TCG GAG AGA GGT ACA AAC GAG GTT GTT T
5'ATG CGA GAC TTT AAG GGT TAC TTG GGT T

7.6 METODOLOGÍA

7.6.1 Infección de ratones.

La infección se realizó por inyección intravenosa (i.v.) de 5×10^4 eritrocitos parasitados con *P. chabaudi* AS, obtenidos de un ratón CBA/Ca macho inoculado previamente con eritrocitos parasitados criopreservados, cuando la parasitemia alcanzó el 20%.

Los ratones fueron mantenidos bajo condiciones libres de patógenos, alimentados con mezcla Harlan TD9936, especial para ratones infectados con *Plasmodium*.

7.6.2 Toma de muestras sanguíneas y evaluación de parasitemia.

Se monitorearon las parasitemias de todos los ratones por examen microscópico en extendidos de sangre en placa (una gota de sangre es extendida en placa, luego de estar seca se fijó con metanol absoluto y se sometió a tinción con Giemsa diluido 1/10 en agua durante 30 minutos, por último se lavó con agua y se almacenó hasta su análisis). La lectura de las parasitemias se realizó en microscopio óptico en 100x de acuerdo a los siguientes criterios:

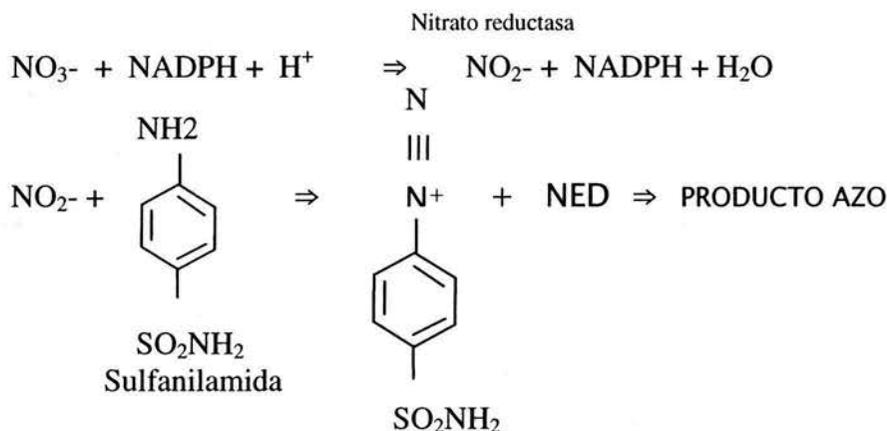
- Si se encuentran menos de 2 eritrocitos parasitados por campo, se leen 50 campos.
- Si se encuentran 2 o más eritrocitos parasitados por campo, se cuentan 200 eritrocitos en total.

Se calculó el porcentaje de parasitemia de cada ratón en cada día, se obtuvo la media geométrica y con esos valores se graficó la curva en escala logarítmica.

7.6.3 Cuantificación de NO.

En días alternados se tomaron 70 µl de sangre de la cola de los ratones para obtener suero, la sangre se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min, se separó el suero en tubos estériles etiquetados, las muestras se almacenaron a -70°C hasta su posterior análisis.

Figura 8. Reacción de Griess.



Se determinó la concentración de NO en suero según la reacción de Griess (figura 8), cuantificando nitritos y nitratos por análisis colorimétrico.

En tubos eppendorf de 1.5 ml se colocaron 15 µl de suero, así como una curva de calibración de 7 puntos más el blanco usando concentraciones seriadas de NaNO₃ en PBS (700; 350; 175; 87.5; 43.7; 21.8; 10.9 y 0.0 µM). Posteriormente se agregaron 15 µl de NADPH a una concentración de 1.25 mg/ml en PBS 1X y 5 µl de Nitrato reductasa 5U/µl en PBS 1X, se agitaron las muestras y se incubó por 20 min a temperatura ambiente en oscuridad. A cada muestra se le adicionaron 50 µl de sulfanilamida 1% en ácido fosfórico p/v, y se incubó por 2 min. Se adicionaron 50 µl de NED 0.1% p/v y se incubó por 2'. Se adicionaron 100 µl de ácido tricloroacético 10% para desproteinizar y se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se colocó en una placa de 96 pozos. Todo el procedimiento anterior fue realizado en campana de flujo laminar. La concentración de NO se cuantificó en el lector de placas Stat Fax 2100 según la curva de calibración de modo punto a punto usando unidades de concentración y filtro de 545 nm. Las muestras se evaluaron por duplicado.

7.6.4 Extracción de esplenocitos.

Los ratones se sacrificaron en cámara de éter, el bazo se extrajo después que se obtuvo la sangre por corte de corazón y succión con pipeta Pasteur heparinizada. El bazo se colocó en medio de cultivo RPMI suplementado con suero fetal bovino al 10% (RPMI/SFB10%), a 4°C, posteriormente se picó con aguja y se extrajeron las células por reflujó suave repetido; las células se centrifugaron a 1,500 rpm durante 4 min. El sobrenadante se excluyó y el botón se resuspendió en RPMI/SFB 10% a 4°C; las muestras se separaron para extracción de RNA y para el análisis de marcadores de superficie y apoptosis por citometría de flujo, para lo cual se colocaron en hielo hasta los siguientes procedimientos.

7.6.5 Detección de apoptosis.

Las células obtenidas se incubaron 1 hora en RPMI/SFB 10% en hielo, posteriormente se contaron, lavaron y resuspendieron en HBSS. Se utilizaron paralelamente los métodos de Anexina V, MC 540 y TUNEL en las células de los ratones infectados así como en los ratones empleados como control negativo (sin tratamiento) y positivo (un ratón tratado con dexametasona 25mg/Kg intraperitoneal, 12 horas antes del sacrificio).

7.6.5.1 Anexina V.

Esta es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de Ca²⁺ conocida por unirse a la fosfatidilserina de la superficie de las células apoptóticas. La fosfatidilserina normalmente se encuentra en lado citosólico de la membrana plasmática pero se expone sobre el lado externo cuando la célula se encuentra en estado apoptótico (Martin et al., 1995); conjugada con fluorocromos como FITC (excitación a 488nm, emisión a 525nm) puede utilizarse para evaluar apoptosis mediante citometría de flujo (Vermees et al., 1995). Un millón de esplenocitos se incubaron con Anexina V-FITC 2 µM durante 10

min a temperatura ambiente. La prueba se realizó adicionando 1.25 μ l de yoduro de propidio (excitación 543nm, emisión 617nm) 1mg/ml y se incubaron las células por 10 min antes de la lectura. Este fluorocromo tiñe las células necróticas, las células positivas para FL3 se excluyeron del análisis. Se realizó un histograma de la fluorescencia en FL1 y se cuantificó el porcentaje de células en la región positiva previamente calibrada con los controles.

7.6.5.2 MC 540.

Esta sonda fluorescente recientemente se ha utilizado para evaluar apoptosis ya que se une a la membrana de las células apoptóticas con mayor afinidad que las células normales (Frey, 1997; Laakko et al., 2002). Es un cromóforo cargado negativamente, se excita a 490nm y emite a 575 nm; interactúa con el lado externo de la membrana plasmática de las células en apoptosis que al perder su asimetría, alteran su estructura, lo cual incrementa la intensidad de fluorescencia de esta sonda (Schelegel et al., 1993). Un millón de esplenocitos se incubaron con 1.75 μ l de MC 540 1mg/ml durante 10 min a temperatura ambiente. La prueba se realizó adicionando 1.25 μ l de yoduro de propidio a una concentración de 1 mg/ml, y se incubó 10 min antes de la lectura. Las células positivas para FL3 se excluyeron del análisis. Se realizó un histograma de la fluorescencia en FL2 y se cuantificó el porcentaje de células en la región positiva previamente calibrada con los controles. La compensación es importante ya que el espectro de fluorescencia de MC 540 y de yoduro de propidio se sobrelapan.

7.6.5.3 TUNEL.

Esta prueba se basa en la fragmentación del DNA que sufren las células apoptóticas (Gorczyca et al., 1992; Gold et al., 1994). Un millón de esplenocitos se fijaron en

formaldehído 2% por 30 min a temperatura ambiente, se lavaron en HBSS y posteriormente se permeabilizaron resuspendiendo el botón en 100 µl de Tritón x100 a una concentración de 0.1% en citrato de sodio al 0.1%, se incubando 2 min en hielo. Luego se lavaron en HBSS y al botón se le adicionó 0.3 µl de enzima TdT (Terminal deoxinucleotidyl Transferasa) a una concentración de 5U/µl junto con 0.6 µl de 12dUTP-FITC 0.3 nM más 5 µl de dATP 30 nM en solución amortiguadora (5 µl de solución amortiguadora TdT 10x + 39 µl de agua estéril). Se incubó 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Finalmente se adicionó 1 ml de HBSS frío y las muestras se incubaron en hielo hasta la lectura. Se realizó un histograma de la fluorescencia en FL1 y se cuantificó el porcentaje de células en la región positiva previamente calibrada con los controles.

7.6.6 Método de tinción con dos colores para apoptosis y marcadores de superficie celular.

Un millón de células de bazo se resuspendieron en 100 µl de HBSS y en tubos por separado se adicionaron 0.5 µl de anti-CD4-FITC 0.5mg/ml o 0.8 µl de anti-CD8-FITC 0.5mg/ml o 0.6 µl de anti-B220-FITC 0.5mg/ml. Se incubó por 30 min en hielo en la oscuridad. Las células se lavaron con HBSS y posteriormente se marcaron con 1.75 µl de MC 540 1mg/ml durante 15 min en hielo. La prueba se realizó adicionando yoduro de propidio como se describió anteriormente. Las células positivas para FL3 fueron excluidas del análisis.

Se realizó una gráfica de FL1 contra FL2 y se evaluó el porcentaje de células positivas para FL2 de las positivas para FL1. Los datos de calibración del citómetro (Instrument settings) y la compensación utilizada fue la siguiente:

Instrument Settings				Compensación	
P1	SSC	E00	2.64	FL1-FL2	15.8 +/- 5 *
P2	FSC	4.21	1.0	FL2-FL1	34.9 +/- 8 *
P3	FL1	6.13		FL3-FL2	5.6
P4	FL2	3.20		FL2-FL3	12.2
P5	FL3	4.20			

* La variación se debe a las diferencias en la composición de los esplenocitos

7.6.7 RT-PCR semicuantitativo.

7.6.7.1 Extracción de RNA.

Los esplenocitos obtenidos se centrifugaron a 1500rpm durante 4 min, luego de desechar el sobrenadante se desprendió el botón agitando vigorosamente, se adicionó 500 µl de reactivo comercial Trizol y se agitó en vortex. Se incubó a temperatura ambiente por 5 min para permitir la completa disociación de complejos nucleoprotéicos. Se adicionaron 200 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (49:1 v/v) y se agitó en vortex durante 15 min. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min para romper la emulsión, la fase acuosa (superior) se separó en otro tubo.

