



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

“PARTICIPACION DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA EXPRESIÓN
DE LAS CITOCINAS IFN- γ , TNF- α , IL-10 Y β -ACTINA EN
RATONES INFECTADOS CON *Plasmodium chabaudi* AS”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

SILVIA RIVAS CONTRERAS

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA

SEPTIEMBRE DE 2008



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.

DEDICATORIA

- ❖ A mis padres José Rosario Rivas Romero y Guadalupe Contreras Caracosa, pieza fundamental de mi formación personal y profesional; porque gracias a su esfuerzo y sacrificio, el día de hoy puedo decir, que soy una persona exitosa y de provecho. Gracias por impulsarme siempre a ser diferente.

- ❖ A mis hermanos Ma. de la Luz, Ma. Luisa, Rosario, Marisol, Rocio, Araceli, Salvador, Pepe y Lupis; y a mis sobrinas por compartir esta importante etapa de mi vida.

- ❖ A O. Daniel Castelán por su amor, apoyo y compañía a lo largo del desarrollo de este proyecto.

- ❖ A mis amigos Fabiola Jiménez, que con su sentido del humor, tolerancia y apoyo, mi estancia en la carrera fue agradable y sencilla; a Alejandro Medina porque su cariño fue un pilar importante que me mantuvo siempre de pie.

AGRADECIMIENTOS

- ❖ A la Dra. Martha Legorreta Herrera por sus enseñanzas y por la confianza depositada en mí para la realización de este trabajo.

- ❖ Al Dr. Alejandro Zentella Dehesa, a José Luis Ventura Gallegos y Guillermo Ordaz; del Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición “Salvador Zubirán” ya que gracias a su accesibilidad y apoyo para el uso del equipo de PCR en tiempo real, contribuyeron de forma importante a la realización de este trabajo.

- ❖ A cada uno de mis sinodales: Q.F.B Ma. de las Mercedes Zamudio Durán, Dra. Martha Legorreta Herrera, Q.F.B. Luz Margarita Chávez Martínez, Dr. Alberto Monrroy García y M. en C. Raquel Retana Ugalde; por sus aportaciones, para hacer que este trabajo contara con un mínimo de errores.

- ❖ Al Dr. Armando Cervantes Sandoval por su apoyo y entusiasmo en la parte estadística.

- ❖ Para la realización de este trabajo se contó con el financiamiento de: CONACYT 52782, PAPIIT 1N221104 y PAPIME PE204105.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	3
1. RESUMEN.....	4
2. INTRODUCCIÓN.....	5
3. MARCO TEÓRICO.....	7
3.1 Malaria (generalidades).....	7
3.1.1 Ciclo de vida del parásito.....	7
3.2 Respuesta celular en malaria.....	9
3.3 Citocinas en malaria.....	11
3.3.1 Interferón gamma.....	12
3.3.2 Factor de Necrosis Tumoral alfa.....	12
3.3.3 Interleucina 10.....	13
3.4 Óxido Nítrico.....	14
3.4.1 Síntesis.....	14
3.4.2 Importancia del NO.....	16
3.4.3 Papel del NO en malaria.....	17
3.5. RT-PCR en tiempo real.....	17
3.5.1 Oligonucleótidos.....	19
3.5.2 DNA blanco.....	19
3.5.3 Enzima DNA polimerasa Taq.....	20
3.5.4 Concentración de magnesio.....	20
3.5.5 Concentración de dNTP's.....	20
3.5.6 Número de ciclos.....	21
3.5.7 Temperatura de alineación.....	21
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
5. OBJETIVOS.....	24
6. HIPÓTESIS.....	25
7. MATERIAL.....	26
7.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	26
7.2 MATERIAL DE LABORATORIO.....	26
7.3 EQUIPO.....	26
7.4.1 Secuencias de los oligonucleótidos iniciadores de los genes: β -actina, IFN γ , TNF α e IL-10.....	28
8. METODOLOGÍA.....	29
8.1 Extracción de esplenocitos.....	30
8.2 Separación magnética de los fenotipos celulares de bazo.....	30
8.3 Extracción de RNA.....	31
8.1.1 Hidratación y cuantificación de RNA.....	31
8.2 Retrotranscripción.....	31
8.3 Amplificación de los genes para citocinas por PCR en tiempo real.....	33
8.4 Análisis estadístico.....	34
8.5 DIAGRAMA DE FLUJO.....	35
9. RESULTADOS.....	36
9.1 Expresión de IFN- γ	36
9.1.1. Análisis de varianza para la expresión de IFN- γ	36
9.2 Expresión de TNF- α	41
9.2.2 Análisis de varianza para los niveles de expresión de TNF- α	41
9.3 Expresión de IL-10.....	47

9.3.1 Análisis de varianza para la expresión de IL-10.....	47
10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	47
11. CONCLUSIONES.....	53
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
13. ANEXOS.....	58
13.2 Niveles de óxido nítrico con respecto a los diferentes tratamientos.....	62
13.1 Expresión de las citocinas: IFN-g, TNF-a e IL-10; en células totales de bazo....	62
13.3 Citometría de flujo del aislamiento de las subpoblaciones celulares de bazo: CD3+, CD4+ y CD8+.....	63

ABREVIATURAS

AG	Aminoguanidina
cDNA	DNA complementario
DNA	Ácido desoxirribonucleico
IFN- γ	Interferón gama
I	Infección
iNOS	Oxido nítrico sintasa inducible
iv	intravenoso
LPS	Lipopolisacárido
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NK	Célula asesina natural
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasas
<i>P.</i>	Plasmodium
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA	Ácido ribonucleico
RNI	Intermediarios reactivos del nitrógeno
RT-PCR	Retrotranscripción –PCR
Th	Células T cooperadoras
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa

1. RESUMEN

La malaria es la enfermedad infecciosa con la mayor morbilidad y mortalidad en todo el mundo, afecta principalmente a países tropicales y subtropicales.

En el presente trabajo se evaluó la participación del óxido nítrico en la respuesta inmune celular durante la infección con *Plasmodium* en un modelo experimental de malaria murina. En particular se analizó si está relacionado con la expresión de citocinas asociadas con el control de la parasitemia. Se evaluó la expresión de citocinas en relación a la expresión de β -actina como gen constitutivo, en las subpoblaciones celulares de bazo: CD3+, CD4+, CD8+ y NK+. Se indujo la sobreexpresión de la enzima iNOS con LPS y por otro lado se bloqueó la síntesis de óxido nítrico inhibiendo a la enzima con aminoguanidina. Para lo anterior se tomó en cuenta un estudio previo realizado en nuestro grupo de investigación, la expresión más alta de RNA mensajero que codifica para las citocinas IFN- γ y de IL-10 se detectó en el día 11 y para TNF- α en el día 4 postinfección, por lo que se eligieron esos días para hacer el análisis por RT-PCR en tiempo real. El tratamiento con aminoguanidina (AG), generó un decremento en la expresión de IFN- γ , TNF- α e IL-10 en todas las subpoblaciones celulares, sin embargo, el tratamiento con LPS no modificó significativamente el patrón de expresión con relación al grupo tratado con PBS, probablemente este hallazgo se deba a un mecanismo de regulación por retroalimentación. Nuestros resultados sugieren que los niveles del óxido nítrico regulan la expresión de IFN- γ , TNF- α e IL-10 en los ratones infectados con *P. chabadi* AS.

2. INTRODUCCIÓN

La malaria o paludismo es una enfermedad infecciosa con manifestaciones paroxísticas y periódicas, transmisible por mosquitos anofelinos, principalmente ubicada en los trópicos y subtropicos (Tay, 1995). Los parásitos que causan el paludismo, son miembros del género *Plasmodium* y su ciclo de vida involucra una fase asexual (en el humano o huésped intermediario) y una fase sexual (en el mosquito anofeles hembra como huéspedes definitivos) (Joklik, 1998).

De las especies de *Plasmodium* que causan malaria, sólo cuatro infectan al hombre: *Plasmodium vivax*, *P. malarie*, *P. ovale* y *P. falciparum*. En México más del 95% de los casos de malaria se originan por *P. vivax* (Tay, 1995).

Durante la infección con *Plasmodium* se activan mecanismos responsables de regular la patogenia de la infección tales como: óxido nítrico y producción de citocinas (Roitt, 2002). Las citocinas tienen una gran variedad de funciones y resultan importantes tanto en la respuesta inmune natural o innata como en la adquirida, se trata de proteínas de bajo peso molecular que estimulan o inhiben la proliferación, la diferenciación o la función de las células inmunitarias que suelen actuar de dos formas diferentes: autócrina (sobre la misma célula productora) o parácrina (sobre células cercanas) (Ramos-Ávila, 2005).

El óxido nítrico (NO), es un gas inestable (radical libre), resulta de la desaminación oxidativa de L-arginina para producir L- citrulina por una reacción catalizada por la enzima Óxido Nítrico Sintasa (NOS). Entre las diferentes isoformas de NOS, la inducible (iNOS, NOS tipo II) es responsable de la alta producción en la síntesis de NO en macrófagos y esto se induce por las citocinas proinflamatorias, tal como IFN- γ e IL-1. Como es un mensajero intracelular, el NO se ha implicado en diversos procesos fisiológicos por ej: homeostasis vascular, neurotransmisión (Jaramillo, 2003), modulación de la respuesta inflamatoria y defensa contra microorganismos (Van der Heyde, 2000). Como los metabolitos reactivos del oxígeno, el NO es una sustancia tóxica para los microorganismos intracelulares y es en

gran medida responsable de su destrucción por macrófagos activados (Rojas-Espinosa, 2001).

La iNOS incrementa la producción de NO endógeno durante el estadio sanguíneo de malaria, está demostrado que el NO está relacionado con la protección en contra de *Plasmodium chabaudi* (Robinson & Smith, 1999). En este trabajo se evaluó el efecto del NO (óxido nítrico) sobre la expresión de IFN- γ , TNF- α e IL-10 en ratones infectados con malaria, por medio de la técnica de PCR en tiempo real.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Malaria (generalidades)

La malaria humana es una enfermedad causada por un parásito del género *Plasmodium*, que se transmite al humano a través de la picadura del mosquito *Anopheles* hembra. Las características de esta enfermedad, son su naturaleza cíclica y los paroxismos febriles aumentan y disminuyen de intensidad con una periodicidad predecible (Stuart, 2000).

Diversas especies de *Plasmodium* causan infecciones en animales, pero sólo cuatro de ellas infectan a los humanos: *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. vivax*. Todas ellas son transmisibles de una persona a otra por la hembra del mosquito *Anopheles* infectada. La forma grave de paludismo que sigue un ciclo febril de 48 horas (con paroxismos en los días 1 y 3 de cada ciclo) la ocasiona *P. falciparum* y se conoce como paludismo terciano maligno o paludismo falciparo, la forma más leve con ciclo semejante y que se debe a *P. vivax*, se llama paludismo terciano benigno o paludismo vivax. La enfermedad con ciclo febril de 72 horas que produce *P. malariae* se llama paludismo cuartano o paludismo palúdico. En 1922 se descubrió que *P. ovale* es el causante del paludismo oval, aunque no hace referencia a su forma cíclica (Stuart, 2000).

3.1.1 Ciclo de vida del parásito

El ciclo biológico del parásito es muy complejo. Se presenta en dos fases: la fase sexual conocida como esporogonia que ocurre en el tracto gastrointestinal del mosquito y la fase asexual conocida como esquizogonia que se lleva a cabo en el hombre (Koneman, 1999).

El primer encuentro del huésped con la malaria comienza cuando los esporozoitos presentes en las glándulas salivales de la hembra del mosquito *Anopheles* infectada, entran al torrente sanguíneo del humano por medio de la picadura del insecto quien al introducir su proboscis hasta ubicarla en la luz de los vasos, inocular saliva, depositando así los esporozoitos en el

torrente sanguíneo, en los primeros 30 minutos de la inoculación estos esporozoitos invaden a los hepatocitos, en los cuales experimentan el ciclo de desarrollo asexual llamado esquizogonia hepática, dentro de cada hepatocito infectado crece una forma polinucleada de gran tamaño llamado esquizonte, que a continuación se divide y da lugar a los merozoitos. Los merozoitos salen de las células hepáticas hacia el torrente sanguíneo donde invaden a los eritrocitos, fijándose a las terminales glucosídicas presentes en la membrana de las glicoforinas A, B y C de los eritrocitos, para penetrar en ellos por medio de un fenómeno que ocurre a manera de una endocitosis, inducido por proteínas secretadas por el parásito que lo internalizan en un saco formado por la membrana del mismo eritrocito (Tay, 1995).

Una vez dentro del eritrocito el plasmodio inicia su fase de equizogonia eritrocítica en la que se alimenta del contenido citoplásmico del eritrocito, que en más de un 30% es hemoglobina, de cuya molécula utiliza la globina como fuente de aminoácidos, dejando la porfirina como una molécula modificada e insoluble, que se denomina hemozoína y que constituye el pigmento malárico. En la primera parte de esta etapa, el trofozoito almacena una gran cantidad de nutrientes en una vacuola que ocupa casi toda la totalidad de su citoplasma, y una mancha de cromatina, la cual le confiere la apariencia de un anillo con un rubí. Por esas características, a esta primera fase se le llama fase anular. El parásito crece, pierde su carácter vacuolado, el citoplasma se vuelve más abundante y aparecen granulaciones rojizas en el citoplasma de los eritrocitos infectados (Stuart, 2000).

Luego su núcleo se divide repetidamente produciendo un esquizonte que tiene de 6 a 24 núcleos. El esquizonte se divide y produce merozoitos uninucleados, que salen al lisarse la membrana de la célula madre y a su vez éstos lisan la membrana del eritrocito huésped y quedan así libres en el plasma armados para invadir otros eritrocitos. La rápida elevación de la temperatura y los fuertes escalofríos que son característicos de la malaria se producen en el momento en que los eritrocitos se lisan. Los merozoitos liberados infectan rápidamente a una nueva población de eritrocitos, iniciando el siguiente ciclo de fiebre y escalofrío. Dentro de algunos eritrocitos, los merozoitos se diferencian dando gametos masculinos y femeninos llamados microgametocitos y macrogametocitos respectivamente, que no rompen la célula hospedera. Estos son ingeridos por el mosquito al alimentarse de sangre.

En el intestino del insecto, los eritrocitos se lisan y los gametocitos maduran y se combinan para producir un cigoto, este último se implanta en el epitelio intestinal y da lugar al oocisto, que a su vez madura convirtiéndose en esporozoitos. Finalmente éstos emigran a la glándula salival del mosquito en espera de ser inyectados a la piel humana cuando el mosquito pica (Stuart, 2000) (Fig. 1).

