

61

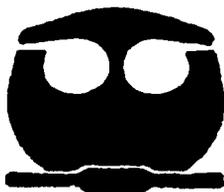


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EL OXIDO NITRICO COMO AGENTE ANTIPARASITARIO

TRABAJO MONOGRAFICO DE ACTUALIZACION QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA PRESENTA: EDITH GOMEZ SERRANO



TESIS CON FALLA DE ORIGEN



MEXICO, D. F.

2002

EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE : Prof. ABEL GUTIERREZ RAMOS

VOCAL : Prof. FRANCISCO HERNANDEZ LUIS

SECRETARIO : Prof. MARCO ANTONIO BECERRIL FLORES

1er SUPLENTE : Prof. ANDRES NAVARRETE CASTRO

2do SUPLENTE: Prof. EVA ELOINA HERNANDEZ AVITIA

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

LABORATORIO 122, DEPARTAMENTO DE FARMACIA.

FACULTAD DE QUÍMICA, U.N.A.M.

ASESOR



Dr. FRANCISCO HERNANDEZ LUIS

SUSTENTANTE



EDITH GOMEZ SERRANO

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por guiarme y darme fuerza para afrontar los momentos más difíciles de mi vida, y por permitirme alcanzar las metas que me he propuesto.

A MIS HERMANOS

FRANCISCO Y JORGE GOMEZ SERRANO

Por su cariño, comprensión y apoyo. Porque han estado conmigo en momentos difíciles y por su colaboración en la realización de este trabajo.

A MI TIO

ANGEL VALENTIN SERRANO CHAVEZ

Por su cariño y paciencia.

A MIS AMIGAS

Emma Z. Viveros Olguin, Mariana Téllez Araiza, Adriana Cruz López y Lupita Velásquez, quienes en momentos difíciles siempre estuvieron a mi lado, brindándome su cariño y apoyo incondicional.

A LA FACULTAD DE QUIMICA DE LA UNAM

Y a los profesores de la misma, por su dedicación y enseñanza

A MI ASESOR: Dr. FRANCISCO HERNANDEZ LUIS

Por la gran ayuda que me brindo para la realización de éste trabajo y por depositar su confianza en mi.

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS DEL INCMNSZ

Por su invaluable amistad.

**A LA QUIMICA CAROLINA RODRIGUEZ PADILLA (Coordinadora de la Central
Toma de Muestras del INCMNSZ)**

Por el gran apoyo, amistad y confianza que me ha brindado siempre

AL INNCMSZ

Por brindarme la oportunidad de realizarme profesionalmente y ofrecerme servicios necesarios para la realización de éste trabajo

A LA FACULTAD DE QUIMICA DE LA UNAM

Y a los profesores de la misma, por su dedicación y enseñanza.

A MI ASESOR: Dr. FRANCISCO HERNANDEZ LUIS

Por la gran ayuda que me brindo para la realización de éste trabajo y por depositar su confianza en mi.

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS DEL INNSZ

Por su invaluable amistad.

A LA QUIMICA CAROLINA RODRIGUEZ PADILLA

Por el gran apoyo, amistad y confianza que me ha brindado siempre.

AL INNSZ

Por brindarme la oportunidad de realizarme profesionalmente y ofrecerme servicios necesarios para la realización de éste trabajo.

DEDICATORIAS

A MIS PADRES
JUDITH SERRANO DE GÓMEZ
Y
FRANCISCO GÓMEZ ORTIZ

A quienes les debo la vida y la oportunidad de estudiar.
Quienes en momentos difíciles siempre han estado junto
a mi para brindarme su cariño y apoyo incondicional.
Y para quienes siempre tendré un lugar especial en mi
corazón.

A MIS HIJOS
MIGUEL DANTE ,
CARLOS IVÁN
Y
BRENDA EDITH

A quienes no solo les dedico éste trabajo, sino que les dedico toda mi vida.

Porque ustedes con su amor, cariño y comprensión me han dado el valor
y la fuerza para seguir adelante.

Y por quienes siempre luchare para ser mejor mamá y profesionista.

**A MI ESPOSO
DAVID OCHOA GUDIÑO**

Quién supo esperar, cuando tubo que hacerlo.
Quién con su gran amor, siempre me ha apoyado.
Quién me ayuda a superarme y lograr mis metas.
Con quién formo una hermosa familia.
Quién me ama y a
quién siempre amare.

**A LA MEMORIA DE MI ABUELITA
MA. DE JESUS CHÁVEZ GONZÁLEZ**

Porque sé que le hubiera gustado verme terminar mis estudios.

INDICE

Introducción

1. Generalidades	1
1.1 Origen y mecanismo de acción del óxido nítrico (NO).....	1
1.2 Fisiología, patología y farmacología del NO	4
1.3 Toxicidad mediada por NO.....	7
1.3.1 Enzimas.....	7
1.3.1.1 Aconitasa	7
1.3.1.2 Citocromo oxidasa	8
1.3.1.3 Ribonucleótido reductasa	8
1.3.1.4 Citocromo P450	8
1.3.1.5 Aldolasa	9
1.3.2 Otros mecanismos de toxicidad a agentes infecciosos por el NO.....	9
1.3.2.1 Reacciones con grupos sulfhidrilos.....	9
1.3.3 Producción de NO durante las infecciones	9
2. NO en defensa del hospedero contra parásitos.....	11
2.1 Evidencias de la actividad antiparasitaria del NO.....	11
2.2 Métodos para la cuantificación del NO	12
2.3 Efecto antiparasitario de la síntesis del NO inducido por citocinas	13
2.4 Evidencias <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de que el óxido nítrico actúa como un agente antiparasitario.....	14
2.5 "Blancos" del NO	14
2.6 Regulación de la síntesis de NO por citocinas	16
2.6.1 Interferon y.....	16

2.6.2 Factor de crecimiento- β -transformante	17
2.6.3 Interleucina-10	17
2.6.4 Interleucina-4	18
2.6.5 Interleucina-13	19
3. El caso del paludismo	20
3.1 Citocinas y paludismo.....	20
3.2 Enfermedades similares no infecciosas	20
3.2.1 Efecto de la inmunoterapia	20
3.3 NO y paludismo.....	21
3.3.1 Origenes de la importancia del NO en la patología del paludismo	21
3.3.2 Inhibición de los parásitos del paludismo por el óxido nítrico	21
3.3.2.1 NO y estado asexual en sangre del parásito del paludismo	21
3.3.2.2 NO y gametocitos de <i>Plasmodium sp</i>	23
3.3.2.3 NO y estado exoeritrocitario de <i>Plasmodium sp</i>	23
3.4 Propuestas sobre el papel del NO en el paludismo.....	24
3.4.1 Efectos cardiovasculares.....	24
3.4.2 Lactaemia palúdica.....	25
3.4.3 NO como inhibidor del metabolismo aerobio.....	26
3.4.4 Daño causado por la hiperlactaemia en el paludismo	26
3.4.5 Hipoglucemia	27
3.4.6 Inhibición de la gluconeogénesis	27
3.4.7 Incremento en la degradación de glucosa.....	28
3.4.8 Inhibición de la aldolasa	29

3.5 Paludismo cerebral	29
3.5.1 Teoría del óxido nítrico en el paludismo cerebral.....	30
3.5.2 El papel de los parásitos del paludismo en su etapa eritrocitaria.....	31
3.5.3 Expresión de las moléculas de adhesión por las citocinas reguladas por el NO.....	31
3.5.4 Lactato	32
3.5.5 Ingesta de una dieta rica en nitratos	32
3.6 Inmunosupresión	33
3.7 Tolerancia al paludismo.....	36
3.7.1 Relación entre la tolerancia al paludismo y la tolerancia al NO.....	36
4. Sensibilidad de plasmodium al NO a bajas presiones de oxígeno	37
5. Acción de la cloroquina sobre la producción de NO y destrucción del parásito por los macrófagos	40
Conclusiones	44
Bibliografía	46

ABREVIATURAS

Ach	Acetilcolina
ADP	Adenosin difosfato
BCG	Bacilo de Calmett-Guérin
CoA	Coenzima A
ConA	Concavalina A
ADN	Acido desoxirribonucleico
EDRF	Factor de relajación derivado del endotelio
FMN	Flavinadenindicucleótido
GADPH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
GC	Guanilato ciclasa
GMPC	Guanosilmonofosfato ciclico
Hb	Hemoglobina
IC	Complejos inmunes
IL-1,2,3, etc.	Interleucina 1,2,3,etc.
INF- γ	Interferon gamma
IRP	Proteina reguladora del hierro
L-cit	L-citrulina
L-NAME	N ⁶ -nitro-L-arginato de metilo
L-NMMA	N ⁶ -monometil-L-arginina
LT	Linfotoxinas
LPS	Lipopolisacáridos

MFO	Oxidadas terminales de la función microsomal
NADPH	Fosfato de nicotinaminadeninucleótido
NO	Oxido nítrico
NOs	Oxido nítrico sintasa
O ₂	Oxígeno molecular
O ₂ ⁻	Anión superóxido
pH	Potencial de hidrógeno
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
SH	Sulfhidrilo
SIN-1	Derivado de la molsidomina
SNAP	S-nitroso-N-acetil penicilamina
SNC	Sistema nervioso central
TCA	Ciclo del ácido tricarboxílico
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α

INTRODUCCION

Las enfermedades parasitarias son un problema de salud pública, sobre todo en los países en vías de desarrollo, en los que se encuentran las condiciones propicias para la transmisión de tales enfermedades.

Como mecanismo de defensa en contra de los parásitos, nuestro organismo produce una serie de compuestos químicos, entre ellos, el óxido nítrico (NO). Sin embargo, una sobreproducción de NO, en lugar de proteger al paciente, le ocasiona una sintomatología similar a la observada en el paludismo.

Estas observaciones son importante de tomar en cuenta, debido a que podemos encontrar la manera de aprovechar sus efectos terapéuticos y contrarrestar los perjudiciales para beneficio de los pacientes. Por considerar que las investigaciones sobre este tema, son relevantes para los profesionales del área de la salud, se desarrolló este trabajo de revisión cuyo objetivo fue, recopilar, revisar y analizar la información publicada sobre el papel del NO como agente antiparasitario, indicando cuales son sus precursores, sus mecanismos de acción, sus inhibidores y sus efectos tanto positivos como negativos en el organismo humano. Además de explicar por qué su sobreproducción produce una parte de la sintomatología observada en el paludismo.

Con este trabajo, se espera contribuir en la difusión y divulgación de los avances en la investigación del NO en el humano, esperando sea de utilidad para personas de área de la salud y permitir un mejor entendimiento de la patología de algunas enfermedades parasitarias.

1. GENERALIDADES.

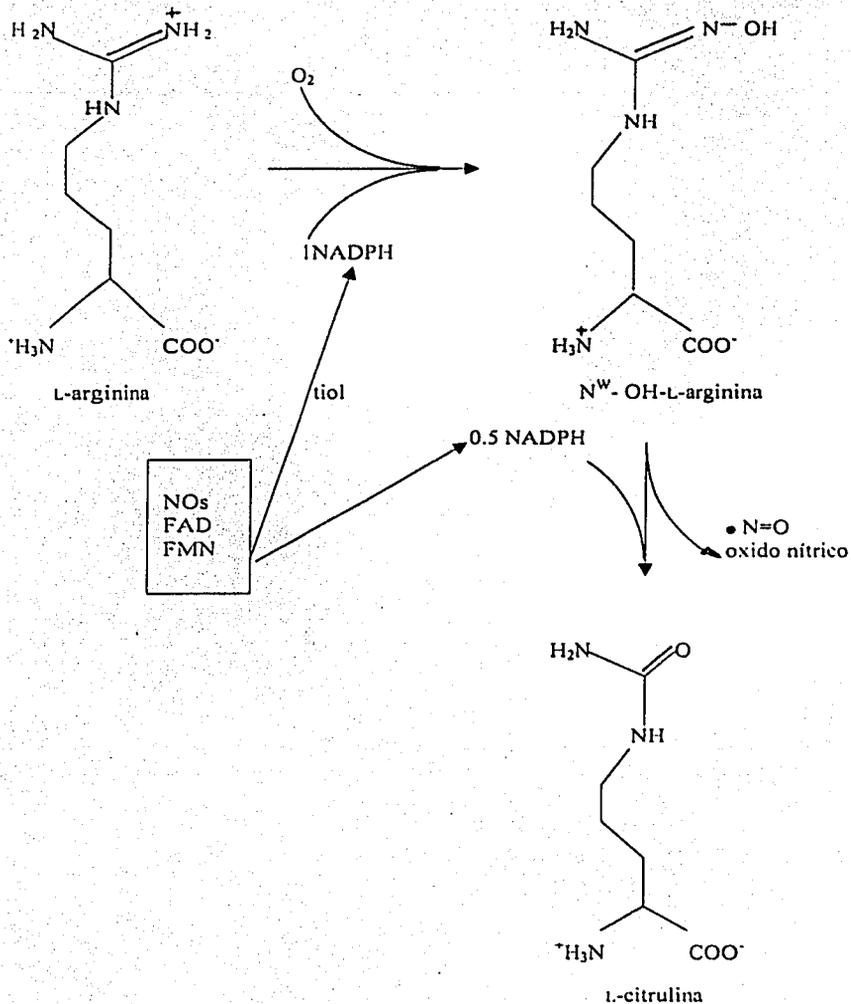
1.1 Origen y mecanismo de acción del óxido nítrico.

En 1980, Furchgott y colaboradores de la Universidad del estado de Nueva York demostraron que la relajación de la aorta aislada del conejo, inducida por acetilcolina (Ach) dependía de la presencia del endotelio vascular y de un factor humoral denominado más tarde factor de relajación derivado del endotelio (EDRF). En 1986, Furchgott e Ignarro, independientemente, sugirieron que el EDRF podía ser el óxido nítrico (NO) (Velasco *et al.*,1996).

Fue hasta 1987 cuando se demostró que el EDRF y el NO eran la misma sustancia con perfiles farmacológicos idénticos que inhibieron la agregación plaquetaria (Sánchez *et al.*,2000) y relajaron el músculo liso (Velasco *et al.*,1996).

NO es un gas muy lábil con una vida media de 6-10 segundos. Difunde rápidamente a las células más próximas. Su efecto es inhibido por la hemoglobina y el azul de metileno. Actúa a través de la activación de la guanilato ciclasa soluble (GC), aumentando los niveles de guanosil monofosfato cíclico (GMPc). El anión superóxido, y compuestos que los generan, inhiben sus efectos, mientras que la enzima superóxido dismutasa los favorece (Velasco *et al.*,1996).

El NO es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina. El nitrógeno guanidino de la L-arginina con cinco electrones, es oxidado por el radical óxido nítrico (\cdot NO) vía un intermediario N^ω-hidroxil-L-arginina. El NADPH dona dos electrones para la formación de éste intermediario y uno más para la oxidación. Ambos pasos son catalizados por enzimas que contienen FAD y FMN así como la óxido nítrico sintasa (NOs). El oxígeno molecular es incorporado tanto al grupo ureido de la citrulina como al propio NO. La tetrahydrobiopterina también es requerida y puede ser regenerada por medio de la enzima, dihidrofolato reductasa (Xie *et al.*,1992).



DHFR Dihidrofolato reductasa
 DHPR Dihidropteridina reductasa
 NOs Óxido nítrico sintetasa

Esquema 1. Síntesis del óxido nítrico. Tomado y adaptado de Xie 1992.

Hasta el momento, se han descrito dos tipos diferentes de NOs: a) Constitutiva: Ca^{2+} /calmodulina dependiente (cNOs), la cual se localiza en células endoteliales, plaquetas y cerebro. b) Inducible: Ca^{2+} /calmodulina independiente (iNOs), la cual es inhibida por los glucocorticoides y localizada en los macrófagos. Ambas enzimas son citosólicas, NADPH dependientes y son inhibidas por análogos de L-arginina (Velasco *et al.*, 1996).

Han sido identificadas dos isoformas de cNOs: La cNOs endotelial y la cNOs neuronal (de Castro *et al.*, 2001).