Se adicionaron 250 µl de isopropanol frío, se mezcló y se almacenaron a -70°C para continuar con el procedimiento un día después. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 20 min y se retiró el sobrenadante, el botón se lavó en 200 µl etanol frío al 70% en agua DEPC, sin mezclar se congeló a -20°C por 24h. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 min, se descartó el sobrenadante y los tubos se cubrieron con parafilm, al cual se le

realizaron pequeños orificios con aguja 29G (insulina) y se colocaron a temperatura ambiente por 24h o hasta que se secaran.

7.6.7.2 Hidratación y cuantificación de RNA.

Las muestras se hidrataron adicionando a cada tubo 20 µl de agua DEPC al 0.1%, estéril. Se agitó por 5 min, para hidratar completamente las muestras se refrigeraron a 4°C entre 1 y 2 horas, agitando en vortex cada 30 min.

Se centrifugó a 14,000 rpm por 5 seg. Para determinar la concentración de la solución de RNA, se realizó una dilución 1:400 en agua DEPC estéril y se leyó la absorbancia a 260 nm. Los cálculos se realizaron de la siguiente forma:

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

Concentración de RNA	Absorbancia de la dilución a 260 nm	Concentración de RNA cuando la abs _{260nm} = 1	Factor de dilución	Unidades
----------------------	-------------------------------------	---	--------------------	----------

7.6.7.3 Retrotranscripción.

De acuerdo a la concentración de RNA obtenida, se determinó el volumen de la solución de RNA necesario para tomar 1.5 µg de RNA y se determinó el volumen de agua DEPC requerido para un volumen final de 10 µl donde:

$$\text{Vol RNA} + 1.5\mu\text{l oligo dT} + \text{Agua DEPC} = 10\mu\text{l.}$$

La mezcla se incubó en tubos eppendorf a 65°C por 10 min en el termociclador, posteriormente las muestras se incubaron en hielo durante 5 min y se centrifugó a

14,000rpm durante 5 seg. De nuevo se colocaron las muestras en hielo y se adicionaron 10 µl de la mezcla de retrotranscripción (Tabla 2).

Se incubó a 37°C por 1h en el termociclador, luego a 95°C por 5 min y posteriormente en hielo durante 5 min. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 seg y se adicionaron 70 µl de agua DEPC. El producto (DNA complementario, cDNA) se almacenó a -20°C hasta su análisis.

Tabla 2. Mezcla de retrotranscripción para una muestra (1X).

Reactivos	Volumen (µl)
Amortiguador de retrotranscripción 5X	4.0
dTT 0.1M	2.0
dNTP's 5mM	2.0
Enzima M-MLV RT	1.0
Inhibidor de RNAsa	0.1
Agua DEPC	1.0
VOLUMEN FINAL	10.1

7.6.7.4 Amplificación de los genes para citocinas por PCR.

Se calcularon las cantidades de los reactivos según el número de muestras, se preparó la mezcla de reacción como se muestra en la Tabla 3, considerando que el volumen final debe ser de 20 µl. Todos los reactivos y la mezcla de reacción se conservaron en hielo.

Posteriormente se mezcló usando el vortex y se distribuyó 15 µl de la mezcla de reacción en cada tubo etiquetado según las muestras. Se adicionaron 50 µl de aceite mineral sobre la mezcla de reacción y se depositaron 3 µl de cDNA o retrotranscrito de cada muestra, atravesando la capa de aceite, sin agitar para evitar la formación de aerosoles. Los tubos fueron mantenidos en hielo.

Tabla 3. Mezcla para PCR por muestra.

Reactivo	[] / muestra	µl / muestra
Amortiguador de PCR 10X	1X	2.0
dNTP's 5mM	0.2 mM	0.8
Oligo β-actina 20 µM.	0.1 µM	0.1
Oligo del gen de interés 20 µM.	0.1 µM	0.1
Taq DNA polimerasa 5U/µl	0.5 U	0.1
Agua para PCR		13.9
VOLUMEN FINAL		17.0

Se ubicaron los tubos con la mezcla y las muestras de cDNA en el termociclador cuando éste se encontraba a 94°C para evitar reacciones inespecíficas. Se corrió el siguiente programa:

1. 94°C, 6'.
2. 55°C, 2'.
3. 72°C, 2'.
4. 94°C, 45''.
5. Se repitió 30 veces del paso 2 al 4.
6. 55°C, 2'.
7. 72°C, 7'.
8. 20°C, 1 h.
9. Fin

Los productos de PCR se almacenaron en refrigeración (4°C) hasta su uso.

7.6.7.5 Electroforesis de los productos de PCR.

Se prepararon geles de acrilamida al 5% en TBE 1X. Se adicionaron 10 µl de amortiguador de carga a cada muestra, se mezcló la fase acuosa evitando la formación de emulsiones con el aceite. Se depositaron 10 µl de cada muestra con amortiguador en cada pozo; en uno de los pozos finales se depositaron 10 µl de marcador de peso molecular de 100 pares de bases. La electroforesis se corrió a 180v por 2 h en TBE 1X.

Se procedió a teñir los geles con bromuro de etidio, utilizando 20 µl de una solución de 10 mg/ml en 400 ml de TBE 1X y se agitó suavemente durante 5 min. Se lavó en agua destilada durante 5 min y el gel se colocó en el equipo analizador Gel Doc para visualizar los productos de PCR. Se determinó la absorbancia de los productos de PCR y se realizaron gráficas usando los conteos medios de la expresión para cada citocina respecto a la de β-actina.

7.6.8 Análisis estadístico.

Se realizaron de tres a cinco repeticiones de cada unidad experimental (ratón). El análisis de varianza se realizó bajo diseño anidado con cuatro tratamientos (inductor, inhibidor, control infectado y control sin infectar). Los resultados se presentaron en medias más el error estándar, se considera como valor significativamente diferente cuando $P < 0.05$.

8. RESULTADOS

8.1 CURVA DE APOPTOSIS

Para determinar el día pico de apoptosis en la infección, además de valorar la eficacia de MC 540, se infectó un grupo de ratones y se evaluó el porcentaje de apoptosis por el método de MC 540 y el de Anexina V, los cuales dependen del mismo evento apoptótico, la exposición de la fosfatidilserina; también se evaluó paralelamente por el método de TUNEL, que depende de otra característica apoptótica, la fragmentación del ADN. La figura 9 muestra el porcentaje de apoptosis registrado por los tres métodos, la figura 10 muestra la eficiencia de MC 540 para evaluar apoptosis en un control *in vivo* para apoptosis.

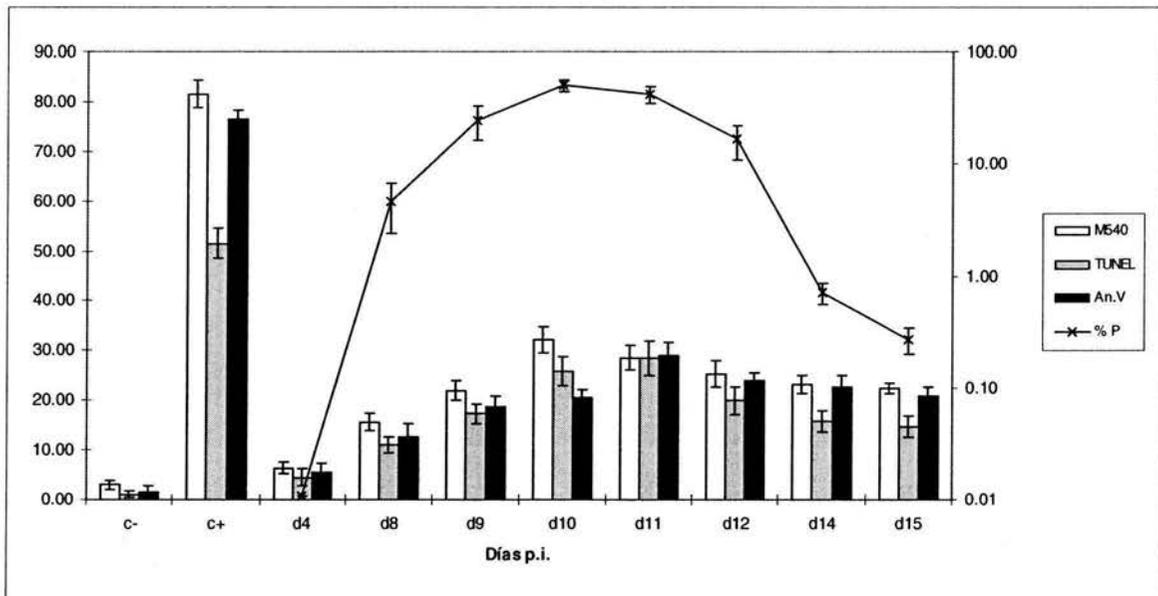


Figura 9. Comparación de Anexina V, MC540 y TUNEL. Porcentaje de apoptosis de ratones infectados con *P. chabaudi*. Blanco, MC 540; Punteado, TUNEL; negro, Anexina V. Parasitemia en línea continua. El control positivo corresponde a esplenocitos cultivados en RPMI/10% SFB más dexametasona 1mg/ml, 14h.

No hubo diferencias estadísticas entre los días 10, 11 y 12 post infección, para cada método, solo hubo diferencias con el método de TUNEL, que detecta el pico entre el día 11 y el 12, mientras que con MC 540 y con Anexina V, se detecta entre el día 10 y el 11; por tal razón se asumió que el día 11 sería considerado como el día pico de la apoptosis. El pico de la parasitemia se detectó entre los días 10 y 11, el cual correspondió al pico de la apoptosis (figura 9).

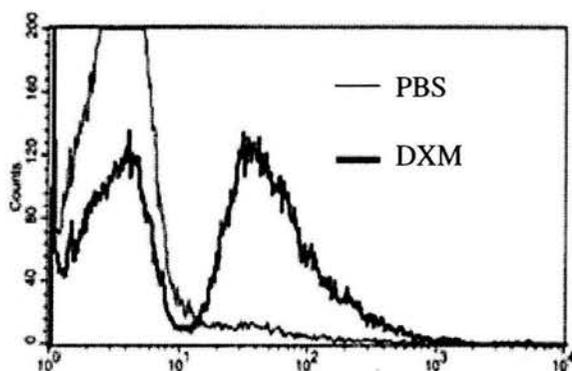


Figura 10. Apoptosis evaluada con MC 540. Control de apoptosis; línea delgada, timocitos de un ratón inyectado con PBS; línea gruesa, timocitos de un ratón tratado con dexametasona 12 h.

8.2 ASOCIACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO CON LA APOPTOSIS

Se infectaron ratones CBA/Ca con *P. chabaudi*, un grupo se trató con aminoguanidina, otro con LPS y el otro permaneció como control infectado. Los tratamientos se administraron dos días antes del sacrificio. La figura 11 muestra la concentración de NO en suero y la parasitemia de los tres grupos de ratones durante la infección.

El pico de concentración de NO se registró en el día 12 post infección, el tratamiento con aminoguanidina, si bien no reduce el nivel basal de NO, si evita el incremento en la concentración que se observa para el día 12 post infección. El tratamiento con LPS incrementó casi al doble la concentración de NO en el día 4, y el aumento es aún más

fuerte para los días 11 y 12. Para el día 21 ninguno de los tratamientos logró modificar la concentración de NO. La modificación de la concentración de NO no influyó en la cinética de la parasitemia.