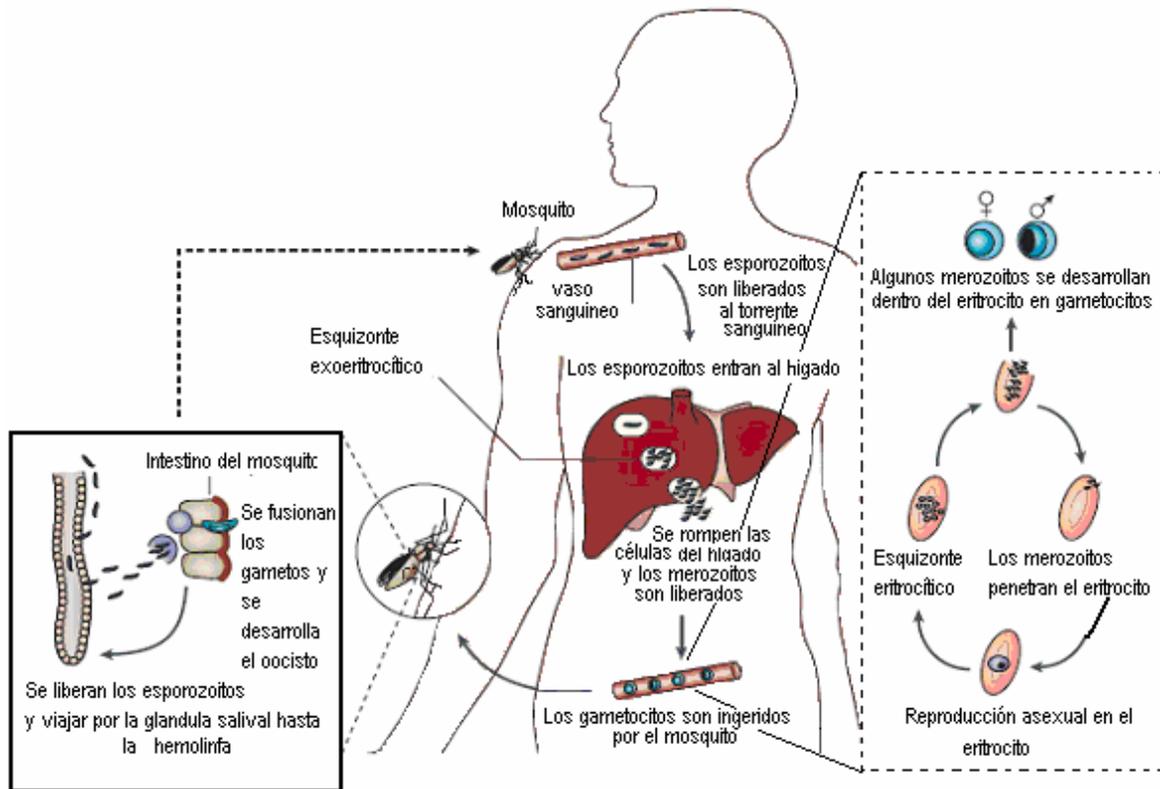


Figura 1. CICLO DE VIDA DEL *Plasmodium* (Tomado y modificado de Stevenson MM & Riley EM, 2004)

3.2 Respuesta celular en malaria

Cuando las células T cooperadoras de tipo 1 (Th1) se estimulan simultáneamente con: antígenos, citocinas de las células presentadoras de antígeno (APC) y por moléculas coestimuladoras de las APC, proliferan y producen otras citocinas que sostienen y expanden la respuesta inmunitaria. Algunas de las moléculas producidas por las células Th1, como las quimiocinas, atraen a otras células linfoides al sitio de la reacción

inmunitaria; otras citocinas como la interleucina-2 (IL-2), estimulan la proliferación de las células reclutadas; algunas como el interferón gamma (IFN- γ), activa macrófagos, y otras más como el factor de necrosis tumoral beta (TNF- β), son citolíticas (la respuesta inmune celular puede causar daño al tejido normal) (Rojas-Espinosa, 2001).

Simultáneamente a la activación de las células Th1 mediadoras de la inmunidad celular, ocurre la activación de las células T cooperadoras de tipo 2 (Th2). Las células Th2 responden a la estimulación antigénica y a las señales derivadas de las células presentadoras de antígeno, proliferando y produciendo nuevas citocinas, como IL-10 (Rojas-Espinosa, 2001).

La infección por *Plasmodium* es capaz de estimular a las células T CD4+ como las CD8+, éstas ejercen efectos protectores en diferentes fases de la infección por *Plasmodium*: las células T CD4+ intervienen en la respuesta inmunitaria frente a la fase sanguínea de *P. yoelii*, mientras que en la fase hepática de la infección por *P. berghei* son las células T CD8+ las que ejercen el efecto protector. El efecto de las células CD8+ es doble: por una parte secretan IFN- γ y por otra destruyen a los hepatocitos infectados. Los hepatocitos expresan moléculas MHC de clase I, pero no de clase II, por lo que las células CD4+ no los pueden reconocer y no se estimulan para que produzcan IFN- γ . De la misma forma, las células CD8+ no afectan a los parásitos durante la fase sanguínea porque los eritrocitos no expresan moléculas MHC de clase II (Roitt, 2002).

Los monocitos/ macrófagos son células de importancia para la eliminación del parásito y el IFN- γ es un potente activador de esas células (Philips, 1994). Cuando se activan los macrófagos son capaces de destruir la fase eritrocitaria del parásito y de secretar citocinas como TNF- α e IL-1 en respuesta a la presencia de los antígenos fosfolipídicos del parásito (Roitt, 2002).

Durante una infección primaria con *P. chabaudi* en ratones, se han logrado identificar patrones de citocinas que permiten caracterizar a la respuesta inmune durante los primeros 10 días como predominantemente Th1, también se ha observado la capacidad de activar

macrófagos y de producir una respuesta inmune inflamatoria. Sin embargo, para que el parásito se pueda eliminar completamente se requiere la participación de la subpoblación de células T CD4+ tipo Th2 (Langhorne, 1994).

3.3 Citocinas en malaria

Se denomina genéricamente citocinas al conjunto de proteínas de bajo peso molecular, a menudo glicosiladas y generalmente monoméricas (González-Regueira, 2003) producidas por una variedad de células tanto linfoides como no linfoides, y tienen varios efectos, también sobre muchas células (Rojas-Espinoza, 2001).

Las fuentes celulares de las citocinas incluyen a los monocitos/macrófagos y a las células dendríticas, además de las células T, B, fibroblastos, neutrófilos, células endoteliales, células cebadas y otras. Los blancos celulares de las diversas citocinas incluyen, entre otros, a los monocitos, macrófagos, a las células T, a las células B, a los neutrófilos, a las células hematopoyéticas de las series linfoides y mieloides, a los fibroblastos, a las células cebadas y a los eosinófilos (Regueira, 2003).

Los efectos de las citocinas incluyen la diferenciación, proliferación y activación de las “células blanco”, la expresión de receptores celulares para un sin número de ligandos y la inducción y secreción de una diversidad de otros mediadores que incluyen prostaglandinas, interleucinas, factores de crecimiento y de diferenciación, factores estimulantes de colonias, inmunoglobulinas y otros, así como la liberación de los mismos receptores solubles. En conjunto, las citocinas participan en la inducción, expresión y modulación de las respuestas inmunitarias y en el desarrollo y regulación de las respuestas inflamatorias (Rojas-Espinoza, 2001).

Algunos estudios sugieren que el balance entre citocinas proinflamatorias (TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL8) y antiinflamatorias (IL-4, IL-10) determina el grado de parasitemia en malaria (Jason, 2001).

3.3.1 Interferón gamma

El interferón gamma (IFN- γ) participa en la regulación de casi todas las fases de las respuestas inmunes e inflamatorias, incluyendo la activación y diferenciación de las células T, B, NK, macrófagos y otras. Se considera por tanto, una citocina inmunorreguladora (Parslow, 2002).

La secreción de IFN- γ representa un rasgo característico de los linfocitos Th1: también se secreta en casi todas las células CD8, algunas Th0 y en las células NK. La producción de IFN- γ se inhibe por la IL-4, la IL-10, TGF- β , glucocorticoides, ciclosporina A y FK506. El IFN- γ incrementa la expresión de proteínas clase II del MHC en las APC (células presentadoras de antígeno) profesionales y de esta manera, promueve la presentación de antígenos a células T cooperadoras (Parslow, 2002). El IFN- γ , es un potente activador de los macrófagos. La exposición a IFN- γ aumenta significativamente la actividad microbicida (en menor grado la citotóxica) de macrófagos y los estimula para secretar óxido nítrico y citocinas como la IL-1, la IL-6, la IL-8 y el TNF- α . También activa a los neutrófilos, a las células NK y a las células endoteliales vasculares. El IFN- γ actúa de manera sinérgica para promover los efectos citotóxicos del TNF- α (Rojas-Espinoza, 2001).

Se sabe que el principal blanco de IFN- γ durante la infección con malaria son los monocitos-macrófagos y los neutrófilos ya que están asociados a la respuesta principal durante una primera infección por *Plasmodium* (Philips et al., 1994). Además, en modelos murinos, se ha demostrado que para controlar la infección se requiere de la producción temprana de IFN- γ (Jason, 2001).

3.3.2 Factor de Necrosis Tumoral alfa

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) puede promover directamente el crecimiento y la diferenciación de las células B, activar a los neutrófilos y macrófagos, estimular la hematopoyesis y producir diversos efectos sobre células no hematopoyéticas. También induce la expresión de muchas otras citocinas y mediadores que promueven la inflamación, por lo tanto, se le conoce como citocina proinflamatoria; no obstante, su importancia principal en la inmunidad, se basa en su capacidad para inducir la activación de linfocitos Th por medio de células presentadoras de antígeno. Los macrófagos activados secretan esta citocina. El TNF- α actúa también sobre la célula Th aumentando la secreción de la IL-2 y la expresión de receptores de superficie para IL-2 e IFN- γ ; contribuye al inicio de las respuestas inmunes tanto humorales como celulares (Parslow, 2002).

En malaria esta citocina se produce en la fase pre-eritrocítica estimulada por antígenos parasitarios en el tiempo de ruptura del esquizonte, y en la fase eritrocítica durante la liberación de los merozoitos de los glóbulos rojos infectados. Este factor junto con las citocinas IL-1, IL-6, IL-12 e IFN- γ están involucrados en la disminución de la parasitemia en malaria, induciendo la producción de intermediarios reactivos del nitrógeno (RNI) (Long, 1993).

En combinación con IFN- γ induce altas cantidades de NO, controlando el pico de la parasitemia, mientras el tratamiento con IFN- γ , TNF- α y el LPS exhibe un fuerte sinergismo para la expresión de iNOS en macrófagos murinos (Nahrevanian, 2006).

3.3.3 Interleucina 10

La interleucina 10 (IL-10) induce la proliferación de linfocitos B, la diferenciación de células plasmáticas y la producción de inmunoglobulinas, es esencial para la maduración de anticuerpos antimalariales. Estos efectos son esperados de una citocina de tipo 2 (Jason, 2001).

La IL-10 es un inhibidor potente de las respuestas inflamatorias e inmunes, debido en parte a que inhibe la función de las APC al suprimir la expresión de moléculas clase II del MHC en células dendríticas y los macrófagos. Es un producto de las células: T CD8 y de las Th2

activadas, de las células B, monocitos y de los queratinocitos. Inhibe la producción de IL-2 e IFN- γ en las células Th1, favoreciendo así las respuestas dependientes de Th2; también inhibe la producción de citocinas en las células NK, y de especies oxígeno-reactivas, óxido nítrico y proteínas de adhesión en macrófagos (Parslow, 2002).

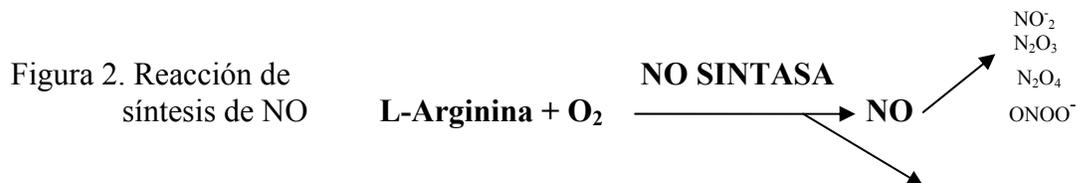
La IL-10, es una citocina que suprime o regula la respuesta inflamatoria, se ha demostrado que controla la inmunopatología en la infección severa de la enfermedad. En malaria, la IL-10 protege a los ratones infectados con *P. berghei* para desarrollar malaria cerebral por una regulación de IFN- γ y TNF- α . En las infecciones por *P. chabaudi* los ratones hembras que tienen el gen IL-10 inactivado, tienen aumentados los niveles de TNF- α e IFN- γ (Li C, et al., 2003).

3.4 Óxido Nítrico

3.4.1 Síntesis

El monóxido de nitrógeno, más comúnmente llamado óxido nítrico o simplemente NO, presenta un electrón desapareado en su orbita externa que le confiere propiedades de radical libre (Lowestein et al, 1994).

Es una pequeña molécula (30 Da) difusible en líquidos y tejidos corporales, con una vida media muy corta (de pocos segundos a algún minuto), se genera en los tejidos por sintasas específicas del óxido nítrico (NOS), que metabolizan a la arginina y al oxígeno molecular en citrulina y óxido nítrico (Fig. 2). 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, la calmodulina (Moncada & Higgs, 1993).



Existen tres diferentes isoenzimas de la NOS (Tabla 1), la neuronal (nNOS), la endotelial (eNOS) y la inflamatoria o inducible (iNOS) las cuales poseen diferentes propiedades (Titherage, 1998).

La nNOS se produce principalmente en el cerebro, la iNOS se expresa en células del sistema inmune principalmente macrófagos y neutrófilos; esta enzima juega un papel importante en la defensa antimicrobiana y por último la eNOS que se expresa por células del endotelio vascular. Es únicamente la iNOS la involucrada en la respuesta inmune en malaria (Van der Heyde, 2000).

Tabla 1. Isoenzimas de la NOS

NOS humana	Tipo de NOS	Tamaño de la proteína	Actividad enzimática
nNOS, NOS-1	Constitutiva	1433 aa, 161 kD	Ca ⁺⁺ -dependiente
iNOS, NOS-2	Inducible	1203 aa, 131 kD	Ca ⁺⁺ -independiente
eNOs, NOS-3	Constitutiva	1153 aa, 133 kD	Ca ⁺⁺ -dependiente

En situación fisiológica la actividad de esta enzima es muy baja o ausente; sin embargo cuando es inducida genera grandes cantidades de NO en forma mantenida interviniendo en múltiples acciones como infección o inflamación (Moncada et al., 1991).

La activación de las NOS constitutivas (eNOS y nNOS) para generar NO; dependen del aumento de calcio intracelular el cual forma un complejo con la calmodulina y a su vez con la eNOS o nNOs (van der Heyde, 2000); en cambio la iNOS se encuentra unida a la calmodulina y su activación es independiente de los cambios en la concentración de calcio, su regulación es a nivel transcripcional y favorece por las citocinas IL-1, TNF- α , IFN- γ y el

lipopolisacárido (LPS), IL-1b, IL-6, IFN- γ , TNF- α , el factor de crecimiento plaquetario, el factor de crecimiento fibroblasto, los agentes estimulantes de la protein-quinasa y del AMP-c. 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 isoenzimas con diferente intensidad. Actualmente se busca una inhibición selectiva y se tiene para la iNOS la aminoguanidina (AG), L-N6(1-iminoetil) lisina y derivados de la isotiurea (Hobbs et al., 1999; Ruetan & Thiernerman, 1996).

3.4.2 Importancia del NO.

Uno de sus efectos celulares más destacados es la activación de la proteína guanilato ciclasa citoplasmática soluble. 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, que se inactivan 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).

El NO también se considera como un transmisor químico, el cual puede difundir libremente a través de las membranas (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 la adhesión de los neutrófilos (Kubes et al., 1991).

En el sistema inmunológico, el NO participa de diversas formas con acciones tan diversas como agente tóxico frente a organismos infecciosos y modulando la respuesta inflamatoria (Grisham et al., 1999 - Nathan, C., and Q. W. Xie, 1994) inductor o supresor de la apoptosis (Krunke et al., 2001). La síntesis de NO durante la infección con *Plasmodium* es a través de la iNOS (Jacobs et al., 1996).

Muchos tipos de células inflamatorias y del sistema inmune expresan actividad iNOS incluyendo a: los macrófagos (Stuehr & Marletta, 1985), las células Th1, los polimorfonucleares (Taylor-Robinson, 1999) y otros tipos de células en el bazo (Jacobs P. et al., 1995). Estudios en ratones han mostrado que el NO inhibe la proliferación de células Th1 y por consiguiente bloquea la producción de IL-2, IFN- γ y de TNF- α (Taylor-Robinson, 1999).

3.4.3 Papel del NO en malaria

Como los metabolitos reactivos del oxígeno, el NO es una sustancia tóxica para los microorganismos intracelulares y es en gran medida responsable de su destrucción por macrófagos activados (Rojas-Espinoza, 2001). Inhibe la síntesis de ATP y ADN por lo que presenta una fuerte acción contra parásitos como *Plasmodium*, *Toxoplasma* y *Trypanosoma* (Roitt et al, 2001).

Cuando se inhibe su síntesis durante la infección por *Plasmodium* se incrementa la parasitemia. El NO además de tener un efecto tóxico sobre *Plasmodium* inhibe la proliferación de células Th1 por consiguiente bloquea la producción de IL-2, IFN- γ y de TNF- α (Taylor- Smith, 1999).

3.5. RT-PCR en tiempo real

La reacción en cadena de la polimerasa, cuyas iniciales en inglés son PCR (“Polymerase chain reaction”), es una técnica que desarrolló Kary Mullis a mediados de los años 80. Con esta metodología se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de DNA específico (Valasek y Repa, 2005).