La NOs constitutiva se encuentra siempre presente en forma inactiva, hasta que aumentan los niveles intracelulares de calcio y un complejo de Ca^{2+} /calmodulina se une a la enzima

El aumento de la actividad de la NOs con el ejercicio puede deberse al aumento del contenido de calcio en las fibras musculares durante la contracción. La actividad muscular libera calcio desde el retículo sarcoplasmático hacia el citosol de la fibra muscular, pudiéndose activar la NOs. A favor de esta observación está el hecho de que ambas isoformas constitutivas (NOs endotelial y NOs neuronal) necesitan el calcio como cofactor (de Castro *et al.*, 2001)

La NOs inducible, no está presente normalmente en las células, requiere el estímulo de un agente inductor, tal como, el factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$), interleucina 1 (IL-1), interferon gama ($\text{IFN-}\gamma$), o linfotoxinas (LT) para generarse. Existe sinergismo entre estos inductores. El NO producido por la iNOs, por la combinación de $\text{IFN-}\gamma$ y $\text{TNF-}\alpha$, es un mediador crítico en la patología intestinal de ratones infectados con *Toxoplasma gondii* por vía oral y contribuye a la mortalidad de ratones susceptibles genéticamente (Liesenfeld *et al.*, 1999) Otras citocinas (IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-13), algunos factores de crecimiento y glucocorticoides, inhiben a esta enzima (Cox *et al.*, 1992).

Un mecanismo de regulación para la enzima NOs neuronal, es la fosforilación por proteincinasas, la cual produce un decremento en la actividad de la misma (Bredt *et al.*, 1990).

Como se mencionó, hay diferentes isoformas de la enzima NOs, las cuales son homólogas y divididas dentro de dos categorías, con diferente regulación y actividad (Figura 1) (Lowenstein *et al.*, 1994).

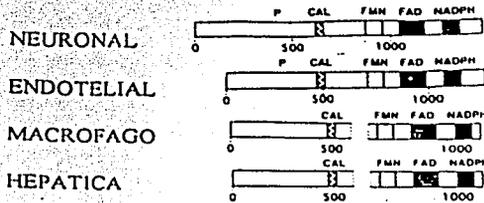


Figura 1. Diagrama que representa las formas clonadas de NOs, con sitios de unión al cofactor CAL= sitio de unión a la calmodulina. FMN= flavinadeninucleótido. NADPH= forma reducida del fosfato de nicotinamadeninucleótido. P = sitios de fosforilación por el adenosinmonofosfato cíclico dependiente de proteincinasas. Los sitios de unión para el grupo hemo, arginina y tetrahydrobiopterina aún no se conocen. Tomado y adaptado de Lowenstein, 1994

El NO es un gas muy reactivo que puede existir en diferentes estados redox, cada uno con distintas propiedades biológicas. El radical libre natural del NO juega un papel muy importante en las enfermedades parasitarias que hasta hace poco se le atribuían al anión superóxido (O_2^-). Estas interacciones del NO con superóxido para formar peroxinitrito, puntualiza la importancia de la superóxido dismutasa en las enfermedades parasitarias (Beckman *et al.*, 1991).

1.2 Fisiología, patología y farmacología del NO.

El NO juega un papel importante en múltiples sistemas del organismo humano. En el sistema cardiovascular, el NO actúa como vasodilatador endógeno y por tanto, en la regulación del tono vascular. Esto lo convierte en un agente fisiológico importante en la regulación del flujo sanguíneo y de la presión arterial sistémica. Su déficit o inhibición por fármacos es importante en la

hipertensión arterial (Lacchini *et al.*, 2001), el vasoespasmo y en la aterosclerosis (Velasco *et al.* 1996). A nivel plaquetario, inhibe la agregación y adhesión plaquetaria (antitrombótico endógeno) (Sánchez *et al.*, 2000).

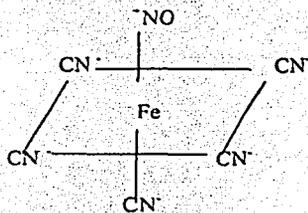
Las neuronas capaces de sintetizar NO son NADP⁺-diforasa positivas y este tipo de células son resistentes a las neurotoxinas. Se especula sobre si hay relación entre el NO (o las enzimas que participan en su síntesis o catabolismo) y la resistencia a las neurotoxinas, y si una malfunción o desajuste de los procesos sería la causa de algunas situaciones patológicas (Snyder *et al.*, 1991, Garthwarte *et al.*, 1991). Además de ser neurotransmisor y vasodilatador, es citotóxico para algunas células tumorales. El papel del NO en la biología del cáncer no se conoce completamente aunque se sabe que es importante en procesos de neovascularización en el desarrollo de tumores sólidos y en el establecimiento de metástasis (Thamrongwittawalpong *et al.*, 2001). También, se ha encontrado que en pacientes con cirrosis, se encuentran elevados los niveles de NO en la vasculatura esplénica (Abornoz *et al.*, 2001).

Por otra parte, el NO es también liberado tras el estímulo inmunológico mediado por la NOs inducible de los macrófagos. Los macrófagos liberan NO como parte de su mecanismo de defensa ya que el NO es citotóxico con características antitumorales y bactericidas. Sin embargo, se ha demostrado en macrófagos alveolares que la edad de los mismos esta asociada con un decremento en la producción de NO (Koike *et al.*, 1999).

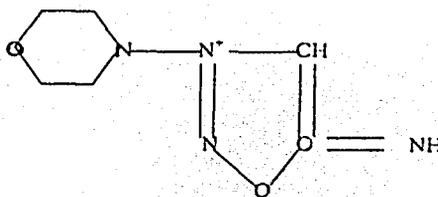
Los niveles elevados de NO, contribuyen al daño articular al inhibir la síntesis de colágeno y proteoglicano, sustancias esenciales para la síntesis de la matriz del cartilago (Castillo *et al.*, 2001). También se ha encontrado que existe menor incidencia de enfermedades cardiovasculares en mujeres premenopausicas en comparación con la encontrada en hombres de la misma edad, postulándose la interacción entre la vía del NO y los estrógenos como el mecanismo responsable (Marcelin *et al.*, 2001).

En la actualidad se dispone de fármacos inhibidores de la NOs, los cuales son estructuralmente análogos a la L-arginina; Por ejemplo el inhibidor competitivo y activado por vía oral, N⁶-monometil-L-arginina (L-NMMA) o el N⁶-nitro-L-argininato de metilo (L-NAME). Igualmente se cuenta con fármacos que liberan NO, por ejemplo, SIN-1 (un derivado de la molsidomina), el S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) o el nitroprusiato sódico (Rockett *et al.*, 1991).

Se investigó la contribución del NO proveniente de L-arginina en la formación de prostaglandina E₂ (PGE₂) por células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes infectados con esquistosomiasis (*Schistosoma mansoni*). Para ello se utilizaron complejos inmunes (CI) aislados de pacientes con esquistosomiasis intestinal crónica. La preincubación de PBMC con CI produce un incremento significativo tanto en la producción de nitrito como de PGE₂. Este efecto fue inhibido por la incubación de células con L-NAME (Simone *et al.*, 1999).



Nitroprusiato sódico



SIN-1

Se demostró que la administración de L-arginina tuvo efectos benéficos en ratas con falla renal, inducida por inhibidores de la NOs, como el L-NAME (Can *et al.*, 2000).

1.3 Toxicidad mediada por NO.

1.3.1 Enzimas.

Una de las primeras moléculas "blanco" del óxido nítrico, fue la hidrogenasa, una enzima importante en la fotosíntesis y presente en un amplio grupo de organismos microbianos. La inhibición por NO fue reversible a bajas concentraciones, más no a altas concentraciones (Krasna *et al.*, 1954). Esta interacción es fuerte debido a que el NO forma complejos con el hierro de la hidrogenasa (Hoberman *et al.*, 1943). Estudios posteriores demostraron que el NO reaccionaba directamente con el centro de hierro-sulfuro de la enzima.

1.3.1.1 Aconitasa. Esta molécula tiene una función dual; una como enzima, en el ciclo de Krebs que convierte citrato en isocitrato, y la otra como proteína reguladora de hierro (IRP). El NO inhibe la actividad de la aconitasa y controla la actividad de IRP. Células tratadas con NO perdieron la actividad de la aconitasa. Evidencias recientes indican, que en condiciones aeróbicas los nitritos pueden inhibir a las bacterias, el NO reacciona con el anión superóxido para formar peroxinitrito, el cual actúa sobre la aconitasa (Figura 2).

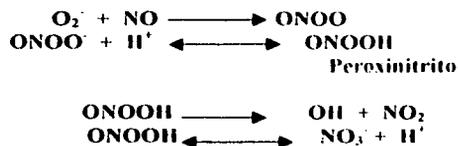


Figura 2. En condiciones aeróbicas, los nitritos pueden inhibir a las bacterias, el NO reacciona con el anión superóxido para formar peroxinitrito, el cual actúa sobre la aconitasa.

La actividad física aumenta la formación de peroxinitritos, compuestos muy oxidante, que podrían inhibir los NOs mediante la oxidación de grupos sulfhidrilo (de Castro *et al.*, 2001).

1.3.1.2 Citocromo oxidasa. Se demostró que la producción de prolina por *Escherichia coli* era inhibida por nitrito, y se sugirió primeramente, que el efecto era debido a una interferencia con la cadena del citocromo. El NO proveniente de los macrófagos fue el responsable de este efecto (Yarbrough *et al.*, 1980).

1.3.1.3 Ribonucleótido reductasa. Cuando células tumorales se incubaron con macrófagos, la síntesis de su ADN disminuyó. Por otra parte, cuando se adicionó NO a éstas mismas células se inhibió la síntesis de ADN y la actividad de la ribonucleótido reductasa disminuyó. Esta enzima catalizó la reducción de nucleósido difosfato en el paso limitante de la síntesis de ADN en todos los organismos, con la excepción de *Lactobacillus sp.* El sitio activo de la enzima contiene diferentes grupos sulfhidrilos, un radical tirosilo y un centro de hierro; los tres son "blancos" potenciales del NO. Esta es una evidencia de que el NO inhibe a la enzima destruyendo el radical tirosilo y también al reaccionar con su grupo sulfhidrilo. Esta inhibición es reversible, lo cual concuerda con la observación de que el NO derivado de las células puede inhibir temporalmente el desarrollo de las células tumorales (Hibbs *et al.*, 1988; Stuehr *et al.*, 1989).

Se ha propuesto que la inhibición de la ribonucleotido reductasa puede explicar el efecto citostático del NO en *Trypanosoma brucei gambiense* y *T. brucei brucei* (Lepoivre *et al.*, 1990; Kwon *et al.*, 1990).

En el parásito del paludismo se encuentra la enzima ribonucleótido reductasa, por lo que es posible que su multiplicación pueda ser retardada por el NO. En contraste, bajas concentraciones de NO pueden ser importantes para la síntesis de ADN y para la división celular, asimismo como para activar a la guanilato ciclasa (Rubin *et al.*, 1993).

1.3.1.4 Citocromo P450. Citocromo P450 es un término colectivo para un grupo de proteínas que contienen el grupo protohemo, está formado por diferentes isoenzimas (Wrighton *et al.*, 1992). Funcionan como oxidasas terminales de la función microsomal (MFO). Las enzimas de citocromo

P450 se localizan dentro de los microsomas, y son responsables de la catálisis oxidativa de moléculas endógenas, así como de diversos fármacos. Como en la estructura de estas enzimas se encuentra el grupo hemo, la interacción con el NO, reduce su actividad (Khatsenko *et al.*, 1993, Wink *et al.*, 1993). En la estructura de *P.falciparum* se encuentra el citocromo P450 (Suroliá *et al.*, 1993).

1.3.1.5 Aldolasa. Se demostraron que la aldolasa bacteriana fue inhibida por el nitrito proveniente del óxido nítrico (Yarbrough *et al.*, 1980).

Esta enzima convierte a la fructosa-1,6-difosfato en fosfato dihidroxiacetona y gliceraldehído-3-fosfato. La aldolasa de mamíferos también es inhibida por el NO, alterandose el metabolismo de carbohidratos, como se han observado en diferentes enfermedades sistémicas, en las que el aumento en la producción de citocinas inducen la síntesis de NO.

1.3.2 Otros mecanismos de toxicidad a agentes infecciosos por el NO.

1.3.2.1 Reacciones con grupos sulfhidrilos.

El NO puede formar un aducto estable, llamado nitrosotiol, con el grupo sulfhidrilo (SH) (Mirna *et al.*, 1969). El efecto tóxico de nitrosotioles ha sido demostrado en extractos de *Salmonella*, *Streptococcus faecium*, *Clostridium sporogenes* (Incze *et al.*, 1974) y *P.falciparum* en estado asexual (fase eritrocitaria) (Rockett *et al.*, 1991). Tanto los sulfhidrilos intracelulares como los de la pared celular pueden ser "blanco" para el NO (Riha *et al.*, 1975).

1.3.3 Producción de NO durante las infecciones.

Desde hace más de un siglo se sabe que los mamíferos excretan nitrato en su orina (Mitchell *et al.*, 1916). Una explicación inicial para esto, incluye la ingestión de óxidos de nitrógeno (Radomski *et al.*, 1978; Chilvers *et al.*, 1984), pero posteriormente se demostró que hay una producción endógena de nitratos. Primero se argumentó que el nitrato provenía de los microorganismos de la flora intestinal, sin embargo, ratas libres de gérmenes sintetizaron nitrato. Una fuente de nitrato *in*

vivo es el amoníaco, y también la arginina, con la que se sintetiza NO. Esto ha sido confirmado en humanos empleando ($^{15}\text{N}^4$)-L-arginina (Castillo *et al.*, 1993).

La información relativa a diversas vías en las que el NO destruye parásitos es de suma importancia. Dosis bajas de NO pueden estimular el crecimiento del parásito, sin embargo esto puede ser revertido a altas dosis. La respiración es también afectada, así como los procesos que requieren energía, metabolismo de fármacos, la vía de antioxidantes (vía del consumo de grupos SH), daño en el ADN (incluyendo mutaciones no letales) y daño a proteínas debido al consumo de sus grupos SH y de la N-nitrosilación (Clark *et al.*, 1994).

2. NO EN DEFENSA DEL HOSPEDERO CONTRA PARÁSITOS.

2.1 Evidencias de la actividad antiparasitaria del NO

Existen evidencias de la actividad antiparasitaria *in vitro* de la producción de NO y/o sus productos de oxidación tales como:

Correlación entre la producción de NO por la activación de citocinas de cultivos celulares y la muerte o inhibición del crecimiento de microorganismos (Fig.3);

Requerimientos de L-arginina para la actividad antiparasitaria e inhibición de esta actividad antiparasitaria en la presencia de inhibidores de iNOS (Fig.3);

Demostración de un efecto citotóxico directo de NO, o compuestos que generan NO en los agentes patógenos (Oswald *et al.*, 1996).

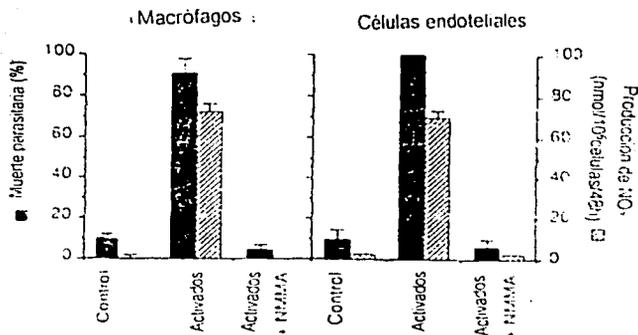


Figura 3. El NO procedente de macrófagos murinos y células endoteliales inhibe el desarrollo de larvas. Macrófagos cultivados en tioglicolato o en células endoteliales, fueron tratados con una combinación de citocinas (100 U/mL de TNF- γ y 1000 U/mL de TNF- α), en la presencia o ausencia de 1mM de NMMA. Las células fueron incubadas y se encontró que a una concentración de 100000:1 la mortalidad de schistosomula de *Schistosoma mansoni* fue mayor. La mortalidad de los parásitos fue cuantificada microscópicamente 48 horas después de la incubación. La acumulación de nitrato en el sobrenadante celular fue cuantificado por medio de la reacción de Griess Tomado y adaptado de Oswald, 1996.

2.2 Métodos para la cuantificación del óxido nítrico.

En farmacología y toxicología se emplean las siguientes estrategias para detectar NO

El NO es "atrapado" por nitrosocompuestos, o al reducir la hemoglobina, forma un aducto estable que es detectado por resonancia paramagnética de electrones

El NO se oxida y reduce la hemoglobina a metahemoglobina, la cual es detectada por espectrofotometría.