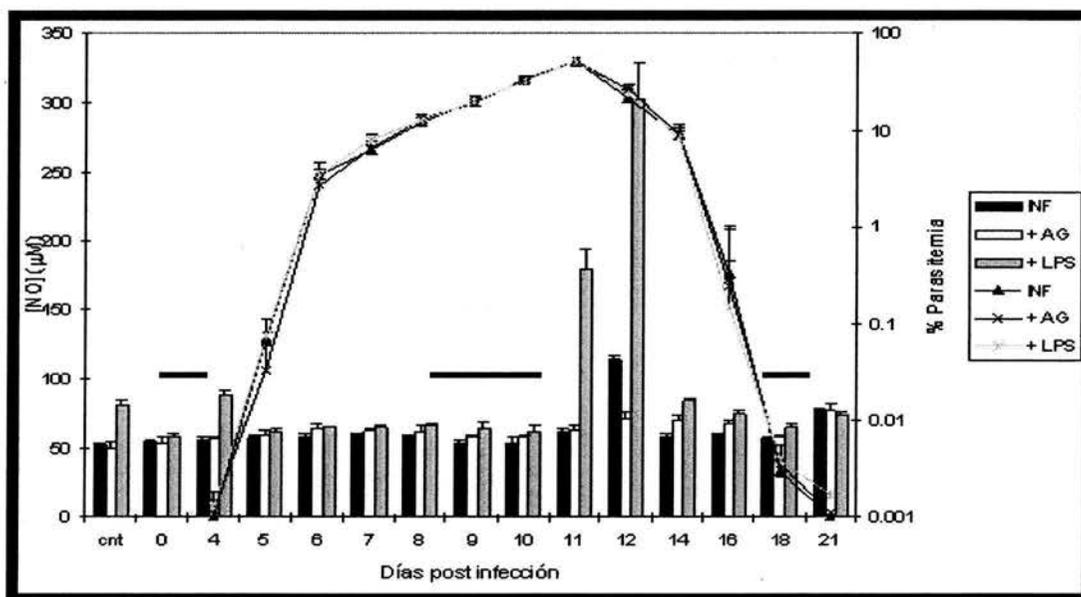


Figura 11. Parasitemia (líneas) y [NO] (barras). Los ratones control sin infección (cnt) fueron tratados con AG (blanco) o LPS (gris), o sin tratamiento (negro) y evaluada su concentración de NO en suero luego de dos días de tratamiento. Las barras horizontales corresponden al tiempo de tratamiento.

Las células del bazo de los mismos ratones se analizaron por el método de MC 540 y tinción de marcador de superficie para determinar el porcentaje de apoptosis en las subpoblaciones CD4+, CD8+ y B220+. En la figura 12 a se muestra la región R1 sobre la cual se realizaron los posteriores análisis, corresponde a la región negativa para yoduro de propidio (fluorescencia en FL3). La separación de los grupos no es muy clara, sin embargo es posible definir la región R1 como negativa para yoduro de propidio ya que el otro grupo (encerrado en círculo) aparece con alta fluorescencia tanto en FL3 como en FL2, lo cual sugiere que corresponde a células necróticas, ya que al presentar disrupción membranal, éstas incorporarían ambos fluorocromos, además de presentar cambios en la estructura membranal.

En la figura 12 b se presenta el resultado de citometría para los esplenocitos de tres ratones en los días 4, 11 y 21 post infección; solo las células negativas para FL3 fueron analizadas. Los resultados promedio muestran que hacia el día 11 se genera un fuerte incremento en el porcentaje de apoptosis frente al registrado el día 4, momento en el que se hace perceptible la parasitemia en sangre; en el día 21 el porcentaje disminuye aunque no al nivel del día 4. Ninguno de los tratamientos logró modificar el porcentaje de apoptosis total de los esplenocitos (figura 12 c).

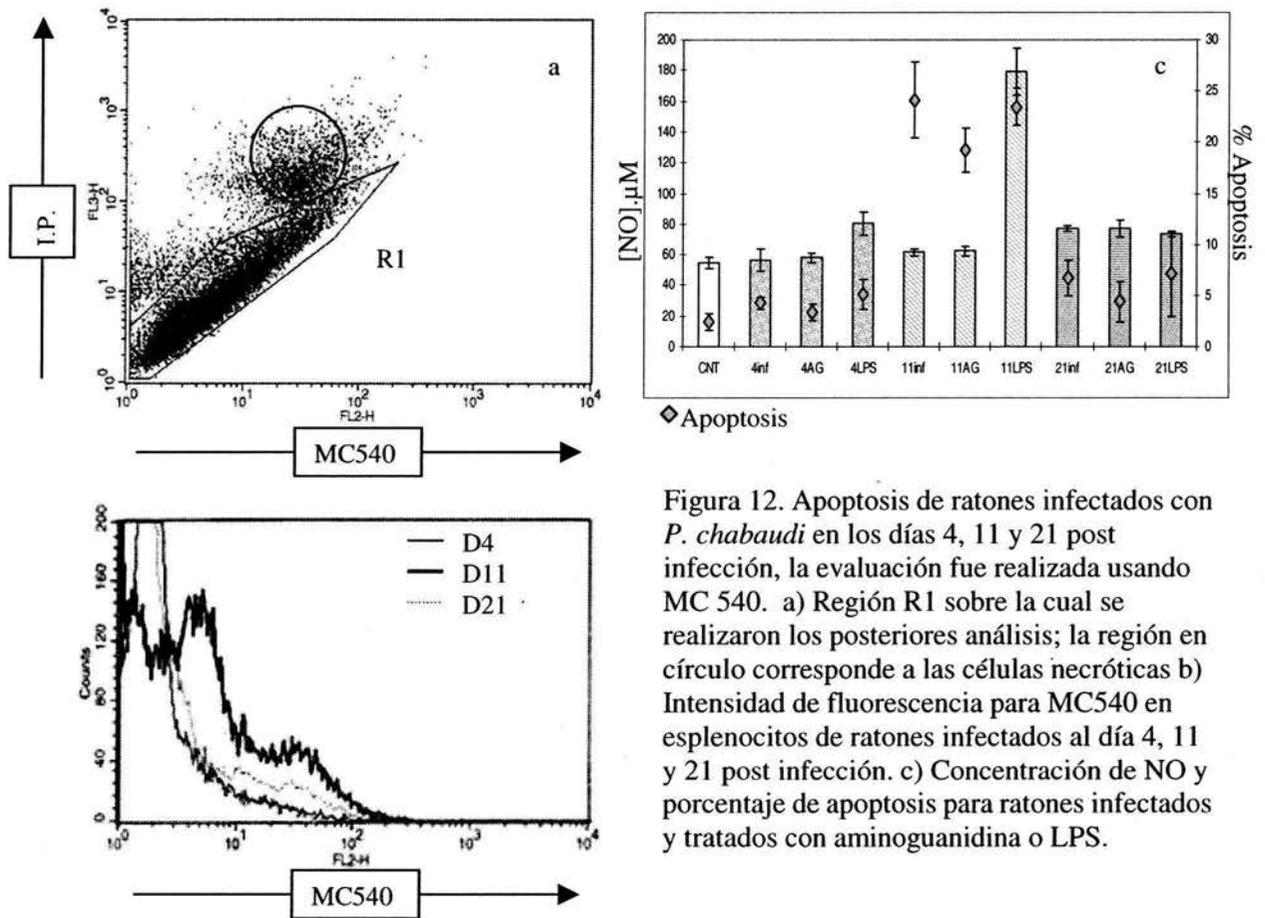


Figura 12. Apoptosis de ratones infectados con *P. chabaudi* en los días 4, 11 y 21 post infección, la evaluación fue realizada usando MC 540. a) Región R1 sobre la cual se realizaron los posteriores análisis; la región en círculo corresponde a las células necróticas b) Intensidad de fluorescencia para MC540 en esplenocitos de ratones infectados al día 4, 11 y 21 post infección. c) Concentración de NO y porcentaje de apoptosis para ratones infectados y tratados con aminoguanidina o LPS.

En la figura 13, 14 y 15 se muestran resultados representativos del análisis de citometría de flujo para apoptosis de CD4+, CD8+ y B220+, respectivamente, en los días 4, 11 y 21; el análisis corresponde a la región negativa para I.P.; el recuadro derecho corresponde a las células positivas para el marcador de superficie, de las cuales se muestra el porcentaje positivo para MC 540.

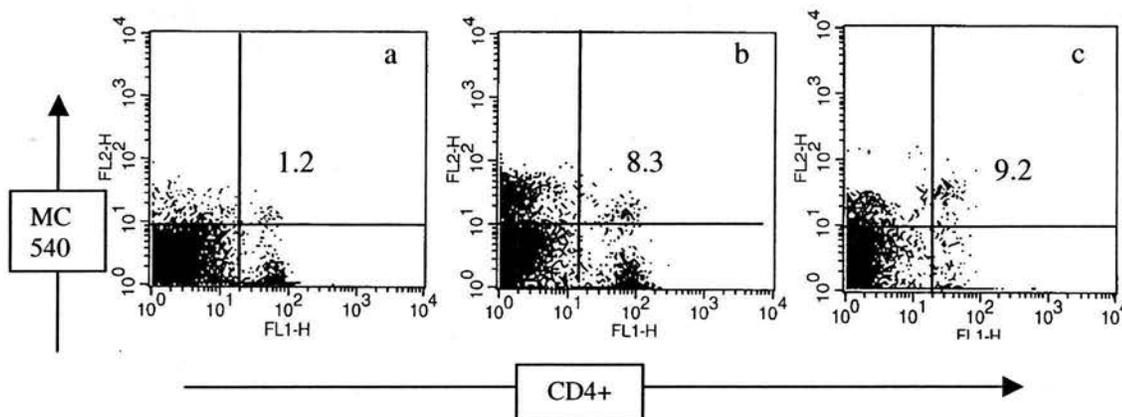


Figura 13. Apoptosis de esplenocitos CD4+ en ratones infectados, en los días 4 (a), 11 (b) y 21 (c) post infección Se muestra el porcentaje de células CD4+ apoptóticas.

Con los dos marcadores CD4 y CD8 se observa un cambio en la distribución de los esplenocitos, en el día 4 el grupo negativo para el marcador aparece más extendido sobre el eje FL1 que en los días 11 y 21, lo cual pudo suceder por autofluorescencia o por pegado inespecífico del anticuerpo conjugado con FITC. Este evento no se observa en el análisis de las células B220, de todas formas sugiere un cambio en la composición y naturaleza de los esplenocitos para los días 11 y 21 post infección.