La PCR es un método *in vitro* de síntesis de ADN con el que un segmento particular de éste es delimitado por un par de cebadores o iniciadores que lo flanquean. Su copiado se logra en forma exponencial a través de repetidos ciclos de diferentes periodos y temperaturas de incubación en presencia de una enzima ADN polimerasa termoestable. Así se obtienen en cuestión de horas millones de copias de la secuencia deseada del ADN (Rodríguez y Barrera, 2004). Es una técnica de biología molecular altamente específica, rápida, sensible y versátil para detectar cantidades ínfimas de un cierto DNA específico, posibilitando su fácil identificación y prescindiendo del uso de radioisótopos, indispensables antes de su invención (Rodríguez y Barrera, 2004).

La reacción consta, por lo regular, de una treintena de ciclos repetitivos conformados cada uno de tres pasos: el primero consiste en la ruptura de los puentes de hidrógeno del DNA para desnaturalizarlo, para lo que se incuba a una temperatura de alrededor de 95°C, por un minuto. Este paso expone las bases nitrogenadas del ADN blanco con los denominados cebadores o iniciadores (DNA sintético de hebra sencilla), a una temperatura que facilita el apareamiento de las bases nitrogenadas complementarias de ambas clases de DNA's. Esta temperatura depende de la de fusión (T_m) de los iniciadores, pero generalmente oscila entre 50 y 60°C. El tercer paso se efectúa a 72°C, temperatura a la que la polimerasa extiende la longitud de los cebadores, añadiendo los diferentes nucleótidos libres en el orden que le va dictando la secuencia de nucleótidos de la cadena que actúa como molde (Rodríguez y Barrera, 2004).

En la PCR en tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia que se produce

en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. Los termocicladores para llevar a cabo la PCR en tiempo real incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida por los viales donde se realiza la amplificación. Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR en tiempo real pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos (Costa, 2004).

Actualmente, existen protocolos que facilitan el montaje de la PCR por primera vez en el laboratorio. No obstante, existen situaciones en las que es necesario establecer todos los parámetros de la reacción, desde el diseño de los oligonucleótidos hasta el análisis del producto amplificado. En estas circunstancias es necesario variar cada uno de los parámetros hasta obtener condiciones óptimas para la reacción. Los parámetros a estandarizar se describen a continuación:

3.5.1 Oligonucleótidos

La secuencia de los oligonucleótidos iniciadores es responsable de la amplificación específica del fragmento deseado, y para su diseño es indispensable conocer la secuencia del DNA blanco. Es uno de los parámetros más importantes que determina la especificidad de la PCR, su elección y diseño debe ser muy cuidadoso. Idealmente, en cada 100µl de la reacción, la concentración aceptable de cada oligonucleótido oscila entre 0.05 y 1.0 µM. El uso de concentraciones mayores favorece la amplificación de regiones inespecíficas y la formación de dímeros de oligonucleótidos (Barrera, 1993; Rodríguez y Barrera, 2004).

3.5.2 DNA blanco

La PCR es tan sensible que la amplificación puede hacerse teóricamente a partir de una sola molécula de DNA. Los genes de una sola copia en el genoma se pueden amplificar fácilmente. La concentración de DNA blanco en la reacción depende de la fuente utilizada,

e idealmente se requieren aproximadamente 10^5 copias de DNA blanco, esto es, de 300 ng a 1 μ g de DNA genómico humano (Barrera, 1993; Innis-Gelfand, 1990).

3.5.3 Enzima DNA polimerasa Taq

La enzima DNA polimerasa termoestable que más se utiliza para la PCR es la DNA polimerasa *Taq* (aislada a partir de la bacteria *Thermophilus aquaticus*, que habita en aguas termales). Esta enzima tiene actividad de DNA polimerasa, de exonucleasa 3' a 5' y de exonucleasa de 5' a 3'. Su índice de error de incorporación es de 1 a 4×10^{-4} bases y amplifica sin dificultad segmentos de hasta 3000 pb (Barrera, 1993; Rodríguez y Barrera, 2004).

3.5.4 Concentración de magnesio

La concentración de iones magnesio es también importante en la especificidad de la reacción. Concentraciones muy altas conducen a una baja especificidad, lo que origina productos indeseables, mientras que las concentraciones mínimas necesarias disminuyen el índice de incorporaciones erróneas de nucleótidos. El ión Mg^{2+} se utiliza como cofactor para la actividad enzimática de la mayoría de las DNA polimerasas. Para una reacción estándar se recomienda utilizar una concentración final de $MgCl_2$ entre 0.5 y 2.5 mM (Barrera, 1993; Innis-Gelfand, 1990).

3.5.5 Concentración de dNTP's

Al igual que el $MgCl_2$, las concentraciones mínimas necesarias de dNTP's disminuyen el índice de incorporaciones erróneas de nucleótidos, mientras que concentraciones muy altas disminuyen la especificidad de la reacción, por lo que la concentración de dNTP's también

debe optimarse. Concentraciones entre 20 y 200 μ m proporcionan resultados óptimos, se debe igualar la concentración de cada uno de los cuatro dNTP's (Barrera, 1993; Innis-Gelfand, 1990).

3.5.6 Número de ciclos

Teóricamente, en condiciones óptimas el nivel de amplificación del DNA en la PCR aumenta en forma exponencial con cada ciclo; sin embargo, en la práctica, después de determinado número de ciclos, la amplificación se detiene gradualmente. Entra primero a una fase lineal y luego a una estacionaria, a la que se denomina fase de “meseta” se debe al agotamiento de la actividad enzimática y a la insuficiencia para llevar a cabo la extensión del número masivo de complejos DNA blanco-oligonucleótidos, presentes en los ciclos que anteceden a este fenómeno. Esto puede evitarse si se aumenta el tiempo de extensión en los últimos ciclos de la reacción o la cantidad de la enzima, aunque lo recomendable es ajustar el número de ciclos de tal manera que la amplificación se realice para obtener los niveles máximos de amplificación en una reacción que presente comportamiento lineal. El número de ciclos promedio oscila entre 20 y 30, dependiendo de la cantidad de DNA inicial (Barrera, 1993, Innis-Gelfand, 1990).

Las temperaturas de desnaturalización (92 a 98°C) y extensión (70 a 74°C) funcionan casi para todas las reacciones. La temperatura que tiene el efecto más crítico en la especificidad es la de alineación, la cual está determinada principalmente por la temperatura media de fusión (T_M) de los oligonucleótidos (Barrera, 1993).

3.5.7 Temperatura de alineación.

Los oligonucleótidos se aparean a una determinada temperatura de alineación por complementariedad al DNA blanco. El alto grado de complementariedad entre las bases nitrogenadas de los oligonucleótidos y del DNA blanco permite utilizar altas temperaturas de alineamiento, lo que favorece la especificidad de la reacción (Barrera, 1993; Innis-Gelfand, 1990).

Cuando la temperatura de alineación es muy baja existe mayor probabilidad de que los oligonucleótidos se apareen a regiones no específicas del DNA blanco y que también se extiendan, toda vez que la polimerasa Taq posee actividad aún a bajas temperaturas. Utilizando temperaturas de hibridación entre 55 a 65 °C se reducen grandemente los sucesos de apareamiento inespecífico (Barrera, 1993).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La malaria es la enfermedad infecciosa con el más alto índice de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, afecta principalmente a países tropicales y subtropicales. Su alta incidencia radica en que el vector ha desarrollado resistencia tanto a los insecticidas como a los medicamentos existentes; además que la respuesta inmune que genera el parásito se desarrolla de forma muy lenta, por lo que se requieren varias infecciones y aún así no es esterilizante. Existe un conocimiento incompleto de los mecanismos de la respuesta inmune que controlan la proliferación del parásito y finalmente lo eliminan, ello ha dificultado el desarrollo de una vacuna eficaz contra la malaria. Por este motivo es importante realizar investigación sobre los mecanismos que conforman la respuesta inmune encargada de inhibir la proliferación o el crecimiento y finalmente eliminar el parásito.

En la respuesta inmune contra malaria se activan: células T, células B, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y células NK, éstas a su vez secretan citocinas; las cuales gracias a su variedad de funciones son importantes en la respuesta inmune tanto innata como adquirida. Entre las funciones de TNF- α e IFN- γ , están las de activar a los macrófagos para la producción de óxido nítrico, el cual resulta del metabolismo de la L-arginina. Tanto el óxido nítrico como los intermediarios de nitrógeno se producen como parte de los mecanismos de resistencia a la infección malárica, esta molécula genera daño en las células además de tener actividad microbicida en particular el *Plasmodium* es susceptible a la actividad o al efecto del óxido nítrico y sus derivados nitrogenados.

En este trabajo para evaluar la participación del óxido nítrico sobre la expresión de las citocinas se utilizó un modelo experimental de malaria murina se indujo la sobreexpresión de la enzima iNOS con LPS y por otro lado se bloqueó la síntesis de óxido nítrico inhibiendo a la enzima con aminoguanidina (un inhibidor específico de la enzima). Para evaluar la expresión del RNA mensajero que codifica para las citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-10 se utilizó qRT-PCR (en tiempo real). Los resultados de este proyecto generaron

conocimiento en cuanto a los mecanismos que regulan la respuesta inmune contra el *Plasmodium*, lo que tiene relevancia para el futuro diseño de vacunas contra la malaria.

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

*Evaluar el efecto del óxido nítrico sobre la expresión de IFN- γ , TNF- α e IL-10 en ratones infectados con malaria.

OBJETIVOS PARTICULARES:

*Evaluar la expresión de IFN- γ , TNF- α e IL-10 por RT-PCR en tiempo real en ratones infectados con *Plasmodium chabaudi* y tratados con un inhibidor de la óxido nítrico sintasa.

*Evaluar la expresión de IFN- γ , TNF- α e IL-10 por RT-PCR en tiempo real en ratones infectados con *Plasmodium chabaudi* AS y tratados con LPS.

*Evaluar la expresión de IFN- γ , TNF- α e IL-10 por RT-PCR en tiempo real en ratones infectados con *Plasmodium chabaudi* AS.

6. HIPÓTESIS

Se ha descrito que el óxido nítrico es un modulador de la respuesta inmune dado que puede favorecer la eliminación de patógenos funcionando como radical libre lo que se ha asociado con efectos citotóxicos en moléculas como lípidos, proteínas y DNA (Van der Heyde 2001, Beckman & Koppenol,1996), en este proyecto proponemos que el óxido nítrico podría también modular la respuesta inmune modulando la expresión del RNA mensajero que codifica para las citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-10 las cuales tienen que ver con los mecanismos que activan a los macrófagos para la eliminación del parásito.

7. MATERIAL

7.1 MATERIAL BIOLÓGICO

- Ratones singénicos CBA/Ca.
- Eritrocitos de ratón parasitados con *P. chabaudi* AS, criopreservados.
- Suero normal de ratón CBA/Ca.

7.2 MATERIAL DE LABORATORIO

- Algodón.
- Cajas de Petri de 4 cm de diámetro Nunc estériles.
- Cubrebocas.
- Gorros y botas de trabajo en áreas limpias.
- Gradillas para tubos Eppendorf.
- Gradillas para tubos Falcon.
- Guantes de látex.
- Jeringas para insulina.
- Agujas de jeringa 21G.
- Placas de 96 pozos para PCR en tiempo real. Applied Biosystem
- Pinzas de disección
- Pipetas Pasteur de vidrio
- Portaobjetos.
- Puntas para micropipetas: 2.5 µl, 10 µl, 250 µl, 1000 µl, nuevas y estériles.
- Tijeras de disección
- Tubos eppendorf: 250 µl, 1.5 ml, nuevos y estériles.
- Tubos Falcon: 15 ml, 50 ml, nuevos y estériles.

7.3 EQUIPO

- Agitador, Scientific Industries, INC.
- Autoclave Brinkmann 2540M.
- Balanza analítica, Mettler H80.
- Balanza granataria, Ohaus.

- Cámara de flujo laminar, Veco.
- Centrifuga Eppendorf 5804R.
- Magneto violeta, Easy Sep
- Microcentrífuga Eppendorf 5415C.
- Micropipetas Eppendorf 2.5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl.
- Micropipetas Gilson p20, p200, p1000.
- Microscopio óptico Standard 25, Carl Zeiss.
- Nanopartículas magnéticas, Easy Sep
- Refrigerador, MayTag.
- Software Sequence Detection System 7000.
- Tanque de nitrógeno líquido 34XT, Taylor-Wharton.
- Termociclador para PCR en tiempo real ABY PRISM 7000. Applied Biosystem
- Vórtex Genie 2, Daigger.

7.4 REACTIVOS

- Agua bidestilada, Hidropura.
- Aminoguanidina, sal de hemisulfato, Sigma.
- Amortiguador para retrotranscripción 5X, Gibco BRL.
- Azul de bromofenol, Sigma.
- Bloqueador FcR para ratón. Easy Sep
- Bromuro de etidio, Sigma.
- Cocktail de selección PE. Easy Sep
- Colorante de Giemsa, Sigma.
- Dexametasona 4mg/ml Alin, Chinoin.
- Dietilpicrocarbonato (DEPC), Sigma.
- 12-dUTP conjugado con FITC, Boehringer Mannheim.
- Ditioeritritol (dTT), Gibco BRL.
- EDTA, Sigma.
- Etanol absoluto, MERCK.

- Éter, JT Backer.
- Heparina de sodio, Sigma.
- Inhibidor de RNA'sa, Gibco BRL.
- Lipopolisacárido *E. coli*, Sigma.
- Nitrato reductasa 20 U, Roche.
- Transcriptasa reversa, Promega.
- Marcador de peso molecular 50 pb, Gibco BRL.
- Metanol, JT Becker.
- Oligo dT₁₂₋₁₈, Gibco BRL.
- Reactivo marcador: CD4PE, CD8aPE, CD90.2(Thy-1.2), panNK PE. Easy Sep
- SDS, Sigma.
- Suero fetal bovino (SFB) Qualified, Gibco BRL.
- Platinum Quantitative PCR Super Mix-UDG with ROX. Invitrogen
- Trizol, Invitrogen.

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

1. β -actina

(5'a 3') : (DNA) - CGG GTC AGG TAG TCT GTC AGG TCC [JOE] G

(5'a 3') : (DNA) - CTA TGC TCT CCC TCA CGC CAT C

2. IFN- γ

(5'a 3') : (DNA) - CGG TGA GAA GAT GTT CCA TGC CAC [FAM] G

(5'a 3') : (DNA) – TCT CCT TCA GGA CAA TGT CAA ACA

3. TNF- α

(5'a 3') : (DNA) – CGG CGT TCT TTG AGA TCC ATG C [FAM]

(5'a 3') : (DNA) – CGT CGT AGC AAA CCA CCA AGT G

4. IL-10

(5'a 3') : (DNA) – CGG TTC TGG ACA ACA TAC TGC TAA C [FAM] C

(5'a 3') : (DNA) – TGG ARC ATT TCC GAT AAG GCT TG

8. METODOLOGÍA

Se utilizó un modelo experimental de malaria murina; los parásitos de la cepa *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS se prepararon a partir de estabilizados criopreservados. Se utilizaron ratones singénicos CBA/Ca machos, entre 8 - 16 semanas de edad, fueron aislados de las demás cepas singénicas de ratón, con aire agua y cama estéril, temperatura, humedad y ciclos luz/ oscuridad controlados automáticamente.

Se realizaron infecciones por inyección intravenosa (i.v.) en tres grupos de ratones (de 4 a 6 ratones por grupo), al primero se le administró LPS como inductor de iNOS (1mg/kg, intraperitoneal, tres inyecciones, una cada 24h); al segundo, el inhibidor selectivo para iNOS, aminoguanidina hemisulfato (300 mg/kg intraperitoneal, cinco inyecciones cada 12h); el tercero se mantuvo como control infectado.

Adicionalmente, a cuatro grupos de ratones sanos (4 ratones por grupo), el primero se conservó como control sano, al segundo se le suministro LPS inductor de iNOS (1mg/kg intraperitoneal, tres aplicaciones cada 24h); al tercero el inhibidor selectivo para iNOS, aminoguanidina hemisulfato (300 mg/kg intraperitoneal, cinco aplicaciones cada 12h) y al cuarto grupo la mezcla AG+LPS.

Se sacrificaron ratones de los tres grupos infectados en tiempos diferentes, al inicio de la parasitemia (día 4), en el día pico de la parasitemia (día 11) y cuando la parasitemia se había controlado (día 21).