El NO interactúa con el ozono produciendo luz "quimioluminiscente". Este ensayo es muy sensible pero requiere de equipo especial (Archer *et al.*, 1993)

La actividad antimicrobial del NO usualmente requiere de la producción de grandes cantidades de NO por la NOs inducida por citocinas, los inmunólogos pueden emplear técnicas menos sensibles para medir la producción de NO. En particular, la cuantificación de citrulina, NO₂, NO₃, y los productos de la desaminación oxidativa de la L-arginina, sirven como indicadores de la producción de NO, tanto en cultivos celulares como en fluidos corporales tales como orina o plasma (Granger *et al.*, 1991; Evans *et al.*, 1993). Las concentraciones de NO pueden determinarse por la reacción con el reactivo de Griess, así como la producción de un cromóforo que absorbe a 543 nm. El NO₃ es cuantificado como NO₂ siendo reducido por *Pseudomonas oleovorans*. La citrulina es cuantificada por medio de la eliminación de urea detectando un compuesto carbamino por medio de un ensayo colorimétrico (Lepoivre *et al.*, 1990). Otro método para tener un seguimiento de la producción de NO es el análisis de la expresión de iNOs. La iNOs puede ser detectada, ya sea por la producción de la enzima o por los niveles de RNAm. La cuantificación de la proteína iNOs por Western blot, requiere de anticuerpos específicos policlonales o monoclonales (Vodovotz *et al.*, 1993). Estos anticuerpos también pueden ser empleados para estudiar la expresión en tejidos o la localización subcelular de iNOs por inmunoquímicos (Wynn *et al.*, 1994). Los niveles de RNAm de

iNOs pueden ser evaluados empleando métodos de hibridación tales como el Northern blot o un método más sensible basado en la amplificación de cDNA por la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Esta técnica detecta pequeñas cantidades de mRNA (Wynn *et al.*, 1994).

El NO constituye un factor fisiológico o patológico dependiendo de la magnitud y duración de su síntesis. Las acciones fisiológicas son mediadas por ligeros incrementos (generalmente por la activación de la cNOs) mientras que las actividades patológicas son el resultado de la producción continua de altos niveles de NO (de Castro *et al.*, 2001).

2.3 Efecto antiparasitario de la síntesis del óxido nítrico inducida por citocinas

La expresión de iNOs se extiende más allá del sistema inmunológico e incluye tejidos y muchos más sitios. Por ejemplo, las células del músculo liso (Busse *et al.*, 1990), miocitos cardiacos, fibroblastos (Werner-Felmayer *et al.*, 1990), hepatocitos (Curran *et al.*, 1989), astrocitos (Lee *et al.*, 1994), osteoblastos (Ralston *et al.*, 1994), células epiteliales (Heiss *et al.*, 1994) y células endoteliales (Oswald *et al.*, 1994), producen cantidades masivas de NO bajo la estimulación de citocinas.

Es evidente que el NO producido puede representar una defensa antimicrobial intrínseca contra patógenos que se localizan en el interior de las células a través de todo el organismo (James *et al.*, 1991). Por ejemplo, hepatocitos tratados con IFN- γ exógeno causa un incremento en la producción de NO por hepatocitos humanos, esto indica que el parásito provee de una señal que activa la inducción del NO (Mellouk *et al.*, 1994).

Se ha demostrado que las células endoteliales murinas pueden ser activadas por citocinas para destruir a *Squitosomas larvae* a través de la producción de NO (Oswald *et al.*, 1996). Tales células tratadas con citocinas demostraron incrementar la expresión de ARNm para iNOs, y tanto la producción de NO como la muerte de las larvas fue suprimido por tratamiento con NMMA o

NAME (Nussler *et al.*, 1991).

La producción de NO por diversos tipos de células también está implicada en la patología que se presenta durante la infección microbiana. Se demostró que el NO contribuye a el daño de tejidos en la tos ferina (Heiss *et al.*, 1994). *Bordetella pertussis*, el agente etiológico de la tos ferina, libera una citotoxina la cual es responsable de la producción de NO por las células de las vías respiratorias.

Uno de los "órganos blanco" del NO es el epitelio traqueal en donde actúa causando ciliostasis y daño a las células ciliadas. Se ha propuesto que una sobreproducción de NO puede ser la responsable de el síndrome neurológico característico del paludismo cerebral (Clark *et al.*, 1991). Sin embargo, la administración de NMMA no revierte las complicaciones neurológicas en ratones infectados con *P. berghei* (Clark *et al.*, 1991).

2.4 Evidencias *in vitro* e *in vivo* de que el óxido nítrico actúa como un agente antiparasitario.

El NO participa en la actividad antimicrobiana de macrófagos para una gran variedad de patógenos, incluyendo hongos (Granger *et al.*, 1988), bacterias (Lepoivre *et al.*, 1991) y virus (Karupiah *et al.*, 1993).

El requerimiento de L-arginina por los macrófagos es mediador en la muerte o citostasis de diversos parásitos extracelulares e intracelulares, tales como *Leishmania major*, *L. enrietti*, *T. brucei* y *T. cruzi*, *Plasmodium yoelii*, *P. berghei* y *P. falciparum* además de *Schistosoma mansoni*. En algunos patógenos, se ha demostrado que se puede ejercer un efecto citotóxico por la exposición directa a NO en forma de gas o compuestos que lo generan (James *et al.*, 1989).

2.5 "Blancos" del NO

La fuente, magnitud y duración de la síntesis del NO por las células, determina su acción en la actividad fisiológica normal, respuesta inmune o patológica. Las acciones fisiológicas son

mediadas por la NO constitutiva que genera pequeñas cantidades de NO (Nathan *et al.*, 1992)

Niveles altos de NO pueden inactivar enzimas que en su estructura presentan átomos de hierro, por medio de nitrosilación del grupo prostético Fe-S de su sitio activo. Estudios de resonancia paramagnética de electrones confirman que la formación de L-arginina depende del grupo nitrosil-ferro-sulfuro. Se ha demostrado que el NO inhibe a la ribonucleótido reductasa, así como algunas enzimas mitocondriales que contienen átomos de hierro: aconitasa, del ciclo de Krebs, NADPH-ubiquinona oxidoreductasa y succinato-ubiquinona oxidoreductasa de la cadena de transporte electrónico. La citocromo P450 involucrada en la biotransformación hepato celular, ha sido identificada como un "blanco" para la acción del NO (Rockett *et al.*, 1991) (Tabla 1)

Tabla 1. Moléculas "blanco" del óxido nítrico

Moléculas "blanco"	Mecanismo	Ejemplos
Proteínas	Unión al hierro del grupo hemo	guanilato ciclasa, hemoglobina, NADPH-ubiquinona oxidoreductasa succinato-ubiquinona oxidoreductasa
	Unión al grupo hierro-tiol	cis-aconitasa, ribonucleótido reductasa
	ADP-ribosilación	GAPDH
Ácidos nucleicos	Desaminación	ADN
Radicales		Anión superóxido

Tomada y adaptada de Lowenstein, 1994.

El NO exógeno difunde dentro de los glóbulos rojos infectados con plasmodio, formando un complejo con cisteína o glutatión para formar un grupo nitrosotiol, demostrando ser 1000 veces más tóxico contra merozoítos que el NO, nitritos o nitratos solos. Otros "blancos" susceptibles a la acción del NO es la inactivación de la superóxido dismutasa dependiente de hierro (SOD) (Beckman *et al.*, 1991).

La generación de niveles elevados de NO puede tener efectos adversos en el hospedero. La sobreproducción de NO esta relacionada con la supresión de la respuesta inmune, fallas metabólicas y eventuales colapsos cardiovasculares. La producción NO también inhibe la ATPasa vacuolar tipo II y altera a la ATPasa de macrófagos, dañando la fagocitosis, síntesis de proteínas y la actividad antimicrobiana (Liew *et al.*, 1990).

2.6 Regulación de la síntesis de NO por citocinas.

La producción de NO por la iNOs es regulada por citocinas y el mejor funcionamiento de estas vías pueden prevenir la toxicidad para el hospedero. Citocinas tales como IFN- γ y TNF- α regulan positivamente la expresión de iNOs. La lipoprotein lipasa puede sinergizar con el IFN- γ para inducir la producción de NO por macrófagos (Renbier *et al.*, 1995). Otras citocinas tales como TGF- β , IL-4, IL-10 e IL-13 pueden bloquear la producción de NO, inhibiendo la actividad antimicrobial mediada por células (Langermans *et al.*, 1992).

2.6.1 Interferon γ

El IFN- γ es el activador prototipo para virtualmente todas las funciones de los macrófagos y monocitos incluyendo la producción de NO. Existe sinergismo entre el IFN- γ y los productos bacterianos tales como lipopolisacáridos (LPS) o muramil dipéptido (MDP) de las paredes celulares de mycobacterias (Oswald *et al.*, 1994).

Diferentes tipos de células son capaces de expresar iNOs; Sin embargo, la citocina que se requiere para inducir la producción de NO varía según el tipo de célula. Por ejemplo, la activación de macrófagos inflamatorios murinos por la producción de NO y destrucción de los parásitos se obtiene por un estímulo muy simple (por ejemplo, IFN- γ ó LPS), mientras que la activación de las células endoteliales requiere de una interacción con al menos dos estímulos, tales como combinaciones de LPS, IFN- γ , TNF- α , IL-1 α , o IL-1 β (Oswald *et al.*, 1994).

2.6.2 Factor de crecimiento- β transformante

In vitro TGF- β bloquea la actividad antiparasitaria dependiente de NO de los macrófagos para diferentes parásitos, incluyendo *L. major*, *T. cruzi* y *S. mansoni*.

Estudios recientes indican que el TGF- β suprime la expresión de la iNOs por tres mecanismos distintos: Decrece la estabilidad del RNAm de iNOs, decrece la translación de RNAm de iNOs, e incrementa la degradación de la enzima iNOs.

El TGF- β actúa inhibiendo la activación de los macrófagos y por lo tanto la producción de NO (Gazzinelli *et al.*, 1992).

2.6.3 Interleucina-10

La IL-10 inhibe la secreción de NO. El bloqueo en la producción de NO es debido a la supresión de la síntesis endógena de TNF- γ , sin embargo la administración exógena puede restaurar la expresión de NO en macrófagos inflamatorios tratados con IL-10 (Corradin *et al.*, 1993).

La IL-10 es producida, no solo por células T y B, sino también por macrófagos activados; Esta activación endógena de la IL-10 puede actuar como un factor autorregulador de la activación de macrófagos.

La forma por la cual la IL-10 inhibe la producción de NO parece depender de la población de macrófagos. Por ejemplo, la IL-10 bloquea la producción de NO y la muerte de parásitos en

macrófagos cultivados con tioglicolato pero éste efecto fue menor en macrófagos cultivados con caseína o macrófagos residentes en células (Fig. 4). Sin embargo, se demostró que en macrófagos derivados de médula, la IL-10 incrementa el RNAm de la iNOs y por lo tanto la producción de NO (Corradin *et al.*, 1993).

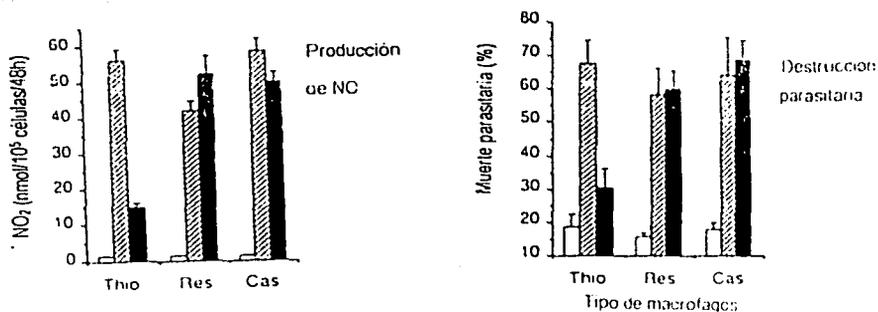


Figura 4. Efecto diferencial de IL-10 procedente de diferentes poblaciones de macrófagos. A macrófagos residentes en células peritoneales murinas, macrófagos cultivados con tioglicolato y macrófagos cultivados con caseína, se les adicionó 100U/mL de IFN- γ en la presencia (■) o ausencia (□) de 250 U/mL de IL-10. Células sin tratar fueron empleadas como control (□). Las células fueron incubadas con *Schistosomulum* por un periodo de 48 horas, la muerte de los parásitos y la producción de NO fue cuantificada. Tomado y adaptado de Oswald, 1996.

2.6.4 Interleucina-4

Al igual que TGF- β y la IL-10, la IL-4 bloquea la producción de NO e inhibe la muerte de los parásitos mediada por macrófagos. Sin embargo, aunque estos tres tipos de citocinas son igualmente potentes para bloquear la activación de macrófagos, inhibiendo tanto la producción de NO como la destrucción de los parásitos, aunque solo la IL-4 inhibe la actividad larvicida mediada por células endoteliales (Jacobs *et al.*, 1996).

2.6.5 Interleucina-13

Se describió recientemente que la IL-13 tiene una actividad similar a la de la IL-4. La IL-13 deprime la producción de NO por macrófagos activados, y esta supresión en los niveles de NO hace que disminuya la actividad contra *L. major* (Oswald *et al.*, 1996).

Estas citocinas no solo actúan individualmente, sino también en combinación sinérgicamente para suprimir la función de los macrófagos (Oswald *et al.*, 1996).

3. EL CASO DEL PALUDISMO.

3.1. Citocinas y paludismo.

El paludismo es un modelo de investigación de gran utilidad para los mecanismos generales implicados en las enfermedades sistémicas. El agente infeccioso está restringido a los eritrocitos del hospedero (además del estado hepático, aparentemente no patogénico), causando una patología sistémica, es decir, afectando a varios órganos, dañando células y tejidos con los que no está en contacto directo (Clark *et al.*, 1996).

Las citocinas tales como TNF- α e IL-1 son tóxicas cuando son producidas constantemente, y pueden causar síndromes tales como el observado en el paludismo, que afecta a humanos (Clark *et al.*, 1981). Los productos de esquizogonia activan la síntesis de citocinas tales como TNF- γ e IL-1 y los niveles de estas citocinas en suero, pueden correlacionarse con la gravedad de la enfermedad (Clark *et al.*, 1996).

3.2 Enfermedades similares no infecciosas.

Un exceso en la producción de citocinas está relacionada directamente con la patogénesis de enfermedades sistémicas infecciosas, tales como el paludismo, siendo posible reproducir la patología de esta infección, inyectando citocinas. Algunas terapias aplicadas en enfermedades no infecciosas, inducen la producción de citocinas, que pueden hacer que se presenten alteraciones en el organismo, similares a las que se observan en el paludismo (Clark *et al.*, 1996).

3.2.1. Efecto de la inmunoterapia.

El efecto de los agentes inmunoterapéuticos depende de la dosis, se observó que en pacientes con tumores a los que se les administró TNF- α experimentaron una sintomatología similar a la

observada en el paludismo: náusea, vómito, diarrea, fatiga, fiebre, escalofrío, trombocitopenia, anorexia, hipotensión, mialgia, anemia, hipertrigliceridemia, y estados mentales alterados. Además de la disminución de los niveles de hierro en el suero, la cascada de la coagulación puede ser activada, y los niveles de lactato en el plasma puede aumentar. Estos cambios son inducidos frecuentemente por dosis pequeñas de TNF- α , suficientes para detectar un aumento de TNF- α en suero. Empleando ratones, se encontró acumulación de leucocitos en vasos sanguíneos pulmonares, además de un incremento en los niveles de lactato. También se manifestó hipotensión, lesiones hemorrágicas, necrosis medular adrenal y necrosis tubular renal aguda. La IL-1 e IL-2 producidos por el estímulo del TNF- α , producen algunos de los efectos antes mencionados. Toda esta patología, incluyendo la hepatomegalia producida por TNF- α en ratas, pueden presentarse en el paludismo humano. Aunque el TNF- α exógeno y funcionalmente similar a las citocinas puede reproducir la patología del paludismo, estas citocinas no son los mediadores finales de estos cambios. El NO revirtió algunos de estos cambios. Se reportó que la hipotensión inducida en perros por TNF- α puede ser revertida inyectando análogos de arginina. (Clark *et al.*, 1994).