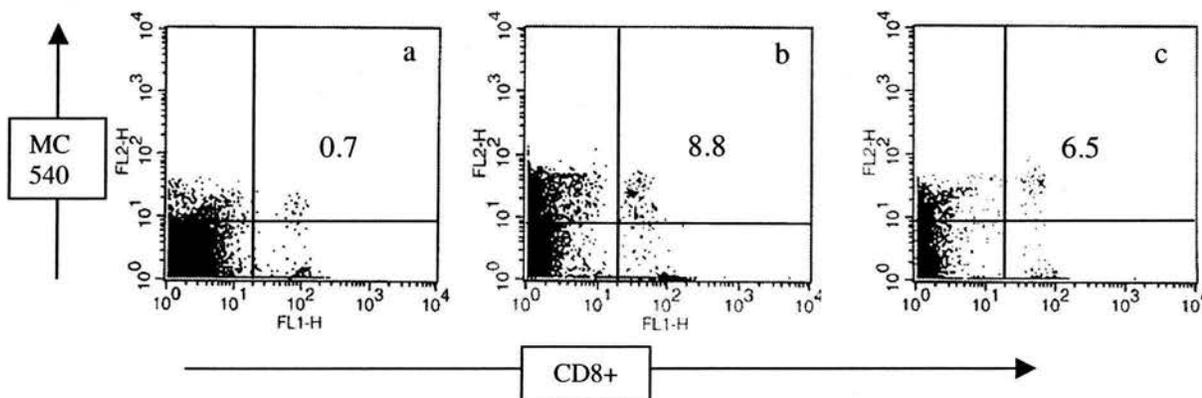


Figura 14. Apoptosis de esplenocitos CD8+ en los días 4 (a), 11 (b) y 21 (c) post infección Se muestra el porcentaje de células CD8+ apoptóticas.

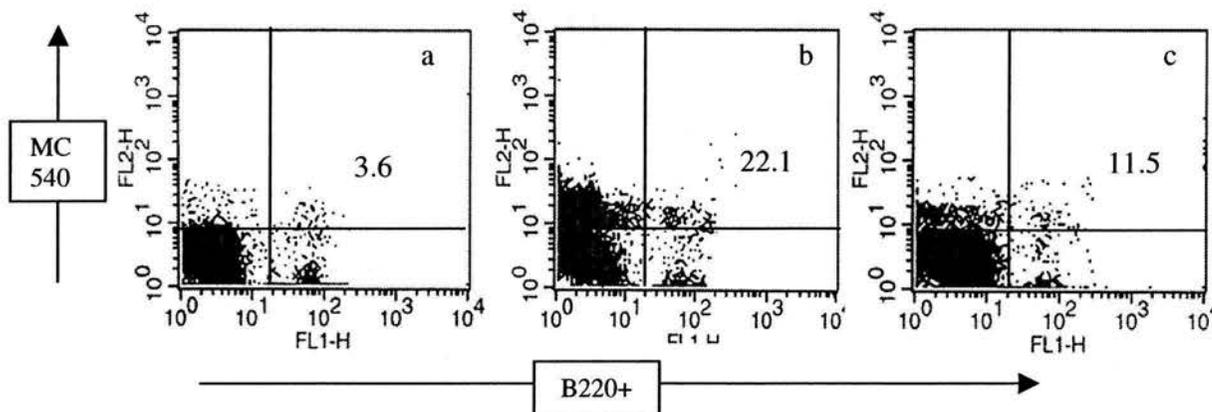


Figura 15. Apoptosis de esplenocitos B220+ en los días 4 (a), 11 (b) y 21 (c) post infección. Se muestra el porcentaje de células B220+ apoptóticas.

En las figuras 16, 17 y 18 se muestra el promedio de células apoptóticas de cada subpoblación celular para los ratones infectados y tratados con inhibidor o inductor de la producción de NO.

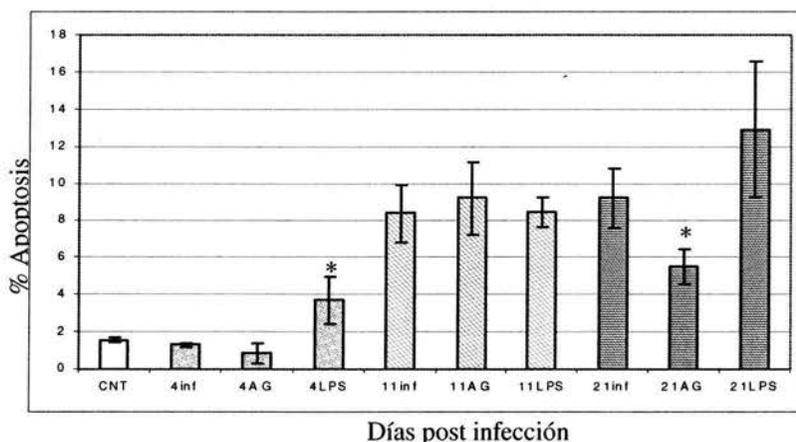


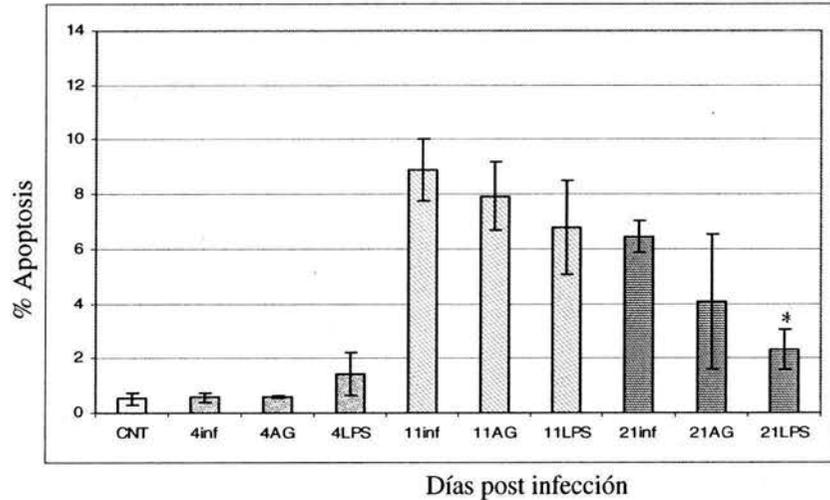
Figura 16. Apoptosis de esplenocitos CD4+ en ratones infectados y tratados. * Diferencia significativa con respecto al control infectado del mismo día.

En la gráfica de la figura 16 se observa que el porcentaje de apoptosis de los esplenocitos CD4+ aumenta en el día 11 y no disminuye en el día 21, a diferencia del análisis del total de esplenocitos. En el día 21 el tratamiento con AG disminuye el porcentaje de apoptosis y con LPS aumenta en el día 4, lo cual coincide con la idea de la

finalización de la respuesta inmune donde el NO presentaría la señal que dispara la apoptosis, o tal vez presenta cierta toxicidad a estas células.

Figura 17. Apoptosis de esplenocitos CD8+ en ratones infectados y tratados.

* Diferencia significativa con respecto al control infectado del mismo día.



El porcentaje de apoptosis se incrementa en el día 11 y disminuye levemente en el día 21 (figura 17). En este día el tratamiento con AG exhibe una tendencia a disminuir y con LPS la disminución es estadísticamente significativa; esto último llama la atención, pues no coincide con la teoría de efectos proapoptóticos, además se presenta de manera contraria a CD4+.

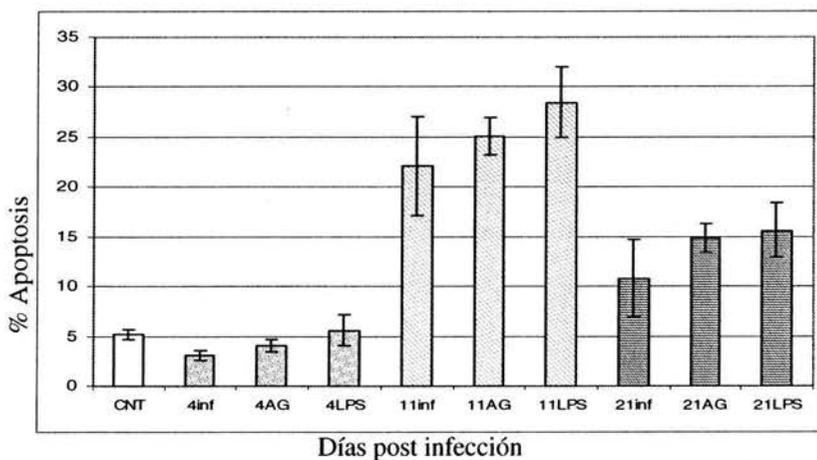


Figura 18. Apoptosis de esplenocitos B220+ en ratones infectados y tratados.

El porcentaje de células B220+ en apoptosis también se incrementó en el día 11 y disminuyó en el día 21 (figura 18). Los tratamientos tienden a incrementar la apoptosis pero la diferencia no es significativa.

Los porcentajes de apoptosis fueron más altos en las células B220+, sin embargo el incremento en el porcentaje de apoptosis fue más alto en las células CD8+ y CD4+ (8 veces aproximadamente), además estas últimas siguen registrando un alto porcentaje de apoptosis en el día 21, contrario a los otros dos subtipos, lo cual sugiere que una parte de esa apoptosis podría estar generada por los mecanismos normales de silenciamiento teniendo en cuenta su papel dentro de la respuesta inmune a este parásito.

Los tratamientos tuvieron mayor impacto en el día 21, tanto sobre CD4+ como sobre CD8+, sin embargo parece mostrar un comportamiento antagónico en uno y otro tipo celular. Solo LPS tuvo acción en el día 4 sobre las células T CD4+. Ninguno de los tratamientos modificó la apoptosis de las células B220+.

El porcentaje de apoptosis de CD8+ indica que este tipo celular se encuentra activado (figura 17). Este hallazgo es interesante ya que el modelo experimental que analizamos corresponde solo a la fase eritrocítica de la infección y la mayoría de los eritrocitos no portan moléculas MHC clase I, proteína de membrana que reconoce esta subpoblación celular. Existe la posibilidad de que esta activación se esté dando con la producción de citocinas, otra vía mediante la cual podrían estar participando estas células.

8.3 CITOCINAS DE LA RESPUESTA Th1/Th2

Paralelamente se evaluó la expresión de citocinas por RT-PCR semicuantitativo en células totales de bazo. Estas citocinas se han utilizado como marcadoras de la respuesta Th/1 (IFN γ y TNF α) y Th2 (IL-4 e IL-10).

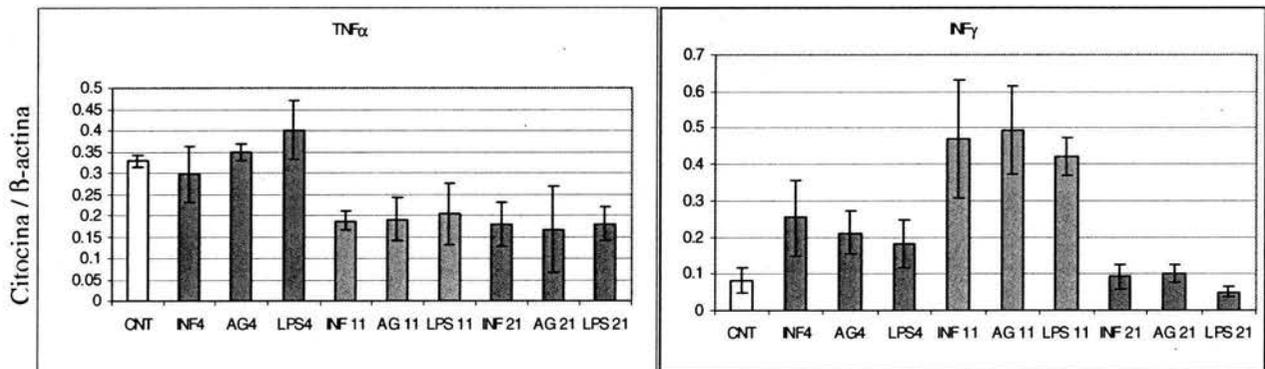


Figura 19. Expresión de citocinas Th1 en bazo de ratones infectados y tratados para los días 4, 11 y 21 post infección Unidades: relación de expresión de la citocina respecto a la expresión de β -actina.