Se realizó el análisis de la expresión de IFN- γ , TNF- α e IL-10 en las poblaciones celulares CD3+, CD4+, CD8+ y NK+; por PCR en tiempo real del producto de RT-PCR en relación a la expresión del gene constitutivo β -actina.

8.1 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.
- Se maceró el tejido haciéndolo pasar por una tela de nylon empleando PBS libre de calcio y magnesio.
- Se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min.
- Se eliminó el sobrenadante

8.2 Separación magnética de los fenotipos celulares de bazo

- Se adicionó el número* de células correspondiente en cada tubo.
- Se centrifugó a 1500 rpm por 2 min.
- Se decantó el sobrenadante
- Se adicionaron 100 μ l de amortiguador (PBS, EDTA+ SBF) en cada tubo
- Se agregó 1 μ l del FcR Blocker y 1 μ l de anticuerpo específico.
- Se dejó 30 min. En hielo protegido de la luz.
- Se lavó 10 veces su volumen con amortiguador (2ml)
- Se centrifugaron a 2500 rpm por 2 min.
- Se adicionó 10ml de Cocktail PE y se incubaron a temperatura ambiente 20 min protegidos de la luz (para NK el volumen del cocktail fue de 15 μ l)
- Se adicionaron 15 μ l de nanopartículas y se dejaron a temperatura ambiente 15 min. protegidas de la luz.
- Se ajustó a un volumen de 2.5ml.
- Se colocaron los tubos en el magneto por 5 min.
- Se lavaron 3 veces con 2ml de amortiguador
- El sobrenadante el cual contiene las células se transfirió a un tubo Eppendorf de 2.5ml etiquetado con el tipo celular y ratón del que proviene.
- La citometría del aislamiento de las células se muestra en los ANEXOS; Fig. 12.

*Número de células: T, CD4+, CD8+ y NK+ = 1×10^7

8.3 Extracción de RNA.

- A la suspensión de células obtenida, se adicionaron 500µl de reactivo de Tripure y se agitó vigorosamente.
- En un tubo eppendorf se colocaron 500µl de lisado y se adicionaron 100µl de la mezcla de cloroformo: alcohol isoamilico (49:1), se agitó en vórtex por 10 min.
- Se centrifugó a 14000 rpm por 15 min.
- Se pasó la fase acuosa a otro tubo evitando la interfase.
- Se adicionó un volumen igual de isopropanol previamente enfriado a -20°C.
- Se centrifugaron las muestras a 14000 rpm durante 15 min.
- Se desechó el sobrenadante y se adicionaron 500ml de etanol al 80% en agua DEPC enfriado previamente a -20°C.
- Se centrifugaron las muestras a 14000 rpm durante 15 min.
- Se desechó el sobrenadante
- Se dejó secar el botón a temperatura ambiente.

8.1.1 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.
- Se centrifugó a 14,000 rpm por 5 seg.
- Se colocó en un tubo eppendorf 1µl de RNA y se adicionaron 199µl de agua bidestilada millipore (dilucion 1:200).
- Se leyó la absorbancia de la solución de RNA a 260 nm.
- Se determinó la concentración del RNA por medio de la siguiente formula:

$$\text{RNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{Abs}_{260 \text{ nm}} \times 40\mu\text{g}/1000\mu\text{l} \times \text{Dilucion}$$

8.2 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

- Se determinó el volumen de agua DEPC requerido para un volumen final de 10 μ l donde:

$$\text{Vol RNA} + 1.0\mu\text{l oligo dT} + \text{Agua DEPC} = 10 \mu\text{l.}$$

- La mezcla se incubó en tubos eppendorf a 65°C por 10 min en el termociclador.
- Las muestras se colocaron hielo durante 5 min y se centrifugaron a 14,000rpm durante 5 seg.
- Se colocaron las muestras en hielo y se adicionaron 10 μ l de la mezcla de retrotranscripción (Tabla 2).

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

Reactivos	Volumen (μ l)
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

- Se incubó a 37°C por 1h en el termociclador.
- Luego a 95°C por 5 min
- Se colocó en hielo durante 5 min.; posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 seg.
- Se adicionaron 50 μ l de agua DEPC y se agitó en vórtex.
- El producto (DNA complementario, cDNA) se almacenó a -20°C hasta su análisis.

8.3 Amplificación de los genes para citocinas por PCR en tiempo real.

- Se calcularon las cantidades de los reactivos según el número de muestras.
- Se preparó la mezcla de reacción como se muestra en la Tabla 2 y 3 (conservando todos los reactivos en hielo), considerando que el volumen final debe ser de 9 μ l
- Se mezcló usando el vórtex.
- Dentro de la campana de flujo laminar se distribuyeron 9 μ l de la mezcla de reacción en cada pozo de la placa según las muestras.
- Fuera de la campana se depositó 1 ml de cDNA o retrotranscrito de cada muestra exceptuando los controles negativos, a los cuales se les adicionó 1 μ l de agua destilada para llevar a un volumen total de 10 μ L.
- Para los controles positivos se utilizó DNA obtenido a partir de ratones tratados con lipopolisacárido.

Tabla 3 y 4. Mezcla para PCR por muestra.

- Se preparó la mezcla de reacción dentro de una campana de flujo laminar, como sigue:

stock	μ l (1 Rx)	[Rx]
Agua	3,00	-
Mezcla de Rx	5,00	-
50 mM MgCl ₂	0,60	3mM
10mM oligo R	0,20	200nM
10mM oligo F	0,20	200nM
Total	9,00	

Tabla 3. IL-10, TNF- α y β actina

stock	μl (1 Rx)	[Rx]
Agua	3,2	-
Mezcla de Rx	5,00	-
50 mM MgCl ₂	0,4	2mM
10mM oligo R	0,2	200nM
10mM oligo F	0,2	200nM
Total	9,00	

Tabla 4. IFN- γ

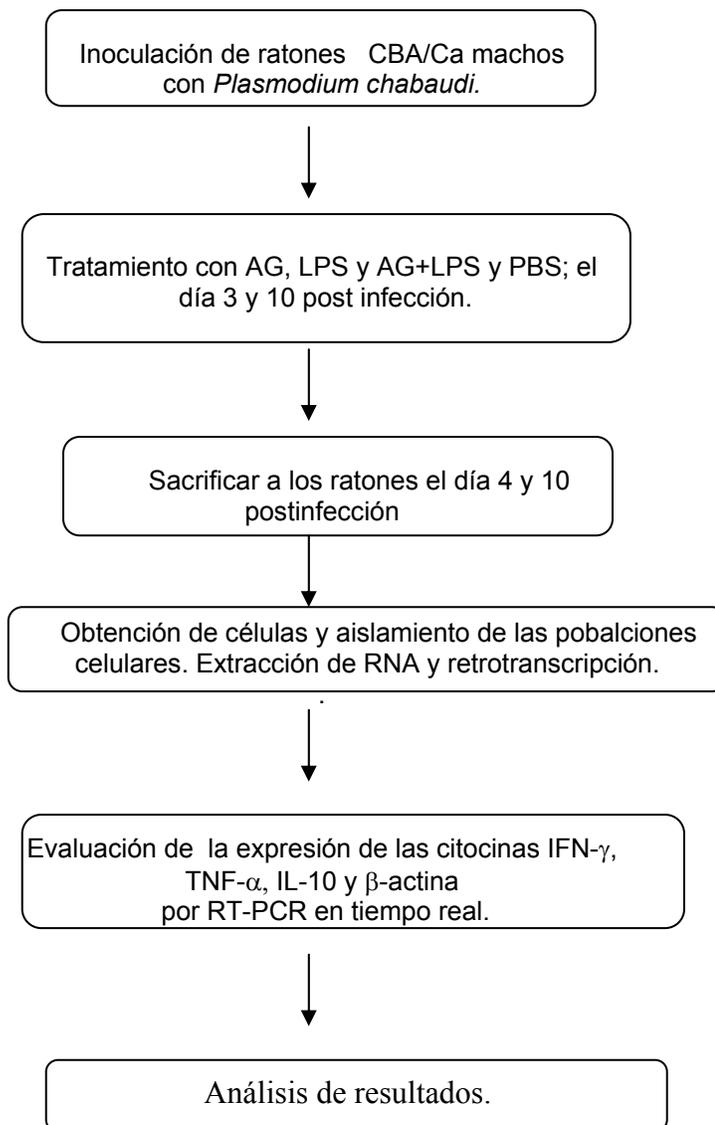
- Se centrifugó la placa durante algunos segundos para eliminar las burbujas que pudieron haberse formado.
- Se ubicó la placa con la mezcla y las muestras de cDNA en el termociclador. Se corrió el siguiente programa:

	Temperatura	Tiempo
1	50°C	2 minutos
2	95°C	2 minutos
3	95°C	30 segundos
4	60°C	45 segundos
5	72°C	45 segundos
6	Repetir de 3 a 5, 45 veces	

8.4 Análisis estadístico.

Se realizaron tres repeticiones de cada unidad experimental (ratón). El análisis de varianza factorial con efectos anidados se realizó con cuatro tratamientos: inductor (I+LPS), inhibidor (I+AG), control infectado (I+PBS) y control sin infectar. Los resultados se presentaron como el valor de las medias más el error estándar, se considera como diferencia estadísticamente significativa cuando el valor de $p < 0.05$ y cuando los valores de los intervalos de confianza no se traslapan.

8.5 DIAGRAMA DE FLUJO



9. RESULTADOS

El objetivo de este trabajo fue evaluar si el óxido nítrico participa en la regulación de la expresión de las citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10 en las células CD3+ CD4+, CD8+ y NK+ en el bazo de ratones que sufren una infección con *Plasmodium chabaudi* (I). Para lo anterior se infectaron por iv con el parásito a ratones CBA/Ca, este lote se dividió en 3 subgrupos uno se trató con aminoguanidina (AG:inhibidor de la óxido nítrico sintasa), otro con LPS (lipopolisacárido) y el otro con PBS en los días que previamente se había detectado la mayor expresión de esas citocinas. Se sacrificaron los ratones, se extrajo el bazo y por separación magnética se aislaron los diferentes fenotipos de las células de bazo, se sometieron a extracción de RNA, se trataron con DNAsa y se retrotranscribieron 1.5 μ g de RNA mismos que se utilizaron para amplificar a las citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10 por PCR en tiempo real.

En un análisis realizado previamente en el laboratorio, se detectó que los niveles más altos de expresión de TNF- α en las células totales de bazo se presentaron en el día 4 postinfección y para las citocinas IFN- γ e IL-10 fue en el día 11, por tal motivo esos días se eligieron para evaluar la expresión de dichas citocinas.

9.1 Expresión de IFN- γ

9.1.1. Análisis de varianza para la expresión de IFN- γ

Fuentes de variación	Valor de p
Células	0.00001
Tratamiento	0.00001
Células*Tratamiento	0.00001
Muestras (Tratamiento)	0.00010

Tabla 5. Análisis de varianza para la expresión de IFN- γ .

Un valor de p que es menor de 0.05 indica que hay diferencia en la expresión de IFN- γ referente a el tipo de célula; los diferentes tratamientos (I+AG, I+LPS, I+PBS, AG, LPS, PBS, AG+LPS) y la interacción que hay entre el tipo de célula y los diferentes tratamientos (Tabla 5).

Expresión de IFN- γ en el día 11 postinfección con *Plasmodium chabaudi*

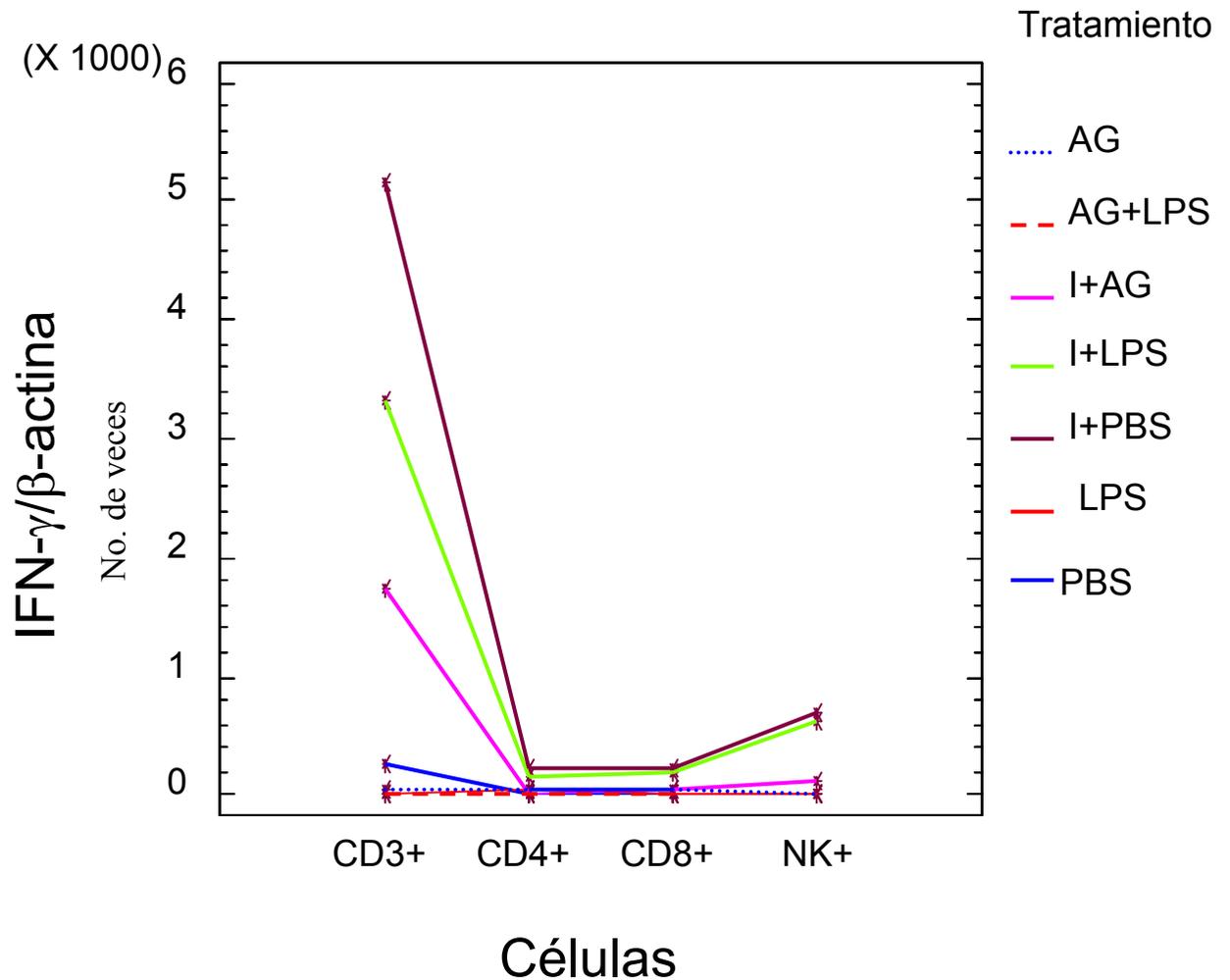


Figura 3. Expresión de IFN- γ en las células de bazo: CD3+, CD4+, CD8+ y NK+ de ratones infectados (I) y que recibieron el tratamiento con: aminoguanidina (AG), Lipopolisacárido (LPS), Amortiguador de fosfatos salino (PBS) y la combinación de AG+LPS en el día 10 y se analizaron en el día 11 postinfección con *P. chabaudi*. Los valores en el eje de las ordenadas representan unidades relativas (No. de veces) de la relación de expresión de IFN- γ con respecto a la de β -actina.

En el día 11 postinfección, el tratamiento con aminoguanidina disminuyó los niveles de expresión de IFN- γ en las poblaciones celulares analizadas (CD3+, CD4+, CD8+ y NK+), es interesante el hallazgo de que el tratamiento con LPS no indujo la sobreexpresión de esta citocina en las subpoblaciones evaluadas, de hecho, se detectó una disminución en relación a los ratones infectados y tratados con PBS. En todas las subpoblaciones celulares analizadas el nivel máximo de expresión de IFN- γ se detectó en el grupo tratado con PBS. La infección con el parásito indujo un incremento notorio en la expresión de IFN- γ en relación a los ratones control que no se infectaron (Figura3).