3.3. Óxido nítrico y paludismo

3.3.1 Orígenes de la importancia del óxido nítrico en la patología del paludismo.

Se trabajó con el bacilo de Calmett-Guérin (BCG) y el parásito del paludismo, con lo que se argumentó que las citocinas inflamatorias juegan el papel central en la respuesta del hospedero para contribuir a controlar al parásito del paludismo y que son las que causan la sintomatología de la enfermedad (Clark *et al.*, 1987).

3.3.2 Inhibición de los parásitos del paludismo por el NO

3.3.2.1 Óxido nítrico y el estado asexual en sangre del parásito del paludismo.

Se demostró la participación de varios mediadores activos contra formas asexuales del *Plasmodium* en la sangre. Tales mediadores incluyen anticuerpos, radicales libres y sustancias que estimulan a los macrófagos y eosinófilos (Mc Gregor *et al.*, 1966; Butcher *et al.*, 1970).

Se adicionaron donadores de NO a un cultivo de *Plasmodium falciparum* y se demostró que su crecimiento fue inhibido (Rockett *et al.*, 1990).

Cuando se administró N⁶-monometil-L-arginina (L-NMMA), a ratones con *Plasmodium vinckei*, no se observó cambio alguno en el curso de la infección. Cuando se utilizaron ratones infectados con *P. chabaudi adami*, sólo se observó un retraso de 24 horas en el inicio de la crisis propia de esta infección (Clark *et al.*, 1996).

Las células T_{H1} CD⁴⁺ son los principales productores de NO (Taylor *et al.*, 1999) Se demostró que los macrófagos producen NO después de la presentación de antígeno por células T_{H1} y que éste inhibió la proliferación de células T_{H1} y T_{H2}, con lo que se inhibe también la producción de algunas citocinas (Roel *et al.*, 2000).

La función inmunosupresora del NO disminuyó la producción de IL-2 *in vivo*, e indirectamente la del IFN- γ y del TNF- α , debilitando la respuesta inmune mediada por las células del hospedero, lo cual es enmascarado por el efecto protector antipalúdico del mismo NO (Taylor *et al.*, 1999).

La expresión del ARNm para la IL-2, correlacionó con la expresión de IFN- γ en la activación de macrófagos (Elias *et al.*, 1997).

Se demostró que el NO liberado por los monocitos humanos puede contribuir a la habilidad de estas células para destruir al parásito del paludismo (Gyan *et al.*, 1994).

3.3.2.2 Oxido nítrico y gametocitos de *Plasmodium sp.*

Durante una infección por paludismo, cuando la parasitemia desaparece rápidamente, existe una disminución pronunciada en la infectividad de los gametocitos (Mendis *et al.*, 1981). Lo cual es mediado por el TNF- α y el IFN- γ . La actividad de ellos parece depender de un factor soluble adicional que los monocitos de la sangre periférica de los humanos producen, debido al estímulo de endotoxinas. Se demostró que en presencia de leucocitos humanos, estas citocinas reducen la infectividad de los gametocitos de *P. vivax* y *P. falciparum* a través de un proceso que involucra al NO (Clark *et al.*, 1996).

3.3.2.3 Oxido nítrico y estado exoeritrocitario de *Plasmodium sp.*

El IFN- γ puede controlar el desarrollo de esporozoitos en el hígado (Ferreira *et al.*, 1986; Mellouk *et al.*, 1987), además de que los hepatocitos generaran NO. 1-NMMA aumenta la producción del parásito, sugiriendo que el NO basal liberado de los hepatocitos retarda el desarrollo de estos organismos. Este enfoque ha sido reforzado por la demostración de que IL-2, un estimulador de IFN- γ , protege a los ratones de la deficiencia de células T y B (ratones SCID) contra esporozoitos (Sedegah *et al.*, 1994).

Los hepatocitos humanos controlan al parásito del paludismo a través de una vía en la que interviene el NO. Tanto el parásito como el IFN- γ , proveen de una señal que induce la producción de NO por estas células (Mellouk *et al.*, 1994) (Fig. 5).

Infección bacterial

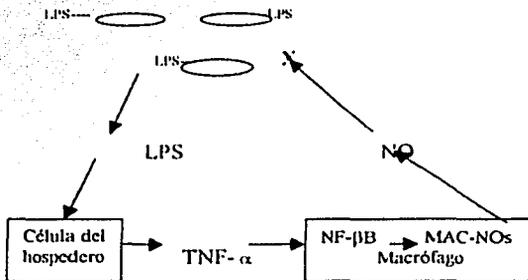


Figura 5. Inducción de NOs en macrófagos. Lipopolisacáridos (LPS) son liberados de la pared celular cuando las células son infectadas por bacterias, causando que en las células del hospedero se genere TNF- γ , éste se une a los macrófagos y activa a proteínas intracelulares tales como el factor- κ B (NF- κ B), el cual induce la transcripción de la NOS. La NOS de los macrófagos sintetiza continuamente NO, el cual destruye bacterias. MAC-NOs=NOs de macrófagos. Tomado y adaptado de Lowenstein, 1994.

3.4 Propuestas sobre el papel del NO en el paludismo

3.4.1 Efectos cardiovasculares

La guanilato ciclasa citosólica es activada cuando el NO desplaza el hierro del anillo de protoporfirina. Diversos procesos fisiológicos normales, tales como la relajación de los vasos sanguíneos, son controlados por el ciclo de la guanosina monofosfato activado por el NO. A través de este mecanismo el NO controla el tono cerebrovascular. Por esta razón en las alteraciones del NO en el paludismo cerebral, se ha incluido el concepto de que este mediador, que dilata los vasos

cerebrovasculares, también causan un incremento en la presión intracraneal que se asocia con signos clínicos observados en muchos niños africanos con paludismo cerebral (Newton *et al.*, 1991, 1994).

Si este efecto vasodilatador es más generalizado, puede observarse una tendencia a la hipotensión sistémica, la cual es mediada por las citocinas inducidas por el NO en el shock séptico y en el paludismo (Petros *et al.*, 1994).

El ejercicio físico aumenta la velocidad del flujo sanguíneo y la capacidad de vasodilatación del endotelio. Por lo tanto, se puede considerar que el entrenamiento ejerce un efecto protector sobre la función endotelial (Fiel *et al.*, 2001).

3.4.2 Lactaemia palúdica

Concentraciones elevadas de ácido láctico en el fluido cerebroespinal (White *et al.*, 1985) y en sangre (Warrell *et al.*, 1988; Taylor *et al.*, 1993) son probablemente la mejor correlación de la severidad de la enfermedad observada en el paludismo causado por *P. falciparum*. Se pensó que el incremento de la hipoxia era secundaria a la obstrucción microvascular (White *et al.*, 1985). Sin embargo existen evidencias de que el flujo de sangre cerebral durante el coma esta dentro de los rangos normales, y no se incrementa con la recuperación de la conciencia (Warrell *et al.*, 1988).

Durante algunos años se incluyó a la hiperlactaemia dentro del concepto de la inducción de citocinas en la patología del paludismo (Clark *et al.*, 1987), en infecciones no palúdicas en las que el TNF- α se incrementó o se indujo, inyectandose a animales (Tracey *et al.*, 1986) y en pacientes con tumores (Starnes *et al.*, 1988). Así cuando los niveles de TNF- α son lo suficientemente altos, dentro de los parásitos como para producir lactato o para obstruir el flujo microvascular, privando de la transferencia del transporte electrónico mitocondrial, necesitando oxígeno para activar el ciclo de TCA. Sin embargo, la hiperlactaemia en el estado de hipoperfusión se incremento desproporcionalmente con relación al piruvato, cuando esta acompañado de infecciones severas,

incluyendo al paludismo, la relación lactato/piruvato se mantiene normal (Mizock *et al.*,1995). Esto también ocurre con TNF- α (Evans *et al.*,1989). En niños con paludismo tipo falciparum, los niveles de lactato y piruvato correlacionaron todo el tiempo (Krishna *et al.*,1994).

3.4.3 Óxido nítrico como inhibidor del metabolismo aeróbico.

El NO influye el metabolismo de la célula muscular de varias formas ya que inhibe la respiración mitocondrial compitiendo con el oxígeno molecular por el sitio activo de la citocromo oxidasa. Este mecanismo regula la disponibilidad de oxígeno y energía en los tejidos (de Castro *et al.*,2001).

La inhibición mitocondrial parece ser mediada por el NO, el cual inhibe reversiblemente los centros o núcleos de hierro-sulfuro de la aconitasa y la citocromo oxidasa, los cuales son necesarios para que el TCA funcione normalmente (Hibbs *et al.*,1988). Esto provee de un mecanismo por el que los niveles de ácido láctico en plasma se incrementan en las enfermedades, en las cuales la producción de citocinas inducidas por el NO, se incrementa sustancialmente. En tales enfermedades, se incluye al paludismo, en el que el mecanismo provee de una explicación sobre la lactaemia independiente de una obstrucción mecánica de la liberación arterial de oxígeno, o de la producción de lactato por los parásitos.

3.4.4 Daño causado por la hiperlactaemia en el paludismo.

El incremento de la producción de ácido láctico en el paludismo severo, alcanzó niveles que son perjudiciales para el paciente. Debido a que el lactato puede actuar como sustrato para el metabolismo energético del cerebro, y así mostrar el efecto dañino de la hipoglucemia en las neuronas (Schurr *et al.*,1988). Existen evidencias experimentales de que niveles elevados de lactato en el cerebro tiene una acción anticonvulsinante (Fornai *et al.*,1994). Las convulsiones son

observadas como una importante complicación del paludismo tipo falciparum en niños pequeños (Wattanagoon *et al.*, 1994).

La hiperlactaemia en pacientes con paludismo puede ser solamente un marcador de la severidad de la enfermedad y de los disturbios metabólicos involucrados. Por lo que el tratamiento con dicloroacetato, reduce los niveles de lactato (Krishna *et al.*, 1994) con lo que probablemente se incrementa la supervivencia de pacientes con paludismo, lo cual ha sido aplicado a enfermedades en las que se ven afectados varios órganos, y que son acompañadas de hiperlactaemia (Staeppole *et al.*, 1992).

3.4.5 Hipoglucemia.

La hipoglucemia es una complicación importante en el paludismo tipo falciparum, produciendo síntomas que pueden ser confundidos con los del paludismo cerebral (Phillips *et al.*, 1986). En los primeros intentos para comprender las bases del consumo de glucosa del hospedero por el parásito, se propuso que niños infectados con paludismo tipo falciparum presentaban hipoglucemia primaria, porque su glucógeno hepático se agotaba (Kawo *et al.*, 1990). La corrección de la hipoglucemia es lenta si no se le da algún tratamiento (Brewster *et al.*, 1990).

3.4.6 Inhibición de la gluconeogénesis.

La hipoglucemia causada por el paludismo a través de las citocinas inducidas por el parásito bloquean la gluconeogénesis hepática (Clark *et al.*, 1987). Se ha reportado que cambios bioquímicos consistentes con el bloqueo hepático de la gluconeogénesis en pacientes jóvenes con paludismo que presentaron hipoglucemia, y niveles en suero de TNF- α fueron también correlacionados con la hipoglucemia en niños con paludismo severo tipo falciparum (Grau *et al.*, 1989). Los efectos del TNF- α sobre las enzimas que intervienen en la gluconeogénesis han sido estudiadas en detalle y se ha demostrado que esta involucrado también el fosfoenolpiruvato (Yasminch *et al.*, 1992), una

enzima cuya formación es inhibida por el NO (Horton *et al.*, 1994). El TNF- α al inducir la producción de NO, provee de una vía en la que actúa el NO en la hipoglucemia observada en el paludismo.

3.4.7 Incremento en la degradación de glucosa.

Así como el TNF- α altera la gluconeogénesis también incrementa la utilización de glucosa (Evans *et al.*, 1989). Empleando TNF- α y miocitos *in vitro*, se investigó el mecanismo por el cual el TNF- α altera tanto los niveles de glucosa como de lactato. La rápida elevación en la utilización de glucosa y la acumulación de lactato en macrófagos, se mide a través de la producción de dióxido de carbono a partir de la glucosa, sin embargo esto no nos explica el rápido incremento en la actividad glucolítica. Más sin embargo, la interrupción en la producción de lactato por la exposición de las células al dicloroacetato, el cual es un estimulador de la piruvato deshidrogenasa, no previene el rápido incremento en la degradación de glucosa. Se argumentó que la deficiencia de energía es mayor debido a la actividad del TNF- α del ciclo fútil, entre fructosa-6-fosfato y fructosa-1-6-difosfato siendo el mayor componente del efecto estimulador de estas citocinas sobre la glucólisis en el músculo. Así como el agotamiento en las reservas de glucógeno predisponiendo a la hipoglucemia, esto puede incrementar la producción de ácido láctico. Estos conceptos no han sido investigados en el contexto de enfermedades infecciosas. Sin embargo, estos resultados y la observación de que el NO puede inhibir a la aldolasa, así como en el hígado a la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (la cual es una enzima que actúa en la gluconeogénesis), el efecto de las citocinas inducidas por NO en esta parte de la vía de la glucólisis puede tener importantes implicaciones para el mecanismo tanto de la hipoglucemia como de la hiperlactemia en el paludismo.

3.4.8 Inhibición de la aldolasa.

El NO inhibe la actividad de la aldolasa que es producida en el músculo. El término de aldolasa tipo A se emplea para la isoenzima que es específica para la fructosa-1-6-difosfato. La aldolasa tipo B, está presente en el hígado, utiliza a la fructosa-1-fosfato. Una deficiencia congénita de aldolasa tipo B lleva a una condición llamada intolerancia hereditaria a la fructosa, en la que hay náusea, vómito, hipoglucemia y lactoacidemia ocurren después de la ingestión de moléculas que contienen fructosa tales como el sorbitol, sucrosa o de la misma fructosa. El NO al inhibir en el hígado a la aldolasa tipo B tanto del hígado como del músculo, ocurren cambios bioquímicos.

Estos dos tipos de aldolasas tienen propiedades físicas y químicas en común (Rutter *et al.*, 1961), tanto el tipo B como el tipo A son inhibidas por el NO.

3.5 Paludismo cerebral.

El mecanismo tradicional del paludismo cerebral es la obstrucción de la microvasculatura por los eritrocitos parasitados (MacPherson *et al.*, 1985) pero de acuerdo con el resto de la patología del paludismo (Sección 3), y por la observación de los estados alterados de conciencia en el paludismo tipo falciparum, asociado con hipoglucemia (Grau *et al.*, 1989) o no (Kwiatkowski *et al.*, 1990), se ha propuesto que son de algún modo debidos a un exceso de citocinas inflamatorias. Se han sugerido algunos mecanismos que explican la inducción del coma no-hipoglucémico por las citocinas inflamatorias incluyendo el daño celular (Grau *et al.*, 1987) y la adhesión de eritrocitos parasitados a las paredes endoteliales (Berendt *et al.*, 1989). La severidad de las lesiones está correlacionada con la duración de la infección (Vuong *et al.*, 1999).

Esta explicación parece ser incompleta, pues la infección o incremento sistémico de la producción de citocinas inflamatorias en personas infectadas con paludismo son asociados con la gravedad de los síntomas del paludismo, incluyendo cambios reversibles en los estados neurológicos.

(Clark *et al.*,1992). Esto ocurre en la ausencia de evidencias de daño endotelial (Olweny *et al.*,1986).

3.5.1 Teoría del NO en el paludismo cerebral.

La causa de la pérdida de la conciencia en el paludismo cerebral es poco probable que sea debida a una liberación adecuada de sangre y por consiguiente de oxígeno y glucosa a las neuronas. El flujo sanguíneo es dañado por eritrocitos parasitados adheridos al endotelio vascular de pequeños vasos sanguíneos. Tales propuestas provienen de pacientes que se recobran del paludismo cerebral, a pesar de un largo periodo de coma, encontrándose una baja incidencia de deficiencias residuales neurológicas observadas cuando hay episodios breves de coma pos-isquémico.