El RNAm para TNF α al inicio de la infección se expresa en niveles similares al control, posteriormente disminuye tanto en el pico como en el descenso de la infección (Figura 19 a). Se observó un patrón diferente en la expresión del IFN γ ya que el nivel más elevado se detectó el día 11 y posteriormente disminuyó en el día 21 (figura 19 b).

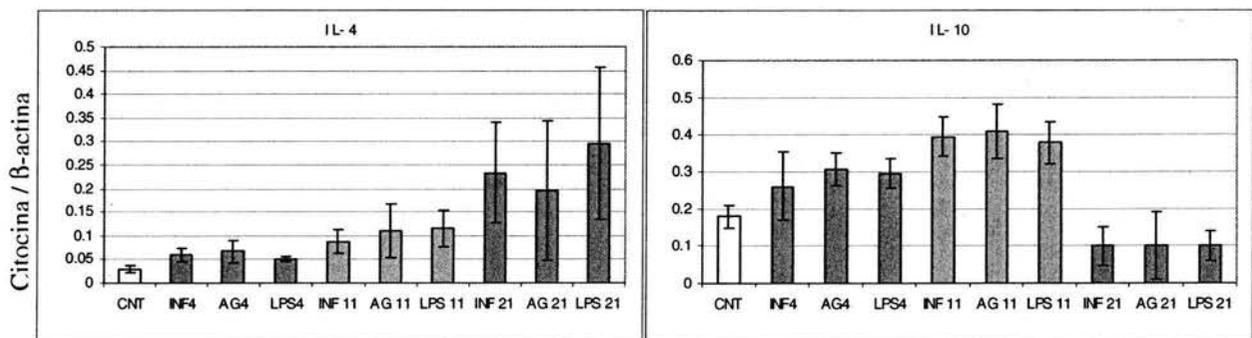


Figura 20. Expresión de citocinas Th2 en bazo de ratones infectados y tratados para los días 4, 11 y 21 post infección Unidades: relación de expresión de la citocina respecto a la expresión de β -actina.

En relación a la expresión del RNAm de IL-4 se observó un incremento en los niveles principalmente en la etapa de descenso de la parasitemia (figura 20 a). La expresión del RNAm correspondiente a IL-10 se incrementó en el día pico y disminuyó en el día 21 (figura 20 b).

El resultado del análisis de la expresión de RNAm que codifica para las citocinas nos muestra que la respuesta inmune inicial que predomina es de tipo Th1 puesto que se incrementaron los niveles de TNF α y posteriormente de IFN- γ , luego de la cual predomina una respuesta tipo Th2 como lo muestran los niveles elevados de citocinas inmunoreguladoras como IL-4.

Los niveles de expresión de RNAm para IL-10 se incrementan en el día pico de la infección y posteriormente disminuyen en el día 21, por lo que es posible que participe en el “switch” de la respuesta predominantemente Th1 hacia la respuesta Th2.

Ninguno de los tratamientos modificó significativamente la expresión de citocinas medida por técnica de RT-PCR en las células de bazo de ratones infectados con *Plasmodium*.

9. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La técnica de MC 540 resultó ser similar a Anexina V y TUNEL para evaluar la apoptosis que se presenta en bazo durante la infección con *Plasmodium* (figura 9). Este evento se ha evidenciado en ratones con la misma cepa de *P. chabaudi*, usando el método de Anexina V (Helmbly et al., 2000; Sanchez-Torres et al., 2001) el cual depende del mismo evento apoptótico que el método de MC 540, la pérdida de la asimetría de la membrana plasmática, aunque más específicamente de la exposición de la fosfatidilserina (Laakko et al., 2001). El método de TUNEL depende de la fragmentación del DNA por lo que su detección sería más tardía que los otros dos métodos (Gorczyca et al., 1992). Esto ayuda a explicar las pequeñas diferencias ocurridas sobre los días 10 y 11 post infección.

La concentración de AG utilizada no redujo el nivel basal de NO, aunque evitó el incremento observado en los ratones control infectados al día 12 post infección (figura 11); previamente se había determinado que la dosis de 300 mg/kg en cinco dosis, lograba evitar el incremento en la concentración de NO que se registraba hacia el pico de la parasitemia (Villagrán, 2003). La enzima iNOS se expresa de forma constitutiva en niveles basales bajos (Bredt et al, 1992), sin embargo los otros tipos de enzimas productoras de NO, eNOS y nNOS, son menos influenciadas por AG (Ruetter & Thiemermann, 1996), y tal vez la actividad de estas isoformas sea la causante de este nivel basal.

El tratamiento con AG inhibe la producción de NO únicamente por encima de los niveles basales, por lo que su acción solo se detectó en los días pico (Figura 11). El LPS logró incrementar la concentración de NO antes y en el pico de la parasitemia, pero no tuvo efecto en el descenso de la parasitemia cuando los ratones ya habían experimentado el pico de la concentración de NO. Este hallazgo concuerda con los resultados del grupo

de Taylor-Robinson (1996) quienes mostraron que después de la expresión de un pico en los niveles NO, en una reinfección temprana con el parásito homólogo no se generaba el incremento en la concentración de NO que se experimentaba en la primera infección.

Nuestro sistema muestra que el mayor porcentaje de apoptosis sucede casi al mismo tiempo en que la parasitemia es máxima, aunque los días anteriores también se presentan porcentajes altos de apoptosis (figura 9). Sin embargo, la concentración de NO sérico no sigue el mismo patrón de incremento que la apoptosis, ya que se mantiene en niveles bajos durante los primeros días y aún el día 11, cuando la parasitemia y la apoptosis están ya muy incrementadas. Esto sugiere que solo una parte de la apoptosis registrada, se debe a NO. En otros sistemas usando la misma cepa de parásito y ratones CB6F1 o BALB/c (Helmby et al., 2000; Sanchez-Torres et al., 2001), se encontró que el pico de apoptosis ocurre un día después del pico de la parasitemia, la cual se presenta hacia el día 9 post infección, sin embargo estos valores registran desviaciones importantes que hacen indiferenciables estos días, al igual que en nuestro sistema.

Se ha discutido al respecto de la participación de la apoptosis en la sobrevivencia de los parásitos. Algunos autores sugieren que esta apoptosis es un mecanismo de modulación de la respuesta inmune que el parásito pudiera estar generando. Otros mencionan que esta modulación es el mecanismo inherente a la respuesta inmune a través del cual se genera tanto la selección de células específicas de antígeno como el silenciamiento de la respuesta inmune (revisado por Welsh et al., 1999). De todas formas es posible que el parásito esté utilizando este evento o que éste coadyuve a su mantenimiento en el hospedero. La otra posibilidad es que la apoptosis de estos subtipos celulares no afecte a la relación hospedero – parásito. La modificación del porcentaje de células T CD4+ y CD8+ en apoptosis que se observó por los tratamientos (figuras 16 y 17), no influyó sobre la parasitemia, sin embargo es posible que esta modificación sea muy leve para tener efecto sobre ella; Aún así, queda la pregunta sobre el papel de esta apoptosis en la

infección. Primeros indicios han señalado una baja asociación entre la apoptosis y la parasitemia (Riccio et al., 2003), aunque si es posible relacionarla con la linfopenia.

El NO no modificó la cinética de la parasitemia (figura 11), este hallazgo corrobora lo descrito por Favre y colaboradores (1999) quienes también utilizaron AG para inhibir la producción de NO y no detectaron modificaciones en la parasitemia. El grupo de Taylor-Robinson (1996) ha descrito una relación entre la protección contra el estado sanguíneo de *Plasmodium* y la concentración de NO en suero. Favre y colaboradores (1997) así como Su & Stevenson (2000) encontraron que ratones knockout para IFN γ son más susceptibles a la infección por *P. chabaudi* y esta susceptibilidad se relaciona con bajas concentraciones de NO en los ratones IFN $\gamma^{0/0}$ o IFN $\gamma R^{0/0}$. Otro grupo (van der Heyde et al., 2000) encontró datos contradictorios ya que reportan que los ratones deficientes en iNOS suprimen la parasitemia con cinética similar a los ratones normales, aún eliminando la respuesta inmune mediada por anticuerpos

Previamente, el grupo de Stevenson (Stevenson et al., 1995; Jacobs et al., 1995; Jacobs et al., 1996) describió que el TNF α , el IFN γ y la IL-12 se requieren *in vivo* para activar la producción de NO durante la infección con *P. chabaudi*, y que el incremento en la producción de NO se relaciona con la protección. Adicionalmente, la producción de NO se induce en el estadio sanguíneo de malaria, en macrófagos esplénicos por una ruta que incluye TNF α e IFN γ (Ahvazi et al., 1995). De esta forma aunque el TNF α y el IFN γ están relacionados con la protección, el NO puede no estarlo, al menos directamente.

Los tratamientos con AG y LPS modificaron la concentración de NO antes de que los ratones desarrollaran el pico del NO y esto no afectó la cinética de la eliminación del parásito, sin embargo tuvieron impacto sobre la apoptosis de las células T CD4+ (d4 y d21) y de las CD8+ (d21) (figuras 16 y 17). Se ha descrito que el NO puede inhibir la proliferación de células T *in vitro* en respuesta a una variedad de estímulos incluyendo

superantígenos, productos bacterianos, tumores y aloantígenos (Bras et al, 1997; Lejeune et al., 1994; Allione et al., 1999); de hecho la exposición de células T en cultivo a SNAP (donador de NO) no solo tiene efecto antiproliferativo sino también apoptótico, sin embargo, a concentraciones menores de SNAP solo tiene efecto antiproliferativo (Mahidhara et al., 2003). Es así que su efecto sobre estas estirpes celulares correlaciona con su actividad *in vitro*, sin embargo es de notar que en el día 11 post infección (figuras 16, 17 y 18) los tratamientos no modificaron el porcentaje de apoptosis, esto sumado al hecho de que se registran valores importantes de apoptosis aún cuando no se encuentra incremento en la concentración de NO en suero, sugiere que el mecanismo por el cual sucede la apoptosis en la etapa aguda de la infección no está relacionado directamente con el incremento súbito de la concentración de NO.

La apoptosis que presentó las células T CD4+ de ratones infectados y tratados con LPS en el día 4 post infección sugiere que esta estirpe celular tiene mayor susceptibilidad al NO cuando se activan en la infección con *Plasmodium* (figura 16). Por otro lado, en el día 21, el efecto de los tratamientos fue evidente aún cuando no fue detectable ningún cambio en la concentración de NO en suero. Es posible que si sucedieran cambios pero que solo se dieran a nivel local, en el bazo, y por esta razón tuvieran efecto sobre los linfocitos T, sin modificar sustancialmente la concentración en suero.

Las células B220+ presentaron el mayor porcentaje de apoptosis en la infección, especialmente en el pico de la parasitemia y aún en la fase de descenso (figura 18), este hallazgo concuerda con el descrito por Helmbly y colaboradores (2000), pero está en desacuerdo con Sánchez-Torres y colaboradores (2001). Estos últimos discuten que la diferencia en los resultados puede ser producto de la técnica utilizada ya que ellos primero separaron los subtipos celulares con perlas magnéticas cubiertas con anticuerpos contra cada uno de los subtipos celulares estudiados, y luego evaluaron la apoptosis. El estudio presentado aquí se realizó de manera similar al realizado por Sánchez-Torres y colaboradores, ya que los porcentajes de apoptosis corresponden a la fracción de células

positivas para MC 540 de las células positivas para el marcador de fenotipo celular, y de todas formas se obtuvo un resultado similar al de Helmby y colaboradores. Es posible que al separar las células con las perlas magnéticas cubiertas con anticuerpos contra antígenos de superficie, se genera algún tipo de respuesta desencadenada por la interacción del anticuerpo y el receptor de membrana, que resultara en una respuesta diferencial de apoptosis en uno y otro tipo celular.

El porcentaje de apoptosis de las células B220+ no fue afectado por los tratamientos (figura 18). Se ha pensado que el NO podría ser un inmunomodulador de la respuesta Th1 ya que limita la amplificación de este tipo de respuesta actuando como retroalimentación negativa (Taylor-Robinson et al., 1994), además no tiene efecto sobre la producción de IL4, lo cual lleva a pensar que su acción está diseñada para favorecer el paso de la respuesta Th1 a Th2, con lo cual es concordante el hecho de no encontrar variaciones en el porcentaje de apoptosis de las células B220+ al modificar la concentración de NO.

En nuestros resultados es interesante observar que los linfocitos B presentan un porcentaje elevado de apoptosis en particular en el pico de la parasitemia, esto sugiere que existe una activación muy importante de esta población celular y que requiere mantenerse regulada para modular o silenciar la respuesta inmune, por lo que proponemos que es debido a esto que se incrementa la apoptosis de esta estirpe celular en el día 11 (figura 18). Nuestros resultados concuerdan con los descritos por varios autores los cuales describen que para poder eliminar la parasitemia que se presenta al final de la infección se requiere de la participación de los linfocitos B; además, los ratones deficientes de esta estirpe celular no pueden eliminar la parasitemia crónica con *P. chabaudi* (van der Heyde et al., 1994; Langhorne et al., 1998; Achtman et al., 2003). Por lo tanto, una vez controlada la parasitemia, el número de linfocitos B se regula por apoptosis y como consecuencia, los niveles de apoptosis de esta estirpe celular disminuyen paulatinamente en el día 21 sin llegar a los niveles basales (figuras 15 y 18).

En nuestro sistema se observa que las citocinas tanto tipo Th1 como Th2 se expresan desde un principio de la infección (figuras 19 y 20), aunque es evidente que en el día 4 predomina la expresión de TNF- α sobre la de IL-4 o IL-10; a medida que la infección transcurre se incrementa notablemente la expresión de IFN- γ , como consecuencia, el sistema inmune responde tratando de regular esta respuesta inflamatoria Th1, por lo que se aumenta la expresión de IL-10. Al final de la infección, la respuesta Th1 ya se ha abatido, por lo que IL-10 disminuye y es entonces cuando predomina la expresión de IL-4, citocina que representa a la respuesta tipo Th2 dado que esta asociada con la maduración y diferenciación de linfocitos B.

Estos hallazgos coinciden con los descritos por diversos autores (Taylor.Robinson et al., 1993; Helmby et al., 1998; Langhorne et al., 1998). Sin embargo, cuando analizamos si el incremento o la disminución en las concentraciones de NO podría modificar la expresión de estas citocinas, los resultados mostraron que el patrón de citocinas no se afectó por los tratamientos con LPS ó AG. Una probable explicación es que el patrón de citocinas que evaluamos corresponde a la expresión de RNA mensajero de todos los subtipos celulares presentes en el bazo, por lo que modificaciones en un subtipo particular podría ser enmascarado por los otros. Solo se afectaron las células T CD4+ y CD8+ en su porcentaje de apoptosis y tal vez el patrón de citocinas de estos subtipos sí se modificaron, pero no se detectó al evaluar la expresión de RNA mensajero en la totalidad de los subtipos celulares; sería necesario evaluar la expresión de citocinas por fenotipo celular. Otra posibilidad es que el impacto que pueda tener el NO pudiera no detectarse a corto plazo, para lo cual es necesario realizar experimentos de cinética de la expresión de citocinas frente al tiempo de modificación de la concentración del NO.

Esto sugiere que el óxido nítrico participa en la regulación de la respuesta inmune en malaria, durante la fase de descenso de la parasitemia. Nuestros datos proveen de nueva información sobre la compleja regulación de la respuesta inmune para el modelo de malaria murina utilizado.

10. CONCLUSIONES

- ☞ El método de Merocianina 540 es eficaz para evaluar la apoptosis que se presenta en bazo de ratones CBA/Ca infectados con *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS.

- ☞ El porcentaje de apoptosis de células de bazo en ratones infectados, es máximo en el día 11 post infección y esto correlaciona con la máxima parasitemia.

- ☞ El porcentaje de apoptosis de las células de bazo de ratones infectados, no depende de la concentración del óxido nítrico.

- ☞ El porcentaje de las células CD4+ en la fase de ascenso y de descenso de la parasitemia, y de las CD8+ en la fase de descenso, depende en parte de la concentración de óxido nítrico, y esto no tiene efecto sobre la cinética de la eliminación del parásito ni sobre el patrón de citocinas Th1 / Th2 expresado como RNA mensajero en células de bazo.

- ☞ La población de células B220+ fue la más afectada por la apoptosis y el óxido nítrico no parece relacionarse con este evento.

11. BIBLIOGRAFIA

- Achtman AH, Khan M, MacLennan IC & Langhorne J. *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection in mice induces strong B cell responses and striking but temporary changes in splenic cell distribution. *J. Immunol.* 2003 171: 317-324.
- Ahvazi B, Jacobs P & Stevenson M. Role of macrophage- derived nitric oxide in suppression of lymphocyte proliferation during blood-stage malaria. *J. Leukocyte Biol.* 1995 58: 23-29.
- Albina JE, Cui S, Mateo RB & Reichner JS. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophage. *J. Immunol.* 1993 150:5080-5085.
- Allione A, Bernabei P, Bosticardo M, Ariotti F, Forni G & Novelli F. Nitric oxide suppresses human T lymphocyte proliferation through IFN γ - dependent and IFN γ - independent induction of apoptosis. *J. Immunol.* 1999 163: 4182-4191.
- Ameisen JC & Capron A. Cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis. *Immunol Today* 1991 12: 102-105.
- Arends MJ & Wyllie AH. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol* 1991 32: 223-254.
- Baldé A, Sarthou JL & Roussilhon C. Acute *Plasmodium falciparum* infection is associated with increased percentages of apoptotic cells. *Immunol Lett.* 1995 46: 59-62.
- Beckman JS. The physiological and pathological chemistry of nitric oxide. En: Lancaster JR, ed. *Nitric Oxide: Principles and Actions*. New York, NY: Academic Press. 1996 pp. 1-82.
- Bras A, Rodríguez-Bolardo L, Gonzalez-García A & Martínez A. Nitric oxide regulates clonal expansion and activation- induced cell death triggered by staphylococcal enterotoxin B. *Infect. Immunol.* 1997 65: 4030-4037.
- Bretz D, Ferris C & Snyder S. Nitric oxide synthase regulatory sites: phosphorylation by cyclic AMP- dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin

- protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. *J. Biol. Chem.* 1992 267: 10976-84.
- Brown H & Neva F. *Parasitología clínica*. 5ª ed. México. Edit. Interamericana. 1985. pp 84-105.
 - Bruce-Chwatt LJ. History of malaria from prehistory to eradication. In Wernsdorfer WH, Mc Gregor I. ed., *Malaria: Principles and Practice of Malariology*, Vol. I. New York: Churchill Livingstone. 1988. pp 1-60.
 - Bruna-Romero O, Schmieg J, Del Val M, Buschle M & Tsuji M. The dendritic cell-specific chemokine, dendritic cell-derived CC chemokine 1, enhances protective cell-mediated immunity to murine malaria. *J. Immunol.* 2003 170: 3195-3203.
 - Brune B, Sandau K & Von Knethen A. Apoptotic cell death and nitric oxide: activating and antagonistic transducing pathways. *Biochemistry* 1998 63:817-825.
 - Brunet LR. Nitric oxide in parasitic infections. *International Immunopharmacol.* 2001 1: 1457-67.
 - Calatayud S, Barrachina MD & Esplugues JV. Nitric oxide: relation to integrity, injury and healing of the gastric mucosa. *Microsc. Res. Tech.* 2001 53: 325-335.
 - Carson D. & Ribeiro JM. Apoptosis and disease. *Lancet* 1993 341:1251-1254.
 - Cavacini LA, Long CA & Weidanz WP. T-cell immunity in murine malaria: adoptive transfer of resistance to *Plasmodium chabaudi adami* in nude mice with splenic T cells. *Infect. Immun.* 1986 52: 637-643.
 - Ceneviva GD, Tzeng E, Hoyt DG, Yee E, Gallagher A, Engelhardt JF, Kim YM, Billiar TR, Watkins SA & Pitt BR. Nitric oxide inhibits lipopolysaccharide-induced apoptosis in pulmonary artery endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 1998 274: L717-28.
 - Clark I & Schofield L. Pathogenesis of Malaria. *Parasitol. Today.* 2000 16: 451-454.
 - Cohen J & Duke R. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Ann rev. Immunol.* 1992 10: 267-293
 - Cohen S. Immunology of malaria. En: Lachman & Peters. *Clinical aspects of immunology*. Oxford. Blackwell Scientific Publications. 1984. pp 1582-1604.

- Colasanti M & Suzuki H. The dual personality of NO. Trends Pharmacol. Sci. 2000 21: 249-252.
- Corberdt, JA. & McDaniel ML. Does nitric oxide mediate autoimmune destruction of B-cells? Possible therapeutic interventions in IDDM. Diabetes. 1992 41: 897-903.
- Cox F. *Plasmodium* species; en: Malaria, Principles and Practice of Malariology. Vol 2. Edit. Wernsdorfer WH and McGregor I. Churchill Livingstone. pp 1503-1543.
- Deloron, P, Lepers, JP & Coulanges P. Evolution of the levels of soluble interleukin-2 receptors during *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria. J Clin Microbiol. 1989 27: 1887-1889.
- Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, & Zeiher A. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. Nature. 1999 399: 601-605.
- Dimmeler S & Zeiher A. Nitric oxide and apoptosis: another paradigm for the double-edged role of nitric oxide. Nitric Oxide 1997 1: 275-281.
- Farrel, AJ. Blake DR, Palmer RM, and Moncada S. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. Ann. Rheum. Dis. 1992 51: 1219-1222.
- Favila-Castillo L, Jarra W & Brown KN. The adoptive transfer of T-cell dependent immunity to *Plasmodium chabaudi chabaudi* in CBA/Ca mice is achieved only after superinfection of immune spleen cell donors. Parasite Immunol. 1990 12: 297-307.
- Favre N, Ryffel B, Bordmann G & Rudin W. The course of *Plasmodium chabaudi chabaudi* infections in IFN γ receptor deficient mice. Parasite Immunol. 1997 19: 375-382.
- Favre N, Ryffel B & Rudin W. Parasite killing in murine malaria does not require nitric oxide production. Parasitology. 1999 118: 139-148.
- Fell AH, Currier J & Good MF. Inhibition of *Plasmodium falciparum* growth in vitro by CD4+ and CD8+ T cells from non-exposed donors. Parasite Immunol. 1994 16: 579-586.

- Feshel LA, Jalowy S, Qi S, Burkart V, Hartmann B & Kolb H. Islet cell DNA is a target of inflammatory attack by nitric oxide. *Diabetes*. 1993 42: 496-500.
- Fehsel K, Droncke KD, Meyer KL, Huber H, Wahn V & Kolb-Bachofen V. Nitric oxide induces apoptosis in mouse thymocytes. *J Immunol*. 1995 155: 2858-2865.
- Forstermann U & Kleinert H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1995 352: 351-364.
- Fossati L, Merino J & Izui S. CD4+ T cells play a major role for IgM and IgG anti-DNA production in mice infected with *Plasmodium yoelii*. *Clin. Exp. Immunol*. 1990 79: 291-296.
- Freeman R & Parish R. Polyclonal B cell activation during rodent malarial infections. *Clin. Exp. Immunol*. 1978 32: 41-45.
- Frey T. Correlated flow cytometric analysis of terminal events in apoptosis reveals the absence of some changes in some model systems. *Cytometry*. 1997 28: 253-263
- Garnham P. Malaria parasites on man: life-cycles and morphology. En: *Malaria, Principles and Practice of Malariology*. Vol 1. Edit. Wernsdorfer WH and McGregor I. Churchill Livingstone. 1988. pp 61-96.
- Gilks C, Walliker D & C Newbold. Relationships between sequestration, antigenic variation and chronic parasitism in *Plasmodium chabaudi chabaudi* - a rodent malaria model. *Parasite Immunol*. 1990 12: 45-64.
- Greenwood BM. The epidemiology of malaria. *Ann. Trop. Med*. 1997 91: 763-769.
- Gold R, Schmied M, Giegerich G, Breitschopf H, Hartung H, Toyka K & Lassman H. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of *in situ* tailing and nick translation techniques. *Laboratory Investigation*. 1994 71: 219-225.
- Good MF. A malaria vaccine strategy based on the induction of cellular immunity. *Immunol. Today* 1992 13: 126-129.
- Good MF. Towards a blood-stage vaccine for malaria: are we following all the leads? *Nat. Rev. Immunol*. 2001 1: 117-125.

- Good MF & Doolan DL. Immune effector mechanisms in malaria. *Curr. Opin. Immunol.* 1999 11: 412-419.
- Good MF, Kumar S & Miller L. The real difficulties for malaria sporozoite vaccine development. Nonresponsiveness and antigenic variation. *Immunol. Today.* 1988 9: 351-355.
- Good MF, Zevering Y, Currier J & Bilosborough J. Original antigenic sin, T cell memory, and malaria sporozoite immunity: an hypothesis for immune evasion. *Parasite Immunol.* 1993 15: 187-193.
- Gorczyca W, Bruno S, Darzynkiewicz R & Darzynkiewicz Z. DNA strand breaks occurring during apoptosis: their early *in situ* detection by the terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays and prevention by serine protease inhibitors. *Internat. J. Oncol.* 1992 1: 639-648.
- Gotoh T & Mori M. Arginase II Downregulates Nitric Oxide (NO) Production and prevents NO-mediated apoptosis in murine macrophage-derived RAW 264.7 cells. *J. Cell Biol.* 1999 144: 427-434.
- Greenwood B. The epidemiology of malaria. *Ann. Trop. Med.* 1997 91: 763-769.
- Groux H, Torpier G, Monte D, Mouton Y, Capron A & Ameisen JC. Activation induced death by apoptosis from individuals. *J. Exp. Med.* 1992 175: 331-340.
- Helmby H, Jönsson G and Troye-Blomberg M. Cellular changes and apoptosis in the spleens and peripheral blood of mice infected with blood-stage *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS. *Infection and Immunity.* 2000 65: 1485-1490.
- Helmby H, Kullberg M & Troye-Blomberg M. Expansion of IL-3- responsive IL-4-producing non-B non-T cells correlates with anemia and IL-3 production in mice infected with blood-stage *Plasmodium chabaudi* malaria. *Eur. J. Immunol.* 1998 28: 2559-2570.
- Hobbs A, Higgs A and Moncada S. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999 39: 191-220.

- Iwashina M, Shichiri M, Marumo F & Hirata Y. Transfection of inducible nitric oxide synthase gene causes apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 1998 98: 1212-1218.
- Jackobsen PH, Morris-Jones S, Theander TG, Hviid L, Hansen MB, Bendtzen K, Ridley RG & Greenwood BM. Increased plasma levels of soluble IL2-R are associated with severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin. Exp. Immunol.* 1994 96: 98-103.
- Jacobs P, Radzioch D & Stevenson M. Nitric oxide expression in the spleen, but not in the liver, correlates with resistance to blood-stage malaria in mice. *J. Immunol.* 1995 155: 5603-5611.
- Jacobs P, Radzioch D & Stevenson M. *In vivo* regulation of nitric oxide production by tumor necrosis factor α and γ interferon, but not by interleukin-4, during blood-stage malaria in mice. *Infect. Immun.* 1996 64: 44-52.
- James S & Hibbs J. The role of nitrogen oxides as effector molecules of parasite killing *Parasitology Today*. 1990 6: 603-605.
- Janeway C, Travers P, Walport M & Capra J. *Immunobiology. The Immune System in Health and Disease*. Current Biology Publications. Fourth Edition. London. 1999. pp 263-305.
- Jaramillo M, Gowda DC, Radzioch D, Olivier M. Hemozoin increases IFN-gamma-inducible macrophage nitric oxide generation through extracellular signal-regulated kinase- and NF-kappa B-dependent pathways. *J. Immunol.* 2003 171: 4243-4253.
- Jarra W & Brown KM. 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.
- Jayawardena A, Targett G, Leuchars E, Carter R, Doenhoff M & Davies A. T cell activation in murine malaria. *Nature*. 1975 258: 149-151.
- Jeffrey SR & Snyder SH. Nitric oxide: a neuronal messenger. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1995 11: 417-40.

- Juedes MJ & Wogan GN. Peroxynitrite-induced mutation spectra of pSP189 following replication in bacteria and in human cells. *Mutat. Res.* 1996 349: 51-61.
- Kaneto HJ, Fujii J., Seo G, Suzuki,K, MatsuokaT, Nakamura M, Tatusmi H, Yamasaki-Kamada T, & Taniguchi N. Apoptotic cell death triggered by nitric oxide in pancreatic β -cells. *Diabetes.* 1995 44: 733-738.
- Kiechle FL and Zhang X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Clin Chim Acta.* 2002 326: 27-45.
- Krammer P, Behrmann I, Daniel P, Dhein J & Devatin M. Regulation of apoptosis in the immune system. *Curr. Opin. Immunol.* 1994 6: 279-289.
- Kubes P, Suzuki M & Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991 88: 4651-4655.
- Kubes P, Suzuki M & Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991 88: 4651-4655.
- Laakko T, King L & Fraker P. Versatility of MC540 for the flow cytometric detection of apoptosis in human and murine cells. *J Immunol. Method.* 2002 5: 35-56.
- Langhorne J, Cross C, Seixas E, Ching Li & von der Weid T. A role for B cells in the development of T cell helper function in a malaria infection in mice. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1998 95 1730-1734.
- Langhorne J, Goodier M, Behr C & Dubois P. Is there a role for T cells in malaria? *Immunol. Today.* 1992 13: 298-299.
- Langhorne J, Mombaerts P & S Tonegawa. Alpha beta and gamma delta T cells in the immune response to the erythrocytic stages of malaria in mice. *Int. Immunol.* 1995 7: 1005-1011.
- Legorreta-Herrera M & Sánchez-Cruz P. La respuesta inmune humoral contra *Plasmodium*: agente etiológico de la malaria. *Vertientes.* 1998 1: 46-52.
- Legorreta-Herrera M, Jarra W, Snounou G, Bourne T & Brown KN. Specificity in protective immunity to malaria. *Advances in Modern Biotechnology.* 1994 2: 11-18.

- Lejeune P, Lagadec P, Onier N, Pinard D, Ohshima H & Jeannin J. Nitric oxide involvement in tumor-induced immunosuppression. *J. Immunol.* 1994 152: 5077-5083.
- Levesque M, Sullivan A & Meshnick S. Splenic and hepatic hemozoin in mice after malaria parasite clearance. *J. Parasitol.* 1999 85: 570-573.
- Li J, Bombeck CA, Yang S, Kim YM & Billiar TR. Nitric oxide suppresses apoptosis via interrupting caspase activation and mitochondrial dysfunction in cultures hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 1999 274: 17325-17333.
- Liles WC. Apoptosis – role in infection and inflammation. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 1997 10: 165–170.
- Lopes MF & DosReis GA. Apoptosis as a cause of T-cell unresponsiveness in experimental Chagas' disease. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1995 28: 913-918.
- Lopes MF, Nunes MP, Henriques-Pons A, Giese N, Morse HC 3rd, Davidson WF, Aaraújo-Jorge TC & DosReis GA. Increased susceptibility of Fas ligand-deficient gld mice to *Trypanosoma cruzi* infection due to a Th2-biased host immune response. *Eur. J. Immunol.* 1999 29: 81-89.
- Mahidhara R, Hoffman R, Huang S, Wolf-Johnston A, Vodovotz Y, Simmons R & Billiar T. Nitric oxide- mediated inhibition of caspase- dependent T lymphocyte proliferation. *J. Leukocyte Biol.* 2003 74: 403-411.
- Malaguarnera L & Musumeci S. The immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet Infect. Dis.* 2002 2: 472–78.
- Martin S, Reutelingsperger C, McGahon A, Rader J, van Schie R, LaFace D & Green D. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.* 1995 182: 1545-1556.
- Martins G, Vieira L, Cunha F & Silva J. Gamma interferon modulates CD95 and CD95L expression and nitric oxide –induced apoptosis during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection: a possible role in immune response control. *Infection and Immunity.* 1999 6: 3864-3871.

- Mavoungou E, Luty AJ, Kremsner PG. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity of *Plasmodium falciparum*-infected human red blood cells in vitro. *Eur Cytokine Netw.* 2003 14: 134-42.
- Menéndez C, Fleming A & Alonso P. Malaria-related anaemia. *Parasitol. Today.* 2000 16: 469-476.
- Miller L, Good M & Milon G. Disease pathogenesis in malaria. *Science.* 1994 264: 1878-1883.
- Mohan K, Moulin P & Stevenson MM. Natural killer cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. *J. Immunol.* 1997 159: 4990-4998.
- Moncada S & Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* 1993 329: 2002-2012.
- Moncada S & Higgs A. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J.* 1995 13: 1319-1330.
- Moncada S, Palmer RM & Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 1991 43: 109-142.
- Nukaya I, Takagi K, Kawabe T & Suketa Y. Suppression of cytokine production in T helper type 2 cells by nitric oxide in comparison with T helper type 1 cells. *Microbiol Immunol.* 1995 39: 709-714.
- Ocana-Morgner C, Mota MM & Rodriguez A. Malaria blood stage suppression of liver stage immunity by dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2003 197: 143-151.
- Organización Panamericana de la Salud. Informe de la Situación de los Programas Regionales de Malaria en las Américas. CD43/IFN/1. 19 septiembre 2001. www.paho.org.
- Palmer R, Ferrige A & Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987 327: 524-526.
- Perry JA, Rush A, Wilson RJ, Olver CS & Avery AC. Dendritic cells from malaria-infected mice are fully functional APC. *J. Immunol.* 2004 172: 475-482.

- Plotkin, L & Plotkin A. En Vaccines. Edit. Plotkin SA & Mortimer EA. Saunders Co., Philadelphia. 1988. pp 1-7.
- Ramasamy R. Molecular basis for evasion of host immunity and pathogenesis in malaria. *Biochem. Biophys. Acta.* 1998 1406: 10-27.
- Riccio EK, Junior IN, Riccio LR, das Gracas-Alecrim M, Corte-Real S, Morgado M, Daniel-Ribeiro CT & de Fatima-Ferreira-da-Cruz M. Malaria associated apoptosis is not significantly correlated with either parasitemia or the number of previous malaria attacks. *Parasitol. Res.* 2003 90: 9-18.
- Ridgley EL, Xiong ZH & Ruben L. Reactive oxygen species activate a Ca²⁺ dependent cell death pathway in the unicellular organism *Trypanosoma brucei brucei*. *Bioche J.* 1999 340: 33-40.
- Ross R & Reske-Kuntz A. The role of nitric oxide in contact hypersensitivity. *Int Immunopharmacol.* 2001 1: 1469-1478.
- Rudin W, Quesniaux V, Favre N & Bordmann G. Malaria toxins from *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS and *P. berghei* ANKA cause dyserythropoiesis in C57BL/9 mice. *Parasitology.* 1997 115: 467-474.
- Ruetten H & Thiemermann C. Prevention of the expression of inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine or aminoethyl-isothiourea in macrophages and in the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996 225: 525-530.
- Ryley EM, Andersson G, Otoo N, Jepsen S & Greenwood BM. Cellular immune response to *Plasmodium falciparum* antigens in gambian children during and after an attack of acute falciparum malaria. *Clin Exp. Immunol.* 1988 73: 17-22.
- Sanchez-Torres L, Rodriguez-Ropon A, Aguilar-Medina M & Favila-Castillo L. Mouse splenic CD4⁺ and CD8⁺ T cells undergo extensive apoptosis during a *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS infection. *Parasite Immunol.* 2001 23: 617-626.
- Sayles PC & Rakhmievich L. Exacerbation of *Plasmodium chabaudi* malaria in mice by depletion of TCR $\alpha\beta$ T cells, but not TCR $\gamma\delta$ T cells. *Immunology.* 1996 87: 29-33.
- Schlegel R, Stevens M, Lumley-Sapanski K & Williamson P. Altered lipid packing identifies apoptotic thymocytes. *Immunology Letters.* 1993 36: 283-288.

- Seixas E, Cross C, Quin S & Langhorne J. Direct activation of dendritic cells by the malaria parasite, *Plasmodium chabaudi chabaudi*. Eur J Immunol. 2001 31: 2970-2978.
- Seixas E, Fonseca L & Langhorne J. The influence of gammadelta T cells on the CD4+ T cell and antibody response during a primary *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection in mice. Parasite Immunol. 2002 Mar; 24(3): 131-40.
- Sgonc R, Boeck G, Dietrich H, Recheis H & Wick G. Simultaneous determination of cell surface antigens and apoptosis. Trends Genet. 1994 10: 41-42.
- Smith NC, Fell A & Good MF. The immune response to asexual blood stages of malaria parasites. Chem. Immunol. 1998 70: 144-162.
- Smith TG, Ayi K, Serghides L, Mcallister CD & Kain KC. Innate immunity to malaria caused by *Plasmodium falciparum*. Clin Invest Med. 2002 25: 262-72.
- Steel JH, Terenghi G, Chung JM, Na HS, Carlton SM & Polak JM. Increased nitric oxide synthase immunoreactivity in rat dorsal root ganglia in a neuropathic pain model. Neurosci. Lett. 1994 169: 81-84.
- Stevenson MM, Ghadirian E, Phillips NC, Rae D & Podoba JE. Role of mononuclear phagocytes in elimination of *Plasmodium chabaudi* AS infection. Parasite Immunol. 1989 11: 529-544.
- Stuehr D & Marletta M. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985 82: 7738-7742.
- Su Z & Stevenson M. Central role of endogenous gamma interferon in protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. Infection and Immunity. 2000 68: 4399-4406.
- Tay Z, Lara A, Velasco C & Gutiérrez Q. Parasitología Médica. 5ª ed. México. Edit. Méndez. 1995. pp 157-170.
- Taylor-Robinson A. Regulation of immunity to malaria: Valuable lessons learned from murine models. Parasitol. Today. 1995 11: 334-342.

- Taylor-Robinson A & Phillips RS. Th1 and Th2 CD4+ T cell clones specific for *Plasmodium chabaudi* but not for unrelated antigen protect against blood stage *P. chabaudi* infection. *J. Immunology*. 1994 24: 158-164.
- Taylor-Robinson A, Phillips RS, Severn A, Moncada S & Liew FY. The role of Th1 and Th2 cells in a rodent malaria infection. *Science*. 1993 260: 1931-1934.
- Taylor-Robinson A, Severn A & Phillips RS. Kinetics of nitric oxide production during infection and reinfection of mice with *Plasmodium chabaudi*. *Parasite Immunol*. 1996 18: 425-430.
- Taylor-Robinson A, Liew FY, Severn A, Xu D, Mccorley SJ, Garside P, Padron J & Phillips RS. Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type 1 and T helper type 2 cells. *Eur. J Immunol*. 1994 24: 980-984.
- Troye-Blomberg M. Human T-cell responses to blood stage antigens in *Plasmodium falciparum* malaria. *Immunol. Lett*. 1994 41: 103-107.
- Theander TG, Bygbjerg IC, Jepsen S, Kharazmi A & Odum N. Suppression of parasite specific response in *Plasmodium falciparum* malaria. A longitudinal study of blood mononuclear cell proliferation and subset composition. *Scand. J. Immunol*. 1986 24: 73-81.
- Toure-Balde A, Sarthou J & Roussilhon C. Acute *Plasmodium falciparum* infection is associated with increased percentages of apoptotic cells. *Immunol. Lett*. 1995 46: 59-62.
- Toure-Balde A, Sarthour JL, Aribot G, Michel P, Trape JF, Rogier C & Roussilhon C. *Plasmodium falciparum* induces apoptosis in human mononuclear cells. *Infect Immun*. 1996 64: 744-750.
- Tsuji M, Mambaerts P, Lefrancois L, Nussenzweig RS, Zavala F & Tonegawa S. Gamma delta T cells contribute to immunity against the liver stages of malaria in alpha-beta T-cell-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994 91: 345-349.

- van der Heyde HC, Elloso MM, Chang WL, Kaplan M, Manning DD & Weidanz WP. Gamma delta T cells function in cell-mediated immunity to acute blood-stage *Plasmodium chabaudi adami* malaria. *J. Immunol.* 1995 154: 3985-3990.
- van der Heyde HC, Gu Y, Zhang Q, Sun G & Grisham M. Nitric oxide is neither nor necessary nor sufficient for resolution of *Plasmodium chabaudi* malaria in mice. *J. Immunol.* 2000 165: 3317-3323.
- van der Heyde HC, Huszar D, Woodhouse C, Manning DD & Weidanz WP. The resolution of acute malaria in a definitive model of B cell deficiency, the JHD mouse. *J. Immunol.* 1994 152: 4557-4562.
- Vaux D & Strasser A. The molecular biology of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996 93: 2239-2244.
- Verinaud L, Da Cruz-Hofling MA, Sakurada JK, Rangel HA, Vassallo J, Wakelin D, Sewell HF & Camargo IJ. Immunodepression induced by *Trypanosoma cruzi* and mouse hepatitis virus type 3 is associated with thymus apoptosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1998 5: 186-191.
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H & Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis - flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Meth.* 1995 184: 39-46.
- Villagrán LE. Participación del óxido nítrico en la regulación de la respuesta inmune en malaria. Tesis de licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo. UNAM-Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. México DF. 2003
- Wang JS, Tseng HH, Shih DF, Jou Hs & Ger LP. Expression of inducible nitric oxide synthase and apoptosis in human lupus nephritis. *Nephron.* 1997 77: 404-411.
- Wang BY, HoHK, Lin PS, Schwarzacher SP, Pollman MJ, Gibbons GH, Tsao PS & Cooke JP. Regression of atherosclerosis: role of nitric oxide and apoptosis. *Circulation.* 1999 99: 1236-1241.
- Weiss L. The spleen in malaria: the role of barrier cells. *Immunol. Lett.* 1990 25: 165-172.

- Wells RA, Pavanand K, Zollyomi S, Permapnich 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.
- Welsh R & McNally J. Immune deficiency, immune silencing, and clonal exhaustion of T cell responses during viral infections. *Curr. Opin. Immunol.* 1999 2: 382-387.
- White K, Snyder HL & Krzych U. MHC class I dependent presentation of exoerythrocytic antigens to CD8 T lymphocytes is required for protective immunity against *Plasmodium berghei*. *J. Immunol.* 1996 156: 3374-3381.
- Williams GT. Programmed cell death: a fundamental protective response to pathogens. *Trends Microbiol.* 1994 2: 463-464
- Wyler DJ. Peripheral lymphocyte populations in human falciparum malaria. *Clin. Exp. Immunol.* 1976 23: 471-476.
- Yamada K, Otabe S, Inada C, Takane N & Nonaka K. Nitric oxide and nitric oxide synthase mRNA induction in mouse islet cells by interferon- γ plus tumor necrosis factor- α . *Bioch. Bioph. Res. Comm.* 1993 197: 22-27.