La expresión de IFN- γ , en los controles no infectados fue muy baja, aún en el grupo que se trató con LPS; sólo se observa que hubo un aumento en el nivel de expresión para IFN- γ en las células CD3+ para los ratones tratados con PBS(Figura3)

Expresión de IFN- γ en el día 11 postinfección con *Plasmodium chabaudi*

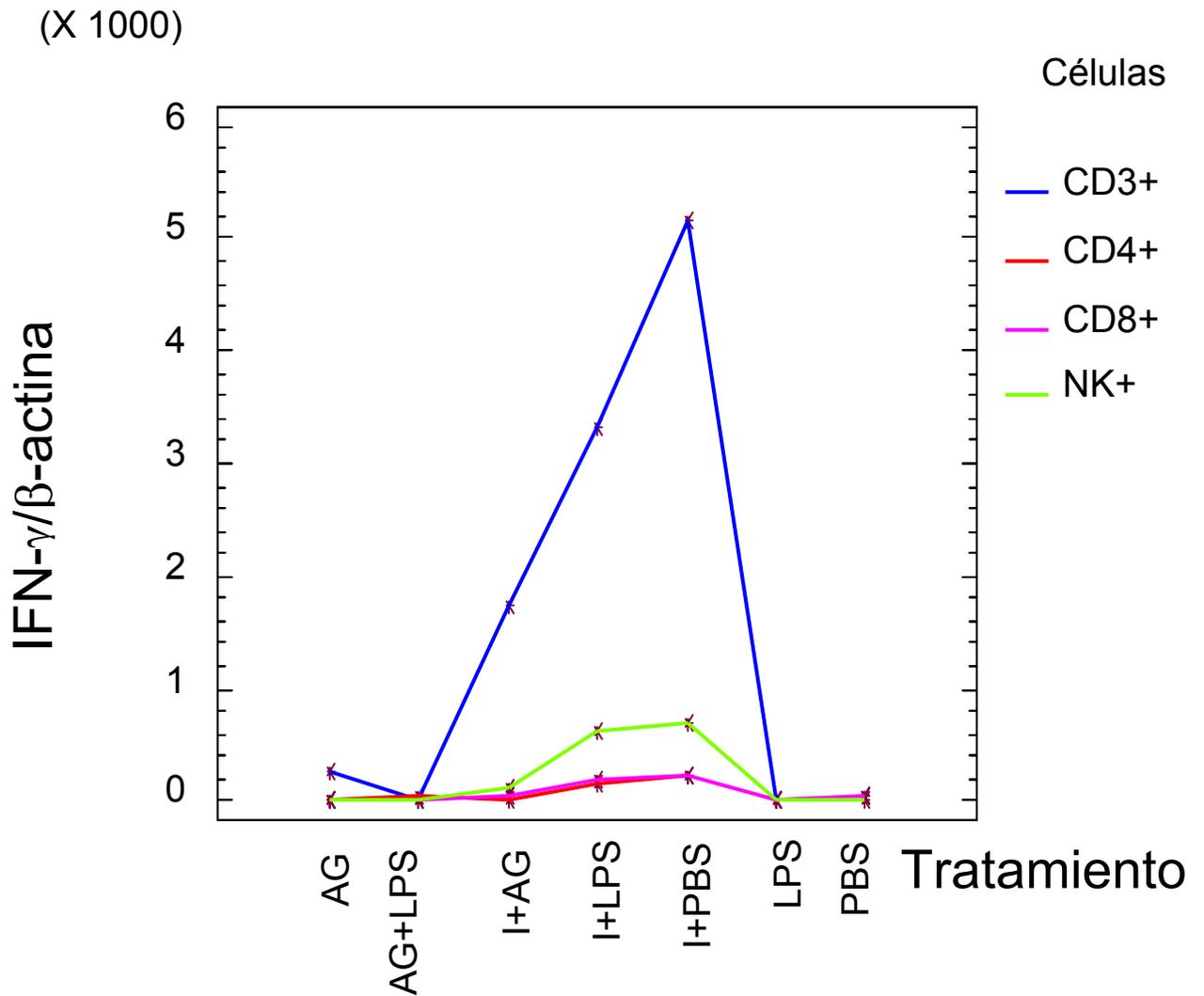


Figura 4. Expresión de IFN- γ en las células de bazo: CD3+, CD4+, CD8+ y NK+ de ratones infectados (I) y que recibieron el tratamiento con: aminoguanidina (AG), Lipopolisacárido(LPS), Amortiguador de fosfatos salino (PBS) y la combinación de AG+LPS en el día 10 y se analizaron en el día 11 postinfección con *P. chabaudi*. Los valores en el eje de las ordenadas representan unidades relativas (No. de veces) de la relación de expresión de IFN- γ con respecto a la de β -actina.

La población celular que más contribuyó en el incremento de IFN- γ en el día 11 postinfección fue la que corresponde a las células CD3+, se detectó una diferencia estadísticamente significativa, en los ratones infectados ya sea tratados con PBS, tratados con LPS o con el inhibidor de la iNOS (Figura 2).

Tabla de mínimos cuadrados

Factores de estudio	n	Media	Error Std	Límite Inferior	Límite Superior	Diferencia	
Células							
CD3+	85	1510.59	146.158	1222.99	1798.18	B	
CD4+	91	75.4517	138.779	-197.624	348.528	A	
CD8+	92	80.5712	137.879	-190.733	351.875	A	
NK+	92	218.16	137.879	-53.1438	489.464	A	
Tratamientos							
AG	48	78.5835	188.858	-293.032	450.2	A	
AG+LPS	48	24.8269	188.858	-346.789	396.443	A	
I+AG	46	484.372	194.333	101.982	866.762	A	
I+LPS	54	1072.45	180.004	718.261	1426.65	B	
I+PBS	71	1581.24	155.421	1275.42	1887.06	B	
LPS	48	21.1922	188.858	-350.424	392.808	A	
PBS	45	35.6764	199.074	-356.041	427.394	A	
Células por tratamiento							
CD3+	AG	12	264.732	377.716	-478.5	1007.96	A
CD3+	AG+LPS	12	27.2376	377.716	-715.994	770.47	A
CD3+	I+AG	10	1732.58	419.808	906.522	2558.63	B
CD3+	I+LPS	13	3323.22	367.783	2599.53	4046.9	C
CD3+	I+PBS	17	5145.41	318.044	4519.6	5771.23	D
CD3+	LPS	12	28.0137	377.716	-715.218	771.246	A
CD3+	PBS	9	52.9063	453.958	-840.347	946.16	A
CD4+	AG	12	12.7259	377.716	-730.506	755.958	A
CD4+	AG+LPS	12	55.679	377.716	-687.553	798.911	A
CD4+	I+AG	12	14.6504	377.716	-728.582	757.882	A
CD4+	I+LPS	13	148.188	367.783	-575.498	871.874	A
CD4+	I+PBS	18	237.268	308.404	-369.579	844.114	A
CD4+	LPS	12	25.5888	377.716	-717.643	768.821	A
CD4+	PBS	12	34.0623	377.716	-709.17	777.294	A
CD8+	AG	12	20.0739	377.716	-723.158	763.306	A
CD8+	AG+LPS	12	7.14545	377.716	-736.087	750.378	A
CD8+	I+AG	12	54.975	377.716	-688.257	798.207	A
CD8+	I+LPS	14	199.208	350.796	-491.052	889.469	A
CD8+	I+PBS	18	236.14	308.404	-370.706	842.987	A
CD8+	LPS	12	8.70646	377.716	-734.526	751.939	A
CD8+	PBS	12	37.7489	377.716	-705.483	780.981	A
NK+	AG	12	16.8027	377.716	-726.429	760.035	A
NK+	AG+LPS	12	9.24537	377.716	-733.987	752.477	A
NK+	I+AG	12	135.285	377.716	-607.947	878.517	A
NK+	I+LPS	14	619.204	350.796	-71.0566	1309.46	A
NK+	I+PBS	18	706.137	308.404	99.2907	1312.98	A
NK+	LPS	12	22.4599	377.716	-720.772	765.692	A
NK+	PBS	12	17.988	377.716	-725.244	761.22	A

Tabla 6. Expresión de IFN- γ en las células de bazo: CD3+, CD4+, CD8+ y NK+ de ratones infectados (I) y no infectados, tratados en el día 10 con: aminoguanidina (AG), Lipopolisacárido(LPS) ó Amortiguador de fosfatos salino (PBS) y la combinación de AG+LPS y analizados el día 11 postinfección. con *P. chabaudi*. **A, B, C y D**; indican que hay diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de IFN- γ . P.ej. **A** comparada con la **A** o con la **B** del siguiente renglón alineadas en la misma columna indica que sus intervalos de confianza se traslapan y que por lo tanto no existe una diferencia estadísticamente significativa entre **A** y **B**. Pero si **A** no está alineada con **B** indica que sus intervalos de confianza no se traslapan y que por lo tanto existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

Para analizar si existe diferencia entre la expresión de IFN- γ de cada una de las subpoblaciones celulares, con relación al tratamiento y la combinación de ambas, se realizó la prueba de mínimos cuadrados. Nuevamente detectamos que la subpoblación de células CD3+ fué la que presentó los niveles de expresión de IFN- γ más altos y que la contribución de las otras subpoblaciones (CD4+, CD8+ y NK+) es baja y sus intervalos de confianza se traslapan unos con otros; de este modo se detectó que existen diferencias estadísticamente significativas con respecto a la población CD3+.

En relación a los tratamientos, se detectó que los niveles más altos de expresión de IFN- γ correspondieron a los obtenidos en ratones infectados, ya sea tratados con LPS o con PBS y que estos niveles fueron similares entre ambos grupos.

En la subpoblación CD3+ se detectaron diferencias en los niveles de expresión de IFN- γ dependiendo si los ratones que recibieron el tratamiento estaban o no infectados. La expresión más alta se presentó en el grupo de ratones infectados y tratados con PBS.

El efecto de los diferentes tratamientos sobre la contribución a la expresión total de IFN- γ de las otras subpoblaciones (CD4+, CD8+ y NK+) mostró diferencias mínimas que no resultaron estadísticamente significativas.

9.2 Expresión de TNF- α

9.2.2 Análisis de varianza para los niveles de expresión de TNF- α

Fuentes de variación	Valor-p
Células	0.00260
Tratamiento	0.00001
Células*Tratamiento	0.00001
Muestras (Tratamiento)	0.00010

Tabla 7 Análisis de varianza para la expresión de TNF- α .

Un valor de p que es menor de 0.05 indica que hay diferencia en la expresión de TNF- α referente a el tipo de célula; los diferentes tratamientos (I+AG, I+LPS, I+PBS, AG, LPS, PBS, AG+LPS) y la interacción que hay entre el tipo de célula y los tratamientos (Tabla 7).

Expresión de TNF- α en el día 4 postinfección con *Plasmodium chabaudi*

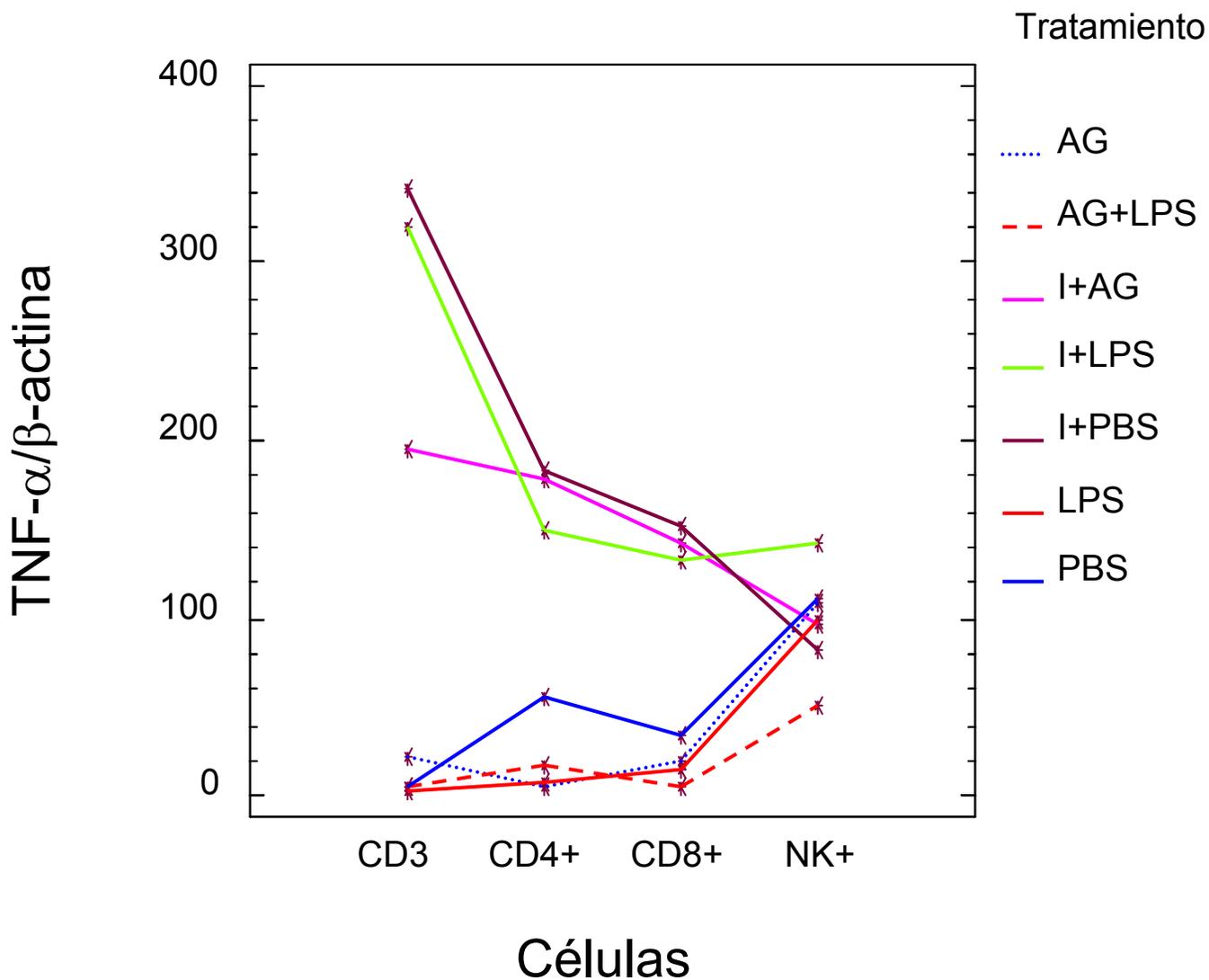


Figura 5. Expresión de TNF- α en las células de bazo: CD3+, CD4+, CD8+ y NK+ de ratones infectados (I) y que recibieron el tratamiento con: aminoguanidina (AG), Lipopolisacárido(LPS), Amortiguador de fosfatos salino (PBS) y la combinación de AG+LPS en el día 3 y se analizaron en el día 4 postinfección con *P. chabaudi*. Los valores en el eje de las ordenadas representan unidades relativas (No. de veces) de la relación de expresión de IL-10 con respecto a la de β -actina.

Al comparar el efecto de los diferentes tratamientos en los ratones infectados con respecto a las subpoblaciones celulares, se detectó que el tratamiento con aminoguanidina disminuyó los niveles de expresión de TNF- α en la subpoblación CD3+, mientras que en las subpoblaciones CD4+, CD8+ y NK+ no se detectó ningún cambio. Cuando los ratones infectados se trataron con LPS, se incrementaron los niveles de expresión de TNF- α en las células NK+, mientras que en las poblaciones celulares CD3+, CD4+ y CD8+ se detectó una disminución en la expresión de este gen. En general, los niveles de expresión más altos se detectaron en el grupo de ratones infectados y tratados con PBS (Figura 5).

La expresión de TNF- α , en los controles no infectados fue muy baja, aún en el grupo que se trató con LPS, sólo se observó un pequeño aumento en el nivel de expresión de ésta citocina en las células CD4+ en los ratones tratados con PBS, y en las células NK en donde los diferentes tratamientos no modificaron los niveles de expresión de TNF- α aun en los ratones infectados.