El TNF- α puede inducir a las células que producen NOs inducible para secretar suficiente NO, el cual tiene una acción importante en la función sináptica normal (Schuman *et al.*,1994). La habilidad del NO exógeno o endógeno, para reducir la actividad electrofísica que produce NMDA y la entrada de calcio dentro de las neuronas post sinápticas. Un efecto inhibitorio similar sobre los canales de NMDA se ha establecido con varios agentes, tales como el etanol (Dildy *et al.*,1989) y la anestesia general, que pueden tener algunos efectos en los estados mentales similares a los observados en el paludismo tipo falciparum. Así esto parece indicar que un exceso de NO es generado cerca de las neuronas por las citocinas, tal como en las paredes cercanas a los vasos sanguíneos en donde se encuentran los esquizontes (Clark *et al.*,1996).

Se ha propuesto que el NO radia hacia las paredes de los vasos sanguíneos cerebrales, donde el TNF- α y la IL-1 pueden estimular su liberación del endotelio y de las células del músculo liso, y de esta forma difundir cerca del Sistema Nervioso Central (SNC) y las neuronas alterando su función; A bajas concentraciones produce síntomas leves, pero a altas concentraciones puede inducir el coma (Clark *et al.*,1991,1992).

El NO generado por la estimulación de las neuronas del SNC es la causa de la vasodilatación local que siempre acompaña a la actividad sináptica (Northington *et al.*, 1992).

Una complicación de la patología del paludismo son las convulsiones (Wattanagoon *et al.*, 1994), similarmente, la producción de NO también produce convulsiones, (Mollace *et al.*, 1991) así mismo como dilatación de las arteriolas nerviosas cerebrales (Faraci *et al.*, 1993)

3.5.2 El papel de los parásitos en su etapa eritrocitaria.

El bloqueo mecánico de los microvasos cerebrales (MacPherson *et al.*, 1985), así como la hipótesis basada en áreas locales de hipoglucemia y acidosis dentro del cerebro (Berendt *et al.*, 1994), dependen directamente del consumo de glucosa y de la excreción de lactato por los parásitos. La teoría del NO/citocinas es también consistente con el importante papel del parásito en los vasos sanguíneos cerebrales, en los que la esquizogonia de estos parásitos, puede causar elevación en las concentraciones locales de citocinas, y por lo tanto de NO dentro de la vasculatura cerebral que en el resto de la circulación. La destrucción de eritrocitos ocurre a través de la fagocitosis de eritrocitos infectados con merozoitos, siendo probablemente la causa de la anemia observada en el paludismo (Jakeman *et al.*, 1999).

La isquemia secundaria a la presencia de parásitos en la circulación, contribuye a la sintomatología del paludismo cerebral humano, particularmente en los casos severos (Wei *et al.*, 1994).

3.5.3 Expresión de las moléculas de adhesión por las citocinas reguladas por el óxido nítrico.

El NO puede causar una sintomatología similar a la del paludismo cerebral, la cual es menor cuando es inducido por citocinas. La actividad de las citocinas está regulada por las moléculas de citoadhesión que unen a los eritrocitos infectados con *P.falciparum* a las paredes del endotelio

(Berendt *et al.*, 1993). El TNF- α , así como la IL-1, incrementan la adherencia de los eritrocitos infectados con *P.falciparum*. (Cid *et al.*, 1994).

3.5.4 Lactato.

Como se discutió en la sección 3.4.2 la hiperlactaemia que se observa en el paludismo, y que generalmente se atribuye a la glucólisis anaerobia que es consecuencia de la isquemia, la cual aumenta por el efecto inhibitorio del NO, generado por las citocinas inflamatorias, en el ciclo de TCA. Los niveles de lactato en el fluido cerebroespinal son buenos indicadores para pronosticar el paludismo cerebral (White *et al.*, 1987). La concentración de lactato encontrado en el fluido cerebroespinal, está directamente relacionado con la severidad del paludismo cerebral (Clark *et al.*, 1996).

3.5.5 Ingesta de una dieta rica en nitratos.

Uno de los propósitos de la ingestión de éste tipo de dieta, es cuantificar la producción de NO en pacientes con paludismo. Se ensayó con el nitrato del plasma, encontrando más nitrato en niños africanos con paludismo cerebral, además se encontró que en niños menos afectados, la concentración de nitratos en plasma fue mayor, e inferior en los niños que presentaban un coma profundo de larga duración, teniendo un resultado desfavorable (secuelas neuronales o muerte). Como primer punto, tenemos que esto es contrario a la idea de que el NO contribuye a el coma e incrementa la presión intracraneal observada en el paludismo cerebral humano, pero se ha sugerido (Clark *et al.*, 1994) que estos datos simplemente reflejan el tiempo que transcurrió desde que cada grupo de niños ingirieron por última vez la dieta rica en nitratos. El periodo de tiempo desde la última ingesta de nitrato, pudo haber sido largo en estos niños que presentaron un coma prolongado, así analizando su plasma se observó que los niveles de nitrato fueron bajos. Las concentraciones de nitrato no correlacionaron con la duración del coma. Muchos comestibles comunes, incluyendo

vegetales (Kilgore *et al.*, 1963), melones y pescado (Hibbs *et al.*, 1992), así como el agua (Chilvers *et al.*, 1984) tienen un alto contenido de nitrato. Se ha comprobado que la producción endógena de nitrato es suficiente, para nuestras necesidades dietéticas (Radomski *et al.*, 1978). Alteraciones en la transcripción de la NOS inducible en ratones de mayor edad, pueden hacer disminuir la producción de varias moléculas inflamatorias en la ausencia de un estímulo exógeno. La ingestión del antioxidante α -tocoferol (vitamina E), restaura tanto la regulación del IFN- γ como la secreción de NO (Mattew *et al.*, 1999).

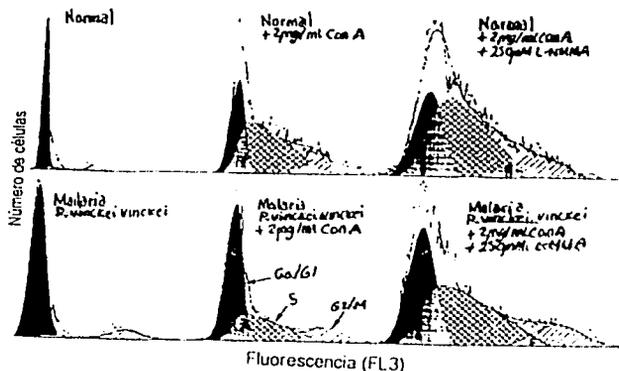
3.6 Inmunosupresión

Uno de los efectos del TNF- α en pacientes con tumores, incluye al herpes labial (Diehl *et al.*, 1988; Tanneberger *et al.*, 1988), una lesión comúnmente observada en el paludismo y atribuida a la inmunosupresión que acompaña a la enfermedad. El paludismo deteriora la eficacia de las vacunas en infantes, tales como la de tetanos, tifoidea y enfermedades meningococcicas. Los mecanismos para explicar la inmunosupresión en el paludismo incluyen un cambio en la función de los macrófagos (Greenwood *et al.*, 1971; Correa *et al.*, 1980), decrementó en la producción de citocinas (Lelchuk *et al.*, 1984) y un incremento en los niveles de inhibidores de citocinas tales como el receptor soluble para la IL-2 (Lelchuk *et al.*, 1985; Kwon *et al.*, 1991; Lepoivre *et al.*, 1991) han demostrado que el NO inactiva a la ribonucleótido reductasa, de esta manera inhibe la capacidad de las células para sintetizar DNA. Esta parece ser la base de la citostasis inducida por los macrófagos de células tumorales (Kwon *et al.*, 1991) y se ha propuesto como una explicación para el efecto citostático inducido por TNF- α en varias patógenesis, incluyendo *Mycobacterium spp.* y *Leishmania spp.* (Clark *et al.*, 1996).

Tanto el paludismo humano como el murino (Whittle *et al.*, 1990) y el TNF- α (Gordon *et al.*, 1990) son asociados con una reducción en la capacidad de proliferación de linfocitos en

respuesta a la concavalina A (Con A), un fenómeno que puede ser causado por un aumento de NO cercano a los macrófagos estimulando a las citocinas (Albina *et al.*, 1990, Mills *et al.*, 1991). En el paludismo se presenta la inmunosupresión, en parte, por que el NO inhibe la habilidad de los linfocitos a proliferar en la presencia de Con A u otro antígeno (Clark *et al.*, 1996). Las lectinas provenientes de la concavalina A, pueden inducir la producción del NO, tanto *in vitro* como *in vivo* (Andrade *et al.*, 1999). La respuesta de células hepáticas infectadas con paludismo a la Con A fue significativamente baja en comparación con la respuesta normal de los animales. Adicionando 1-NMMA se previene la inmunosupresión tanto *in vitro* como *in vivo*. Los macrófagos de ratones infectados con paludismo pueden transferir inmunosupresión, como se demostró por su efecto sobre la proliferación de células hepáticas normales, y que este actúa a través del NO. Esto ocurre, debido a que la ribonucleótido reductasa en estas células ha sido inactivada (Kwon *et al.*, 1991; Lepoivre *et al.*, 1991). Las bases para esta idea están justificadas en el hecho de que las células hepáticas de ratones infectados con paludismo entran en la fase S del ciclo celular cuando se estimulan con Con A (Rickett *et al.*, 1994) (Figura 6).

La inhibición de la ribonucleótido reductasa de progenitores de eritrocitos por citocinas inducidas por NO en médula, explica por que la eritropoyesis es pobre en el paludismo (Phillips *et al.*, 1986), el TNF- α (Clark *et al.*, 1988; Johnson *et al.*, 1989) también conduce a anemia. La hidroxiourea, el prototipo farmacológico de los inhibidores de la ribonucleótido reductasa, ha sido catalogado como causante de anemia al producir NO (Kwon *et al.*, 1990).



Ejemplos de perfiles de células del bazo de ratones normales comparados con los de ratones infectados por paludismo, ambas teñidas con yoduro de propidio, y análisis del ciclo celular.

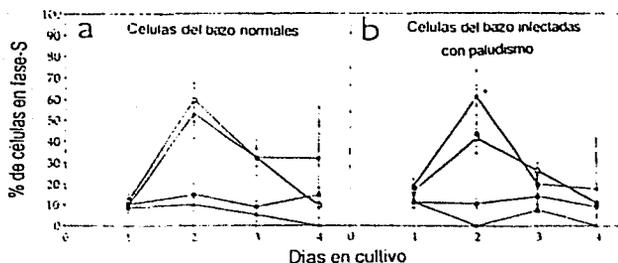


Figura 6. Análisis del ciclo celular en el segundo día de cultivo de células del bazo de (a) ratones normales y (b) ratones infectados con *Plasmodium vivax*. El porcentaje de células en fase S fueron calculadas empleando células con ciclo programado; Los puntos indican valores inferiores y las líneas verticales representan \pm SEM. Los resultados fueron obtenidos de células de bazo en medio (□), en medio más 2 (µg/mL con Con A (■), y en medio más 2 (µg/mL con Con A y 250 µM de L-NMMA (*)) y en medio más 50 (µg de L-NMMA (Δ)). El asterisco (*) indica un valor mayor a los obtenidos con medio más Con A ($P = 0.0366$ por la prueba de Mann-Whitney). Tomado y adaptado de Clark 1996.

3.7 Tolerancia al paludismo

Sólo una pequeña cantidad de parásitos (50-100 parásitos por microlitro de sangre) son necesarios para infectar a humanos. En áreas hiperendémicas, tales como la costa de Papua en Nueva Guinea, es común que niños con historias de crisis repetidas de paludismo conduce a la producción de miles de parásitos, sin daño aparente (Wilson *et al.*, 1950, Mc Gregor *et al.*, 1966). Se ha documentado que tales individuos son tolerantes al paludismo. El concepto de citocinas del paludismo (ver sección 3.1) ha llevado a modelos para explicar la tolerancia al paludismo. Las propuestas se basan en la presencia de anticuerpos específicos neutralizando a los exoantígenos del paludismo que hacen aumentar al TNF- α e IL-1 (Playfair *et al.*, 1990) y la tolerancia a los efectos de ellos mismos (TNF- α e IL-1)(Clark *et al.*, 1987)

3.7.1 Relación entre la tolerancia al paludismo y la tolerancia al óxido nítrico

La posibilidad de tolerancia a los efectos del NO inducido por estas citocinas ha sido ya considerada. Cuando nitrovasodilatadores son administrados repetidamente se requieren altas dosis para alcanzar el mismo efecto terapéutico inicial. Esta tolerancia ha probado ser específica para la generación de NO por estos agentes y responsable de la actividad vasodilatadora (Bult *et al.*, 1991, Fung *et al.*, 1993).

4. SENSIBILIDAD DE LOS PARASITOS DEL PALUDISMO AL OXIDO NITRICO A BAJAS PRESIONES DE OXIGENO.

El NO y sus derivados, actúan como protectores contra el paludismo. El obstáculo para la actividad antipalúdica del NO es la ubicación inmunológica del *Plasmodium* dentro de los eritrocitos. Los protozoarios libres en la sangre (*Trypanosoma*) o dentro de los macrófagos (*Leishmania* y *Toxoplasma*) son más accesibles al NO (Jones *et al.*, 1996)

La Hb puede tener un efecto dual, como receptor o como donador de NO (Stamler *et al.*, 1997), uniéndose al oxígeno y al hierro del grupo hemo en la Hb, promueve la unión de NO a cisteína beta93, formando S-nitrosoHb. La desoxigenación es acompañada por una transición alostérica en esta molécula de alta o baja afinidad de oxígeno, con la consecuente liberación del NO. Por lo tanto si la Hb esta nitrosilada dependerá de cuanto oxígeno halla en la atmósfera del microambiente (Taylor *et al.*, 1998). El estrecho control de las propiedades vasorelajantes del NO, funciona regulando el flujo sanguíneo y facilita la eficiencia de la liberación del oxígeno a los tejidos (Ramírez *et al.*, 2001).

Esta observación conduce a que el efecto antipalúdico del NO puede variar dependiendo de la prevalencia de la presión de oxígeno: a baja presión de oxígeno, el parásito del paludismo es más susceptible. Se examinaron efectos de los generadores químicos de NO sobre el crecimiento *in vitro* del estado cíclico sincronizado de *P. falciparum* cuando se incubaba a diferentes presiones de oxígeno a una temperatura de 37^o C (Taylor *et al.*, 1988). El crecimiento del parásito fue óptimo a una concentración de oxígeno del 5%, así los resultados fueron normalizados al comparar la modulación del crecimiento por NO en cada atmósfera gaseosa (Taylor *et al.*, 1998).

La proliferación de eritrocitos parasitados, incubados con donadores de oxígeno fue mayor a concentraciones reducidas de oxígeno. A concentraciones de oxígeno del 1%, la viabilidad del parásito fue baja, como la reincubación en ausencia de NO tiene una mínima reanudación del crecimiento. Cuando se cultivan *P.falciparum* con macrófagos J774 activados para producir 60-90 micromoles de NO por un periodo de 4 horas de pre exposición a 400 U/mL de INF- γ y 10 ng/mL de lipopolisacáridos hubo un efecto citostático a 5% de oxígeno, pero citotóxico a 1% de oxígeno, para el parásito del paludismo (Taylor *et al.*, 1998).

Se demostró que los parásitos del paludismo en su estado intraeritrocítico son sensibles al NO *in vitro* y que el efecto del NO se incrementa en proporción directa al decremento en la presión de oxígeno. Sin embargo con un decremento de oxígeno la tensión del tránsito arterial-venoso, también decrece y la Hb con facilidad libera al NO. Debido a la corta vida media del NO, los vasos sanguíneos son precisamente en donde hay un íntimo contacto entre los parásitos y el NO (Clark *et al.*, 1992). Este dinámico circuito, explica como el NO y sus derivados pueden proactivarse contra el paludismo. A menor concentración de oxígeno, en ausencia de NO, la proliferación de *P.falciparum* aumenta; sin embargo en presencia de NO su proliferación disminuye. Probablemente debido a que la adaptación a la hipoxia estimula la producción de NO, pero a la vez, también su almacenamiento. (Fig. 10)(Manukhina *et al.*, 1999). Esto también ayuda a formar la hipótesis de que el NO juega un papel importante en la etiología del paludismo cerebral en estas circunstancias de producción localizada, provocando una inmunopatología, en lugar de una protección (Taylor *et al.*, 1998).

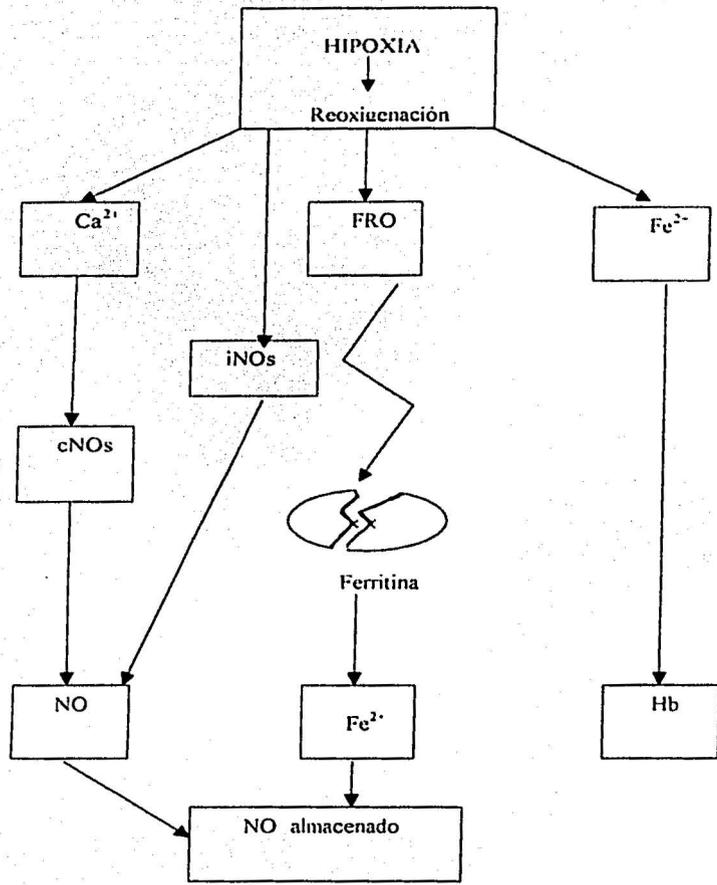


Fig. 7 Mecanismo tentativo del incremento de la síntesis y almacenamiento del NO en adaptación a la hipoxia Tomado y adaptado de Manukhina, 1999.

FRO Oxidación de radicales libres
NO Oxido nítrico
iNOS NOS inducible
cNOS NOS constitutiva
Hb Hemoglobina

5. ACCION DE LA CLOROQUINA SOBRE LA PRODUCCION DE NO Y DESTRUCCION DEL PARASITO POR LOS MACROFAGOS.

La cloroquina es la mejor droga antipalúdica conocida (Wellems *et al.*, 1992; Slater *et al.*, 1993) pero también tiene varios efectos sobre las funciones de los macrófagos. La cloroquina inhibe la fagocitosis y la síntesis de proteínas (Antoni *et al.*, 1986), procesamiento y presentación de antígenos (Unanue *et al.*, 1984; Lang *et al.*, 1991); Actúa como un agente lisosomotrópico incrementando el pH lisosomal (Ziegler *et al.*, 1982) e inhibe la transcripción del TNF- α (Zhu *et al.*, 1993).

El papel del NO en la destrucción de parásitos eucarióticos por los macrófagos esta bien documentado (Adams *et al.*, 1990). Macrófagos peritoneales extraídos *in vivo* y cultivados en caseína producían más NO, cuando fueron tratados con citocinas *in vitro* (Hrabák *et al.*, 1998)

El protozoario intracelular, *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) el cual causa la enfermedad de Chagas (Tanowitz *et al.*, 1992) se multiplica en macrófagos. Sin embargo, los macrófagos activados con IFN- γ pueden también inhibir la infección por *T. cruzi* a través de la producción de NO (Muñoz *et al.*, 1992). También se ha examinado el efecto de la cloroquina sobre el NO, la producción de urea y la capacidad de los macrófagos para controlar la infección por *T. cruzi* dependiente de la producción de NO. La síntesis de NO por los macrófagos de ratones estimulados *in vitro* con IFN- γ (Metz *et al.*, 1993) y células de rata cultivadas *in vivo* con caseína fue evaluada (Hrabák *et al.*, 1996).

La cloroquina inhibe la producción de NO por los macrófagos cuando las células son incubadas con concentraciones de 50-100 micromoles. Este efecto es debido al bloqueo de la inducción para la NOs inducible en lugar de un efecto directo sobre la actividad de la enzima. Una concentración de 50 a 100 micromoles de cloroquina, no bloquea significativamente la formación de L-citrulina (L-cit) directamente, pero las cantidades de NO y L-citrulina decrecen cuando las células

son incubadas con el fármaco durante 2 a 5 horas, indicando que el efecto de la cloroquina no es reversible. La cloroquina actúa sobre las células que activan al IFN- γ y sobre los macrófagos que pueden sintetizar NO (Tabla 2). La actividad de la NADPH diaforasa, la cual es arginina dependiente de la NOs inducible, también disminuyen con la cloroquina. Los resultados obtenidos por el método de Western blot demuestran que la cloroquina inhibe la síntesis de *NOs* y la inducción de la NOs inducible (Hrabák *et al.*, 1998).

Tabla 2. Efecto de la cloroquina sobre macrófagos activados.

Concentración de cloroquina	Actividad de la arginasa (%)	NO sintasa		Aumento de L-arginasa (%)*
		Actividad (%)*	Inducción (%)*	
Control	100	100	100	100
10 M	117	n.d	94 \pm 8	89 \pm 12
50 M	111	88 \pm 6	56 \pm 9	93 \pm 6
75 M	104	n.d	40 \pm 6	n.d
100 M	106	87 \pm 6	23 \pm 12	94 \pm 16

La actividad de la arginasa fue cuantificada espectrofotométricamente a través de la formación de urea. La actividad de la iNOs fue cuantificada por la formación de L-citrulina. * media \pm desviación estándar.

La cloroquina probablemente no inhibe selectivamente la inducción de la NOs inducible, pero tiene efecto sobre la síntesis de proteínas. No obstante, esta inhibición no análoga al efecto de la inhibición de la síntesis de proteínas, demostrado por la falta del efecto sobre la inducción de la arginasa. Los macrófagos incapaces de producir arginasa, pueden inducir la síntesis de la enzima por

adición de lipopolisacáridos. Células incubadas con lipopolisacáridos y cloroquina producen urea, y la producción de ésta es proporcional a la concentración de arginasa contenida en los macrófagos. El efecto de la cloroquina sobre la inducción de la arginasa se ilustra en la tabla 3 (Hrabák *et al.*, 1998)

Tabla 3. Efecto de la cloroquina sobre la inducción de la arginasa

MUESTRA	CONCENTRACIÓN DE UREA (nm/10 ⁵ células) *
Control	9.84±1.68
LPS	36.27±5.30
LPS + cloroquina	34.48±6.12

* media ± desviación estandar

La cloroquina puede también afectar las interacciones entre TNF- α y la formación de NO. (Zhu *et al.*, 1993). La cloroquina también inhibe la conversión de proteínas pro-TNF- α para la citocina activa en una línea celular de macrófagos, bloqueando la síntesis del RNAm (Hrabák *et al.*, 1998).

La inducción de la NOs es particularmente importante para la protección contra las infecciones parasitarias (Adams *et al.*, 1990; James *et al.*, 1991; James *et al.*, 1995). Así el bloqueo de la producción de NO puede ayudar a los parásitos a sobrevivir. Cuando se empleó el tratamiento con cloroquina, se encontraron menos células parasitadas que cuando no se aplica el medicamento. Otro mecanismo de la destrucción parasitaria está basado en el efecto lisosomotrópico de la cloroquina, aunque es poco probable, debido a que se aumenta el pH lisosomal, y para que se de la producción

de NO debe disminuir el pH, para que se forme a partir de compuestos S-nitroso (Rubanyi *et al.*, 1991). El cloruro de amonio, otro agente lisosomotrópico, no tiene el mismo efecto sobre la formación de NO, o sobre el tratamiento con TNF- α (Jae *et al.*, 1997)

La cloroquina también afecta la producción de varias citocinas involucradas en la activación de los macrófagos, y en la producción de NO. La interleucina-1 (IL-1) y el TNF- α actúan sinérgicamente sobre la producción de NO (Rockett *et al.*, 1994) La cloroquina inhibe la transcripción del RNAm del TNF- α por un anticuerpo específico que indirectamente decrete la síntesis de NO, dañando la defensa celular contra los parásitos (Muñoz *et al.*, 1992)

El tratamiento con cloroquina *in vivo* tiene como resultado, un incremento en la producción de NO en el hígado (Prada *et al.*, 1996). Esto puede ser debido a: (1) Los tipos de células presentes, (2) A las diferencias encontradas en situaciones de experimentación *in vivo* como *in vitro*; (3) A las posibles contaminaciones de cloroquina con lipopolisacáridos; (4) Al posible efecto lisosomotrópico de la cloroquina, incrementando el pH, y por consiguiente la producción de NO (Hrabák *et al.*, 1998).

El efecto de la cloroquina es mediado por lo menos en parte, por la inhibición de la NOs inducible, la droga puede quizás ser empleada en procesos patológicos en los que la inducción de NO este involucrada (Zhu *et al.*, 1993; Jae *et al.*, 1997). La cloroquina tiene la ventaja de que sus propiedades farmacológicas y sus dosis efectivas son bien conocidas (Hrabák *et al.*, 1998)

La cloroquina inhibe irreversiblemente la producción de NO en macrófagos de ratas y ratones infectados con paludismo. Paradójicamente, se ha encontrado que la cloroquina incrementa la gametocitogénesis *in vitro* de *Plasmodium falciparum*, sin embargo, esto no se ha asociado con la resistencia a la cloroquina (Backling *et al.*, 1999).

CONCLUSIONES

El NO es de gran importancia en múltiples sistemas del organismo humano. En el sistema cardiovascular, el NO actúa como vasodilatador endógeno y por tanto en la regulación del tono vascular, a nivel plaquetario, inhibe la agregación y adhesión plaquetaria; también se ha demostrado que el NO es citotóxico con características antitumorales y bactericidas. Por otra parte, la generación de niveles elevados de NO pueden tener efectos adversos en el hospedero, como lo son: supresión de la respuesta inmune, fallas metabólicas y eventuales colapsos cardiovasculares. El NO ejerce su actividad antiparasitaria de varias formas, una de las cuales es la interacción con diversas enzimas presentes en los parásitos, así como reacciones con grupos sulfhidrilos para formar nitrosotiol, el cual es tóxico para diversos parásitos.

El NO actúa como agente antiparasitario por medio de diferentes mecanismos, tales como la reacción con hierro, con grupos sulfhidrilos o por reacción con superóxido para formar peroxinitrato.

El NO es una molécula con múltiples funciones que van desde actividades fisiológicas, patológicas, antiparasitarias y terapéuticas. Son dos los principales factores que van a determinar su función: su concentración y la magnitud de la duración de su efecto.

El NO actúa como agente antiparasitario por medio de diversas vías. Sin embargo hay una gran variedad de factores que pueden actuar sobre él, para incrementar o disminuir su concentración, así como para potenciar o no su efecto.

Es necesario conocer las propiedades normales, anormales, antiparasitarias y terapéuticas del NO, para poder tener un mejor entendimiento de sus mecanismos de acción, de sus efectos y de sus posibles aplicaciones, con la finalidad de contrarrestar sus efectos no deseados y aprovechar los que nos sean de utilidad.

BIBLIOGRAFIA

- Adams, L.B.; Hibbs, J.B.; Taintor, R.R.; Krahenbuhl, J.L. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*: role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *Journal of Immunology* 1990, 144, 2725-2729.
- Albina, J.E.; Mills, C.D.; Henry, W.L.; Caldwell, M.D. Temporal expression of different pathways of L-arginine metabolism in healing wounds. *Journal of Immunology* 1990, 144, 3877-3880.
- Albornoz, L.; Motta, A.; Alvarez, D.; Estévez, A.; Bandi, J.C.; McCormack, L.; Matera, J.; Bonofiglio, C.; Cividallo, M.; de Santibañez, E.; Gimena, M.; Gadano, A. Nitric Oxide synthase activity in the splanchnic vasculature of patients with cirrhosis: relationship with hemodynamic disturbances. *Journal of Hepatology* 2001, 35, 452-456.
- Andrade J.L.; Arrada S.; Barbosa T.; Pam L.; Ramos M.V.; Cavad B.S.; Barral-Netto M. Lectin-induced nitric oxide production. *Cellular Immunology* 1999, 194, 98-102.
- Antoni, F.; Hrbák, A.; Csuka, I. Effect of emetine and chloroquine on phagocytic processes of rat macrophages. *Biochemical and pharmacology* 1986, 35, 2869-2874.
- Archer, S. Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J* 1993, 7, 349-360.
- Backling A.; Ranford-Cartwright L.C.; Miles A.; Read A.F. Chloroquine increases *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis *in vitro*. *Parasitology* 1999, 118, 339-346.
- Beckman, J.S.; The double-edged role of nitric oxide in brain function and superoxide-mediated injury. *Journal of Developmental Physiology* 1991, 15, 53-59.
- Berendt, A.R.; Simmons, D.L.; Tansey, J.; Newbold, C.L.; Marsh, K. Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for *Plasmodium falciparum*. *Nature* 1989, 341, 57-59.
- Berendt, A.R. Sequestration and its discont- infected erythrocyte- endothelial cell interactions in *Plasmodium falciparum* malaria. *Research in Immunology* 1993, 140, 740-745.
- Berendt, A.R.; Turner, G.D.G.; Newbold, C.O. Cerebral malaria the sequestration Hypothesis. *Parasitology today* 1994, 10, 412-419.
- Bredt, D. S.; Snyder, S.G. Isolation of nitric oxide synthetase a calmodulin-requiring enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1990, 87, 682-685.
- Brewster, D.; Hill, A.V.S.; Kwiatkowski, D.; Greenwood, B. Hypoglycaemia and cerebral malaria. *Lancet* 1990, 336, 951-952.

- Bult, H.; Demeyer, F.R.Y.; Jordaens, F.G.; Herman, A.G. Chronic exposure to exogenous nitric oxide may suppress its endogenous release and efficacy. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 1991, 17, S79-S82.
- Busse, R.; Molsch, A. Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *Federation of European Biochemical Societies* 1990, 275, 87-90.
- Butcher, G.A.; Cohen, S.; Garnham, P.C.C. Passive immunity in *Plasmodium knowlesi* malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1970, 64, 850-856.
- Can, C.; Sen, S.; Boztok, N.; Tuglular, I. Protective effect oral L-arginine administration on gentamicin induced renal failure in rats. *European Journal of Pharmacology* 2000, 390, 327-334.
- Castillo, L.; Derojas, T.C.; Chapman, T.E.; Vogl, J.; Burde, J.F.; Tannenbaum, S.R. and Young, V.R. Splanchnic metabolism of dietary arginine in relation to nitric oxide synthesis in normal adult man. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1993, 90, 193-197.
- Castillo, A.M. Oxido nítrico y su relación con las enfermedades del colágeno. *Archivos Dominicanos de Pediatría* 2001, 36, 23-26.
- Chilvers, C.; Inskip, H.; Caygill, C. A survey of dietary nitrate in well-water users. *International Journal of Epidemiology* 1984, 13, 324-331.
- Cid, M.C.; Kleinman, H.K.; Grant, D.S.; Schnaper, H.W.; Fauci, A.S.; Hoffman, G.S. Estradiol enhances leukocyte binding to tumor necrosis factor (TNF)-stimulated endothelial cells via an increase in TNF-induced adhesion molecules E-selectin, intercellular adhesion molecule type 1, and vascular cell adhesion molecule type 1. *Journal of Clinical Investigation* 1994, 93, 17-25.
- Clark I.A.; Virelizier, J.L.; Carswell, E.A.; Wood, P.R. Possible importance of macrophage-derived mediators in acute malaria. *Infection and Immunity* 1981, 32, 1058-1066.
- Clark, I.A. Cell-mediated immunity in protection and pathology of malaria. *Parasitology Today* 1987, 3, 300-305.
- Clark, I.A.; Chaudri, G. Tumour necrosis factor may contribute to the anaemia of malaria by causing serythropoiesis and erythrophagocytosis. *British Journal of Haematology* 1988, 70, 99-103.
- Clark, I.A.; Rockett, K.A.; Cowden, W.B. Proposed link between cytokines, nitric oxide, and human cerebral malaria. *Parasitology Today* 1991, 7, 205-207.
- Clark, I.A.; Rockett, K.A.; Cowden, W.B. Possible central role of nitric oxide in condition clinically similar to cerebral malaria. *Lancet* 1992, 340, 894-896.