Expresión de TNF- α en el día 4 postinfección con *Plasmodium chabaudi*

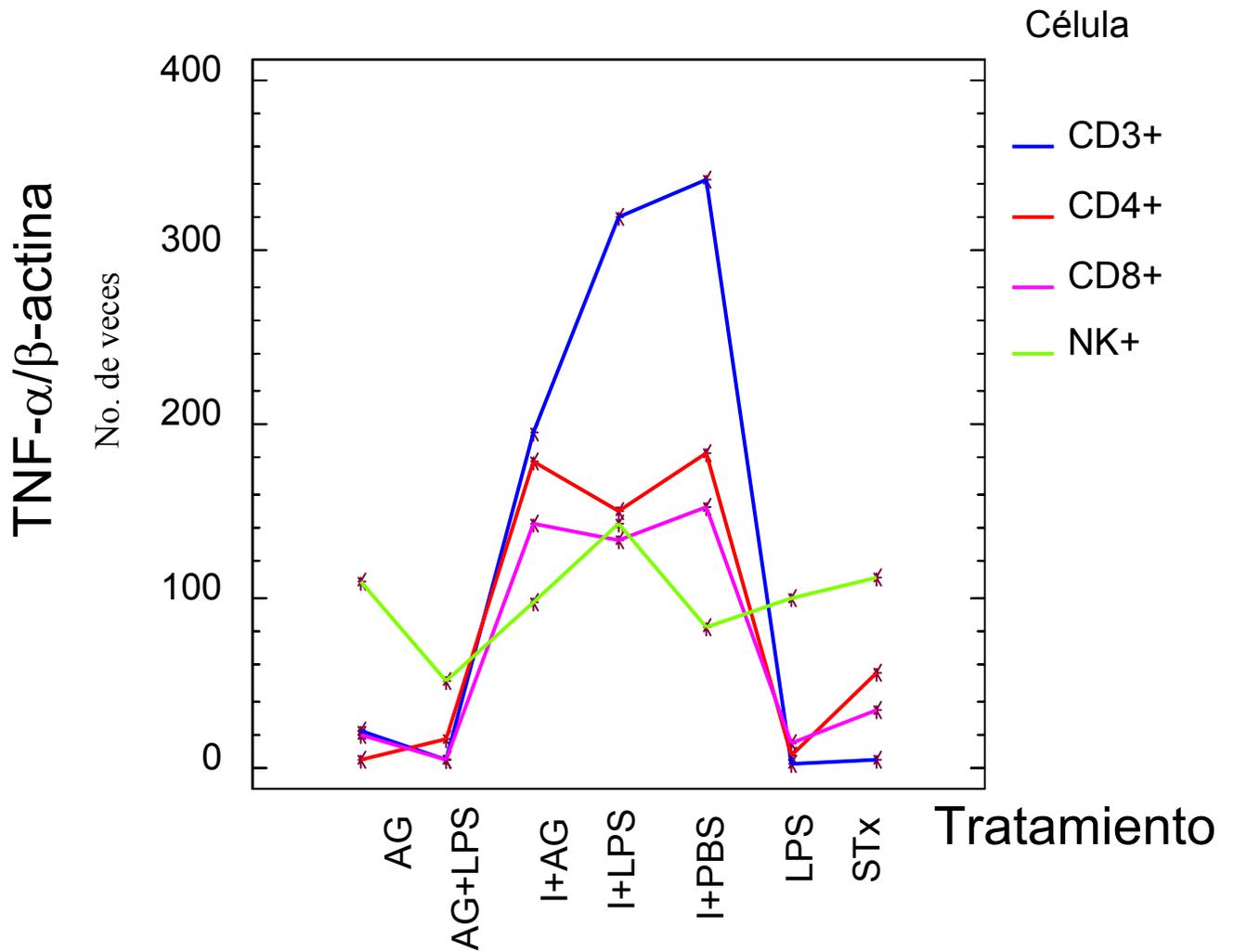


Figura 6. Expresión de TNF- α en las células bazo: CD3+, CD4+, CD8+ y NK+ de ratones infectados (I) y que recibieron el tratamiento con: aminoguanidina (AG), Lipopolisacárido(LPS), Amortiguador de fosatos salino (PBS) y la combinación de AG+LPS en el día 3 y se analizaron en el día 4 postinfección con *P. chabaudi*. Los valores en el eje de las ordenadas representan unidades relativas (No. de veces) de la relación de expresión de TNF- α con respecto a la de β -actina.

Para analizar la subpoblación celular que más contribuye a los niveles de TNF- α en los grupos de ratones infectados dependiendo del tratamiento se realizó el gráfico de interacción. Aparentemente, las células CD3⁺ son las que más contribuyeron al incremento de TNF- α . Se detectó una ligera diferencia de mayor contribución de las células CD3⁺ con respecto a las demás poblaciones; con la única que tiene diferencia significativa es con la población CD8⁺ (Figura 6), sin embargo para las demás poblaciones (CD4⁺ y NK⁺) esta diferencia no resultó ser estadísticamente significativa, tanto en los ratones tratados con PBS, LPS como a los que se les administró el inhibidor de iNOS, (tabla 8).

Tabla de mínimos cuadrados

Factores de estudio		n	Media	Error Std	Límite Inferior	Límite Superior	Diferencia
Células							
CD3+		84	127.741	10.7614	106.559	148.923	B
CD4+		82	85.6045	10.9407	64.0692	107.14	A
CD8+		83	71.916	10.8361	50.5867	93.2454	A
NK+		84	98.6396	10.7614	77.4574	119.822	A
Tratamientos							
AG		48	39.1717	14.236	11.1503	67.1932	A
AG+LPS		48	19.9321	14.236	-8.08934	47.9536	A
I+AG		48	153.658	14.236	125.636	181.679	B
I+LPS		47	185.749	14.4085	157.388	214.11	B
I+PBS		46	189.92	14.6487	161.086	218.753	B
LPS		48	31.6178	14.236	3.59635	59.6393	A
PBS		48	51.7792	14.236	23.7577	79.8006	A
Células por tratamiento							
CD3+	AG	12	22.5609	28.4719	-33.482	78.6038	A
CD3+	AG+LPS	12	5.50585	28.4719	-50.5371	61.5487	A
CD3+	I+AG	12	195.604	28.4719	139.561	251.647	A
CD3+	I+LPS	12	319.445	28.4719	263.402	375.488	B
CD3+	I+PBS	12	342.148	28.4719	286.106	398.191	B
CD3+	LPS	12	3.76898	28.4719	-52.2739	59.8119	A
CD3+	PBS	12	5.15441	28.4719	-50.8885	61.1973	A
CD4+	AG	12	4.48291	28.4719	-51.56	60.5258	A
CD4+	AG+LPS	12	17.3506	28.4719	-38.6923	73.3935	A
CD4+	I+AG	12	179.216	28.4719	123.173	235.259	B
CD4+	I+LPS	12	150.019	28.4719	93.9761	206.062	B
CD4+	I+PBS	10	183.311	31.6448	121.023	245.599	B
CD4+	LPS	12	8.45266	28.4719	-47.5902	64.4956	A
CD4+	PBS	12	56.399	28.4719	0.356071	112.442	A
CD8+	AG	12	20.6933	28.4719	-35.3496	76.7362	A
CD8+	AG+LPS	12	6.43453	28.4719	-49.6084	62.4774	A
CD8+	I+AG	12	142.827	28.4719	86.7845	198.87	B
CD8+	I+LPS	11	132.029	29.8285	73.3154	190.742	B
CD8+	I+PBS	12	150.989	28.4719	94.946	207.032	C
CD8+	LPS	12	15.6573	28.4719	-40.3856	71.7002	A
CD8+	PBS	12	34.7823	28.4719	-21.2606	90.8252	A
NK+	AG	12	108.95	28.4719	52.9069	164.993	A
NK+	AG+LPS	12	50.4375	28.4719	-5.60542	106.48	A
NK+	I+AG	12	96.9831	28.4719	40.9402	153.026	A
NK+	I+LPS	12	141.504	28.4719	85.4606	197.546	A
NK+	I+PBS	12	83.2302	28.4719	27.1873	139.273	A
NK+	LPS	12	98.5922	28.4719	42.5493	154.635	A
NK+	PBS	12	110.781	28.4719	54.738	166.824	A

Tabla 8. Expresión de TNF- α en las células de bazo:CD3+, CD4+, CD8+ y NK+ de ratones infectados (I) y no infectados, tratados en el día 3 con: Aminoguanidina (AG), Lipopolisacárido(LPS), Amortiguador de fosfatos salino (PBS) y la combinación de AG+LPS analizados el día 4 postinfección con *P. chabaudi*. A, B y C; indican que hay diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de IFN- γ . P.ej. A comparada con la A o con la B del siguiente renglón alineadas en la misma columna indica que sus intervalos de confianza se traslapan y que por lo tanto no existe una diferencia estadísticamente significativa entre A y B. Pero si A no esta alineada con B indica que sus intervalos de confianza no se traslapan y que por lo tanto existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

Los niveles de expresión de TNF- α fue similar en las subpoblaciones CD3+, CD4+, CD8+ y NK+. En la subpoblación CD3+ se detectó una diferencia estadísticamente significativa

con relación a las células CD8+, sin embargo cuando los resultados se compararon con las demás subpoblaciones (CD4+, NK), la diferencia no fue estadísticamente significativa (Tabla 8).

Los tratamientos con AG, LPS y PBS sólo modificaron significativamente los niveles de expresión de TNF- α en los ratones infectados. El tratamiento con AG en estos ratones disminuyó los niveles de esta citocina, mientras que no se detectó diferencia estadísticamente significativa entre los grupos tratados con LPS o PBS.

Únicamente en la subpoblación CD3+ se detectaron diferencias entre los grupos de ratones infectados tratados con LPS y con PBS con respecto a los demás tratamientos.

Cuando se analizaron las contribuciones a la expresión total de TNF- α de las subpoblaciones CD4+ y CD8+ en los grupos de ratones infectados y tratados con AG, LPS y PBS, se observaron niveles más elevados con respecto a los grupos control de ratones no infectados y tratados de la misma forma, en estos últimos grupos no detectamos diferencia en los niveles de expresión de TNF- α .

La expresión de TNF- α en la subpoblación NK+ no se afectó cuando los ratones se sometieron a los diferentes tratamientos (Tabla 8).

9.3 Expresión de IL-10

9.3.1 Análisis de varianza para la expresión de IL-10

Fuentes de variación	Valor-p
Células	0.00001
Tratamiento	0.00001
Células*Tratamiento	0.42870
Muestras (Tratamiento)	0.00001

Tabla 9 Análisis de varianza para la expresión de IL-10.

Un valor de p que es menor de 0.05 indica que hay diferencia en la expresión de IL-10 referente a el tipo de célula y los diferentes tratamientos (I+AG, I+LPS, I+PBS, AG, LPS, PBS, AG+LPS). La interacción que existe entre el tipo de células y los tratamientos no muestra diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a este análisis (Tabla 9).

Expresión IL-10 en el día 11 postinfección con *Plasmodium chabaudi*

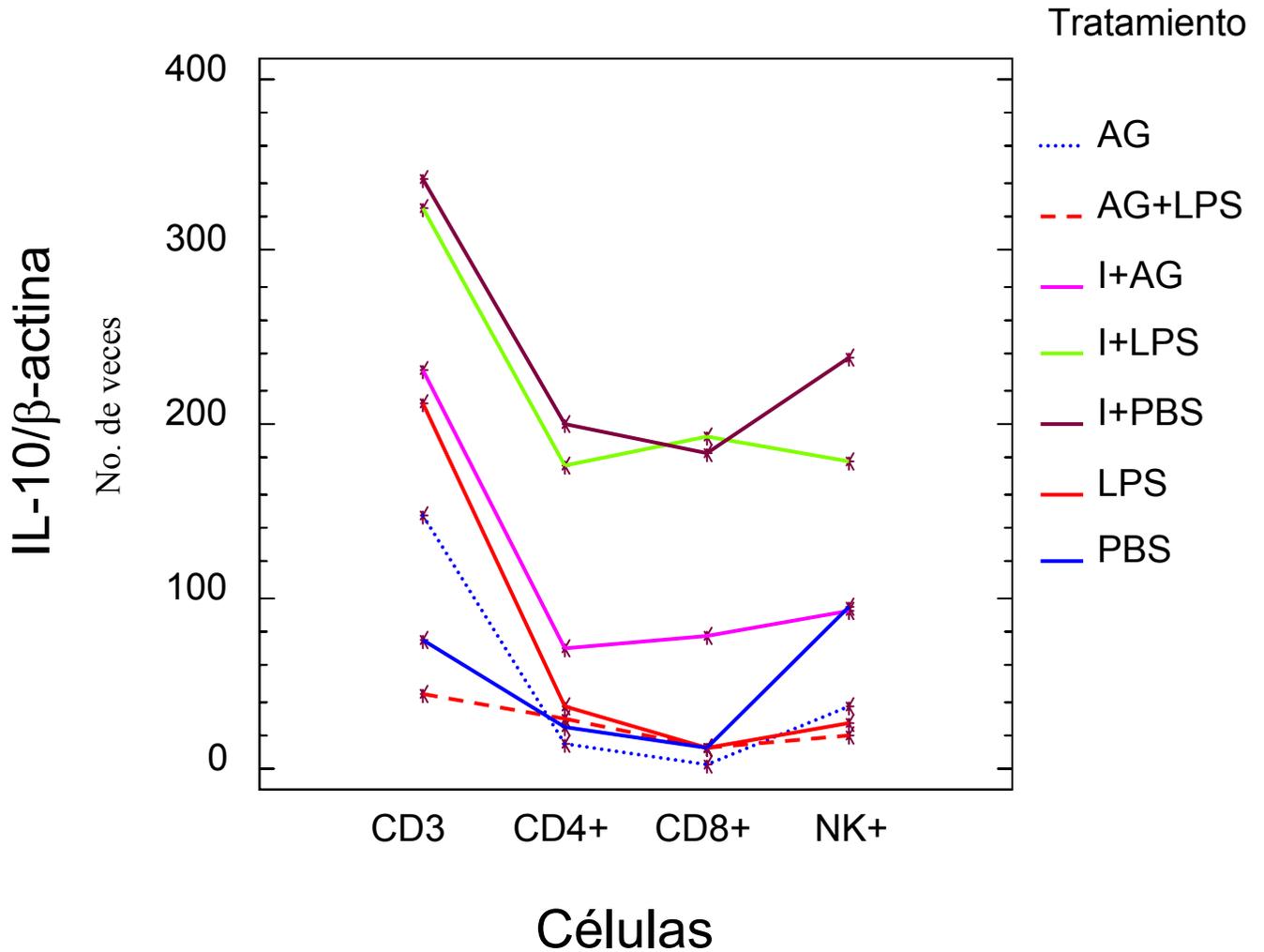


Figura 7. Expresión de IL-10 en las células de bazo: CD3+, CD4+, CD8+ y NK+ de ratones infectados (I) y que recibieron el tratamiento con: aminoguanidina (AG), Lipopolisacárido(LPS), Amortiguador de fosfatos salino (PBS) y la combinación de AG+LPS en el día 10 y que se analizaron en el día 11 postinfección con *P. chabaudi*. Los valores en el eje de las ordenadas representan unidades relativas (No. de veces) de la relación de expresión de IL-10 con respecto a la de β-actina.

En el día 11 postinfección con *P. chabaudi*, el tratamiento con aminoguanidina disminuyó los niveles de expresión de IL-10 en las poblaciones celulares analizadas (CD3+, CD4+, CD8+ y NK+), es interesante el hallazgo de que el tratamiento con LPS no indujo la sobreexpresión de esta citocina en las subpoblaciones evaluadas, de hecho, se detectó una disminución en relación a los ratones infectados y tratados con PBS. En todas las subpoblaciones celulares analizadas el nivel máximo de expresión de IL-10 se detectó en el grupo tratado con PBS. La infección con el parásito indujo un incremento notorio en la expresión de IL-10 en relación a los ratones control que no se infectaron (Figura 7).

La expresión de IL-10, en los controles no infectados fue muy baja, aún en el grupo que se trató con LPS, sólo se observó que las células CD3+ fueron las más susceptibles a los diferentes tratamientos ya que hubo un aumento en el nivel de expresión de IL-10 en esta población celular.

Expresión IL-10 en el día 11 postinfección con *Plasmodium chabaudi*

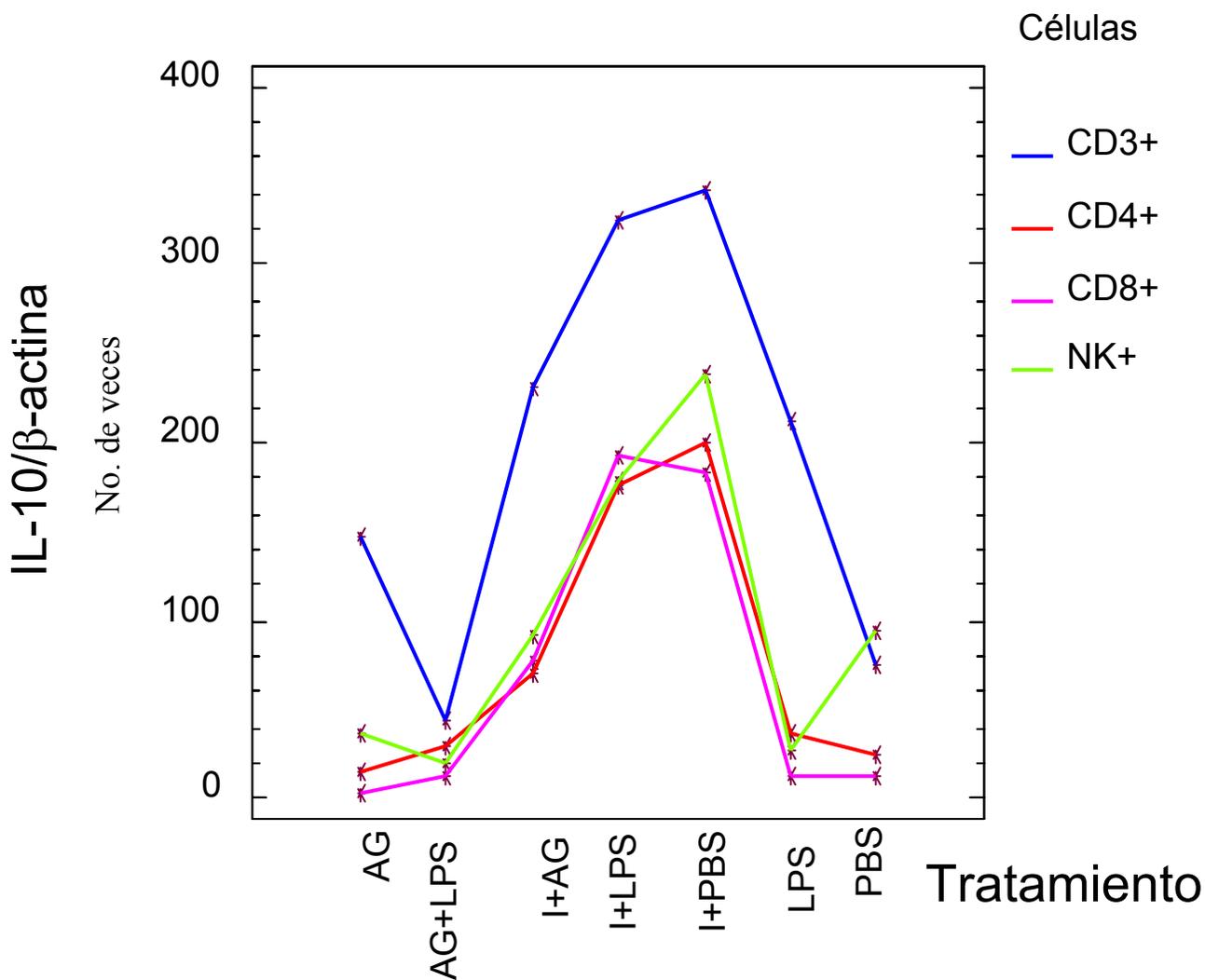


Figura 8. Expresión de IL-10 en las células de bazo: CD3+, CD4+, CD8+ y NK+, de ratones infectados (I) y que recibieron el tratamiento con: aminoguanidina (AG), Lipopolisacárido (LPS), Amortiguador de fosfatos salino (PBS) y la combinación de AG+LPS en el día 10 y se analizaron en el día 11 postinfección con *P. chabaudi*. Los valores en el eje de las ordenadas representan unidades relativas (No. de veces) de la relación de expresión de IL-10 con respecto a la de β-actina.

Al comparar los resultados en las diferentes subpoblaciones celulares del bazo en los ratones infectados que se les administraron los diferentes tratamientos la población celular de bazo que mas contribuyó en el incremento de IL-10 fue de las células CD3+ tanto en ratones tratados con PBS, con LPS como con los del inhibidor de la iNOS (Figura 8).

Tabla de mínimos cuadrados

Factores de estudio		n	Media	Error Std	Límite Inferior	Límite Superior	Diferencia
Células							
CD3		92	197.362	12.4993	172.767	221.956	B
CD4		89	78.5187	12.9011	53.1336	103.904	A
CD8		91	70.7248	12.5795	45.9725	95.4771	A
NK		89	98.4248	12.7027	73.43	123.42	A
Tratamientos							
AG		48	50.4312	17.122	16.7406	84.1218	A
AG+LPS		48	26.7409	17.122	-6.94971	60.4315	A
I+AG		48	118.1	17.122	84.4091	151.79	B
I+LPS		57	218.015	15.7894	186.946	249.083	C
I+PBS		68	241.505	14.532	212.911	270.099	C
LPS		48	72.3968	17.122	38.7062	106.087	A
PBS		44	51.6141	18.2045	15.7936	87.4346	A
Células por tratamiento.							
CD3+	AG	12	147.968	34.2441	80.5868	215.349	A
CD3+	AG+LPS	12	45.0757	34.2441	-22.3055	112.457	A
CD3+	I+AG	12	231.445	34.2441	164.064	298.826	B
CD3+	I+LPS	14	325.806	31.786	263.261	388.35	B
CD3+	I+PBS	18	342.257	27.9602	287.241	397.274	B
CD3+	LPS	12	212.865	34.2441	145.484	280.246	B
CD3+	PBS	12	76.1164	34.2441	8.73515	143.498	A
CD4+	AG	12	14.6605	34.2441	-52.7207	82.0417	A
CD4+	AG+LPS	12	29.6198	34.2441	-37.7614	97.001	A
CD4+	I+AG	12	69.8399	34.2441	2.45867	137.221	A
CD4+	I+LPS	15	175.695	30.6288	115.427	235.963	B
CD4+	I+PBS	17	200.396	28.8351	143.658	257.133	B
CD4+	LPS	12	35.6237	34.2441	-31.7575	103.005	A
CD4+	PBS	9	23.7967	41.1735	-57.2192	104.813	A
CD8+	AG	12	2.28762	34.2441	-65.0936	69.6688	A
CD8+	AG+LPS	12	12.8273	34.2441	-54.5539	80.2085	A
CD8+	I+AG	12	78.6638	34.2441	11.2826	146.045	A
CD8+	I+LPS	13	192.118	33.2993	126.596	257.64	B
CD8+	I+PBS	18	183.945	27.9602	128.929	238.962	B
CD8+	LPS	12	13.5144	34.2441	-53.8668	80.8956	A
CD8+	PBS	12	11.7176	34.2441	-55.6637	79.0988	A
NK+	AG	12	36.8088	34.2441	-30.5724	104.19	A
NK+	AG+LPS	12	19.4408	34.2441	-47.9404	86.822	A
NK+	I+AG	12	92.4503	34.2441	25.0691	159.832	A
NK+	I+LPS	15	178.441	30.6288	118.173	238.708	B
NK+	I+PBS	15	239.423	31.4716	177.497	301.349	B
NK+	LPS	12	27.584	34.2441	-39.7972	94.9652	A
NK+	PBS	11	94.8258	35.88	24.2256	165.426	A

Tabla 10. Expresión de IL-10 en las células de bazo: CD3+, CD4+, CD8+ y NK+ de ratones infectados (I) y no infectados, tratados en el día 10 aminoguanidina (AG), Lipopolisacárido(LPS), Amortiguador de fosatos salino (PBS) y AG+LPS y analizados el día 11 postinfección con *P. chabaudi*. A, B y C; indican que hay diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de IFN- γ . P.ej. A comparada con la A o con la B del siguiente renglón alineadas en la misma columna indica que sus intervalos de confianza se traslapan y que por lo tanto no existe una diferencia estadísticamente significativa entre A y B. Pero si A no esta alineada con B indica que sus intervalos de confianza no se traslapan y que por lo tanto existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

La subpoblación CD3+ de acuerdo a la diferencia que hay en los intervalos de confianza, es la que muestra la expresión más alta de IL-10 con relación a la de las células CD4+, CD8+ y NK+ quienes entre ellas no mostraron diferencias estadísticamente significativas

Los niveles de expresión de IL-10 no se modificaron en los ratones no infectados que se trataron con AG, AG+LPS y PBS. Sin embargo, se detectaron diferencias estadísticamente significativas cuando los niveles de IL-10 de estos grupos se compararon con los de los ratones infectados que recibieron los mismos tratamientos.

En general se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de IL-10 de las subpoblaciones celulares CD3+, CD4+, CD8+ y NK+, en los grupos de ratones infectados y tratados con LPS o con PBS con respecto a los diferentes tratamientos (Tabla 10).

10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En un estudio previo que se desarrolló en el laboratorio se observó que en el día 11 y 12 postinfección se detectaron las concentraciones más altas de NO, las cuales se presentaban cercanas o bien en el pico de la parasitemia y en ese día también se desarrollaban los niveles más altos de expresión tanto de IFN- γ como de IL-10 (ANEXOS, Fig. 10 y 11)

El objetivo del presente trabajo fue analizar si el óxido nítrico modifica la expresión de las citocinas: IFN- γ , TNF- α e IL-10 en las subpoblaciones celulares CD3+, CD4+, CD8+ y NK+ en ratones infectados con *Plasmodium chabaudi*, para lo cual se purificaron cada una de esas poblaciones y se les analizó la expresión de las mencionadas citocinas. Este estudio también nos permitió evaluar cual de las subpoblaciones celulares estudiadas contribuía en mayor grado a la expresión de las citocinas: IFN- γ , TNF- α e IL-10, lo anterior nos permitió evitar el efecto de dilución, dado que alguna de estas subpoblaciones que pudiera no contribuir afectaría los niveles totales de expresión para alguna/s de las citocinas ya que en un estudio previo se analizó la expresión a partir de una cantidad definida de RNAm total de todas las células de bazo.

La aminoguanidina es un inhibidor específico de la iNOs (Ahvazi Behrouz et al. 1995) que evita que el NO se genere por esta enzima (Taylor-Robinson et al., 1998). Se sabe que el LPS es un potente inductor de intermediarios reactivos de oxígeno y de intermediarios reactivos de nitrógeno en los macrófagos, que actúa contra una variedad de patógenos intracelulares y extracelulares, también se ha demostrado que es un potente estimulador de las isoformas de mRNA que codifican para NOS y por lo tanto un inductor del NO (Dascombe M. J., Nahrevanian, 2003), por lo tanto se esperaría que debería aumentar también la expresión de las citocinas de forma importante; sin embargo esto sólo se observó en algunos casos. A continuación daremos una posible explicación del por qué, de este patrón de expresión para cada citocina en cuestión.

En el presente trabajo se demostró que tratar con aminoguanidina a los ratones infectados con *P. chabaudi* indujo una disminución en los niveles de expresión de las citocinas: IFN- γ ,

TNF- α , e IL-10 en todas las subpoblaciones celulares analizadas. Este hallazgo indica que el NO es importante en la regulación de la expresión de estas citocinas y está de acuerdo a lo descrito previamente en la literatura (Taylor-Robinson et al., 1998). Es importante indicar que la expresión no se abatió completamente y eso se podría explicar porque existen otras enzimas productoras de NO, como lo son: la eNOS y la nNOS, que no son susceptibles a la acción de la aminoguanidina (Ruetter & Thiernemann, 1996) y el NO producido por ellas podría favorecer la expresión de las citocinas, como mecanismo compensatorio de la deficiencia de iNOS, también existe la posibilidad de que además del NO existan otras moléculas involucradas en la regulación de la expresión de las citocinas analizadas.

Como control positivo de la situación en donde se incrementa de forma importante la concentración de NO, inyectamos LPS a ratones infectados con *P. chabaudi* y medimos como afecta la expresión de las citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-10. El patrón en los niveles de expresión de cada citocina fue diferente para cada subpoblación celular. En las subpoblaciones CD3+, CD4+, CD8+ y NK+ se detectaron niveles intermedios de expresión de IFN- γ con relación al grupo de ratones infectados y tratados con PBS y con AG (Figura 3; Tabla 6).

Estos resultados indican que si la concentración de NO aumenta notoriamente, no se afectan los niveles de expresión de IFN- γ , probablemente el efecto se modula dependiendo de la concentración del NO. Este hallazgo se podría explicar con lo que han descrito otros autores, en donde se ha demostrado que la producción de IL-12 e IFN- γ por células Th1 se puede inhibir por la presencia de NO exógeno. Además, se ha descrito que el NO derivado de macrófagos o células T, puede inhibir la proliferación de células Th1 por bloqueo en la secreción de IL-12 y mediadores autócrinos de crecimiento de células T (Taylor-Robinson, 1999) lo que como consecuencia afectaría disminuyendo los niveles de IFN- γ de igual forma que en nuestros experimentos (Figuras 3 y 4; tabla 6).

En cuanto a los niveles de expresión de TNF- α en el grupo de ratones infectados y tratados con LPS, se detectó que la expresión varía de acuerdo a la población celular: para las células CD3+, existió una diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo de ratones infectados y tratados con AG, sin embargo, no existe la misma diferencia con

respecto al grupo de ratones infectados y tratados con PBS. En las subpoblaciones CD4⁺ y CD8⁺ los niveles de expresión de TNF- α no se detectaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo de ratones infectados y tratados con PBS o con AG. En contraste, la subpoblación de células NK⁺ en los ratones infectados y tratados con LPS fue la única en donde se incrementaron los niveles de TNF- α aunque no de forma estadísticamente significativa (Figuras 5, 6 y Tabla 8). Se ha descrito que el LPS es un modulador de diversos genes (Magder, Neculcea et al. 2006) dependiendo de la concentración en la que se administre, además incrementa la expresión de TNF- α (Edelman, Jiang et al. 2007), en el presente trabajo es posible que el LPS a la dosis inyectada en los ratones infectados únicamente promovió la regulación positiva de TNF- α en las células NK⁺ y no afecta a las demás subpoblaciones analizadas dado que su efecto depende de la dosis, tal y como se describe en la literatura (Magder, Neculcea et al. 2006).

En relación a la expresión de IL-10 en el grupo de ratones infectados y tratados con LPS, únicamente en las células NK se detectó un incremento que no fue estadísticamente significativo en la expresión del RNAm de esta citocina. En general sólo se detectaron diferencias significativas en los niveles de IL-10 de las subpoblaciones celulares CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ y NK⁺ en los ratones infectados que se sometieron a el tratamiento con LPS o con PBS (Figura 7 y 8; Tabla 10).

Se ha descrito previamente, que el NO afecta la producción de más de 20 citocinas, incluidas IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α y TGF- β , en varias subpoblaciones de células de la respuesta inmune como los macrófagos, las células T, las células NK y las endoteliales (Bogdan C. et al., 2000).

Una probable explicación al hecho de que las citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-10 no se hayan sobreexpresado en el grupo de ratones infectados y tratados con el LPS podría deberse a un mecanismo de regulación en el cual, cuando la concentración de NO se eleva más allá de los niveles que se alcanzan en los ratones parasitados; se desencadenan mecanismos de regulación negativa y por lo tanto disminuye la expresión de citocinas para evitar que este tipo de respuesta sea tóxica.

En el grupo de ratones infectados y tratados con PBS se demostró que los niveles de expresión de las citocinas: IFN- γ , TNF- α en todas las subpoblaciones (con excepción de la población NK+) e IL-10 (con excepción de la población CD8+) celulares analizadas son los más altos, con respecto a los diferentes tratamientos, sin embargo esta diferencia no es estadísticamente significativa cuando se comparó con el grupo de ratones infectados y tratados con LPS. Esto puede deberse a que la población celular CD3+ en particular para cada una de las citocinas que evaluamos es más susceptible al cambio en las concentraciones de NO que las poblaciones CD4+, CD8+ y NK+.

11. CONCLUSIONES

El óxido nítrico regula la expresión de las citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-10, ya que cuando se inhibe la isoforma iNOS con la aminoguanidina; los niveles de expresión de dichas citocinas disminuyen, sin embargo este efecto depende de la dosis, dado que un incremento mayor de los niveles de NO (provocado por el LPS) no favorece la sobreexpresión de las citocinas: TNF- α , IL-10 e INF- γ ; incluso los niveles pueden ser menores que en el grupo que permaneció como control infectado (I+PBS) este efecto probablemente se debe a un mecanismo de regulación negativa.

Las células CD3⁺ son la subpoblación celular de bazo que más contribuye a la expresión de las citocinas: IFN- γ e IL-10, en el día 11 postinfección con *Plasmodium chabaudi*.

La subpoblación celular de bazo que más contribuye a la expresión de TNF- α en el día 4 postinfección con *Plasmodium chabaudi*, no se pudo determinar debido a que no hubo diferencia estadísticamente significativa.

13. ANEXOS

13.1 Niveles de óxido nítrico con respecto a los diferentes tratamientos

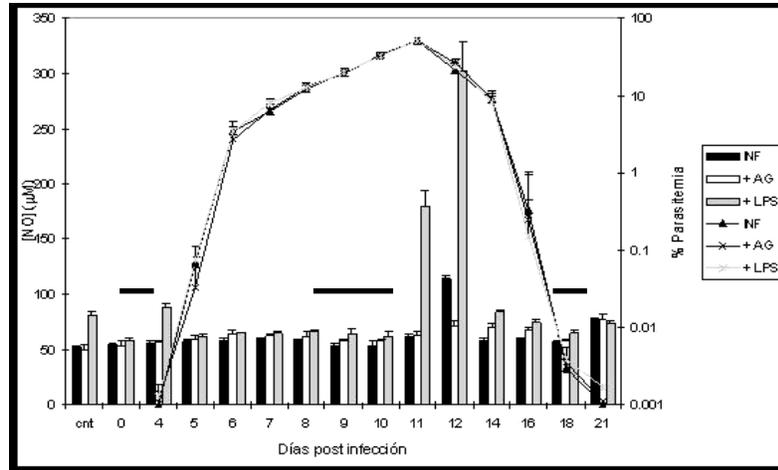


Figura 9 Parasitemia (líneas) y [NO] (barras). Los ratones control sin infección (cnt) fueron tratados con AG (blanco) o LPS (gris), o sin tratamiento (negro) y evaluada su concentración de NO en suero luego de dos días de tratamiento. Las barras horizontales corresponden al tiempo de tratamiento.

13.2 Expresión de las citocinas: IFN- γ , TNF- α e IL-10; en células totales de bazo

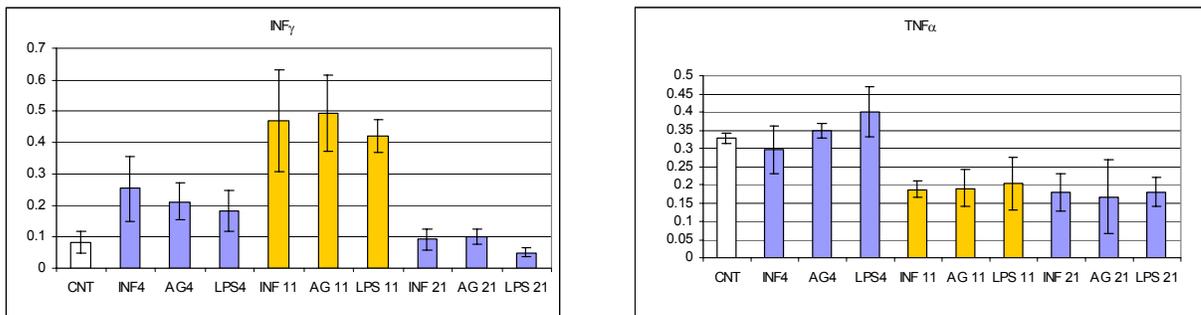


Figura 10 Expresión de citocinas Th1 en bazo de ratones infectados y tratados para los días 4, 11 y 21 post infección Unidades: relación de expresión de la citocina respecto a la expresión de β -actina.

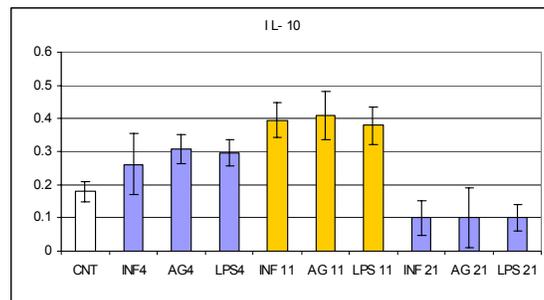


Figura 11. Expresión de citocinas Th2 en bazo de ratones infectados y tratados para los días 4, 11 y 21 post infección Unidades: relación de expresión de la citocina respecto a la expresión de β -actina.

13.3 Citometría de flujo del aislamiento de las subpoblaciones celulares de bazo: CD3+, CD4+ y CD8+

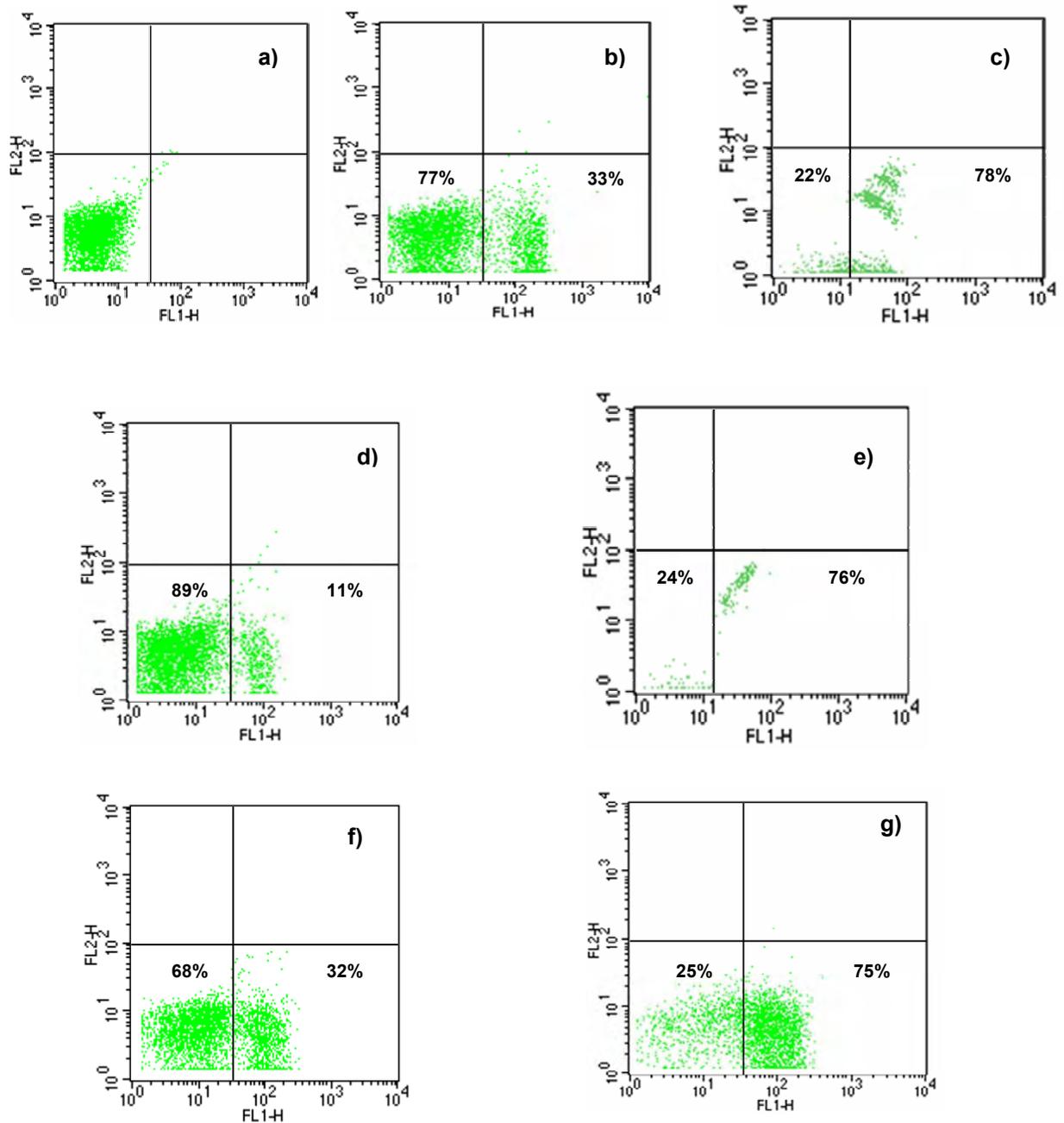


Figura 12. Citometría de flujo del aislamiento de las poblaciones celulares CD4+, CD8+ y CD3+. a) células totales de bazo sin teñir; b) Células totales de bazo marcadas con el anticuerpo y con FITC (Ab-FITC); c) Células CD4 purificadas de bazo marcadas con Ab-FITC; d) Células totales de bazo marcadas con Ab-FITC; e) Células CD8 purificadas de bazo marcadas con Ab-FITC; f) Células totales de bazo marcadas con el Ab-FITC; g) células CD3 purificadas de bazo y marcadas con Ab-FITC.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahvazi Behrouz C, Jacobs Phipippe, and Stevenson Mary M. Role of macrophage-derived nitric oxide in suppression of lymphocyte proliferation during blood-stage malaria. *Journal of Leukocyte Biology* 1995; 58: 23-31.

Barrera SH, Ortiz LR, Rojas MA y Reséndiz PD. Reacción en cadena de la polimerasa. *Ciencia y desarrollo*. 1993. 18: 50-60.

Beckman JS. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1620-1624.

Beckman JS & Koppenol WH. Nitric oxide: superoxide and peroxynitrite: The good, the bad and the ugly. *Am J Physiol* 1996; 271: C1424-C1437.

Bodgan C, Rollinghoff M., Diefenbach A. Reactive oxygen and reactiv nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 2000;12:64-76.

Brunet LR. Nitric oxide in parasitic infections. *Internacional Immunopharmacol* 2001; 1:1457-1467.

Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades infecciosas, microbiología clínica*. 2004; 22(5): 299-305.

Dascombe M. J., Nahrevanian H. Pharmacological assesment of the role of nitric oxide in mice infected with lethal and nonlethal species of malaria, *Parasite Immunol*. 2003;25: 149-159.

GentYJ, Wu Q, Muszynski M, et al. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-g, tumor necrosis factor-a, and interleukin-1b. *Arteroscler Tromb Vasc Biol* 1996; 16:19-27.

Edelman, D. A., Y. Jiang. Cytokine production in lipopolysaccharide-exposed rat lung pericytes. *J Trauma*. 2007; 62(1): 89-93.

González Regueira JR. *Inmunología, biología y patología del sistema inmune*. 3ª ed. :Editorial Médica Panamericana, 2003: 111-120.

Grisham, M B., D. Jourd'Heuil, and D. a. Wink. Nitric oxide Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites; implications in inflammation. *Am. J. Physiol*. 1999; 276:276:G315.

Hobbs A, Higgs A and Moncada S. Inhibition of nitric oxide syntase as a potential therapeutic target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39: 191-220.

Hommel M, Immunology of malaria. WHO, Health Co-Operation Papers, Quaderni, Di Coperation Sanitaria. Geneva:WHO;1996;15: 53-70.

Innis M. Gelfand D. PCR protocols. A guide to methods and applications. USA: Academic Press, Inc., 1990: 3-12.

Jacobs P., Radizoch D., Stevenson M.M. Nitric oxide expression in the spleen, but not in the liver, correlates with resistance to blood-stage malaria in mice. *J Immunol* 1995; 155:5306-5313.

Jacobs P., Radizoch D., Stevenson M.M. In vivo regulation of nitric oxide production by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon, but not by interleukin-4 during blood stage malaria in mice. *Infect Immun* 1996; 64: 44-49.

Jaramillo M. Hemozoin increases INF-g-inducible macrophage nitric oxide generation through extracellular signal-regulated kinase and NF-kB-dependent pathways. 2003; 171: 4243-4253.

Jason Janine, Archibald L. Nwanyanwu O, Bell M, Buchanan I, Larned J, et al. Cytokines and malaria parasitemia. *Clinical Immunology*. 2001; 100(2): 208-218.

Joklik WK. *Zinsser Microbiología*. 20^a ed. Buenos Aires: Editorial Panamericana, 1998:1565-1569.

Koneman EW. *Diagnóstico microbiológico, texto y atlas a color*. 5^a ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 2003: 1092-1095.

Korhonen R. Regulation of inducible nitric oxide production in activated macrophages. Finlandia: Medical School of the University of Tampere 2002, 1-9.

Kubes P, Suzuki M & Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88: 4651-4655.

Li C. Pathology of *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection and mortality in interleukin-10-deficient mice are ameliorated by antitumor necrosis factor alpha and exacerbated by antitumor necrosis factor-antibodies. *Infection and Immunity*. 2003; 71 (9): 4850-4856.

Long CA, Immunity to blood stages of malaria. *Curr Opin Immunol*. 1993; 5:548-556.

Lowenstein Ch. J. Nitric oxide: an physiologic messenger. *Ann Int. Med*. 1994; 120: 227-237.

Mac Micking J, Nitric oxide and macrophage function. *Ann Rev Immunol*. 1997; 15: 323-350.

Magder, S., J. Neculcea. Lipopolysaccharide and TNF-alpha produce very similar changes in gene expression in human endothelial cells. *J Vasc Res.* 2006; 43(5): 447-61.

Moncada S & Higos A. Molecular mechanism and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J.* 1995; 39: 709-714.

Moncada S, Palmer RM & Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 1991; 43: 109-142.

Moncada S & Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* 1993; 329: 2002-2012.

Nahrevanian Hossein. Immune effector mechanisms of the nitric oxide pathway in malaria: cytotoxicity *versus* cytoprotection. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2006; 10(4):283-292.

Nathan, C., and Q. W. Xie. Nitric oxide sintases: roles, tolls, and controls. *Cell* 1994; 78:915.

Palmer R, Ferrige A & Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987; 327: 524-526.

Parslow TG. *Inmunología básica y clínica.* 10ª ed. México: El Manual Moderno, 2002; 169, 178-182.

Phillips RC, Mathers KE, Taylor-Robinson AW. T cells in immunity to *Plasmodium chabaudi chabaudi*: operation and regulation of different pathways of protection. *Res Immunol.* 1994; 145: 405-411.

Ramos-Ávila A. Efecto de la cloroquina sobre la regulación por apoptosis de la respuesta inmune en malaria. Tesis de licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Estudio Superiores Zaragoza, UNAM, México D.F. 2005.

Roitt I, Brostoff J, Male D. *Inmunología.* 5a ed. Barcelona: Elsevier, 2000; 242-261.

Rojas-Espinosa O. *Inmunología de memoria.* 2ª ed. México: Editorial Médica Panamericana, 2001; 101-111.

Rodríguez Sanchez IP, Barrera Saldaña HA. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. 2004; 7(3): 323-333.

Ruetten H & Thiemerman C. Prevention of the expression of inducible nitric oxide syntase by aminoguanidine or aminoethyl-isothiourea in macrophages and the rat. *Biochem. Biophys. Res. Comun.* 1996; 225: 525-530.

Stevenson M.M. and Riley E.M. Innate immunity to malaria, Nature Publishing Group; 2004; 4:169-180.

Stuart WT. Microbiología. 5ª ed. México: MacGraw-Hill Interamericana, 2000; 464-470.

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.

Taylor- Robinson AW, C. Smith E. A dichotomous role for nitric oxide in protection against blood stage malaria infection. Immunology Letters. 1999; 67: 1-9.

Tay-Zavala J. Microbiología y parasitología médicas. 3ª ed. México: Méndez Editores S.A. de C.V., 1995; 490-501.

Titheradge M., Nitric oxide protocols. Humana Press, New Jersey; 1998; 1-5, 75-79.

Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. Advan. Physiol. Edu. 2005; 29: 151-59.

van der Heyde HC, Gu Y, Zhang Q, Sun G & Grisham M. Nitric oxide is neither necessary nor sufficient for resolution of *Plasmodium chabaudi* malaria in mice. J. Immunol. 2000; 165:3317-3323.

Zhang HY, Gharaee-Kermani M, Phan SH. Regulation of lung fibroblast and smooth muscle actin expression, contractile phenotype, and apoptosis by IL-1b. J Immunol 1997; 158: 1392-1399).