- Clark, I.A. The cytokine theory of human cerebral malaria. *Parasitology Today* 1994, 10, 410-412.
- Clark, I.A.; Rockett, K.A. Nitric Oxide and Parasitic Disease. *Advances in Parasitology* 1996, 37, 1-56.
- Corradin S.B.; Fasel N.; Buchmuller-Roviller Y.; Ransijn A. Smith J.; Manuel J. Induction of macrophage nitric oxide production by interferon gamma and tumor necrosis factor-alpha is enhanced by interleukin-10. *European Journal of Immunology* 1993, 23, 2045-2048.
- Correa, M.; Narayanan, P.R.; Miller, H.C. Suppressive activity of splenic adherent cells from plasmodium chabaudi-infected mice. *Journal of Immunology* 1980, 125,749-754.
- Cox, F.E.G.; Liew, F.Y. T-cell subsets and cytokines in parasitic infections. *Immunology Today* 1992, 13, 445-448.
- Curran, R.D.; Billar, I.R.; Stuehr, F.J.; Hofmann, K.; Simunons, R.I. Hepatocytes produce nitrogen oxides from L-arginine in response to inflammatory products of Kupffer cells. *Journal of experimental medicine* 1989, 170, 1769-1774.
- De Castro, P.A.; Efectos del óxido nítrico en la fisiología muscular. *Revista Digital* 2001, 39, 150-157.
- Diehl, V.; Pfeundschuh, M.; Steinmetz, H.T.; Schaadt, M. Phase 1 studies of recombinant human tumor necrosis factor in patients with malignant disease. In: *Tumor Necrosis Factor/Cachectin and Related Cytokines* (B. Bonavida, G.E. Gifford, H. Kirchner and L.J. Old, eds) 1988, 183-188.
- Dildy, J.E.; Leslie, S.W. Ethanol inhibits NMSA-induced increases in free intracellular Ca^{2+} in dissociated brain cells. *Brain Research* 1989, 499,383-387.
- Elias K.; Haddad, A.J.; Duclos, E.A.; Wayne S.L.; Malcolm G. B. Role of interferon-gamma in the priming of decidual macrophages for nitric oxide production and early pregnancy loss. *Cellular Immunology* 1997, 181, 68-75.
- Evans, D.A.; Jacobs, D.O.; Wilmore, D.W. Tumor necrosis factor enhances glucose uptake by peripheral tissues. *American Journal of Physiology* 1989, 257, R1182-R1189.
- Evans, T.G.; Thas, L.; Granger, L.; Hibbs, J. J. Effect of *in vivo* inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasis. *Journal of Immunology* 1993, 151, 907-915.
- Faraci, F.M.; Breese, K.R. Nitric oxide mediates vasodilatation in response to activation of N-methyl-D-aspartate receptors in brain. *Circulation Research* 1993, 72, 476-480.
- Feihl, F. Influence de l'Activité Physique sui la Fonction de l'Endothelium Vasculaire. *Médecine et Hygiène* 2001, 58, 2010-2015.

- Ferreira, A.; Schofield, L.; Enea, V.; Schellekens, H.; Van der M.P., Collins, W.E.; Nussenzweig, R.S.; Nussenzweig, V. Inhibition of development of exocerythrocytic forms of malaria parasites by gamma-interferon. *Science* 1986, 232, 881-884.
- Fornai, F.; Fybdal, D.J.; Proctor, M.R.; Gale, K. Focal intracerebral elevation of L-lactate is anticonvulsant. *European Journal of Pharmacology* 1994, 254, R1-R2.
- Fung, H.L.; Solving the mystery of nitrate tolerance – a new scent on the trail. *Circulation* 1993, 88, 322-324.
- Garthwaite, J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neuroscience* 1991, 14, 60-67.
- Gazzinelli, R.T.; Oswald, I.P.; James, S.L.; Sher, A. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN- γ -activated macrophages. *Journal of Immunology* 1992, 148, 1792-1796.
- Gordon, D.; Wofsy, D. Effects of recombinant murine tumor necrosis factor- α on immune function. *Journal of Immunology* 1990, 144, 1753-1758.
- Granger, D.L.; Hibbs, J.B.; Perfect, J.R.; Durack, D.T. Specific amino acid (L-arginine) requirement for the microbistatic activity of murine macrophages. *Journal of Clinical Investigation* 1988, 81, 1129-1136.
- Grau, G.E.; Fajardo, L.F.; Piquet, P.F.; Allet, B.; Lambert, P.H.; Vassali, P. Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria. *Science* 1987, 237, 1210-1212.
- Grau, G.E.; Fajardo, L.F.; Piquet, P. F.; Allet, B.; Lambert, P.H.; Vassali, P.; Hommel, M.; Lambert, P.H. Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria. *New England Journal of Medicine* 1989, 320, 1586-1591.
- Greenwood, B.M.; Playfair, J.H.L.; Torrigiani, G. Immunosuppression in murine malaria: I. General characteristics. *Clinical and Experimental Immunology* 1971, 8, 467-478.
- Gyan, B.; Troye-Blomberg, M.; Perlmann, P.; Björkman, A. Human monocytes cultured with and without interferon- γ inhibit Plasmodium falciparum parasite growth in vitro via secretion of reactive nitrogen intermediates. *Parasite Immunology* 1994, 16, 371-375.
- Heiss, F. N.; Lancaster, J.R.; Corbett, J.A.; Goldman, W.E. Epithelial autotoxicity of nitric oxide: Role in the respiratory cytopathology of pertussis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994, 91, 267-270.
- Hibbs, J.B.; Taintor, R.R.; Vavrin, Z.; Rachlin, E.M. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1988, 157, 87-94.

- Hibbs, J.B.; Westenfelder, C.; Taintor, R.; Vavrin, Z.; Kablitz, C.; Baranowski, R.L.; Ward, J.G.; Menlove, R.L.; McMurry, M.O.; Kushner, J.P.; Samlowski, W.E. Evidence for cytokine-inducible nitric oxide synthesis from L-arginine in patients receiving interleukin-2 therapy. *Journal of Clinical Investigation* **1992**, *89*, 867-877.
- Hoberman, H.; Rittenberg, D. Biological catalysis of the exchange reaction between water and hydrogen. *Journal of Biological Chemistry* **1943**, *147*, 211-227.
- Horton, R.A., Ceppi, E.D., Knowles, R.G. and Titheradge, M.A. Inhibition of hepatic gluconeogenesis by nitric oxide: a comparison with endotoxic shock. *Biochemical Journal* **1994**, *299*, 735-739.
- Hrabák, A.; Bajor, T.; Temesi, A. Computer-aided comparison of the inhibition of arginase and nitric oxide (NO) synthase by amino acids not related to arginine. *Comp. Biochem. Physiol.* **1996**, *113b*, 375-381.
- Hrabák, A.; Sefrioui, H.; Vercrusysse, V.; Temesi, A.; Bajor, T.; Vray, B. Action of chloroquine on nitric oxide production and parasite killing by macrophages. *European Journal of Pharmacology* **1998**, *354*, 83-90.
- Incze, K.; Farkas, J.; Mihályi, V.; Zukaľ, E. Antibacterial effect of cysteine-nitrosothiol and possible precursors thereof. *Applied Microbiology* **1974**, *27*, 202-205.
- Jacobs P.; Radzich 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. *Infection and Immunity* **1996**, *64*, 44-49.
- Jac-Yeon, J.; Dae-Myung, J. Chloroquine inhibits processing of tumor necrosis factor in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Journal of Immunology* **1997**, *158*, 4901-4907.
- Jakeman G.N.; Saul A.; Hogarth W.L.; Collins W.E. Anaemia of acute malaria infections in non-immune patients primarily results from destruction of uninfected erythrocytes. *Parasitology* **1999**, *119*, 127-133.
- James, S.L.; Glaven, J. Macrophage cytotoxicity against schistosomula of *Schistosoma mansoni* involves arginine-dependent production of reactive nitrogen intermediates. *Journal of Immunology* **1989**, *143* 4208-4212.
- James, S.L. The effector function of nitrogen oxides in host defense against parasites. *Experimental Parasitology* **1991**, *73*, 223-226.
- James, S.L. Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiology Review* **1995**, *59*, 533-547.
- Jhonsan, R.A., Waddelow, T.A., Caro, J., Oliff, A. and Roodman, G.D. Chronic exposure to tumor necrosis factor in vivo preferentially inhibits erythropoiesis in nude mice. *Blood* **1989**, *74*, 359-364.

- Jones, I.W.; Thomsen, L.L.; Knowles, R. Nitric oxide synthase activity in malaria-infected mice. *Parasite Immunology* 1996, 18, 535-538.
- Karupian, G.; Xie, Q.W.; Baller, R.M.; Nathan, C.; Duarte, C.; MacMicking, J.D. Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase. *Science* 1993, 261, 1445-1448
- Kawo, N.G.; Msengi, A.E.; Swai, A.B.M.; Chuwa, L.M.; Alberti, K. g.; VcLarty, D.G. Specificity of Hypoglycaemia for cerebral malaria in children. *Lancet* 1990, ii, 454-457.
- Khatsenko, O.G.; Gross, S.S.; Fikind, A.B.; Vane, J.R. Nitric oxide as a mediator of the decrease in cytochrome-P450-dependent metabolism caused by immunostimulants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1993, 90, 11147-11151.
- Kilgore, L.; Stasch, A.R.; Barrentine, B.F. Nitrate content of beets, collards, and turnip greens. *Journal of the American Dietary Association* 1963, 43, 39-42.
- Krasna, A.I.; Rittenberg, D. The inhibition of hydrogenase by nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1954, 40, 225-227.
- Krishna, S.; Waller, D.W.; Ter Kuile, F.; Kwiatkowski, D.; Crawley, J.; Craddock, C.F.C.; Nosten, F.; Chapman, D.; Brewster, D.; Holloway, P.A.; White, N.J. Lactic acidosis and hypoglycemia in children with severe malaria: pathophysiological and prognostic significance. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1994b, 88, 67-73.
- Koike E.; Kobayashi T.; Mochitate K.; Murakami M. Effect of aging on nitric oxide production by rat alveolar macrophages. *Experimental Gerontology* 1999, 34, 889-894.
- Kwiatkowski, D.; Hill, A.V.; Sambou, I.; Twamasi, P.; Sastrocane, J.; Manogue, K.R.; Cerami, A.; Brewster, D.R.; Greenwood, B.M. TNF concentration in fatal cerebral, non fatal cerebral and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet* 1990, 336, 1201-1204.
- Kwon, N.S.; Nathan, C.F.; Gilker, C.; Griffith, O.W.; Matthews, D.E.; Stuehr, D.J. L-citrulline production from L-arginine by macrophage nitric oxide synthase: the ureido oxygen derives from dioxygen. *Journal of Biological Chemistry* 1990, 265, 13442-13445.
- Kwon, N.S.; Stuehr, D.J.; Nathan, C.F. Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitric oxide. *Journal of Experimental Medicine* 1991, 174, 761-767.

- Lacchini, S.; Ferlin, L.E.; Moraes, S.R.; Ribeiro, P.J.; Irigoyen, C.M. Contribution of NO to arterial pressure and heart rate variability in rats submitted to high-sodium intake. Hypertension. *Journal of the American Heart Association* 2001, 38, 326-331.
- Lang, T.; Kaye, P.M. Presentation of *Leishmania donovani* promastigotes occurs via a brefeldin A-sensitive pathway. *European Journal of Immunology* 1991, 21, 2407-2413.
- Langermans, J.A.; Van der Holst, M.E.; Nibbering, P.H.; Hiemstra, P.S.; Franssen, I.; van Furth, R. IFN- γ -induced L-arginine-dependent toxoplasmatatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor- α . *Journal of Immunology* 1992, 148, 568-574.
- Lee, S.C.; Dickson, D.W.; Broshan, C.F.; Casademir, A. Preferential Usage of the Fc receptor (chain in the T cell antigen receptor Complex by T cells localized in epithelia. *Journal of experimental medicine* 1994, 180, 365-369.
- Lelchuk, R.; Rose, G.; Playfair, J. G. Changes in the capacity of macrophages and T cells to produce interleukins during murine malaria infection. *Cellular Immunology* 1984, 84, 253-263.
- Lelchuk, R.; Playfair, J.H. Serum IL-2 inhibitor in mice. Increase during infection. *Immunology* 1985, 56, 253-263.
- Lepoivre, M.; Chenais, B.; Yapo, A.; Lemaire, G.; Thelander, L.; Tenu, J.-P. Alterations of ribonucleotide reductase activity following induction of the nitrite-generating pathway in adenocarcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry* 1990, 265, 14143-14149.
- Lepoivre, M.; Fieschi, G.; Coves, J.; Thelander, L.; Fontecave, M. Inactivation of ribonucleotide reductase by nitric oxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1991, 179, 442-448.
- Liesenfeld O.; Kang H.; Pard D.; Nguyen T.A.; Parkh C.V.; Watanabe H.; Abo T.; Sher A.; Remington J.S.; Suzuki Y. TNF-alpha, nitric oxide and IFN-gamma are all critical for mortality in genetically susceptible mice infected perorally with *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunology* 1999, 194, 98-102.
- Liew, F.Y.; Millott, S.; Parkinson, C.; Palmer, R.M.J.; Moncada, S. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Journal of Immunology* 1990, 144, 4794-4797.
- Lowenstein, C.J.; Dinerman, J.L.; Snyder, S.H. Nitric Oxide: Physiologic Messenger. *Annals of Internal Medicine* 1994, 120, 227-237.

- MacPherson, G.G.; Warrell, M.J.; White, N.J.; Looareesuwan, S.; Warrell, D.A. Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. *American Journal of Pathology* **1985**, *119*, 385-401.
- Manukhina, E., B.; Yu, E.; Boris, M.; Yu, S., S.; Salykova, M., V.; Vanin, A. Production and Storage of Nitric Oxide in Adaptation to hypoxia. *NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry* **1999**, *5*, 393-401.
- Marcelín, J.G.; Ceja, O.I.; Hernández, P.I.; Escalante, A.B. El 17- β estradiol induce la expresión de sinasa de óxido nítrico III en células endoteliales en cultivo. *Archivos de Cardiología de México* **2001**, *71*, 114-120.
- Matthew, E.P.; Raymond, A.D. Age-Associated alterations in splenic iNOS regulation: influence of constitutively expressed IFN-gamma and correction following supplementation with PPAR and activators or vitamin E. *Cellular Immunology* **1999**, *195*, 127-136.
- McGregor, I.A.; Hall, P.J.; Williams, K.; Hardy, C.L. Demonstration of circulating antibodies to *Plasmodium falciparum* by gel-diffusion techniques. *Nature* **1966**, *210*, 1384-1386.
- Mellouk, S.; Maheshwari, R.K.; Rhodes, F.A.; Beaudoin, R.L.; Berbiguier, N.; Matile, H.; Miltgen, F.; Landau, L.; Pied, S.; Chigot, J.P.; Friedman, R.M.; Mazier, D. Inhibitory activity of interferons and interleukin - on the development of *Plasmodium falciparum* in human hepatocyte cultures. *Journal of Immunology* **1987**, *139*, 4192-4195.
- Mellouk, S.; Hoffman, S.L.; Liu, Z.Z.; De la Vega, P.; Billiar, T.R.; Nüssler, A.K. Nitric oxide-mediated antiplasmodial activity in human and murine hepatocytes induced by gamma interferon and the parasite itself: enhancement by exogenous tetrahydrobiopterin. *Infection and Immunity* **1994**, *62*, 4043-4046.
- Mendis, K.N.; Targett, G.A. Immunization to produce a transmission-blocking immunity in *Plasmodium yoelii* malaria infections. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **1981**, *75*, 158-159.
- Metz, G.; Carlier, Y.; Vray, B. *Trypanosoma cruzi* upregulates nitric oxide release by interferon-gamma-primed macrophages, limiting cell infection independently of the respiratory burst. *Parasite Immunology* **1993**, *15*, 633-699.
- Mills, C.D. Molecular basis of "suppressor" macrophages: arginine metabolism via the nitric oxide synthetase pathway. *Journal of Immunology* **1991**, *146*, 2719-2723.
- Mirna, A.; Hofmann, K. The behaviour of nitrite in meat products. *Fleischwirtschaft* **1969**, *10*, 1361-1366.

- Mitchell, H.H.; Sconle, H.A.; Griendley, H.S. The origin of the nitrates in the urine. *Journal of Biological Chemistry* 1916, 24, 460-491.
- Mizock, B.A. Alterations in carbohydrate metabolism during stress: a review of the literature. *American Journal of Medicine* 1995, 98, 75-84.
- Mollace, V.; Bagetta, G.; Nistico, G. Evidence that L-arginine possesses proconvulsant effects mediated through nitric oxide. *NeuroReport* 1991, 2, 269-272.
- Muñoz-Fernández, M.A.; Fernández, M.A.; Fresno, M. Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. *European Journal of Immunology* 1992, 22, 301-307.
- Nathan, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB* 1992, 6, 3051-3064.
- Newton, C.R.J.C.; Kirkham, F.J.; Winstanley, P.A.; Pasvol, G.; Peshu, N.; Warrell, D.A.; Marsh, K. Intracranial pressure in African children with cerebral malaria. *Lancet* 1991, 337, 573-576.
- Newton, C.R.J.C.; Peshu, N.; Kendall, B.; Kirkham, F.J.; Sowunmi, A.; Waruru, S.; Mwangi, I.; Murphy, S.A.; Marsh, K. Brain swelling and ischemia in Kenyans with cerebral malaria. *Archives of Disease in Childhood* 1994, 70, 281-287.
- Northington, F.J.; Matherne, G.P.; Berne, R.M. Competitive inhibition of nitric oxide synthase prevents the cortical hyperemia associated with peripheral nerve stimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1992, 89, 6649-6652.
- Nussler, A.; Drapier, J. C.; Régnier, L.; Pied, S.; Miltgen, F.; Gentilini, M.; Mazier, D. Arginine dependent destruction of intrahepatic malaria parasites in response to TNF and/or IL-6 stimulation. *European Journal of Immunology* 1991, 21, 227-230.
- Olweny, C.; Chauhan, S.; Simooya, O.; Bulsara, M.; Njelsani, E.; Van Thuc, H. Adult cerebral malaria in Zambia: preliminary report of clinical findings and treatment response. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1986, 89, 123-129.
- Oswald, I.P.; Eltoun, I.; Wynn, I.A.; Schartz, B.; Paulin, D.; Sher, A.; James, S.L. Endothelial cells are activated by cytokine treatment to kill an intravascular parasite, *Schistosoma mansoni* through the production of nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1994, 91, 999-1003.

- Oswald, I.P.; James, S.L. Nitrogen Oxide in Host Defense against Parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1996, 10, 8-14.
- Petros, A., Lamb, G., Leone, A., Moncada, S., Bennett, D. And Vallance, P. Effects of a nitric oxide synthase inhibitor in humans with septic shock. *Cardiovascular Research* 1994, 28, 34-39.
- Phillips, R.E.; Warrell, D.A. The pathophysiology of severe falciparum malaria. *Parasitology Today* 1986, 2, 271-282.
- Playfair, J.H.L.; Taverne, J.; Bate, C.A.W.; de Souza, J.B. The malaria vaccine: anti-parasite or anti-disease? *Immunology Today* 1990, 11, 25-27.
- Prada, J.; Muller, S.; Bienzle, U.; Kremsner, P.G. Upregulation of reactive oxygen and nitrogen intermediates in *Plasmodium berghei* infected mice after rescue therapy with chloroquine or artemether. *J. Antimicrob. Chemother* 1996, 38, 95-102.
- Radomski, J.L.; Palmiri, C.; Hearn, W.L. Concentrations of nitrate in normal human urine and the effect of nitrate ingestion. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1978, 45, 63-68.
- Ralston, S.H.; Todd, D.; Helfrich, M.; Benjamin, N.; Grabowski, P.S. Human osteoblast-like cells produce nitric oxide and express Inducible Nitric Oxide Synthase. *Endocrinology* 1994, 135, 330-336.
- Ramírez, R. L.; Calderon, J.; Zarco, E.; Garcia, M.J.; Molina, M.J.; Fernández, G. Cambios en los índices de oxigenación con el uso de óxido nítrico en el postoperatorio de corrección de cardiopatías congénitas con hipertensión pulmonar severa. *Archivos de Cardiología* 2001, 71, 121-126.
- Renbier G.; Lambert A. Lipoprotein lipase synergizes with interferon gamma to induce macrophage nitric oxide synthetase mRNA expression and nitric oxide production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995, 15, 392-399.
- Riha, W.E.; Soberg, M. Clostridium perfringens inhibition by sodium nitrite as a function of pH, inoculum size and heat. *Journal of Food Science* 1975, 40, 439-442.
- Rockett, K.A. Antimalarial properties of rabbit tumour necrosis serum: in vivo and in vitro studies. PhD thesis, University of London 1990.
- Rockett, K.A.; Awburn, M.M.; Cowden, E.B.; Clark, I.A. Killing of *Plasmodium falciparum* in vitro by nitric oxide derivatives. *Infection and Immunity* 1991, 59, 3280-3283.
- Rockett, K.A.; Awburn, M.M.; Rockett, E.J.; Cowden, W.B.; Clark, I.A. Possible role of nitric oxide in malarial immunosuppression. *Parasite Immunology* 1994, 16, 243-349.

- Roel C.; Van der V.; Therese A.; Cielin, J.; Dixon G.; Wendy Gilmore. Macrophage-derived nitric oxide inhibits the proliferation of activated T helper cells and is induced during antigenic stimulation or resting T cells, *Cellular Immunology* **2000**, *199*, 43-49.
- Rubanyi, G.M.; Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *Journal Cellular Biochem.* **1991**, *16*, 27-36.
- Rubin, H.; Salem, J.S.; Li, L.S.; Yang, F.D.; Mama, S.; Wang, Z.M.; Fisher, A.; Hamann, C.S.; Cooperman, B. S. Cloning, sequence determination and regulation of the ribonucleotide reductase subunits from *Plasmodium falciparum*: a target for antimalarial therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **1993**, *90*, 9280-9284.
- Rutter, J.W.; Richards, O.C.; Woodfin, B.M. Comparative studies of liver and muscle aldolase. I. Effect of carboxypeptidase on catalytic activity. *Journal of Biological Chemistry* **1961**, *236*, 3193-3199.
- Sánchez, M.L.; Montón, M.; Guerra, J.I.; Jiménez, A.; González, F.F.; Garepia, D.M.; Bellver, T.; Rico, L.; Romero, J.; Gómez, J.; Núñez, A.; Marcos, P.; Ayala, R.; Farré, J.; Casado, S.; López-Farré, A. Efecto del trifusal sobre la agregación plaquetaria y secreción de las plaquetas humanas: papel del óxido nítrico. *Revista Española de Cardiología* **2000**, *53*, 205-211.
- Schuman, E.M.; Madsison, D.V. Nitric Oxide and synaptic function. *Annual Review of Neuroscience* **1994**, *17*, 153-183.
- Schurr, A.; West, C.A.; Rigor, B.M. Lactate-supported synaptic function in the rat hippocampal slice preparation. *Science* **1988**, *240*, 1326-1328.
- Sedegah, M.; Finkelman, F.; Hoffman, S.L. Interleukin-12 induction of interferon gamma-dependent protection against malaria. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* **1994**, *91*, 10700-10702.
- Simone M. F.; Neves, S.A.; Rezende, A.M.; Nitric oxide-mediated immune complex-induced prostaglandin E₂ production by peripheral blood mononuclear cells of humans infected with *Schistosoma mansoni*. *Cellular Immunology* **1999**, *195*, 37-42.
- Slater, A.F. Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacol. Ther.* **1993**, *57*, 203-235.
- Snyder, S.H.; Bredt, S.B. Nitric oxide as a neuronal messenger. *Trends Pharmacology Science* **1991**, *12*, 125-127.
- Stacpool, P.W.; Wright, E.C.; Baumgartner, T.G.; Bersin, R.M.; Buchalter, S.; Curry, S.H.; Duncan, C.A.; Harnan, E.M.; Henderson, G.N.; Jenkinson, S.; Lachin, J.M.; Lorenz, A.; Schneider, S.H.; Siegel, J.H.; Summer, W.R.; Thopson, D.; Wolfe, C.L.; Zorovitch, G. The Dichloroacetate-Lactic Acidosis Study Group. A controlled

- clinical trial of dichloroacetate for treatment of lactic acidosis in adults. *New England Journal of Medicine* **1992**, 327, 1564-1569.
- Stamler, J.S.; Jia, L.; Eu, J.P. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science* **1997**, 276, 2034-2037.
- Stames, H.F.; Warren, R.S.; Jeevanandam, M.; Gabrilove, J.L.; Larchian, W. Tumor necrosis factor and the acute metabolic response to tissue injury in man. *Journal of Clinical Investigation* **1988**, 82, 1312-1325.
- Stuehr, D.J.; Nathan, C.F. Nitric oxide: a macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *Journal of Experimental Medicine* **1989**, 169, 1543-1555.
- Suroli, N.; Karthikeyan, G.; Padmanaban, G. Involvement of cytochrome P-450 in conferring chloroquine resistance to the malarial parasite, *Plasmodium falciparum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1993**, 197, 562-569.
- Tanneberger, S.; Lenk, H.; Muller, U.; Ebert, J.; Shiga, T. Human pharmacological investigation of a human recombinant tumor necrosis factor preparation. In: *Tumor Necrosis Factor: Cachectin and Related Cytokines* (B. Bonavida, G.E. Gifford, H.L. Kirchner and J. Old, eds) **1988**, 205-209.
- Tanowitz, H.B.; Kirchhoff, L.V.; Simon, D.; Morris, S.A.; Weiss, L.M.; Wittner, M. Chagas disease. *Clinical Microbiology Review* **1992**, 2, 395-428.
- Taylor, T.E.; Molyneux, M.E.; Wirima, J.J.; Fletcher, K.A.; Morris, K. Blood glucose levels in Malawian children before and during the administration of intravenous quinine for severe *falciparum* malaria. *New England Journal of Medicine* **1988**, 319, 1040-1047.
- Taylor, T.E.; Borgstein, A.; Molyneux, M.E. Acid-base status in pediatric *Plasmodium falciparum* malaria. *Quarterly Journal of Medicine* **1993**, 86, 99-109.
- Taylor-Robinson A.W.; Looker, M. Sensitivity of malaria parasites to nitric oxide at low oxygen tension. *Sciences* **1998**, 234, 1820.
- Taylor-Robinson A.W.; Smith E.C. A dichotomous role for nitric oxide in protection against blood stage malaria infection. *Immunology* **1999**, 15, 1-9.
- Thamrongwittawalpong, L.; Sirivatanauksorn, Y.; Batten, J.J.; Williamson, R.; Kakkar, A. The effect of N^ω-monomethyl-L-arginine and tamoxifen on Nitric Oxide Production in Breast Cancer cells Stimulated by Oestrogen and Progesterone. *The European Journal of Surgery* **2001**, 167, 484-489.

- Tracey, K.J.; Beutler, B.; Lowry, S.F.; Merryweather, J.; Wolpe, S.; Milsark, I.W.; Harere, R.J.; Gabeay, T.J.; Zentella, A.; Albert, J.D.; Shires, G.T.; Cerami, A. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* **1986**, *234*, 470-474.
- Unanue, E.R. Antigen-presenting function of the macrophage. *Annu. Rev. Immunol.* **1984**, *2*, 395-428.
- Velasco, A.; Lorenzo, F.; Serrano, J.; Andres-Trelles, F. *Farmacología; Editorial Interamericana: España*, 1996; pp 235-236, 239, 242, 564-565, 292, 761, 815.
- Vodovotz, Y.; Bogdan, C.; Paik, J.; Xie, G. W.; Nathan, C. Mechanisms of suppression of Macrophage Nitric Oxide Release by Transforming Growth Factor (*Journal of Experimental medicine* **1993**, *178*, 605-613.
- Vuong P.N.; Richard F.; Snounou G.; Coquelín G.; Renia L.; Gonnet F.; Chabaud A.G.; Landau I. Development of irreversible lesions in the brain, heart and kidney following acute and chronic murine malaria infection. *Parasitology* **1999**, *119*, 543-553.
- Warrell, D.A.; Veall, N.; Chanthavanich, P.; Karbwang, J.; White, N.J.; Looareesuwan, S.; Phillips, R.E.; Pongpaew, P. Cerebral anaerobic glycolysis and reduced cerebral oxygen transport in human malaria. *Lancet* **1988**, *ii*, 534-538.
- Wattanagoon, Y.; Srivilairit, S.; Looareesuwan, S.; White, N.J. Convulsions in childhood malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **1994**, *88*, 46-428.
- Wei, H.M.; Chi, O.Z.; Liu, X.; Sinha, A.K. Oxygen balance in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* **1994**, *25*, 445-449.
- Wellems, T.E. Malaria. How chloroquine works. *Nature* **1992**, *355*, 108-109.
- Werner-Felmayer, G.; Werner, F.R.; Fuchs, D.; Hauson, A.; Reibnegger, G.; Wachter, H. Tetrahydrobiopterin-dependent Formation of Nitrite and Nitrate in Murine Fibroblasts. *Journal of Experimental medicine* **1990**, *172*, 1599-1607.
- White, N.J.; Warrell, G.A.; Looareesuwan, S.; Chanthavanich, P.; Phillips, R.E.; Pongpaew, P. Pathophysiological and prognostic significance of cerebrospinal-fluid lactate in cerebral malaria. *Lancet* **1985**, *i*, 776-778.
- White, N.J.; Marsh, K.; Turner, R.C.; Miller, K.D.; Berry, C.D.; Williamson, D.H.; Brown, J. Hypoglycaemia in African children with severe malaria. *Lancet* **1987**, *i*, 708-711.
- Whittle, H.C.; Broun, J.; Marsh, K.; Blackman, M.; Jobe, O.; Shenton, F. The effects of *Plasmodium falciparum* malaria on immune control of B lymphocytes in Gambian children. *Clinical and Experimental Immunology* **1990**, *80*, 213-218.

- Wilson, D.B.; Garnham, P.C.C.; Swellengrebel, N.H. A review of hyperendemic malaria. *Tropical Diseases Bulletin* 1950, 47, 677-698.
- Wink, D.A.; Osawa, Y.; Darbyshire, J.F.; Jones, C.R.; Eshenaur, S.C.; Nims, R.W. Inhibition of cytochrome-P450 by nitric oxide and a nitric oxide-releasing agent. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1993, 300, 115-123.
- Wrighton, S.A.; Stevens, J.C. The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. *Critical Reviews of Toxicology* 1992, 22, 1-21.
- Wynn, T.A.; Oswald, I.P.; Eltoun, L.; Caspar, P.; Lowenstein, C.J.; Lewis, F.A.; James, S.L.; and Sher, A. Elevated expression of Th1 Cytokines and Nitric Oxide Synthase in the Lungs of Vaccinated Mice After Challenge Infection with *schistosoma mansoni*. *Journal of Immunology* 1994, 153, 5200-5209.
- Xie, Q.W.; Cho, G. J.; Calaycay, J.; Mumford, R.A.; Swidrek, K.M.; Lee, T.D.; Cloning and characterization of inducible citric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 1992, 256, 225-228.
- Yarborough, J.M., Rake, J.B. and Eagon, R.G. Bacterial inhibitory effects of nitrite: inhibition of active transport, but not of group translocation, and of intracellular enzymes. *Applied and Environmental Microbiology* 1980, 39, 831-834.
- Yasmineli, W.G.; Theologides, A. Effect of tumor necrosis factor on enzymes of gluconeogenesis in the rat. *Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1992, 199, 97-103.
- Zhu, X.; Ertel, W.; Ayala, A.; Morrison, M.H.; Perrin, M.M.; Chaudry, L.H. Chloroquine inhibits macrophage tumour necrosis factor-alpha mRNA transcription. *Immunology* 1993, 80, 122-126.
- Ziegler, H.K.; Unanue, E.R. Decrease in macrophage antigen catabolism caused by ammonia and chloroquine es asociatend. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 1982, 79, 175-178.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA