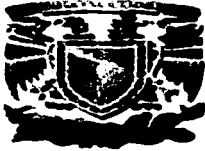


50524  
101 H



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**PARTICIPACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO EN  
LA REGULACIÓN DE LA RESPUESTA  
INMUNE EN MALARIA**

**T E S I S**  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**  
**LUIS EDUARDO VILLAGRAN PEÑAFLOR**

DIRECTOR DE TESIS  
DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA

MÉXICO, D.F.

AGOSTO 2003

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**TESIS  
CON  
FALLA DE  
ORIGEN**

# PAGINACIÓN DISCONTINUA

# D E D I C A T O R I A

✚ Este trabajo se lo dedico a mis padres: José Luis Villagrán García y María Concepción Adelaida Peñaflor Albarran., gracias por su apoyo incondicional enseñándome a tener metas en la vida, y trabajar para alcanzarlas, y principalmente por el ejemplo de nunca darse por vencido ante la adversidad, gracias a esto e alcanzando una meta muy importante para mi. Con estas palabras quiero decirles lo importantes que han sido y serán en mi vida. "Los quiero mucho."

✚ A mis hermanos Ricardo y Erik Gustavo Villagrán P, por ser mis amigos y un ejemplo de superación constante.

✚ A Alma Lidia Olivares, gracias por tu cariño, atenciones, mimos, cuidados, sonrisas, y el enseñarme que uno es tan feliz como se decida serlo, pues la felicidad se hace, no se encuentra; brota del interior, no viene de afuera; la llevamos dentro y sólo necesitamos sacarla a la superficie, disfrutando con plenitud lo que tenemos, sin ambicionar ni envidiar lo que otros poseen. Te quiero mucho.

✚ A Maria Laura Ventura A., gracias por tu amistad, apoyo y por ser una gran amiga.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# D E D I C A T O R I A

↴ A Larrid Cesario, Leticia Juárez, por ser las personas que siempre tuvieron palabras de aliento durante el transcurso de la licenciatura, y el saber que en ustedes tengo dos personas con las cuales puedo contar, gracias por ser mis amigos.

↴ A las personas que me mostraron que en equipo todo es más sencillo y las cosas se hacen mejor, por lo cual, les reitero mi amistad y cariño: Martín Leonardo Salazar G., Maria de Jesús Chávez G., Raúl Fernández G., Juan Manuel Gutiérrez R.

↴ En memoria de mi abuelita Pascuala Albararran Olivares.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## A G R A D E C I M I E N T O S

↓ A la Dra. Martha Legorreta Herrera, por su apoyo y confianza depositados para llevar a cabo este proyecto.

↓ A los laboratoristas: Elia Rincón Simbrón y Ricardo Gerardo Silvestre por su valioso apoyo en el mantenimiento y el cuidado de los animales.

↓ Al M. en C. Armando Cervantes Sandoval por su apoyo en el tratamiento estadístico de los datos.

↓ Este trabajo recibió apoyo de los proyectos: CONACYT 34936-N y PAPIIT IN210100.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# INDICE

Lista de Tablas.....	vii
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Gráficas.....	ix
Lista de Anexos.....	x
Abreviaturas.....	xi
Resumen.....	xiii
<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Marco teórico.....</b>	<b>4</b>
2.1. Ciclo biológico del <i>Plasmodium</i> .....	4
2.2. Respuesta inmune en malaria.....	6
2.3. Interleucinas asociadas a la eliminación del <i>Plasmodium</i> .....	9
<b>3. Óxido Nítrico.....</b>	<b>11</b>
3.1. Biosíntesis del óxido nítrico.....	11
3.2. Acción fisiológica.....	12
3.3. Actividades patológicas.....	12
3.4. Síntesis de óxido nítrico de forma: constitutiva de baja producción e inducible de alta producción.....	14
3.5. NOS tipo I.....	15
3.6. NOS tipo II.....	15
3.7. NOS tipo III.....	16
3.8. Óxido nítrico y malaria.....	17
3.9. Inhibidores e inductores del óxido nítrico.....	18
3.9.1. Inhibidores.....	18
3.9.2. Inductores.....	19
<b>4. Reacción de Griess.....</b>	<b>23</b>
<b>5. Retrotranscripción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).....</b>	<b>25</b>
5.1. Retrotranscripción (RT).....	25
5.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	26



6. Planteamiento del problema.....	29
7. Objetivos.....	30
7.1. Objetivo general.....	30
7.2. Objetivos específicos.....	30
8. Hipótesis.....	31
9. Material.....	32
9.1. Biológico.....	32
9.2. Laboratorio.....	32
9.3. Equipo.....	33
9.4. Reactivos.....	33
10. Método.....	36
10.1. Infección de animales.....	36
10.2. Administración del inhibidor e inductor.....	36
10.3. Toma de muestras.....	36
10.4. Técnica de Griess.....	37
10.5. Procesamiento de las muestras problema.....	37
10.6. Extracción de RNA.....	38
10.7. Retrotranscripción de RNAm.....	39
10.8. Amplificación de los genes para citocinas por PCR.....	40
10.9. Electroforesis de los productos de PCR.....	42
11. Resultados.....	43
12. Análisis de resultados.....	55
13. Conclusión.....	60
14. Anexos.....	61
15. Bibliografía.....	65

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Lista de Tablas**

Tabla	Pág.
1. Comparación entre los ciclos vitales de las especies de <i>Plasmodium</i> que infectan al ser humano.....	2
2. Isoformas de óxido nítrico sintetasa.....	17
3. Inhibidores de la NOS y su selectividad.....	18
4. Preparación de la mezcla de retrotranscripción.....	40
5. Características y preparación de la mezcla para PCR en un tubo de reacción.....	41

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Lista de Figuras

Figura	Pág.
1. Ciclo biológico del <i>Plasmodium</i> .....	5
2. Diagrama esquemático que ilustra la acción recíproca entre la regulación celular TH1 y TH2. Mecanismo de inmunidad de la fase asexual eritrocítica durante la infección con <i>Plasmodium chabaudi</i> AS en Ratones.....	8
3. La síntesis y el destino del óxido nítrico en las células.....	13
4. Estructura de los inhibidores de la iNOS y el SNP.....	20
4.1. L-arginina (L-arg); sustrato para la síntesis de óxido nítrico.....	20
4.2. N <sup>α</sup> -monometil-L-arginina (L-NMMA); inhibidor de la nNOS.....	20
4.3. N <sup>w</sup> -nitro -arginina metil éster (L-NAME); inhibidor de la nNOS.....	20
4.4. Aminoguanidina (AG); inhibidor de la iNOS.....	20
4.5. Nitroprusiato de sodio (SNP); donador de óxido nítrico.....	20
5. Lipopolisacárido (LPS) de la envoltura celular gramnegativa.....	22
6. Reacción de Griess.....	24
7. Amplificación de DNA usando la reacción en cadena de la polimerasa.....	26
8. RT-PCR semicuantitativa, amplificación simultánea de dos cDNA utilizando el mismo número de iniciadores.....	28
9. Expresión de los genes de las citocinas en el día 4 post-infección en ratones CBA/Ca infectados con <i>Plasmodium chabaudi</i> AS.....	51
10. Expresión de los genes de las citocinas en el día 11 post-infección en ratones CBA/Ca infectados con <i>Plasmodium chabaudi</i> AS.....	52

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

## Lista de Gráficas

Gráfica	Pág.
1. Comparación de parasitemia y concentración de óxido nítrico en ratones CBA/Ca sin tratamiento contra la parasitemia y concentración de óxido nítrico en ratones CBA/Ca Tx. con L-arginina 600 mg/Kg.....	44
2. Comparación de parasitemia y concentración de óxido nítrico en ratones CBA/Ca sin tratamiento contra la parasitemia y concentración de óxido nítrico en ratones CBA/Ca Tx con Nitroprusiato de sodio 4 mg/Kg.....	45
3. Comparación de parasitemia y concentración de óxido nítrico en ratones CBA/Ca sin tratamiento contra la parasitemia y concentración de óxido nítrico en ratones CBA/Ca Tx. con Aminoguanidina Hemisulfato 300 mg/Kg.....	45
4. Comparación de parasitemia y concentración de óxido nítrico en ratones NIH sin tratamiento contra las parasitemias y concentraciones de óxido nítrico en ratones NIH Tx. con Lipopolisacárido (LPS) 1 mg/Kg. y Aminoguanidina Hemisulfato (AGH) 300mg/Kg.....	47
5. Comparación de parasitemia y concentración de óxido nítrico en ratones CBA/Ca sin tratamiento contra las parasitemias y concentraciones de óxido nítrico en ratones CBA/Ca Tx. Lipopolisacárido y Aminoguanidina Hemisulfato (AGH) 300 mg/Kg.....	50
6. Expresión de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-10 durante la primera infección.....	53
7. Expresión de iNOS durante la primera infección.....	54

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

## Lista de Anexos

Anexo	Pág.
1. NADPH 1.25 mg/mL.....	61
2. Nitrato reductasa ( <i>Aspergillus</i> ) 5 U/mL.....	61
3. Sulfanilamida al 1% en ácido fosfórico al 5%:.....	61
4. Nafiteilendiamina (NED) al 0.1% en H <sub>2</sub> O estéril.....	61
5. Ácido tricloroacético al 10%.....	61
6. Nitrato de sodio (NaNO <sub>2</sub> ) al 0.7 mM.....	61
7. Acetato de sodio 3M; pH = 6.....	61
8. Acril-bisacrilamida al 30%.....	62
9. Amortiguador de carga 5X.....	62
10. Gel de acrilamida al 5%.....	62
11. Amortiguador de PCR 10X con Mg <sup>+2</sup> .....	63
12. Solución amortiguadora de fosfatos (PBS).....	63
13. Persulfato de amonio (APS) al 10%.....	63
14. Amortiguador Tris-Ácido Bórico-EDTA (TBE) 10X.....	64

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ABREVIATURAS

AG	Aminoguanidina
AGH	Aminoguanidina Hemisulfato
APS	Persulfato de amonio
L-arg	L-arginina
BH <sub>4</sub>	Tetrahidriopterina
CMCDA	Citotoxicidad mediada por células y dependientes de anticuerpos
CRO	Compuestos reactivos de oxígeno
DEPC	Diethylpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	DNA complementario
dNTP's	Desoxirribonucleótidos de trifosfato
dTT	Ditiotreitol
EP	Eritrocitos parasitados
IFN-γ	Interferón gamma
FAD	Flavina adenina dinucleótido
FMN	Flavina mononucleótido
Hb	Hemoglobina
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
i.v.	Intravenoso
LPS	Lipopolisacárido
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
M-MLVRT	Retrotranscriptasa del virus de leucemia murina Moloney
NK	Asesino natural
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato
L-NAME	N <sub>w</sub> -nitro-L-arginina metil éster

NED	N-1-nafiletilenediamina
L-NMMA	N <sup>G</sup> -monometil-L-arginina
NOS	Óxido nítrico sintetasa
eNOS	Óxido nítrico sintetasa endotelial
iNOS	Óxido nítrico sintetasa inducible
nNOS	Óxido nítrico sintetasa neuronal
NO	Óxido nítrico
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrito
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrato
ONOO <sup>-</sup>	Peróxinitrito
<i>P.</i>	<i>Plasmodium</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	RNA mensajero
RNI	Intermediarios reactivos del nitrógeno
RT-PCR	Retrotranscriptasa-PCR
SNP	Nitroprusiato de sodio
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Amortiguador Tris-ácido bórico-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamina
TGF	Factor de crecimiento transformante
TNF	Factor de necrosis tumoral
Tx	Tratados

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## RESUMEN

El paludismo sigue siendo uno de los principales problemas de salud pública a pesar de los enormes esfuerzos por erradicarlo en las regiones tropicales y subtropicales del mundo.

Un propósito fundamental de la OMS es obtener una vacuna, sin embargo, las vacunas generadas empleando biología molecular no son 100% efectivas debido en gran parte a que se desconocen los mecanismos de respuesta celular precisos para eliminar al plasmodio.

Las infecciones parasitarias frecuentemente se acompañan de supresión de la inmunidad mediada por células T, esta regulación podría atribuirse a citocinas inhibitorias producidas tanto por linfocitos T como otras células o bien al óxido nítrico (NO). Las citocinas involucradas en efectos inhibitorios son IL-4, IL-10 y TGF- $\beta$ , mismas que pueden inhibir la capacidad del IFN- $\gamma$  para activar a los macrófagos. Interesantemente, las citocinas inhibitorias también evitan la producción de óxido nítrico, un mecanismo efector importante en la muerte de parásitos intracelulares por los macrófagos activados.

La infección aguda con *Plasmodium chabaudi* está asociada con una marcada depresión de las respuestas de las células T de bazo. En el caso de la infección con *Plasmodium chabaudi*, la supresión más severa ocurre durante los primeros 14 días post-infección, esto corresponde a la fase aguda de la infección que coincide con un incremento en la producción de NO. El estudio de los mecanismos de respuesta inmune en el humano, en condiciones experimentales bien definidas está muy limitado, debido tanto a razones éticas como técnicas, por lo cual, en este trabajo se utilizó un modelo murino para estudiar la participación del óxido nítrico en la regulación de la respuesta inmune en malaria.

Se analizó si el óxido nítrico está relacionado con la regulación de la respuesta inmune en ratones CBA/Ca infectados con *P. chabaudi* tratados con inhibidores e inductores de la iNOS. Los resultados mostraron que la administración del inhibidor (AG) como el inductor (LPS) no modifica la cinética de la parasitemia, sugiriendo que el óxido nítrico no participa directamente en la eliminación del *Plasmodium*. Para analizar si el NO funciona como molécula inmunorreguladora, se estudió la expresión de citocinas tipo TH1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) y de TH2 (IL-4 e IL-10) en los ratones tratados con inhibidor e inductor de la iNOS, los resultados mostraron que los niveles de NO modulan la expresión de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-4 en el día 11 post-infección lo que favorece una respuesta inmune tipo TH2, con lo anterior se demostró que el NO es una molécula inmunorreguladora en nuestro modelo experimental de malaria.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



---

## INTRODUCCIÓN

La malaria o paludismo es una enfermedad ocasionada por un protozoario- que pertenece al género *Plasmodium*, se conocen cuatro especies que infectan a los humanos: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*. De las cuatro especies, las dos primeras son responsables de más del 95 por ciento de los casos. El *P. malariae* tiene distribución irregular y el *P. ovale* se encuentra prácticamente sólo en África, en particular en la región occidental.

El paludismo ocurre principalmente en las regiones tropicales del mundo, en donde el clima es cálido y húmedo. En México las áreas maláricas descritas en 1958 son las mismas al presente. Para 1999-2000, estas áreas fueron clasificadas de acuerdo a su intensidad de transmisión en:

- a) Focos hiperendémicos: que comprenden la Frontera Sur con Guatemala, Oaxaca y Guerrero y la Región Noroeste del país.
- b) Focos hipoendémicos que incluyen a los Estados de Nayarit, Sinaloa, Durango, Jalisco, Guerrero y Michoacán.

En cuanto a los vectores, en la Costa del Pacífico están presentes *Anopheles pseudopunctipennis* y *Anopheles albimanus* mientras que en el Golfo de México el principal vector es *Anopheles albimanus* (Organización Panamericana de la salud, 2002). Los esfuerzos por erradicar el paludismo han sido intensos en muchas partes del mundo, sin embargo, la erradicación se ha complicado por la aparición de mosquitos resistentes a los insecticidas residuales, y a que han surgido cepas de *Plasmodium* resistentes a las drogas antimaláricas existentes (Legorreta-Herrera y Sánchez, 1999). También existen obstáculos e impedimentos sociales y políticos que se interponen a la ejecución de programas de erradicación.

La dificultad para el tratamiento de la malaria se debe en gran parte a que el parásito es un organismo eucariótico y, por tanto, más similar al huésped humano que los patógenos bacterianos procarióticos. El curso crónico y prolongado de la infección aunado al complejo ciclo vital y los múltiples estadios de desarrollo del parásito, aumentan las dificultades para una intervención quimioterapéutica efectiva. El problema se complica en el mundo subdesarrollado, debido a: (1) la presencia de múltiples infecciones y la probabilidad de reinfección; (2) el cúmulo de gran número

de personas inmunodeprimidas por desnutrición y (3) la enorme influencia de la pobreza y las malas condiciones sanitarias. Así pues la planificación global para prevenir y tratar las infecciones parasitarias, debe contemplar diversas estrategias, incluyendo la mejora de la higiene y las condiciones sanitarias, el control del vector de la enfermedad, la elaboración de vacunas efectivas, y la administración profiláctica y terapéutica de fármacos seguros y eficaces (Schwartz, et. al., 1992).

La cloroquina es el fármaco de elección para profilaxis y tratamiento contra las cepas de plasmodio susceptibles. Es activa contra las cuatro especies de plasmodios (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *ovale*), y resulta bien tolerada, barata y eficaz por vía oral. Sin embargo, la resistencia de *P. falciparum* a la cloroquina es frecuente en Asia, África y Sudamérica, lo que limita la utilidad del fármaco. Las drogas antipalúdicas no eliminan totalmente al *Plasmodium* debido a que el parásito genera resistencia (Schwartz, et. al. 1992).

Son varios los factores que determinan la capacidad del parásito para invadir a los glóbulos rojos. La edad del eritrocito es un factor determinante en todos los casos, excepto en el paludismo por *P. falciparum* que es capaz de invadir a eritrocitos de todas las edades. También el medio fisicoquímico dentro del glóbulo rojo determina la capacidad del parásito para la reproducción de éste (Tabla 1) (Youmans, et. al 1984).

**TABLA I. COMPARACIÓN ENTRE LOS CICLOS VITALES DE LAS ESPECIES DE PLASMODIUM QUE INFECTAN AL SER HUMANO**

	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. malariae</i>
Periodo de incubación (días)	10-14	12-15	12-15	18-30
Persistencia del parásito extraeritrocíticos	No	Sí	Sí	Tal vez no
Edad del eritrocito parasitado	Todos	Reticulocito	Reticulocito	Viejo
Duración del ciclo eritrocítico (horas)	48	48	48	72
Magnitud de la parasitemia de glóbulos rojos.	Alta Hasta 60%	Baja <2%	Baja <2%	Baja <1%

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

---

En la actualidad se están realizando grandes esfuerzos para desarrollar vacunas contra el paludismo, sin embargo las infecciones parasitarias humanas son especialmente difíciles de abordar, en parte por las características polimórficas y rápidamente cambiantes de muchos antígenos parasitarios, lo que origina una enorme variación antigénica en particular en *Plasmodium falciparum*. Se han creado vacunas frente al paludismo, empleando antígenos de las formas hepáticas o sanguíneas, con un éxito moderado (Hoffman, et. al. 1996).

Hay tres grandes dificultades obstruyendo el desarrollo de una vacuna para malaria:

1. No está completa la comprensión del tipo preciso de respuesta inmune durante las tres etapas del ciclo de vida del parásito.
2. Sólo algunos cientos de antígenos derivados del parásito se han estudiado, algunos de ellos son protectores en los modelos animales pero se desconoce si éstos son los más potentes.
3. El parásito puede evadir la inmunidad del huésped, por ejemplo por la variación antigénica.

Probablemente la estrategia más importante para el control del paludismo es el diseño de vacunas, sin embargo, para ello es necesario conocer y potenciar los mecanismos efectores de la respuesta inmune, con el propósito de intervenir inmunológicamente en la diferenciación y expansión del parásito en el huésped o en el vector (Phillips, et. al. 1997).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

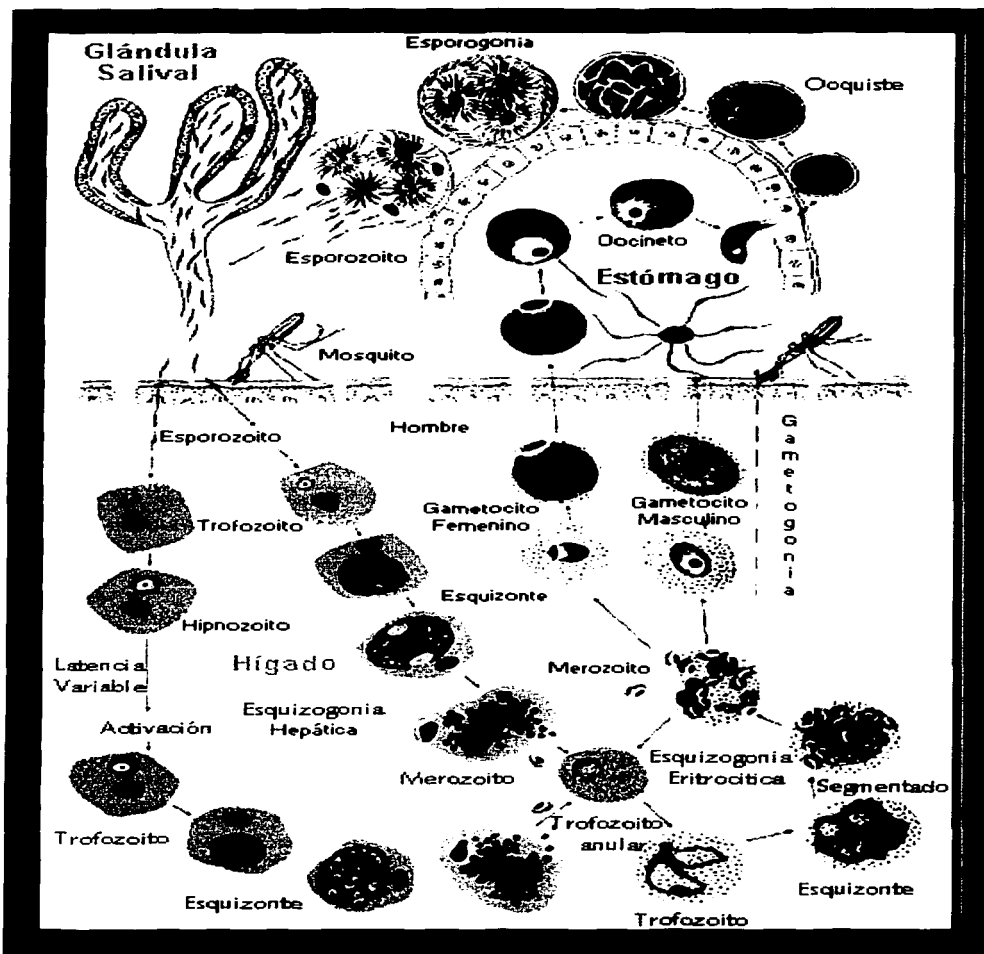
---

## MARCO TEORICO

### CICLO BIOLÓGICO DEL *Plasmodium sp*

La fase preeritrocitaria asintomática se inicia cuando el mosquito hembra infectado del género *Anopheles* inyecta esporozoítos al torrente sanguíneo del hombre. Los esporozoítos presentes en la saliva de éste pasan a la sangre; antes de una hora llegan al hígado, y los parásitos entran en las células parenquimatosas, donde maduran durante aproximadamente dos semanas para convertirse en esquizontes tisulares. En la fase hepática, el parásito crece y su núcleo se divide varias veces, lo que origina la formación de merozoítos tisulares. El número de merozoítos formados a partir de cada esporozoíto varía según la especie. Un esporozoíto de *P. falciparum* forma hasta 40 000 merozoítos, mientras que los esporozoítos de otras especies de *Plasmodium* producen de 2 000 a 15 000 merozoítos. Una vez formados, los merozoítos rompen el hepatocito y penetran a la circulación. La mayoría de ellos son destruidos con rapidez, sin embargo, una cantidad considerable se fija a sitios receptores específicos sobre la membrana de los glóbulos rojos, por lo cual los merozoítos circulan en la sangre durante unos pocos minutos antes de entrar en los hematíes para iniciar la fase sanguínea asexual o eritrocítica. Algunos parásitos, sin embargo, permanecen dentro del hígado en estado latente como hipnozoítos, que constituyen la causa de las recidivas. Una vez en los hematíes, los merozoítos maduran para dar lugar a la forma anular, los trofozoítos y los esquizontes, que completan el ciclo al madurar para liberar merozoítos a la circulación. Algunos merozoítos inician la fase sexual y maduran dentro de los hematíes para formar gametocitos machos y hembras, que pueden ser ingeridos por el mosquito *Anopheles* al alimentarse. Cuando entran en el intestino del insecto, los gametocitos machos pierden los flagelos para formar microgametos que fertilizan a los gametos hembras y forman el cigoto. El cigoto invade después la mucosa intestinal, donde se transforma en un ooquiste. El ooquiste se desarrolla para producir miles de esporozoítos que son liberados en el intestino y finalmente emigran hasta las glándulas salivares del insecto, donde comienza otra vez el ciclo (Fig. 1) (Youmans, et. al., 1984).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**FIGURA 1. Ciclo biológico del *Plasmodium***

TECIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## LA RESPUESTA INMUNE EN MALARIA

La adquisición y mantenimiento de la inmunidad protectora contra malaria depende de los linfocitos T. Éstos desempeñan una función primordial en la producción de anticuerpos y en el establecimiento de una respuesta inmune celular contra el plasmodio (Fossati 1990).

La infección por *Plasmodium* es capaz de estimular a las células T CD4<sup>+</sup> como las CD8<sup>+</sup>, éstas ejercen efectos protectores en diferentes fases de la infección por *Plasmodium*: las células T CD4<sup>+</sup> intervienen en la respuesta inmunitaria frente a la fase sanguínea de *P. yoelii*, mientras que en la fase hepática de la infección por *P. berghei* son las células T CD8<sup>+</sup> las que ejercen el efecto protector. Los hepatocitos expresan moléculas MHC (complejo principal de histocompatibilidad) de clase I, pero no de clase II, por lo que las células CD4<sup>+</sup> no los pueden reconocer y no son estimuladas para que produzcan IFN- $\gamma$ . De la misma forma, las células CD8<sup>+</sup> no afectan a los parásitos durante la fase sanguínea porque los eritrocitos no expresan moléculas MHC de clase I. (White et. al. 1996).

Las células T CD4<sup>+</sup> pueden dividirse en dos subpoblaciones principales TH1 y TH2, con base en el patrón de citocinas secretadas posterior a la estimulación; los distintos perfiles de citocinas que se expresan indican su función. Las células TH1 producen interleucina dos (IL-2), interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y factor de necrosis tumoral beta (TNF- $\beta$ ), a través de éstas moléculas se activan los macrófagos (Taylor-Robinson, 1995) Las células TH2 producen: interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 10 (IL-10), lo que proporciona cooperación con las células B productoras de anticuerpos (Fig. 2). Las células TH1 actúan durante la fase hepática del paludismo (Stevenson & Tam, 1993; Yap et al. 1994). Las células TH2 suelen colaborar en la producción de anticuerpos que aumentan la especificidad de la reacción inmunitaria, la eliminación de los parásitos palúdicos durante la fase eritrocitaria se produce en el bazo por medio de células efectoras activadas y por medio de citotoxicidad dependiente de anticuerpos (Phillips, 1994). La fagocitosis por parte de los macrófagos constituye un importante mecanismo de defensa frente a los parásitos de menor tamaño; sin embargo estas células también secretan muchos

factores citotóxicos como son los intermediarios reactivos del oxígeno (ROI) y los intermediarios reactivos del nitrógeno (RNI), lo que les permite destruir parásitos sin necesidad de ingerirlos. Los macrófagos activados por las citocinas son capaces de destruir tanto pequeños parásitos extracelulares, como las fases eritrocitarias del parásito del paludismo (Roitt, et. al., 2000). Los macrófagos también se pueden comportar como células asesinas mediante los mecanismos de citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpos (CMCDA). Los macrófagos y los granulocitos producen compuestos reactivos del oxígeno (CRO) tras la fagocitosis de algunos parásitos. Los macrófagos activados por citocinas, liberan cantidades de superóxido y peróxido de hidrógeno superiores a las que liberan los macrófagos residentes normales, también se estimulan los mecanismos destructores no dependientes de oxígeno (Grima, et al. 2001).

El óxido nítrico (NO), producto del metabolismo de la L-arginina, en una reacción catalizada por la enzima óxido-nítrico sintetasa inducible (iNOS), es una potente toxina no dependiente de oxígeno (Taylor-Robinson, 1995). Las citocinas IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  estimulan su síntesis por parte de los macrófagos, este efecto es más intenso cuando las dos citocinas actúan conjuntamente. Las células endoteliales también pueden producir óxido nítrico. Este compuesto forma parte de los mecanismos de resistencia frente al paludismo, y probablemente es importante para el control de la mayoría de las infecciones parasitarias (Rockett, et al. 1996). Las infecciones parasitarias frecuentemente se acompañan de supresiones de la inmunidad mediada por células T, ésta regulación podría atribuirse a citocinas inhibitorias producidas tanto por linfocitos T como a otras células o bien al óxido nítrico. Las citocinas involucradas en efectos inhibitorios son IL-4, IL-10 y TGF- $\beta$ , mismas que pueden inhibir la capacidad del IFN- $\gamma$  para activar a los macrófagos. Las citocinas inhibitorias también evitan la producción de óxido nítrico, un mecanismo efector importante en la muerte de parásitos intracelulares por los macrófagos activados (Rockett, et. al. 1994).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

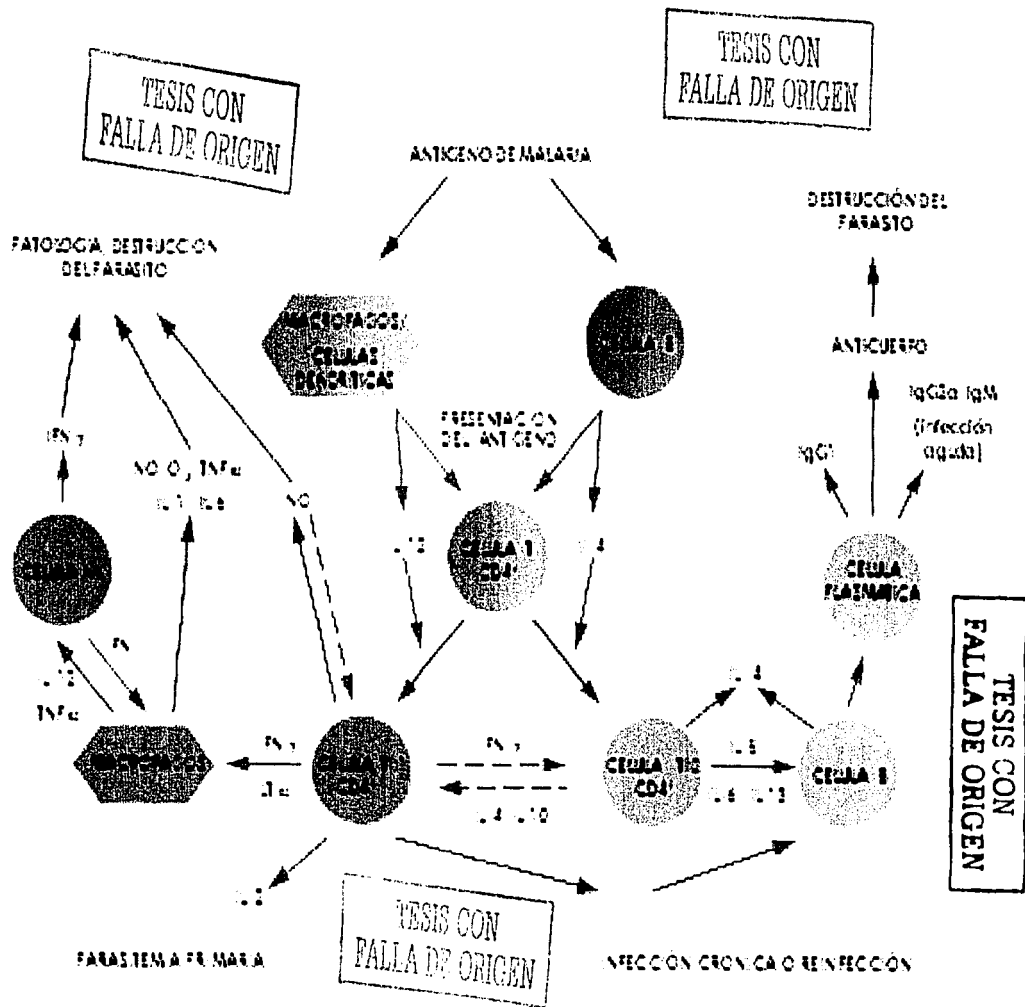


FIGURA 2. Diagrama esquemático que ilustra la acción recíproca entre la regulación celular TH1 y TH2. Mecanismo de inmunidad de la fase asexual eritrocítica durante la infección con *Plasmodium chabaudi* AS en ratones. (Redibujado de Taylor-Robinson, 1995)



---

## INTERLEUCINAS QUE ESTAN ASOCIADAS CON LA ELIMINACIÓN DEL *Plasmodium*

La comunicación entre las células del sistema inmune se produce tanto mediante interacciones directas célula-célula, en la que participan las moléculas de superficie de las mismas, como mediante citocinas. Las citocinas son proteínas mensajeras, mediadores solubles de la comunicación intercelular, que forman, junto con las hormonas y los neurotransmisores, un sistema de lenguaje químico, que regula el desarrollo, la reparación tisular y las respuestas inmunes de los organismos multicelulares (Roitt et al., 2000).

Las citocinas TH<sub>1</sub> son producidas predominantemente durante la fase aguda de la infección y dirigidas a la inducción de citocinas derivadas de macrófagos (Taylor-Robinson, 1995)

El IFN- $\gamma$ : es producido por los linfocitos T CD8+ y CD4+ en respuesta específica a antígenos así como por células NK en una manera no específica. (Schofield et al., 1987; Brake et al., 1988). Es la principal linfocina de células TH<sub>1</sub> considerada pluripotente, activa macrófagos, aumentando la expresión de moléculas del MHC clase II, incrementa la fagocitosis, induce la producción del factor necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y metabolitos reactivos de oxígeno (Meding et al. 1990). El IFN- $\gamma$  activa macrófagos y éstos estimulan la liberación de TNF, RIO (intermediarios reactivos del oxígeno), RNI (intermediarios reactivos del nitrógeno), TGF- $\beta$ , IL-1 (interleucina 1), y IL-6, los cuales solos o combinados matan e inhiben el crecimiento del parásito *in vitro* e *in vivo* (Ockenhouse et al., 1984). Así mismo el principal blanco del IFN- $\gamma$  durante la malaria son los monocitos-macrófagos (Bate et al., 1988), neutrófilos (Kumaratilake, et al., 1991) y células TH<sub>2</sub> que inhiben la proliferación del *Plasmodium* (Taverne, 1993). La regulación de la secreción de IFN- $\gamma$  en su mayor parte está bajo el control de la citocina, IL-12 (Sedegah et al., 1994).

El factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), se produce en la fase pre-eritrocítica, estimulado por antígenos parasitarios en el tiempo de la ruptura del esquizonte, y en la fase eritrocítica durante la liberación de los merozoitos de los glóbulos rojos infectados. El TNF junto con las citocinas IL-1, IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$  y RNI están

involucradas en la disminución de la parasitemia de malaria, ya que es capaz de matar gametocitos intraeritrocíticos, así como inactivar parásitos intraeritrocíticos indirectamente, induciendo la producción del intermediario del nitrógeno (RNI). TNF es una citocina proinflamatoria producida por células NK (Asesinas naturales) y macrófagos activados por toxinas del parásito del estadio sanguíneo (Long, 1993). Durante el transcurso de la infección el patrón de citocinas se modifica lo que produce un cambio de respuesta del tipo TH1 a TH2. En la respuesta TH2 las células B juegan un papel crucial para la eliminación del parásito. Luego de la infección con el *Plasmodium* se requiere regular la disminución de IFN- $\gamma$  que induce la activación de macrófagos, la regulación se lleva a cabo por citocinas del tipo TH2 (IL-4 e IL-10).

La IL-4. Secretada por células TH2 induce el crecimiento y la maduración de células B a células plasmáticas productoras de anticuerpos (Fell & Smith, 1998). Favorece el crecimiento de células TH2, activa células B para generar anticuerpos IgE e induce la expresión de moléculas MHC clase II (Langhorne, 1994; Troye-Blomberg, 1994) por lo cual IL-4 y las células TH2 son importantes en la respuesta de anticuerpos contra *Plasmodium*. IL-4 es un componente que induce el cambio de la respuesta inmune TH1 a TH2 ya que IL-4 estimula la proliferación y diferenciación de las células TH2 (Mosmann, 1991) e inhibe la respuesta TH1 por la disminución de la producción de IFN- $\gamma$  (Taverne, 1993).

Interleucina 10 (IL-10). Proviene de células TH2, suprime la producción de citocinas por células TH1. También se ha descrito que es sintetizada por células B Ly-1<sup>+</sup>, células cebadas y bajo ciertas condiciones por macrófagos. Inhibe la actividad microbicida de macrófagos activados por IFN- $\gamma$  suprimiendo la vía dependiente de arginina mediante la cual se produce NO, también inhibe la producción de IFN- $\gamma$  por células NK, bloquea la producción de TNF- $\alpha$ , estimula la formación de médula ósea evitando así el desarrollo de anemia severa, IL-10, IL-4 Y TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) sinergizan para inhibir la activación de macrófagos (Oswald, et. al., 1992; Kurtzhals, et. al., 1998).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

---

# ÓXIDO NÍTRICO

## BIOSÍNTESIS DEL ÓXIDO NÍTRICO

El NO posee un electrón desapareado en su órbita externa, por lo tanto es un radical libre, esto es la base para su actividad biológica, como la interacción electroquímica entre el NO y los metales. Sin embargo, como radical libre, su reactividad es muy débil (Ignarro, 1989). Ésta pobre reactividad, combinada con su liposolubilidad, le permite ser marcadamente difusible (Vaughn, 1998) *in vivo*, ésta difusión puede regularse en gran parte por su reacción con la hemoglobina (Liu, et. al 1998).

En 1988 (Marletta, 1988) se estableció la relación entre la función de los macrófagos y la presencia de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ). Otros investigadores descubrieron que dichos macrófagos eran incapaces de producir nitratos si en el medio no había L-arginina (Palmer, 1988, Palmer, 1989). Este hallazgo permitió descubrir que los macrófagos poseen una enzima específica (Palmer 1989), a ésta enzima se le denominó NO-sintetasa (NOS) que no requiere de ATP.

El óxido nítrico es un gas biológicamente activo, producido por casi todos los tipos celulares del organismo, participa en muy diversos procesos como la regulación del tono vascular (endotelio), la neurotransmisión (sistema nervioso central y periférico y la citotoxicidad mediada por células (macrófagos y neutrófilos) (Lowenstein, 1994 y Bredt & Snyder, 1994).

Debido a su bajo peso molecular (30 Da) y a su naturaleza lipofílica, el NO difunde rápidamente a través de las membranas lipídicas y de las paredes celulares de bacterias y hongos (Ignarro, 1990).

Una vez difundido el NO activa a la enzima guanidil ciclasa y ésta provoca el aumento intracelular de GMPc, mediador de los efectos fisiológicos. La actividad del NO va a depender del lugar, de la cantidad y del tiempo durante el cual se produce, además del estado de óxido-reducción del medio en el que va a actuar, es importante la concentración de radical libre de oxígeno ( $\text{O}_2^-$ ) que exista, pues de esto va a depender la formación de mayores o menores cantidades de peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), que es un radical libre oxidante que tiene un papel fundamental en la lesión tisular (Rodella, et. al., 1999).

TESIS CON  
FALLA DE CALIFICACION

---

La magnitud y la duración de la síntesis de NO por las células determina que su acción sea fisiológica o patológica.

### **ACCIÓN FISIOLÓGICA**

La acción fisiológica es mediada por pulsos de pequeñas cantidades de NO, las cuales pueden aumentar los niveles de cGMP a través de la nitrosilación del hemo de la guanilato ciclasa, produciendo la dilatación de los vasos sanguíneos, la desagregación plaquetaria y la apertura y cierre de algunos canales iónicos.

El NO tiene una vida media efímera de 4 a 5 segundos en condiciones fisiológicas, se inactiva fácilmente por oxidación, dando lugar a la formación de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) o reacciona con el radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) para formar peroxinitritos ( $\text{ONOO}^-$ ). Ésta última reacción es extremadamente rápida y depende únicamente de las concentraciones existentes de NO y  $\text{O}_2^-$  (Moncada, 1991 y López-Jaramillo, 1990).

### **ACTIVIDADES PATOLÓGICAS**

Las actividades patológicas son el resultado de la producción sostenida de elevados niveles de NO, que pueden inactivar enzimas dependientes de hierro, involucradas en la respiración mitocondrial, en la producción de energía y en la replicación celular.

En grandes cantidades, el NO mata cualquier tipo de célula, inhibe el crecimiento de muchos patógenos incluyendo bacterias, hongos y parásitos, en especial patógenos intracelulares; y tiene un papel importante en el sistema inmunológico y en la inflamación (Ignarro, 1990 y Middendorf, et. al., 1997). El NO inhibe la producción de ATP y de ADN, por consiguiente presenta una fuerte acción antimicrobiana contra parásitos intracelulares (*Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Trypanosoma*) (Roitt, et. al., 2000).

Las óxido nítrico sintetasas (NOS) catalizan la oxidación de uno de los dos nitrógenos guanidínicos equivalentes de la L-arginina, que es un aminoácido semi-esencial, para producir NO y L-citrulina (Marletta, 1993). Otros sustratos que se requieren son el oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ ) y el NADPH (Fig. 3) (Moncada, 1993). El descubrimiento de la caracterización de las tres isoformas de la NOS conocidas fue esencial para comprender las regulaciones y funciones del NO. Cada isoforma exhibe patrones de expresión únicos, mecanismos de regulación peculiares y patrones especializados de

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

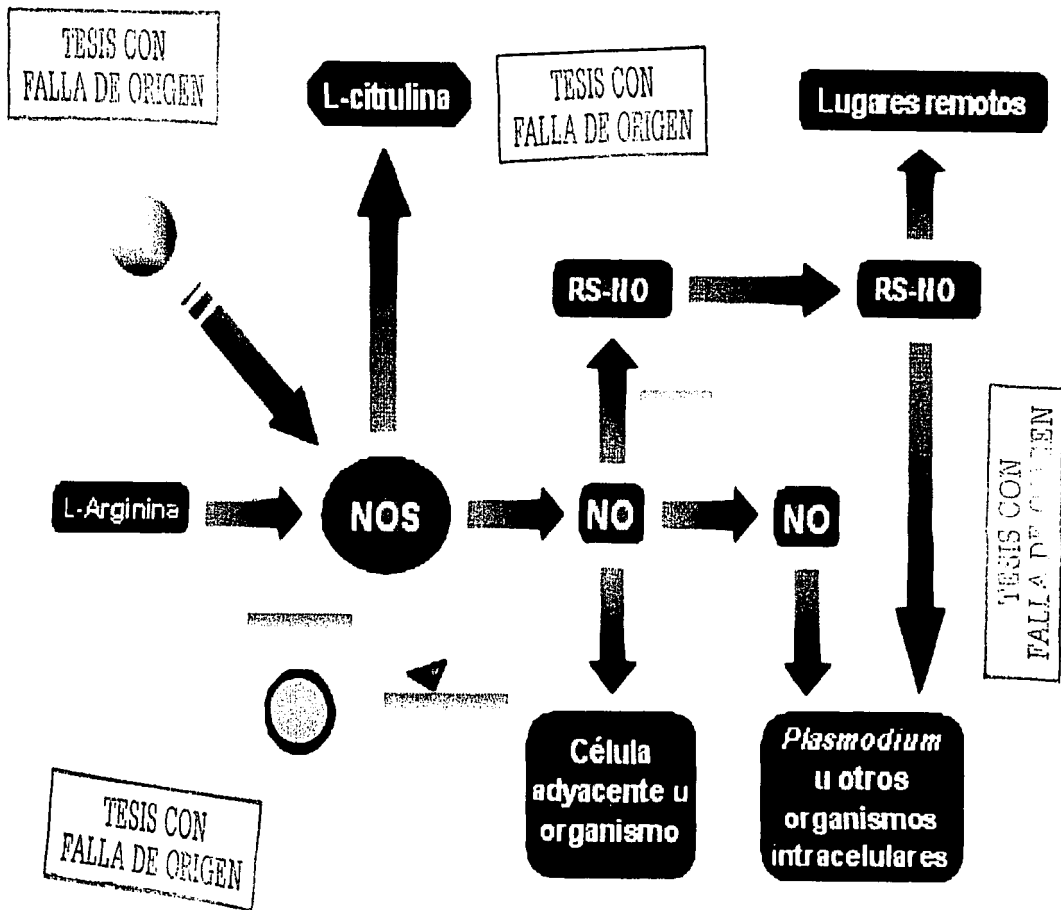


FIGURA 3. La síntesis y el destino del óxido nítrico en las células.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

---

la síntesis de NO. En los últimos tiempos, se han producido importantes avances en el campo de la regulación gracias a la definición de las características de cada isoforma. Estas isoformas tienen en común que producen NO a partir de L arginina y que todas utilizan flavina mononucleótido (FMN), flavina adenina dinucleótido (FAD), tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) y protoporfirina-IX-hemo como cofactores. Las flavinas, aparentemente, almacenan y transfieren electrones al grupo hemo durante el proceso de oxidación (Abu-Soud, 1993). La tetrahidrobiopterina parece ser importante para mantener la enzima en su forma dimérica activa (Baek, et. al., 1993).

### **SÍNTESIS DE ÓXIDO NÍTRICO DE FORMAS: CONSTITUTIVA DE BAJA PRODUCCIÓN E INDUCIBLE DE ALTA PRODUCCIÓN**

Las células que presentan las isoenzimas constitutivas, como las neuronas (NOS-I) y las células endoteliales (NOS-III), responden a agonistas que elevan el Ca<sup>2+</sup> intracelular. El Ca<sup>2+</sup> aumenta la unión de la calmodulina a la NOS, que produce una activación transitoria de la enzima con síntesis de cantidades picomolares (10<sup>-12</sup>M) de NO. Las enzimas constitutivas son sensibles a quelantes de Ca<sup>2+</sup>, a inhibidores de la calmodulina y se sintetizan de forma continua.

La activación de la NOS inducible (NOS-II) es a nivel transcripcional. Los macrófagos, células prototípicas de la NOS inducible, comienzan a producir NO varias horas después de la estimulación con citocinas. Después de la transcripción del gen y la expresión de la proteína, los macrófagos activados producen cantidades nanomolares (10<sup>-9</sup>M) de NO durante días, hasta que la enzima es degradada por proteólisis. Se ha sugerido que el NO podría inhibir la actividad de las NOS constitutiva e inducible, en forma dosis-dependiente e irreversible (Assreuy, et. al., 1993). Los dos tipos de NOS pueden coexistir en la misma célula.

El NO puede actuar dentro de la célula en la cual es generado o difundir a las células adyacentes activando la guanilato ciclasa soluble lo que resulta en un aumento de los niveles de cGMP (Ignarro et. al., 1987) Este aumento puede conducir a: la activación de la proteincinasa dependiente de cGMP, la fosforilación alterada de muchas proteínas endógenas, la disminución de la actividad de la fosfolipasa C y la disminución del calcio citosólico. La disminución del calcio intracelular es responsable de la relajación mediada por NO del músculo liso vascular y no vascular, de la

---

inhibición de la agregación y adhesión plaquetaria, de la inhibición de la adhesión leucocitaria y es una señal de transducción del sistema nervioso central y periférico (Durante, et al. 1992).

Algunos efectos del NO, como los citotóxicos, son independientes de cGMP y se deben a la interacción directa del NO con un grupo prostético férrico. El NO interacciona con el centro Fe-S de la aconitasa o de algunas enzimas de la cadena mitocondrial de transporte de electrones como la NADH-óxidorreductasa o succinato-óxidorreductasa, alterando el metabolismo energético y la respiración celular (Castro, et. al., 1994). También actúa sobre la ribonucleótido reductasa inhibiendo la replicación celular.

### **NOS tipo I.**

Una característica importante de esta isoenzima es su capacidad de producir tanto  $O_2^-$  como óxido nítrico (Pou, et. al., 1992). La NOS neuronal genera  $O_2^-$  en ausencia de L-arginina mientras que el agregado de L-arginina reduce la producción de  $O_2^-$  y aumenta la formación de NO. El óxido nítrico y el superóxido, formados por la misma enzima, pueden combinarse formando radicales más tóxicos, posibles mediadores de la citotoxicidad.

En el cerebro, la NOS neuronal está presente en pequeñas poblaciones neuronales. En algunas áreas, como en la corteza cerebral, el hipotálamo y el cuerpo estriado, existe en pequeñas interneuronas, comprendiendo sólo el 1-2% de la población neuronal total (Bredt, 1992).

### **NOS tipo II**

La NOS-II puede expresarse en diversos tipos celulares en respuesta a distintas señales que actúan sinérgicamente, incluyendo citocinas y productos microbianos. Esta NOS es calcio-calmodulina independiente. La calmodulina está presente como una subunidad fuertemente ligada a la enzima y, a diferencia de las isoformas constitutivas, no se requieren niveles altos de calcio para su unión con la NOS de los macrófagos lo que, posiblemente, se debe a una unión irreversible entre ambas. El gen de la NOS-II humana se localiza en el cromosoma 17 (Eizirik, et. al., 1993).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La NOS inducible es susceptible a la supresión inmunológica por el factor de crecemento beta, factor desactivador de macrófagos e IL-4, IL-8 e IL-10. La supresión de la activación de los macrófagos por IL-4, IL-10 y TGF- $\beta$  podría deberse en parte a la supresión de TNF- $\alpha$ , una segunda señal requerida para alcanzar niveles citotóxicos de NO (Taylor-Robinson, 1995).

### **NOS tipo III.**

La NOS-III, presente en el endotelio y en las células epiteliales, contiene 1203 aminoácidos, con un peso molecular de 135 KDa, comparte el 52% de la secuencia de aminoácidos con la NOS neuronal. (Janssens, et. al., 1992). El gen de la NOS endotelial humana está ubicado en el cromosoma 7. La asociación de la NOS endotelial con la membrana celular podría mitigar los efectos citotóxicos del NO sobre las células endoteliales y aumentar la señal en el músculo liso vascular subyacente y en las plaquetas intraluminales. En contraste, la NOS inducible de los macrófagos aparentemente exhibe una alta actividad enzimática en el citosol celular, pero esto ocurre en una célula inflamatoria terminalmente activada, en la cual los efectos autocidas del NO producido pueden tener una consecuencia biológica relativamente pequeña. A pesar de que se ha creído que la NOS neuronal era predominantemente citosólica. La localización de la NOS endotelial es totalmente dependiente de la concentración de calcio dentro de un intervalo de 100-500 nM, y parece estar mediada por calmodulina a semejanza de la NOS neuronal. Para su actividad requiere la presencia de tetrahidrobiopterina (Tabla II) (Knowles, 1992).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**TABLA II. CARACTERISTICAS PRINCIPALES DE LAS ISOFORMAS DE LA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTETASA**

ISOFORMA	OTRO NOMBRE	PESO MOLECULAR	REGULACIÓN	LOCALIZACIÓN
NOS Tipo I	nNOS o bNOS	155 Kda	Ca <sup>++</sup> /calmodulina	Neuronas del SNC y SNP, neuroglías, islotes del páncreas
NOS Tipo II	iNOS	125 Kda	Expresión inducida por citocinas y endotoxinas	Macrófagos, hepatocitos, células musculares lisas, neutrófilos y otros.
NOS Tipo III	eNOS	135 Kda	Ca <sup>++</sup> /calmodulina	Endotelio vascular, riñón, plaquetas.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

### ÓXIDO NÍTRICO Y MALARIA

El óxido nítrico y los intermediarios reactivos de nitrógeno (RNI) son producidos en la resistencia a la infección a malaria o pueden producir daño en las células. El óxido nítrico tiene actividad microbicida, *Plasmodium* es sensible al efecto de éste, así como a compuestos nitrogenados derivados del óxido nítrico (Hommel, 1996).

El óxido nítrico es inactivado por el grupo hem o puede reaccionar con el ion superóxido para formar peroxinitritos (ONOO<sup>-</sup>), RNI, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. El NO y los RNI reaccionan de manera intensa causando la muerte celular. Células mononucleares incluyendo macrófagos y eosinófilos, producen óxido nítrico después de la estimulación con citocinas, endotoxinas bacterianas (LPS) o antígenos de agentes infecciosos (Oliveira, 1998). En malaria los RNI reaccionan con la hemoglobina (Hb) de los glóbulos rojos que están parasitados y forman dos tipos de compuestos, nitrosotiol-Hb o met-Hb, lo que resulta con la muerte del parásito (Rockett, et. al., 1991). El NO puede inhibir los dos estadios de la infección malárica en el hombre (hepática y sanguínea) (Rockett, et. al., 1992). En ratones infectados con *Plasmodium chabaudi* el óxido nítrico tiene un papel protector en la respuesta temprana no específica (Jones, et. al., 1996).

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## INHIBIDORES E INDUCTORES DEL ÓXIDO NÍTRICO

Existen muchos mecanismos potenciales por medio de los cuales los fármacos pueden inhibir o inducir la síntesis de óxido nítrico o bien liberar óxido nítrico en el organismo.

Los descubrimientos de las diversas funciones biológicas del óxido nítrico, aportan conocimientos del papel de la arginina, el cual es el sustrato para su síntesis. La arginina es un aminoácido semi-esencial, dado que se ingiere en la dieta, sin embargo, la arginina puede ser sintetizada en cantidades suficientes en el adulto sano (Rose, 1937; Barbul, 1986). La arginina es el sustrato de todas las isoformas de la síntesis de óxido nítrico (Fig. 4a), en la reacción la L-arginina y oxígeno molecular dan origen al óxido nítrico y a la citrulina (Grant, et. al., 1998). El papel fisiopatológico de la arginina está entrelazado con el efecto biológico del óxido nítrico (Morris, 1999), varias funciones del óxido nítrico se han delineado de la atenuación o acrecentamiento de su efecto con respecto a la presencia de inductores o inhibidores de la óxido nítrico sintetasa.

### Inhibidores:

Los inhibidores de la NOS se han empleado para evaluar el papel del NO en los procesos fisiológicos y fisiopatológicos. La mayoría de ellos son análogos de la L-arginina (Rees, et. al., 1990 y Corbett, et. al., 1992) o contienen un grupo guanidínico por lo cual compiten con la arginina. Los más utilizados son la N<sup>G</sup>-monometil-L-arginina (L-NMMA), N<sub>w</sub>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) y Aminoguanidina (AG) (Tabla III).

TABLA III. INHIBIDORES DE LA NOS Y SU SELECTIVIDAD  
(Tomada de Bryk & Wolf, 1999)

INHIBIDOR	SELECTIVIDAD
L-NMMA	I = III > II
L-NAME	I > III > II
AMINOGUANIDINA	II >> I > III

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

---

Como inhibidor de la actividad de la NOS, el compuesto L-NMMA (Fig. 4b) puede producirse a partir de residuos de arginina tras metilación durante la renovación proteica (Vallance, et. al., 1992), este compuesto en condiciones fisiológicas se encuentra en concentraciones bajas, pero en situaciones patológicas, como es el caso de las afecciones renales, puede llegar a tener concentraciones bastante elevadas que pueden disminuir la síntesis de NO (Vallance, et. al., 1992). Otro inhibidor como el N<sup>ω</sup>-nitro-arginina metil éster (L-NAME) (Fig. 4c) puede inhibir de manera preferente a las isoformas constitutivas de la NOS (Gross, et. al., 1991 y Lambert, et. al., 1992), mientras que la aminoguanidina inhibe la iNOS de los macrófagos de una manera selectiva (Stuehr, 1992) El inhibidor L-NAME parece inhibir *in vitro* la síntesis de NO por las tres isoformas (Pollock, et. al., 1991).

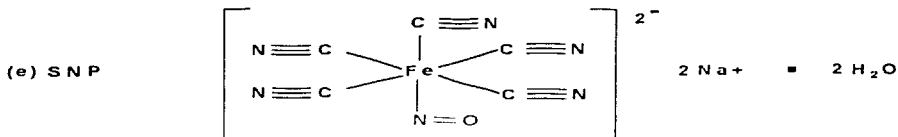
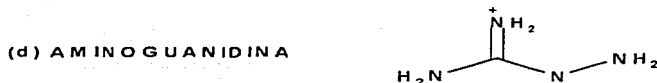
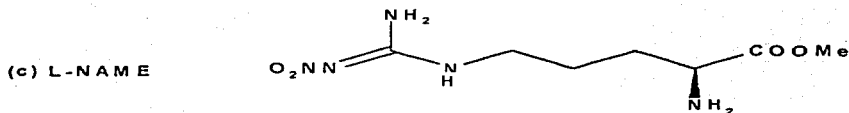
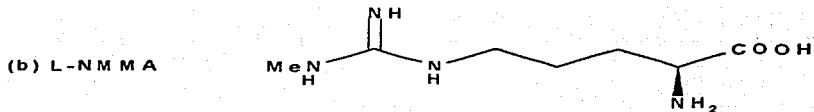
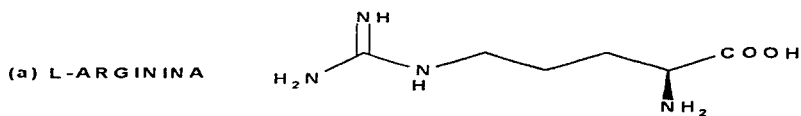
En algunas especies, incluyendo la humana, la administración intravenosa de L-NMMA aumenta la presión arterial. La infusión de L-NMMA en la arteria branquial humana produce vasoconstricción. Esto se puede explicar a partir de la inhibición de la producción basal de NO. (Elliott, et. al., 1993).

La aminoguanidina (Fig.4d) se identificó como uno de los primeros inhibidores selectivos de la iNOS (Corbett, et. al., 1992 y Misko, et. al., 1993). La inhibición de la actividad de la iNOS por la aminoguanidina y cualquier otro inhibidor o inductor se evalúa examinando la acumulación del producto final de oxidación del óxido nítrico (Jones, et. al., 1996).

### **Inductores:**

El inductor nitroprusiato de sodio (SNP) (Fig. 4e) se utiliza en estudios farmacológicos como donante de óxido nítrico, es un potente vasodilatador por lo cual es un agente anti-hipertensivo, también relaja o inhibe la contracción del músculo liso. El SNP libera NO<sup>+</sup> el cual es metabólicamente convertido en NO<sup>-</sup> o S-nitrosuccinato, el cual activa a la guanilato ciclasa soluble (Bates, et. al., 1991 y Feelisch, 1987), causando la producción de cGMP (Arnold, et. al., 1977), con lo cual se produce la relajación, hiperpolarización, activación de los canales de K<sup>+</sup> o inhibición de canales de calcio.

Las toxinas de origen microbiano se pueden dividir en dos grupos: las endotoxinas y las exotoxinas. Las exotoxinas son las toxinas biológicas más potentes conocidas,



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 4. a) L-arginina; sustrato para la síntesis de óxido nítrico, b) N<sup>G</sup>-monometil-L-arginina (L-NMMA); inhibidor de la nNOS, c) N<sup>W</sup>-nitro-arginina metil éster (L-NAME); inhibidor de nNOS, d) Aminoguanidina (AG); inhibidor de la iNOS, e) Nitroprusiato de sodio (SNP); donador de óxido nítrico.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

---

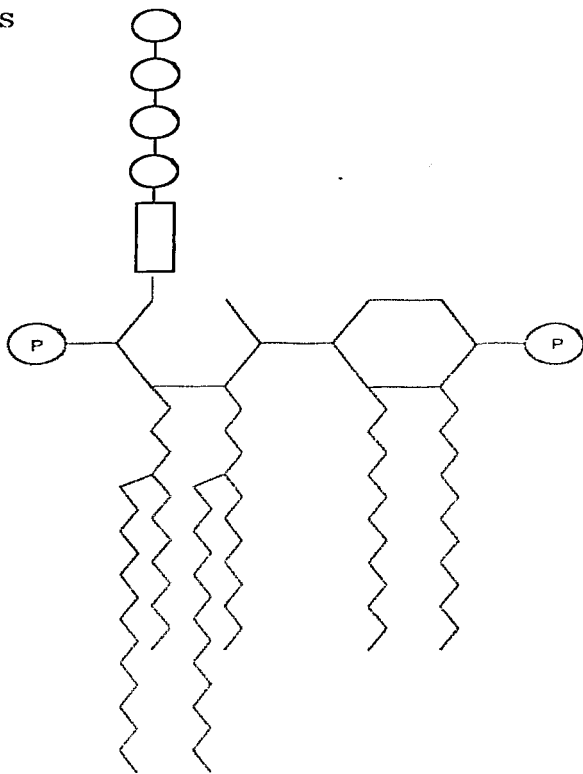
producidas fundamentalmente por bacterias grampositivas, son en general de naturaleza proteica y termolábiles, dado que son proteínas. Algunas exotoxinas sólo se activan después de una hidrólisis parcial por enzimas proteolíticas, su actividad tóxica puede ser destruida por tratamiento con formaldehído y neutralizada por anticuerpos específicos (Koneman, et. al., 1999).

Las endotoxinas son un producto de las bacterias gramnegativas y principalmente lipopolisacáridos (LPS). El LPS (Fig. 5), es un componente estructural de la pared externa de las bacterias gramnegativas. Las endotoxinas son estables al calor, no son detoxificadas por tratamiento con formaldehído y se neutralizan por anticuerpos específicos. Comparadas con muchas de las exotoxinas, las endotoxinas tienen una toxicidad relativamente baja. Las actividades biológicas y tóxicas de las endotoxinas son amplias. Concentraciones tan bajas como nanogramos de una endotoxina causan fiebre en el hombre y la liberación de pirógenos endógenos, dosis mayores causan hipertensión, disminución del número de polimorfonucleares y plaquetas por el aumento de la marginación de éstas células en los pequeños vasos sanguíneos y hemorragia. Las endotoxinas también son mitogénicas para los linfocitos B y estimulan la liberación de varias citocinas de los macrófagos (Koneman, et. al., 1999). Las moléculas de los LPS son glucolípidos complejos, compuestos por una porción lipídica llamada lípido A, la región del centro o core polisacárido que en general es similar en estructura dentro de un género o una especie dados de bacterias y cadenas laterales O- específicas, que son regiones de estructura bioquímica variable. La porción conocida como lípido A del LPS está incluida en la cara externa de la membrana externa, con el centro polisacárido y las cadenas O-específicas que se proyectan desde la superficie de la membrana externa como si fueran escobillas (Koneman, et. al., 1999).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

LPS



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Antígeno O

Centro Polisacárido

Lípido A

FIGURA 5. Lipopolisacárido (LPS) de la envoltura celular gramnegativa.  
(Redibujado de Brooks, et. al., 1991)

## REACCIÓN DE GRIESS

Uno de los medios para investigar la formación de óxido nítrico es la determinación de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) por análisis colorimétrico, los  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  son los dos principales productos de degradación del NO y son estables pues ya no sufren de modificaciones posteriores (Gilliam, et. al., 1993).

Griess es quien describió dicha reacción por primera vez y a través de los años, esta técnica ha sufrido de varias modificaciones.

La concentración de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) y nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) en muestras de suero se evalúa por el método enzimático, en el cual, el primer paso es reducir los nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) a nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ). Se utiliza nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) junto con la enzima nitrato reductasa. En el segundo paso, los nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) llevan a cabo una reacción de diazonización usando el reactivo de Griess, el cual contiene sulfanilamida y bicloruro de N-1-naftiletilediamina (NED) en condiciones ácidas con ácido fosfórico (Fig. 6) (Graham, 1998).

Este sistema detecta al  $\text{NO}_2^-$  en una gran variedad de líquidos biológicos y experimentales tales como el plasma, suero, orina y medios de cultivo celular.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

*Nitrato Reductasa*

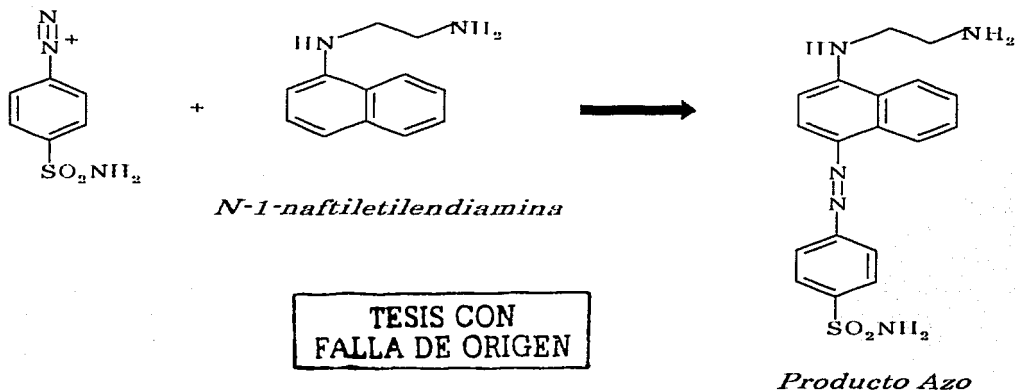
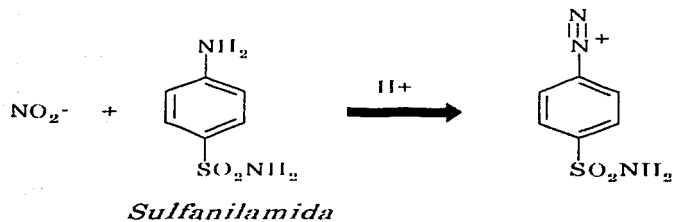


FIGURA 6. Reacción de Griess

**TESIS CON FALLA DE ORIGEN**



---

## **RETROTRANSCRIPCIÓN-REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR)**

Es una técnica que utiliza PCR en conjunto con la transcripción reversa, es de gran utilidad para estudiar los cambios en la expresión de genes a nivel de RNA.

### **RETOTRANSCRIPCIÓN (RT)**

Es la amplificación de RNA (especialmente RNAm) a través de la síntesis previa de su cDNA (DNA complementario al RNA), que después se amplificará por PCR. Es decir, no se obtienen copias de RNA de partida, sino de DNA, aunque se conserva la secuencia del RNA. El método de RT-PCR tiene la mayor capacidad de detección para la medición de la expresión génica *in vitro*. Esta técnica se utiliza para amplificar RNAm de células asequibles. La mezcla inicial contiene todos los componentes necesarios: muestra de RNA, transcriptasa inversa, DNA polimerasa, cebadores y dNTPs. El proceso se inicia con la síntesis de una hebra de cDNA por la acción de la transcriptasa inversa, una polimerasa de DNA dirigida por RNA, permaneciendo el cDNA unido al molde como dúplex RNA: cDNA. En una segunda etapa se desnaturaliza el dúplex y comienza la amplificación (etapas del PCR): la hebra de cDNA liberada actúa como molde para una segunda hebra de cDNA, amplificándose el dúplex en sucesivos ciclos.

Al analizar cambios en la expresión de genes específicos a nivel de RNA se utiliza un RNAm celular como estándar interno. La estrategia consiste en llevar a cabo una PCR doble, es decir, que identifique al mismo tiempo dos RNAm específicos: el de estudio comparado con otro que no sufra cambios significativos durante el proceso fisiológico o fisiopatológico. Para ello, se ha empleado como estándar interno el producto de la expresión de genes constitutivos a nivel de RNAm (RNAm de la  $\beta$ -actina). El primer paso consiste en extraer el RNA total de una misma muestra biológica, a partir de la cual se efectúa la reacción de la transcriptasa inversa para obtener el cDNA total (Panduro, 2000).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

En el año 1986, el investigador norteamericano, K. Mullis, desarrolló un método que permite, a partir de una muestra muy pequeña de DNA, obtener millones de copias de DNA *in vitro*, en unas pocas horas y sin necesidad de usar células vivas (Panduro, 2000).

La técnica de PCR requiere conocer la secuencia de nucleótidos de los extremos del fragmento que se requiere amplificar. Estas secuencias se usan para diseñar dos oligonucleótidos sintéticos de DNA complementarios a una porción de cada una de las dos cadenas de la doble hélice. La muestra de DNA se coloca en una solución (mezcla de reacción).

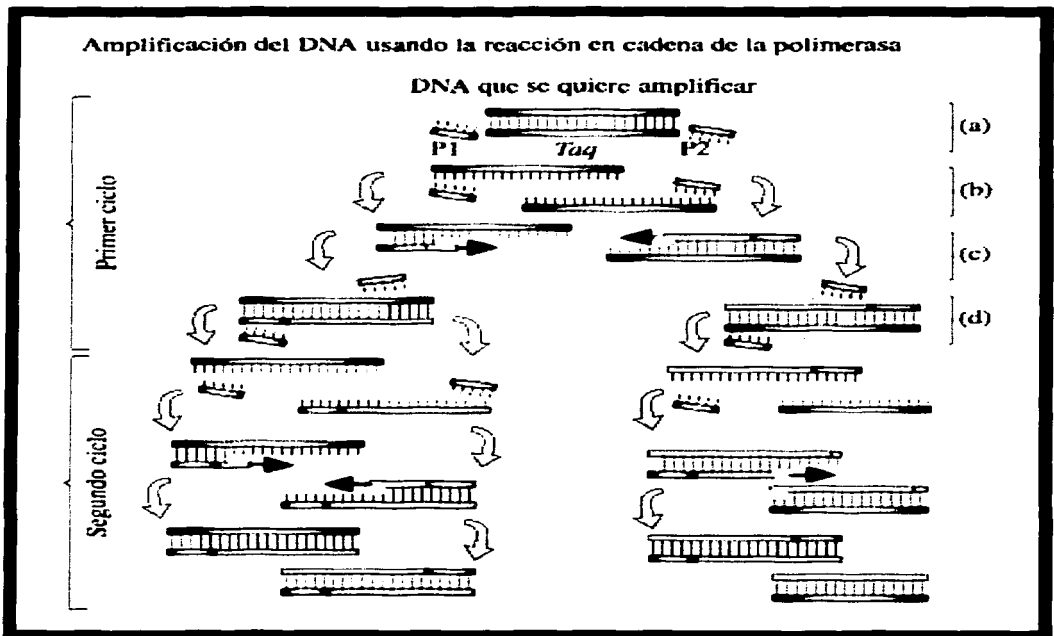


Figura 7. Amplificación del DNA usando la reacción en cadena de la polimerasa

---

a) La mezcla de reacción contiene la secuencia de DNA que se quiere amplificar, dos oligonucleótidos sintéticos (P1 y P2) que servirán como cebadores, una DNA polimerasa termoestable (Taq) y los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato -dATP, dGTP, dCTP y dTTP-.

b) La mezcla de reacción se somete a ciclos sucesivos, cada uno correspondiente a una fase de desnaturalización, una hibridación y una de elongación. Durante la desnaturalización, que se realiza por calentamiento de la mezcla a 95 °C, se separan las dos cadenas del DNA molde.

c) Durante la hibridación, la temperatura de incubación se reduce para permitir el apareamiento de las bases de ambos cebadores en el sitio donde encuentran una secuencia complementaria.

d) Durante la fase de elongación, la mezcla se calienta a 72 °C, temperatura a la cual la DNA polimerasa extiende la cadena complementaria a partir del extremo 3' de los cebadores. Al finalizar cada ciclo, la cantidad de DNA molde disponible para el ciclo siguiente aumenta al doble (Fig. 7).

Al término de la reacción, los productos amplificados se someten a electroforesis de acrilamida y se tiñe el gel con lo cual se visualizan dos bandas, una que corresponda al estándar interno y la otra al RNAm en estudio. Para tener la certeza de que los cambios o variaciones en la expresión del gen de interés son reales, la banda correspondiente al estándar interno debe tener la misma intensidad en las diferentes muestras de estudio al visualizarse con el bromuro de etidio.

El paso siguiente consiste en determinar la variación de intensidad de la banda de RNAm, entre muestras o comparada con el estándar interno. Para ello, se toma una fotografía del gel y se analiza cada banda por densitometría (Fig. 8) (Panduro, 2000).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

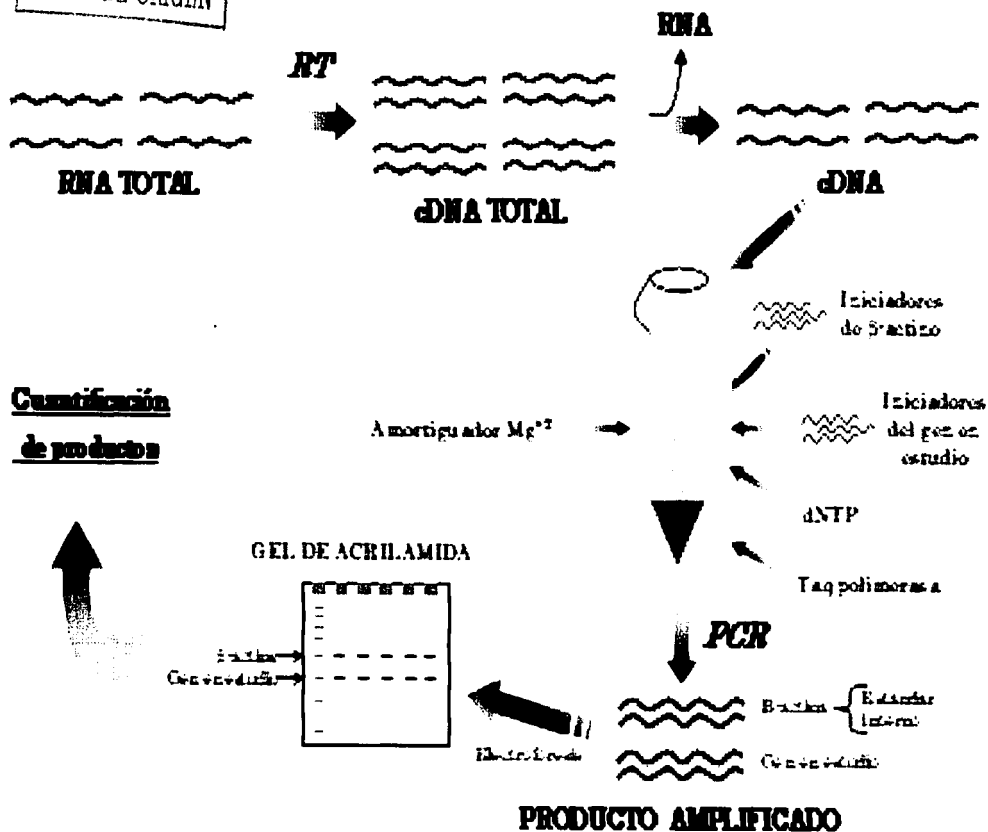


FIGURA 8. RT-PCR Semicuantitativa, amplificación simultánea de dos cDNA utilizando el mismo número de iniciadores.

(Redibujado de Panduro, 2000)

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

---

## PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

La malaria es uno de los principales problemas de salud pública en el mundo, y ésta presente en 102 países (Grenwood, 1997). El agente etiológico es el parásito del género *Plasmodium* que se transmite a los humanos por la picadura del mosquito hembra infectado del género *Anopheles*. Durante décadas se ha intentado erradicar ésta enfermedad, a través de medidas de saneamiento básico y control del mosquito vector. Sin embargo, múltiples problemas de orden técnico, socioeconómico y político han impedido el éxito de los programas de erradicación. Entre los factores más importantes relacionados con la persistencia de la malaria están; la resistencia de los mosquitos a los insecticidas y del parásito a las drogas antimaláricas. Probablemente la estrategia más importante para el control de la malaria es el diseño de vacunas, sin embargo, para ello es necesario conocer y potenciar los mecanismos efectores de la respuesta inmune, con el propósito de intervenir inmunológicamente en la diferenciación y expansión del parásito en el huésped o en el vector (Good, 1992; Bruce-Chwatt, 1987). En este proyecto se analizará el papel del óxido nítrico (NO) en la regulación de la respuesta inmune celular durante la infección con *Plasmodium* en un modelo experimental de malaria murina. Para lo cual se cuantificara la concentración sérica de óxido nítrico en ratones sanos e infectados con *Plasmodium chabaudi*. Se estandarizara las dosis de inhibidor e inductor necesarias para inducir o inhibir a la enzima óxido nítrico-sintetasa inducible, con el fin de establecer el papel que juega el óxido nítrico en la regulación de la respuesta inmune en malaria. Finalmente se evaluara por la técnica de RT-PCR la expresión de los genes que codifican para  $INF-\gamma$ ,  $TNF-\alpha$ , IL-4, IL-10 e iNOS en ratones infectados con *Plasmodium*, tratados con los inhibidores e inductores de la iNOS.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

---

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL:

- ❖ Analizar el papel del óxido nítrico (NO) en la regulación de la respuesta inmune celular durante la infección con *Plasmodium*.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- ❖ Estandarizar la técnica para cuantificar óxido nítrico por el método de Griess en el suero de ratones infectados con *Plasmodium*.
- ❖ Determinar la cinética de la parasitemia de ratones CBA/Ca infectados con *Plasmodium chabaudi*.
- ❖ Evaluar la concentración óptima de inhibidores e inductores del óxido nítrico sintetasa en los ratones CBA/Ca.
- ❖ Determinar si el óxido nítrico interfiere con la expresión de las citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 e iNOS en ratones infectados con *Plasmodium*.

TESIS CON  
FALLA DE CALIFICACIÓN

---

## HIPÓTESIS

Si el óxido nítrico interviene en la modulación de la respuesta inmune celular durante la infección con *Plasmodium chabaudi* AS en ratones CBA/Ca, entonces al inducir o al inhibir la producción de óxido nítrico, se modificará la parasitemia y la expresión de las citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 e iNOS con relación a los ratones del grupo control.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

---

## MATERIAL

### MATERIAL BIOLÓGICO

- ❖ Ratones CBA/Ca machos, de 8-12 semanas de edad, mantenidos en condiciones libres de patógenos específicos
- ❖ Eritrocitos parasitados de ratón con la cepa *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS criopreservados en nitrógeno líquido
- ❖ Suero normal de ratones CBA/Ca

### MATERIAL DE LABORATORIO

- ❖ Portaobjetos
- ❖ Tijeras de disección
- ❖ Guantes de hule látex
- ❖ Pipetas Pasteur de vidrio
- ❖ Gradillas para tubos falcon
- ❖ Gradillas para tubos eppendorf
- ❖ Jeringas de insulina nuevas y estériles, plastipac
- ❖ Malla de acero inoxidable nueva y estéril
- ❖ Gorros y botas para trabajar en áreas limpias
- ❖ Tubos falcon: 15 mL, 50 mL, nuevos y estériles
- ❖ Cajas Petri de 10 cm de diámetro, de plástico, nuevas y estériles
- ❖ Tubos eppendorf: 1.5mL, 650  $\mu$ L, 250  $\mu$ L, nuevos y estériles (libres de nucleasas)
- ❖ Puntas para micropipetas: 2.5  $\mu$ L, 10  $\mu$ L, 250  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L, nuevas y estériles (libres de nucleasas)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



---

## **EQUIPO**

- ❖ Balanza analítica, SCIENTECH
- ❖ Cámara de electroforesis BIO-RAD, PROTEAN II xi Cell, 16 cm.
- ❖ Campana de flujo laminar, Veco
- ❖ Congelador Nieto
- ❖ Espectrofotómetro UV, WPA
- ❖ Equipo analizador de geles; Gel Doc 1000, BIO-RAD
- ❖ Microcentrifuga, Eppendorf 5415C
- ❖ Micropipetas Eppendorf: 2.5  $\mu$ L, 10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L
- ❖ Micropipeta Eppendorf 8 X 200  $\mu$ L
- ❖ Micropipetas Gilson: p20, p200, p1000
- ❖ Microscopio óptico, Carl Zeiss Estándar 25
- ❖ Refrigerador, MayTag
- ❖ Tanque de nitrógeno líquido, 34XT, Taylor-Wharton
- ❖ Termociclador, Eppendorf
- ❖ Vortex Genie 2, Daigger
- ❖ Lector de ELISA, Stat fax-2100, Awareness Technology Inc
- ❖ Impresora, Deskjet 680C, Hewlett Packard
- ❖ Ultracongelador REVCO, Legaci Refrigeration System
- ❖ Autoclave, Tuttnauer Brinkmann 2540M

## **REACTIVOS**

- ❖ Aceite mineral, Sigma
- ❖ Ácido fosfórico, Sigma Chemical
- ❖ Acetato de sodio, Sigma
- ❖ Ácido Bórico, Sigma
- ❖ Ácido Tricloroacético, Droguería Cosmopolita SA de CV
- ❖ Acrilamida, USB/Amersham
- ❖ Agua bidestilada, Hidropura
- ❖ Albúmina sérica bovina, Sigma
- ❖ Aminoguanidina hemisulfato, Sigma

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- ❖ Amortiguador para retrotranscripción 5X (5X first strand buffer), Gibco BRL
- ❖ L-Arginina, Sigma
- ❖ Azul de bromofenol, Sigma
- ❖ Bis acrilamida, Sigma
- ❖ Bromuro de etidio, Sigma
- ❖ Citrato de sodio, Sigma
- ❖ Cloroformo, Burdick-Jackson
- ❖ Cloruro de magnesio, Sigma
- ❖ Cloruro de potasio, USB/Amersham
- ❖ Cloruro de sodio, USB/Amersham
- ❖ Colorante de Giemsa, Sigma
- ❖ Dietilpirocarbonato, Sigma
- ❖ dNTP's (desoxirribonucleótidos de trifosfato), Pharmacia
- ❖ Ditiotreititol (dT) Gibco BRL
- ❖ EDTA, Sigma
- ❖ Etanol absoluto, Merck
- ❖ Éter, JT Backer
- ❖ Fenol ácido, Sigma
- ❖ Gelatina, Sigma
- ❖ Glicol, Sigma
- ❖ Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), USB/Amersham
- ❖ Fosfato de sodio monobásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), USB/Amersham
- ❖ Heparina de sodio, Sigma
- ❖ Inhibidor de RNA'sa, Gibco BRL
- ❖ Lipopolisacárido, Sigma
- ❖ Marcador de peso molecular 120pb, Gibco BRL
- ❖ 2-mercaptoetanol, Sigma
- ❖ Metanol, JT Backer
- ❖ NADPH (Tetrasodium salt) 98%, Roche
- ❖ NED (N-1-Naphthyle Thylenediamine Dihydrochloride), Baker Analyzed Reagent
- ❖ Nitrate reductase 20 U, Roche
- ❖ Oligo dT

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- ❖ Persulfato de amonio, Sigma
- ❖ Retrotranscriptasa MMLV-RT
- ❖ Sacarosa, Sigma
- ❖ Sarcosil, Sigma
- ❖ SNP (Sodium Nitroprusside Dihydrate), Sigma
- ❖ Sulfanilamida (p-Aminobenzenesulfonamida) 99%, Sigma
- ❖ SDS (Dodecilsulfato de sodio), Sigma
- ❖ Taq polimerasa (AmpliTaq DNA polimerase), Perkin Elmer
- ❖ TEMED, Sigma
- ❖ Tiocianato de guanidinio, Sigma
- ❖ Tris base, Sigma
- ❖ Xilencianol, Sigma
- ❖ Primers u oligos para los genes:  $\beta$ -actina, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 e iNOS, Gibco BRL

**$\beta$ -actina**

3'CTC TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC  
5'GTG GGC CGC TCT AGG CAC CAA.

**IFN- $\gamma$**

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

**TNF- $\alpha$**

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

**iNOS**

3'CAG GAT GCT CTG AAC GTA GAC CTT G  
5'CAG CTC CAC AAG CTG GCT CG

**IL-4**

5'ATG GGT CTC AAC CCC CAG CTA GT3'  
3'GCT CTT TAG GCT TTC CAG GAA GTC3'

**IL-10**

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

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# MÉTODO

## INFECCIÓN DE LOS ANIMALES

- ❖ Los ratones CBA/Ca se infectaron intraperitonealmente con  $5 \times 10^4$  eritrocitos parasitados.
- ❖ Diariamente se tomara una muestra de sangre de la cola de los ratones para evaluar la parasitemia en frotos teñidos con Giemsa.

## ADMINISTRACIÓN DEL INHIBIDOR E INDUCTOR

- ❖ Se infecto un grupo de ratones con la técnica antes mencionada.
- ❖ Se administró el inhibidor e inductor intraperitonealmente a cada uno de los grupos de ratones
- ❖ La primera administración de inhibidor e inductor se aplicó del día 2 al 4 de la infección con *Plasmodium chabaudi*.
- ❖ La segunda administración de inhibidor e inductor se realizó del día 8 al 13 de la infección con *Plasmodium chabaudi*.

## TOMA DE MUESTRAS

- ❖ Diariamente se tomó una muestra de sangre de cola de los ratones para evaluar la parasitemia en frotos teñidos con Giemsa.
- ❖ En días alternados se tomaron 80  $\mu$ L de sangre de la cola para obtener suero útil en la cuantificación de óxido nítrico.
- ❖ Se dejo coagular la sangre en el tubo y se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos.
- ❖ Se separó el suero en un tubo estéril con ayuda de una micropipeta.
- ❖ Se congeló a  $-70$  °C, hasta que se procesaron.
- ❖ Se cuantificó la concentración de NO en el suero de los ratones con la técnica de Griess.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **TÉCNICA DE GRIESS (CURVA PATRON)**

- 1) La curva se realizó en condiciones estériles en la campana, en una placa de ELISA de 96 pozos de fondo plano estéril.
- 2) En el primer pozo se colocó el blanco de reactivos, 100  $\mu$  L.
- 3) En los siguientes pozos se adicionaron las disoluciones seriadas del estándar de nitritos (700  $\mu$  M, 350  $\mu$  M, 175  $\mu$  M, 87.5  $\mu$  M, 43.75  $\mu$  M, 21.87  $\mu$  M, 10.9  $\mu$  M).
- 4) Se adicionaron 50  $\mu$  L de sulfanilamida (p- Aminobencenesulfonamida) al 1 % en ácido fosfórico al 5 %.
- 5) Se incubo por 2 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz.
- 6) Se adicionaron 50  $\mu$  l de NED (N-1-Naphthyl ethylene diamine Dihydrochloride) al 0.1%.
- 7) Se incubo por 2 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz.
- 8) La Absorbancia de cada muestra se evaluó a 545 nanometros en un lector de ELISA.

## **PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PROBLEMA**

- 1) La técnica se realizo en la campana de flujo laminar con material nuevo y en condiciones estériles.
- 2) En un tubo eppendorf se adicionaron 15  $\mu$  L de suero, 15  $\mu$  L de NADPH (stock 1.25 mg/mL en PBS 1X) y 5  $\mu$  L de Nitrato reductasa (stock 5 U/mL en PBS 1X).
- 3) Se incubó por 25 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz.
- 4) Se adicionaron 50  $\mu$  L de sulfanilamida.
- 5) Se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz
- 6) Se adicionaron 50  $\mu$  L de NED.
- 7) Se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz.
- 8) Se adicionaron 100  $\mu$  L de ácido tricloroacético al 10%.
- 9) Se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente.
- 10) Del sobrenadante de las muestras se tomaron 100  $\mu$  L y se depositaron en los pozos de la placa de ELISA.
- 11) La absorbancia de cada muestra se evaluó a 545 nanometros en un lector de ELISA.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **EXTRACCIÓN DE RNA**

- 1) Se sacrificó el ratón en una cámara de éter
- 2) Se humedeció la parte abdominal con etanol al 70% (para evitar el desprendimiento del pelo), se procedió a la extracción del bazo, siempre procurando obtener el órgano totalmente limpio de grasa.
- 3) Se maceró el bazo con el émbolo de una jeringa de insulina (nueva y estéril) pasándola a través de una malla de acero inoxidable y enjuagando con PBS libre de calcio y magnesio, llevando a un volumen de 5 mL.
- 4) Se centrifugaron las muestras a 1000 rpm durante 5 min.
- 5) Se desecharon los sobrenadantes y los botones formados se desprendieron agitándolos vigorosamente.
- 6) A la suspensión de tejido obtenido se adicionaron 500  $\mu$ L de trizol.
- 7) En un tubo eppendorf se colocaron 500  $\mu$ L del lisado y se adicionaron: 100  $\mu$ L de la mezcla cloroformo- alcohol isoamilico, se mezcló por 1 min.
- 8) Se colocó en hielo.
- 9) Se centrifugaron las muestras 14,000 rpm por 15 min.
- 10) Las fases acuosas se pasaron a otros tubos.
- 11) Se colocaron en hielo.
- 12) Se centrifugaron a 14,000 rpm. por 15 min.
- 13) Se paso la fase acuosa a otro tubo evitando la interfase.
- 14) Se adicionaron 500  $\mu$ L de isopropanol y se dejaron a -70 °C toda la noche.
- 15) Se centrifugaron las muestras de RNA que contenían isopropanol a 14,000 rpm durante 15 min.
- 16) Se decantaron los sobrenadantes con una micropipeta
- 17) Se adicionaron 800  $\mu$ L de etanol al 80% en agua DEPC y se agitaron suavemente.
- 18) Se guardaron en el congelador (-20 °C) durante 24 hrs.
- 19) Se centrifugaron las muestras que contienen etanol al 80% a 14,000 rpm durante 15 min.
- 20) Se decantaron los sobrenadante con una micropipeta.

- 21) Se destaparon los tubos y se cubrieron con papel parafilm, posteriormente se realizaron pequeños orificios con una aguja (limpia y estéril).
- 22) Se colocaron los tubos en un lugar limpio y a temperatura ambiente, permitiendo que se sequen durante 24 hrs.
- 23) Se hidrataron las muestras adicionando a cada tubo 20  $\mu\text{L}$  de agua DEPC al 0.1% estéril, se prehidrató por 1 hora.
- 24) Se centrifugaron a 14,000 rpm durante 5 seg.
- 25) Se determinaron las concentraciones de cada una de las muestras de RNA, realizando una dilución 1:400 con agua estéril y se cuantificó a 260 nanómetros.
- 26) Se realizaron los cálculos correspondientes para determinar la concentración en  $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ , considerando el factor de dilución.

$$[\text{RNA}] = (\text{Abs}_{260\text{nm}}) (40 \mu\text{g} / 1000 \mu\text{L}) (400) = \mu\text{g} / \mu\text{L}$$

Donde:

$\text{Abs}_{260}$  = Absorbancia de la dilución a 260nm.

$40 \mu\text{g} / 1000 \mu\text{L}$  = Concentración de RNA cuando la absorbancia<sub>260nm</sub> = 1

400 = Dilución.

### RETROTRANSCRIPCIÓN DEL RNAm

- 1) De acuerdo a la concentración de RNA obtenida, se determinó el volumen de la solución de RNA necesario para tomar 1.5  $\mu\text{g}$  de RNA, requerido para la retrotranscripción.
- 2) Se determinó el volumen de agua DEPC requerido para la retrotranscripción, considerando que el volumen final es de 10  $\mu\text{L}$ :

$$\text{Volumen RNA} + 1.5 \mu\text{L oligo dT} (0.5 \mu\text{g} / \mu\text{L}) + \text{Agua DEPC} = 10 \mu\text{L}$$

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- 3) En un tubo Eppendorf se colocaron: agua DEPC, oligo dT (0.75 $\mu$ g) y el RNA
- 4) Se incubó a 65 °C por 10 min., utilizando el termociclador.
- 5) Se colocaron en hielo durante 5 min.
- 6) Se centrifugaron a 14,000 rpm durante 5 seg.
- 7) Se colocaron en hielo y se adicionarán 10 $\mu$ L de la mezcla de retrotranscripción (Tabla IV).

	1 Rx
Amortiguador de retrotranscripción 5X	4.0 $\mu$ L
0.1M dTT	2.0 $\mu$ L
5 mM dNTP's	2.0 $\mu$ L
Enzima M-MLV RT	1.0 $\mu$ L
Inhibidor de RNAsa	0.1 $\mu$ L
Agua DEPC	1.0 $\mu$ L
<b>Volumen Final</b>	<b>10.1 <math>\mu</math>L</b>

TABLA IV. Preparación de la mezcla de retrotranscripción

- 8) Se incubó a 37 °C por 1 hora, empleando el termociclador.
- 9) Se incubó a 95 °C por 5 min.
- 10) Se colocaron en hielo durante 5 min.
- 11) Se centrifugaron a 14,000 rpm por 5 seg.
- 12) Se adicionaron 70  $\mu$ L de agua DEPC y se guardaron en el congelador (-20 °C) hasta su uso. El producto se denomina cDNA (DNA complementario).

TESIS CON  
PALLA DE ORIGEN

### AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES PARA CITOCINAS POR PCR

- 1) Se etiquetaron tubos (fecha, número de tubo y tipo de citocina)
- 2) Se calcularon las cantidades de reactivo para el número de tubos utilizados.
- 3) Se preparó la mezcla de reacción como se muestra en la Tabla V, considerando que el volumen final en un tubo de reacción debe ser de 20  $\mu$ L.
- 4) Todos los reactivos y la mezcla de reacción se mantuvieron en hielo



Stock	Reactivo	[ $\mu$ ]/Rx	$\mu$ L/Rx
10X	Amortiguador de PCR	1X	2.0 $\mu$ L
5mM	DNTP's	0.2Mm	0.8 $\mu$ L
20 $\mu$ M	Oligo $\beta$ -actina	0.1 $\mu$ M	0.1 $\mu$ L
20 $\mu$ M	***Oligos	0.1 $\mu$ M	0.1 $\mu$ L
5 U/ $\mu$ L	Taq DNA pol	0.5U	0.1 $\mu$ L
	Agua para PCR		14.9 $\mu$ L
	cDNA		2.0 $\mu$ L
<b>VOLUMEN FINAL</b>			<b>20.0 <math>\mu</math>L</b>

\*\*\*De acuerdo al gen que se valla amplificar se coloca el oligonucleotido correspondiente.

**TABLA V. Características y preparación de la mezcla para PCR en un tubo de reacción**

- 5) Se mezcló en vortex y se distribuyó en cada tubo 18  $\mu$ L de la mezcla de reacción.
- 6) Se adicionaron 50  $\mu$ L de aceite mineral en cada tubo con la mezcla de reacción.
- 7) Se depositaron 2  $\mu$ L de cDNA o retrotranscrito, atravesando la capa de aceite y sin agitar. Lo cual evitó la formación de aerosoles y por consecuencia la contaminación con cDNA. Hasta este paso se mantuvieron en hielo los tubos.
- 8) Se colocaron los tubos en el termociclador cuando éste alcanzó la temperatura de 94 °C y se sometieron al siguiente programa:
  1. 94 °C por 6 min.
  2. 55 °C por 2 min.
  3. 72 °C por 2 min.
  4. 94 °C por 45 seg.
  5. Se repetirá 29 veces del paso 2-4
  6. 55 °C por 2 min.
  7. 72 °C por 7 min.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

8. 20 °C por 1 hrs.
9. Fin.
- 9) Se guardaron los productos de PCR en congelación (-20 °C) hasta su uso.

### **ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS DE PCR**

- 1) Se prepararon geles de acrilamida al 5% en TBE 1X.
- 2) Se adicionaron a cada muestra 10  $\mu$ L de amortiguador de carga, se mezcló la fase acuosa, sin hacer emulsiones con el aceite.
- 3) Se depositaron 10  $\mu$ L de la muestra con amortiguador en cada pozo, utilizando un pozo por muestra.
- 4) Se colocó en un pozo de los extremos 10  $\mu$ L de marcador de peso molecular de 100 pares de bases.
- 5) Se corrió la electroforesis a 180 volts por 2 horas, en TBE 1X.
- 6) Se procedió a teñir los geles con bromuro de etidio, utilizando 20  $\mu$ L de una solución 10 mg/mL en 200 mL de TBE 1X, se agitó suavemente durante 5 min.
- 7) Se lava con agua destilada durante 5 min.
- 8) El gel se colocó en el equipo analizador de geles: Gel Doc para visualizar los resultados.
- 9) Utilizando el software del equipo se determinó la absorbancia de los productos de PCR y por densitometría se realizaron gráficos para la expresión de cada citocina en relación a la expresión del gen constitutivo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

---

## RESULTADOS

### Parasitemias de los ratones CBA/Ca

En la mayoría de los experimentos en los cuales se utilizaron ratones CBA/Ca infectados con *Plasmodium chabaudi* el pico de la parasitemia se detectó el día 11 de la infección (gráficas 1, 2, 5), exceptuando un grupo de ratones que el pico de la parasitemia se presentó el día 12 (gráfica 3).

Los ratones CBA/Ca a los cuales se les administró un tratamiento para inducir o inhibir la síntesis de óxido nítrico mostraron niveles de parasitemias semejantes a la de los ratones controles parasitados (gráficas 1, 2, 3, 5).

Los ratones que recibieron el tratamiento con el aminoácido L-arginina (L-arg), no mostraron modificación de la parasitemia, durante o después de los días en que se administró el tratamiento, en comparación a los ratones controles parasitados, el tratamiento se administró del día 6 al 12 post-infección, (gráfica 1).

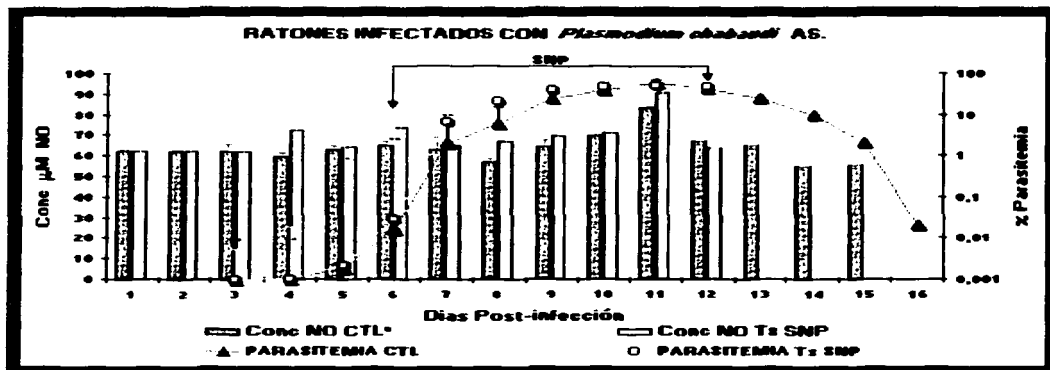
Los ratones que recibieron el tratamiento con Nitroprusiato de sodio (SNP), no mostraron modificación de la parasitemia, durante o después de los días en que se administró el tratamiento, en comparación a los ratones controles parasitados, el tratamiento se administró del día 6 al 12 de la infección, para el día 13 los ratones que fueron tratados con el SNP murieron (gráfica 2).

Los ratones que recibieron el tratamiento con Aminoguanidina hemisulfato (AGH), no mostraron modificación de la parasitemia, durante o después de los días en que se administró el tratamiento, esto en comparación a los ratones controles parasitados, el tratamiento se administró del día 8 al 13 de la infección (gráfica 3).

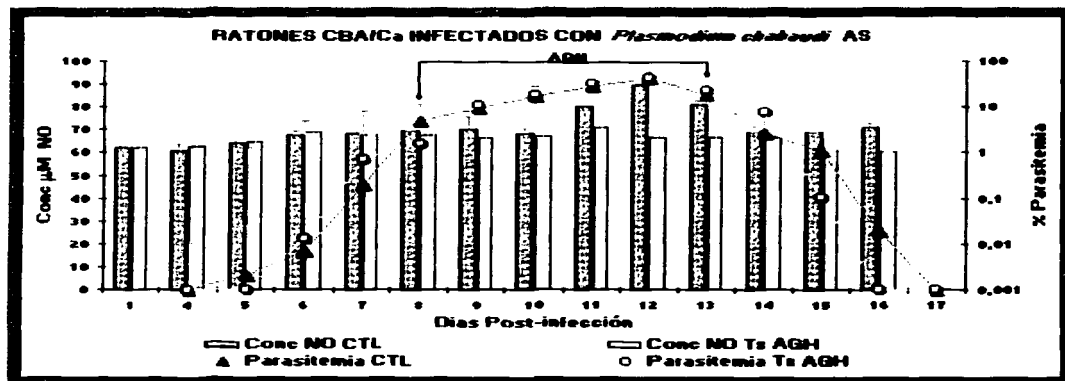
### Concentraciones de óxido nítrico durante las parasitemias en ratones CBA/Ca

Las concentraciones de óxido nítrico de los ratones CBA/Ca tratados con L-arginina y con SNP (gráficas 1 y 2) fueron semejantes a los del grupo control durante los días analizados. La L-arginina y el SNP se administraron del día 6 al 12, durante la infección con el parásito se presentaron incrementos de óxido nítrico en el día 11 de la infección, lo que coincidió con los picos de las parasitemias. El grupo control parasitado también desarrollo un pico en las concentraciones de NO.





GRÁFICA 2. COMPARACIÓN DE PARASITEMIA Y CONCENTRACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN RATONES CBA/Ca SIN TRATAMIENTO CONTRA LA PARASITEMIA Y CONCENTRACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN RATONES CBA/Ca TRATADOS CON NITROPRUSIATO DE SODIO (SNP) 4mg/Kg. Los ratones fueron inoculados i.v. con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi* AS. La administración del medicamento fue del día 6 al 12 post-infección. En los días señalados se realizaron frotis sanguíneos teñidos con Giemsa, cada punto representa la parasitemia promedio de 6 ratones. La concentración de óxido nítrico se determinó en suero empleando la técnica de Griess.



GRÁFICA 3. COMPARACIÓN DE PARASITEMIA Y CONCENTRACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN RATONES CBA/Ca SIN TRATAMIENTO CONTRA LA PARASITEMIA Y CONCENTRACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN RATONES CBA/Ca TRATADOS CON AMINOQUANIDINA HEMISULFATO (AGH) 300mg/Kg. Los ratones fueron inoculados i.v. con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi* AS. La administración del medicamento fue del día 8 al 13 post-infección. En los días señalados se realizaron frotis sanguíneos teñidos con Giemsa, cada punto representa la parasitemia promedio de 6 ratones. La concentración de óxido nítrico se determinó en suero empleando la técnica de Griess.

---

### **Parasitemias de los ratones NIH**

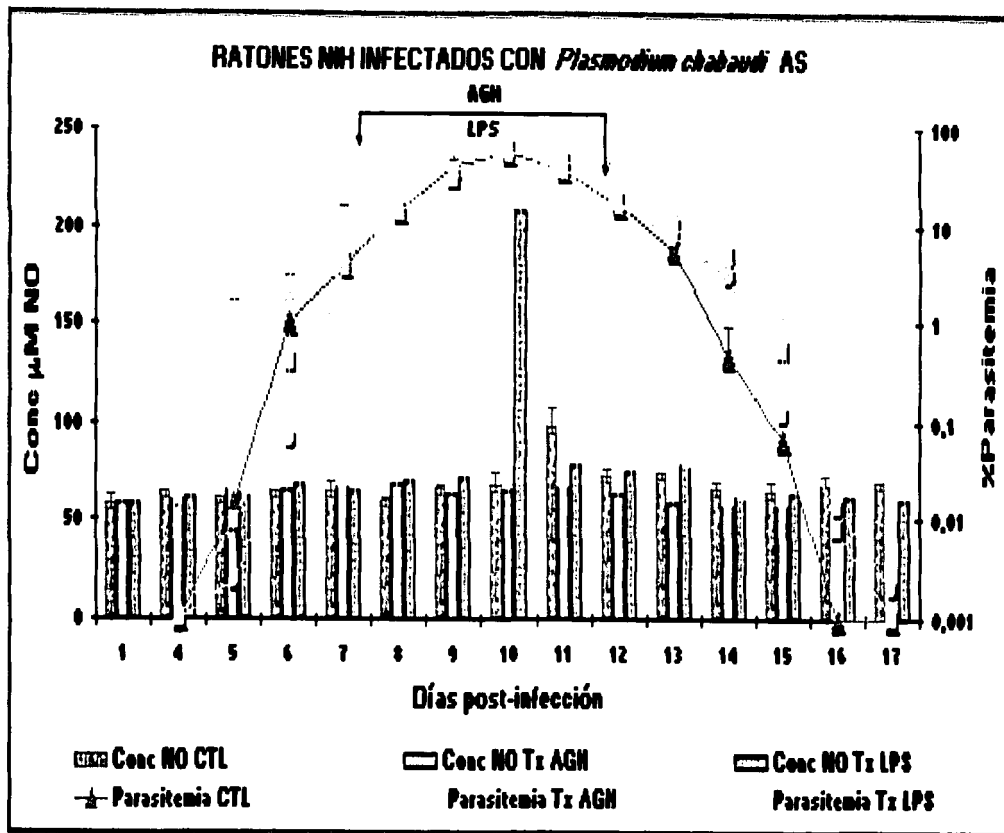
Los ratones NIH se infectaron con *Plasmodium chabaudi*, desarrollaron el pico de la parasitemia el día 10 de la infección, El mismo comportamiento en las parasitemias se presentó tanto en los ratones controles parasitados como en los ratones infectados y tratados con el inhibidor (Aminoguanidina) o con el inductor (Lipopolisacárido) de la síntesis de óxido nítrico. Los niveles de las parasitemias no se modificaron en ninguno de los grupos en relación al grupo control. El tratamiento con AGH y LPS fue a partir del día 8 al 13 post-infección (gráfica 4).

### **Concentraciones de óxido nítrico durante las parasitemias en ratones NIH**

Las concentraciones séricas de óxido nítrico en los ratones NIH infectados con *Plasmodium chabaudi* y tratados o no con LPS fueron muy similares a excepción de los días 10 y 11. Los ratones tratados con LPS mostraron un incremento importante en los niveles de NO el día 10 (207 $\mu$ M) mientras que los ratones del grupo control desarrollaron el pico más alto el día 11 con una concentración de 97.4 $\mu$ M (gráfica 4).

Los ratones NIH tratados con Aminoguanidina hemisulfato, desarrollaron valores de NO semejantes al grupo control no tratado, excepto en los días 11, 12 y 13 de la infección, en que el grupo tratado con el inhibidor de la iNOS mostró una disminución de los niveles de óxido nítrico. La AGH se administró del día 8 al 13 post-infección, y los ratones no desarrollaron un incremento en la concentración de NO. El pico en los niveles de óxido nítrico del grupo control parasitado no coincidió con el pico de la parasitemia (gráfica 4).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



GRÁFICA 4. COMPARACIÓN DE PARASITEMIA Y CONCENTRACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN RATONES NIH SIN TRATAMIENTO CONTRA LAS PARASITEMIAS Y CONCENTRACIONES DE ÓXIDO NÍTRICO EN RATONES NIH Tx. CON LIPOPOLISACÁRIDO (LPS) 1mg/Kg. y AMINOGUANIDINA HEMISULFATO (AGH) 300mg/Kg. Los ratones fueron inoculados i.v. con  $6 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi* AS. La administración de los medicamentos fue del día 8 al 13 post-infección. En los días señalados se realizaron frotis sanguíneos teñidos con Giemsa, cada punto representa la parasitemia promedio de 6 ratones. La concentración de óxido nítrico se determinó en suero empleando la técnica de Griess.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

---

## **Parasitemias de los ratones CBA/Ca**

En el último experimento se utilizaron ratones CBA/Ca, infectados con *Plasmodium chabaudi*.

Los ratones que recibieron el tratamiento con Aminoguanidina hemisulfato (AGH), no mostraron modificación en la parasitemia, durante o después de los días en que se les administró el tratamiento (día 8-11) (gráfica 5).

Los ratones que recibieron el tratamiento con Lipopolisacárido (LPS), no mostraron cambios en la parasitemia, durante o después de los días en que se administró el tratamiento (días 8 al 11 post-infección), en relación a los ratones controles parasitados (gráfica 5).

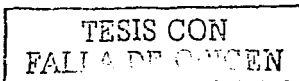
## **Concentraciones de óxido nítrico durante las parasitemias en ratones CBA/Ca**

a) Ratones tratados con el inhibidor de iNOS AGH.- Los niveles de NO en los ratones CBA/Ca tratados con AGH (días 8-11 post-infección) prácticamente no se modificaron durante el curso de la infección. En contraste el grupo control no tratado mostró un incremento en la concentración de NO en el día 12 el cual no coincidió con el pico de la parasitemia (gráfica 5).

b) Ratones CBA/Ca tratados con LPS.- Los niveles de NO en el grupo tratado con LPS se incrementaron los días 11 y 12 (160 $\mu$ M y 350 $\mu$ M), mientras que en el grupo control el nivel más alto se obtuvo el día 12 con 119 $\mu$ M (gráfica 5).

## **Expresión de citocinas**

Para analizar la expresión de las citocinas se obtuvo RNAm del bazo de los ratones, el cual se retrotranscribió para obtener el DNAc, a partir del cual se realizaron las amplificaciones de cada uno de los genes que codifican para las citocinas estudiadas. Se analizaron los RNAm obtenidos de: a) ratones sanos, b) ratones parasitados con *P. chabaudi*, c) ratones parasitados tratados con AGH y d) ratones parasitados con *P. chabaudi* tratados con LPS, en los días 4 y 11 post-infección.





---

El análisis de los productos de PCR se realizó por electroforesis en acrilamida y con el equipo analizador de geles Gel Doc se determinaron las absorbancias de cada una de las bandas obtenidas. En las **figuras 9 y 10** se muestran los geles correspondientes a la amplificación de las diferentes citocinas.

**IFN- $\gamma$** . La expresión de IFN- $\gamma$  es muy similar en los grupos de ratones parasitados no importando si fueron o no tratados con inductores o inhibidores de la iNOS: Sin embargo, en todos los grupos se observó un incremento en los niveles de expresión el día 11 post-infección (**Figura 9, 10 y gráfica 6**).

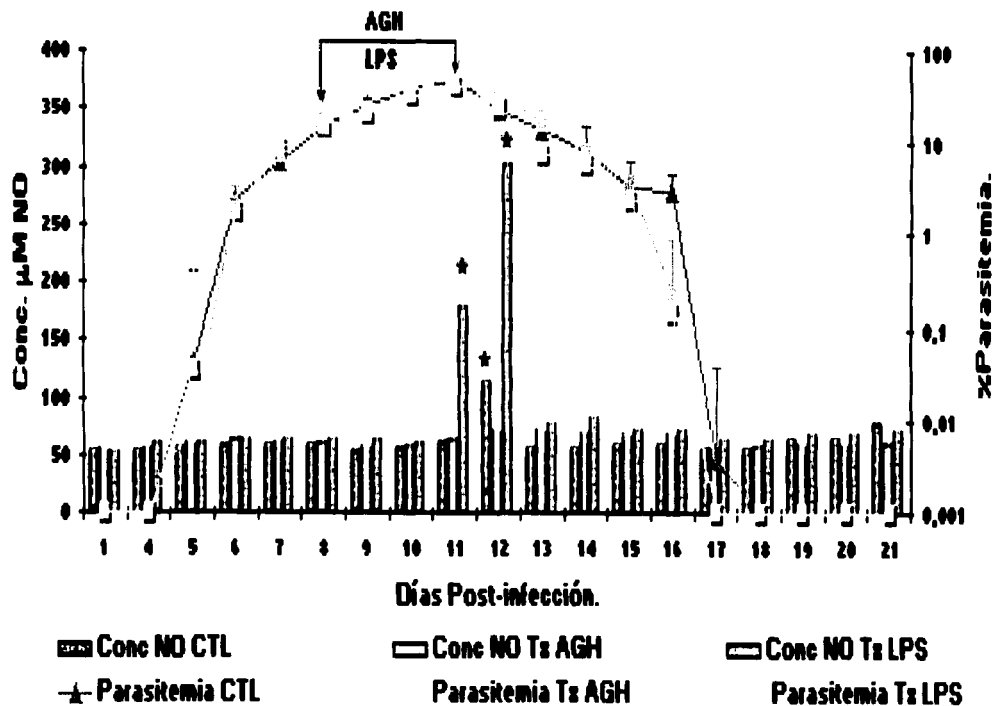
**TNF- $\alpha$** . La expresión de TNF- $\alpha$  en todos los grupos de ratones con y sin tratamiento fue similar en el día 4. Sin embargo en el día 11 los niveles de expresión de TNF- $\alpha$  en todos los grupos de ratones parasitados disminuyeron (**Figuras 9, 10 y gráfica 6**).

**IL-4**. La expresión de IL-4 en todos los grupos de ratones parasitados fue similar. En el día 11 se observó un ligero incremento en los niveles de expresión en todos los grupos (**Figuras 9, 10 y gráfica 6**).

**IL-10**. Los niveles de expresión de IL-10 se incrementaron con la infección. Entre los grupos no se observaron diferencias importantes por tratamiento. A medida que avanzó la parasitemia (día 11) los niveles aumentaron, no obstante no se detectaron diferencias significativas entre los grupos de ratones infectados. (**Figuras 9, 10 y gráfica 6**).

**iNOS**. La expresión del gen, en los ratones no infectados como en los infectados sin tratamiento y los infectados con tratamiento (Aminoguanidina y Lipopolisacárido), son similares tanto en los días 4 como en el día 11 de la infección (**Figuras 9, 10 y gráfica 7**).

## RATONES CBA/Ca INFECTADOS CON *Plasmodium chabaudi* AS



GRÁFICA 5. COMPARACIÓN DE PARASITEMIA Y CONCENTRACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN RATONES CBA/Ca SIN TRATAMIENTO CONTRA LAS PARASITEMIAS Y CONCENTRACIONES DE ÓXIDO NÍTRICO EN RATONES CBA/Ca Tratados CON. LIPOPOLISACÁRIDO (LPS) 1mg/Kg. Y AMINOGUANIDINA HEMISULFATO (AGH) 300mg/Kg. Los ratones fueron inoculados i.v. con  $5 \times 10^4$  EP de *P. chabaudi* AS. La administración del inductor e inhibidor fue del día 8 al 11 post-infección. En los días señalados se realizaron frotis sanguíneos teñidos con Giemsa, cada punto representa la parasitemia promedio de 6 ratones. La concentración de óxido nítrico se determinó en suero empleando la técnica de Griess. ( \* ) Datos estadísticamente significativos  $P < 0.05$  (Análisis estadístico t student).

**DIA 4.**

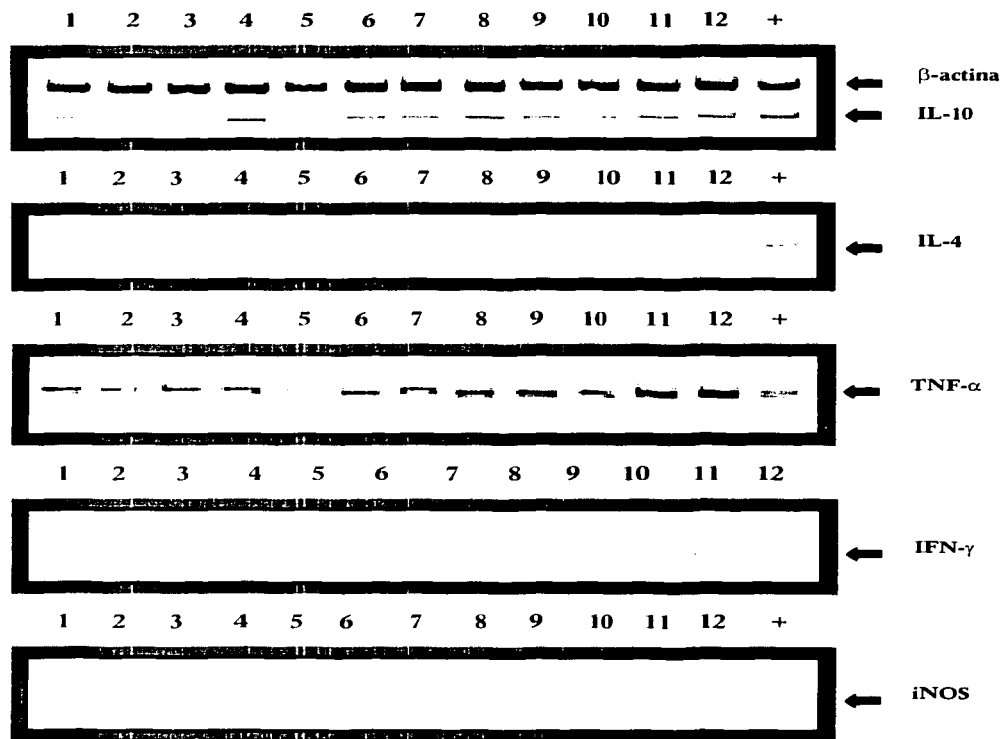


FIGURA 9. EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LAS CITOCINAS EN EL DIA 4 POST-INFECCIÓN EN RATONES CBA/Ca INFECTADOS CON *Plasmodium chabaudi* AS. Se realizó la extracción de RNA del bazo, la expresión de las citocinas se determinó por RT-PCR, utilizando geles de acrilamida al 5%. Carriles 1-3 corresponden a ratones sanos, carriles 4-6 corresponden a ratones infectados, carriles 7-9 corresponden a ratones infectados y tratados con un inhibidor de la iNOS (aminoguanidina hemisulfato), carriles 10-12 corresponden a ratones infectados y tratados con un inductor de la iNOS (Lipopolisacárido).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**DIA 11.**

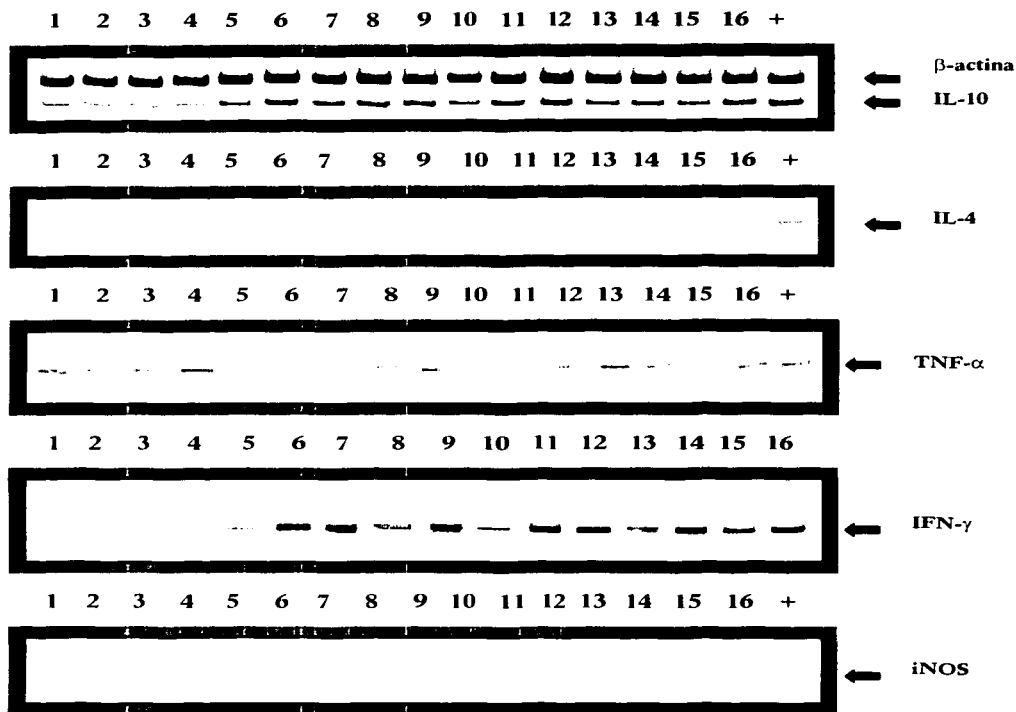
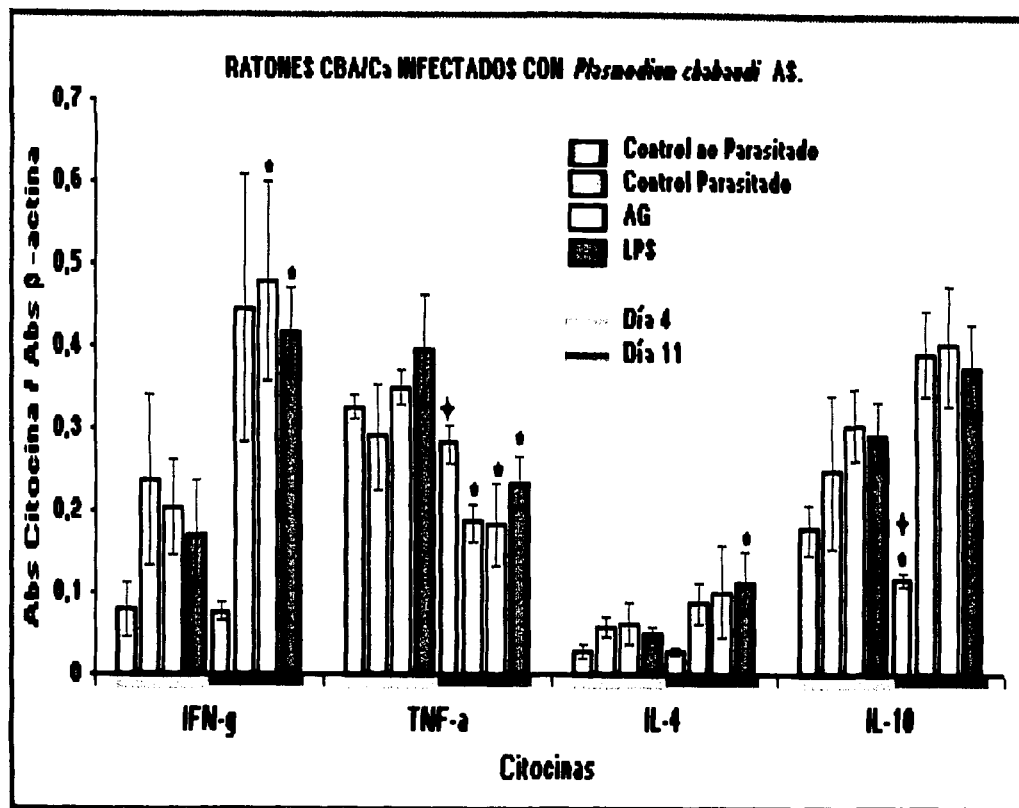


FIGURA 10. EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LAS CITOCINAS EN EL DIA 11 POST-INFECCIÓN EN RATONES CBA/Ca INFECTADOS CON *Plasmodium chabaudi* AS. Se realizó la extracción de RNA del bazo, la expresión de las citocinas se determinó por RT-PCR, utilizando geles de acrilamida al 5%. Carriles 1-4 corresponde a ratones sanos, carriles 5-8 corresponde a ratones infectados, carriles 9-12 corresponde a ratones infectados y tratados con un inhibidor de la iNOS (aminoguanidina hemisulfato), carril 13-16 corresponde a ratones infectados y tratados con un inductor de la iNOS (Lipopolisacárido).

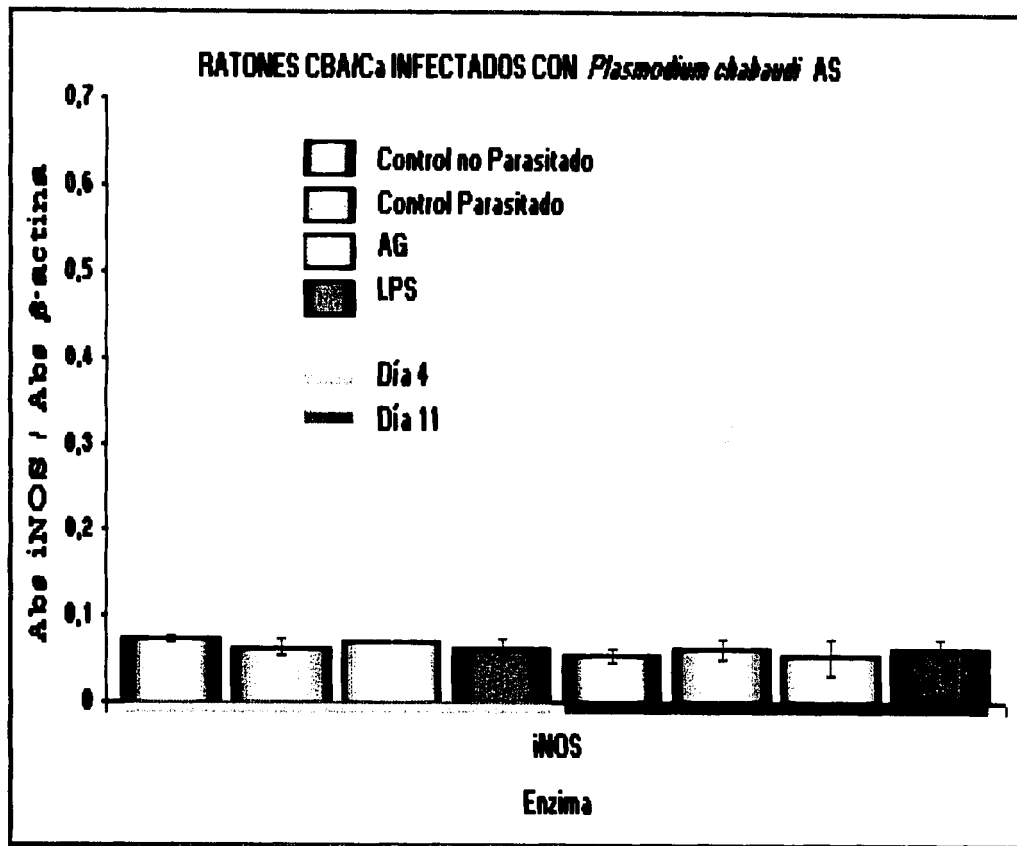
**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

CITOCINAS



GRÁFICA 6. EXPRESIÓN DE IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 E IL-10 DURANTE LA PRIMERA INFECCIÓN. Ratones CBA/Ca se inocularon i.v con  $5 \times 10^4$  EP de *Plasmodium chabaudi* AS. En los días 4 y 11 se obtuvo el bazo para la extracción de RNA y se determinó la expresión de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 E IL-10 por RT-PCR. Cada punto del día 4 representa la expresión promedio de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 E IL-10 en 3 ratones y cada punto del día 11 representa la expresión promedio de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 E IL-10 en 4 ratones. (★) Datos estadísticamente significativos  $p < 0.05$  (Análisis estadístico t student).

iNOS



GRÁFICA 7. EXPRESIÓN DE iNOS DURANTE LA PRIMERA INFECCIÓN. Ratones CBA/CA fueron inoculados i.v con  $5 \times 10^4$  EP de *Plasmodium chabaudi* AS. En los días 4 y 11 se obtuvo el bazo para la extracción de RNA y se determinó la expresión de iNOS por RT-PCR. Cada punto del día 4 representa la expresión promedio de iNOS en 3 ratones y cada punto del día 11 representa la expresión promedio de iNOS en 4 ratones.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para poder evaluar la participación del óxido nítrico en la respuesta inmune en malaria, se decidió inducir experimentalmente un incremento o una eliminación del NO *in vivo* para lo cual se ensayaron diversos inductores e inductores de la iNOS.

La cinética de las parasitemias de los ratones CBA/Ca que recibieron tratamiento con L-arginina y la de los ratones controles parasitados fueron semejantes (gráfica 1). Se ha descrito que la L-arginina es un inductor de la enzima iNOS y que por lo tanto su administración conduce a un incremento en la concentración de óxido nítrico (Palmer, et. al., 1988, Ashton, et. al., 1988), sin embargo, en nuestro modelo experimental, la dosis de L-arginina que se administró no incremento el nivel de NO. Una probable explicación a lo anterior es que el metabolismo del ratón en lugar de canalizar el aminoácido a la vía de la producción de NO, lo está eliminando por la vía de la urea, que es la vía de excreción de compuestos nitrogenados (Lehninger, 1993). Dado que con el anterior tratamiento no se logró incrementar el nivel de óxido nítrico, se tomó la decisión de cambiar el inductor de la iNOS, se decidió estudiar el nitroprusiato de sodio (SNP), los resultados mostraron que la cinética de las parasitemias en los ratones CBA/Ca tratados con nitroprusiato de sodio y la de los ratones controles parasitados son semejantes antes, durante y después del tratamiento por lo cual, se infirió que el SNP no modificó el curso de la parasitemia (gráfica 2). Las concentraciones de óxido nítrico son similares en los dos grupos de ratones durante el curso de la infección, este hallazgo podría deberse a que el SNP que es un donador de NO debe sufrir un proceso de reducción en las membranas celulares, como las del músculo liso, para poder liberar el NO (Arnold, et. al., 1977), por lo anterior las concentraciones de óxido nítrico liberadas podrían diluirse y no ser suficientes para aumentar el efecto citotóxico del NO en la eliminación del parásito. Es importante indicar que el SNP genera tiocianato y cianuro (Giha, 1974), lo que conduce a intoxicación y daño renal (Young, 2000). En nuestro modelo experimental los ratones tratados con SNP murieron el día 13 post-infección probablemente como consecuencia de la intoxicación con cianuro y tiocianato. Dado que en nuestro modelo experimental los inductores de NO probados no tuvieron efecto en incrementar la concentración de NO se decidió a) probar un diferente inhibidor de la iNOS y b) montar un modelo idéntico al descrito en la literatura. Por lo tanto, en el

siguiente experimento se utilizó Aminoguanidina (AG) un reconocido inhibidor de la iNOS (Wolf, 1995, Corbett, 1996 y Babu, 1998). La administración de AG no modificó la cinética de la infección con plasmodio. Este resultado no coincidió con lo observado por Taylor-Robinson et. al., 1999, quienes describieron que el tratamiento con AG días 8-13 post-infección en ratones NIH infectados con *Plasmodium chabaudi* indujo una elevación y extensión de la infección aguda, asociado con la disminución de los niveles de óxido nítrico. Ese resultado se basa en que la AG modifica la parasitemia sólo si se administra durante los días 8-13 post-infección. Sin embargo, encontraron que el pico de la concentración del óxido nítrico de los ratones controles parasitados coincidió con el punto máximo de la parasitemia, lo cual coincide con nuestros resultados (**gráfica 3**). Las concentraciones séricas de óxido nítrico en nuestro modelo experimental mostraron una tendencia similar a las determinadas por Taylor-Robinson et. al., 1999. No obstante las concentraciones que obtuvimos son notoriamente menores, las diferencias en los resultados descritos por Taylor-Robinson (1999) y las nuestras podrían explicarse por diferencias en las técnicas empleadas y a la diferente cepa de ratones. Por lo anterior se tomó la decisión de utilizar un modelo igual al descrito por Taylor-Robinson con Aminoguanidina, y Lipopolisacárido (LPS). Se utilizaron ratones NIH para: a) poder determinar si la cepa de ratones CBA/Ca fue la causa de que las parasitemias no se modificaran con el tratamiento de AG, así como b) determinar cuales son los niveles de óxido nítrico que detecta la técnica de Griess en los ratones NIH.

En los ratones NIH, el tratamiento con LPS no modificó la cinética de la parasitemia (**gráfica 4**). Sin embargo, en el grupo tratado se manifestó un marcado incremento en los niveles de óxido nítrico el día 10 post-infección que coincidió con el pico de la parasitemia, lo anterior sugiere que el óxido nítrico no participa directamente en la eliminación del *Plasmodium*. Este resultado no concuerda con lo descrito por Taylor-Robinson (1998), quien le atribuye al óxido nítrico la capacidad de eliminar al *Plasmodium* (Taylor-Robinson, 1993, 1994, 1995, 1996).

En el grupo de ratones NIH el tratamiento con el inhibidor de la iNOS (aminoguanidina) no modificó la cinética de la parasitemia. La aminoguanidina mantuvo la concentración de óxido nítrico baja durante toda la infección (**gráfica 4**). Este resultado correlacionó con el experimento anterior y sugiere que el óxido nítrico



---

no participa directamente en la eliminación del parásito. Este hallazgo no está de acuerdo con lo descrito por Taylor-Robinson (1999) y las diferencias no pueden atribuirse a la técnica utilizada para la determinación de NO. Sin embargo, en la literatura, existen publicaciones que sugieren que el óxido nítrico no participa directamente en la eliminación del parásito de malaria (Favre, 1999, Van der Heyde, 2000, Philippe, 1995)

En el modelo de ratones NIH se observó que el LPS produce un incremento en las concentraciones de NO. Además que la AG mantiene bajos los niveles de óxido nítrico dado que es un inhibidor selectivo de la iNOS, decidimos entonces utilizar ambos: un inhibidor e inductor en el modelo de ratones CBA/Ca para investigar el papel del NO en la infección con *P. chabaudi* AS en nuestro modelo experimental.

En los ratones CBA/Ca los tratamientos con AG y LPS no modificaron el curso de la parasitemia (**gráficas 5**). La AG permitió que la concentración de óxido nítrico se mantuviese baja durante toda la infección, mientras que el LPS incrementó significativamente el pico del NO ( $\star p < 0.05$ ) el día 12 post-infección. A un cuando se logró manipular la concentración de NO en los ratones infectados no se manifestaron cambios relevantes en las parasitemias. Partiendo de la premisa en la que algunos autores (James, 1991, Hirunpetcharat, et. al., 1999, Taylor-Robinson, 1999) confieren al NO una actividad más que citotóxica, reguladora de la respuesta inmune decidimos analizar si la concentración de óxido nítrico podría modificar los niveles de expresión de los genes que codifican para las citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , involucrados en una respuesta tipo TH1 y la de los genes IL-4 e IL-10 asociados con la respuesta tipo TH2 (**Figuras 9 y 10**), además analizamos la expresión del gene iNOS. Para el diseño de estos experimentos se eligieron dos puntos importantes el inicio y el pico de las parasitemias, este último, coincidió anteriormente con el pico del NO.

Los tratamientos con AG y con LPS si modificaron la expresión de IFN- $\gamma$  en el día 11 (**gráfica 6**), la diferencia en relación al grupo control fue estadísticamente significativo ( $\star P < 0.05$ ). Este resultado demuestra que los niveles de óxido nítrico si regulan la expresión de IFN- $\gamma$ . Para detallar la cinética el análisis de la expresión de citocinas podría ampliarse a un mayor número de días.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

---

Los niveles de expresión de **TNF- $\alpha$**  si se modificaron con los tratamientos de AG ó LPS, en el día 11 de la infección disminuyeron a medida que la infección avanzó (★  $P < 0.05$ ) (gráfica 6). Si se considera que **TNF- $\alpha$**  es una citocina característica de un tipo de respuesta TH1, el resultado anterior sugiere una modificación de la respuesta inmune que en un principio de la infección es primordialmente tipo TH1 y que posteriormente se transforma a un tipo TH2, lo anterior es consistente con lo descrito por algunos autores (Allen, 1997)

El tratamiento con AG mantuvo las concentraciones de óxido nítrico en los niveles basales sin modificar la expresión de **IL-4**, Por el contrario, el tratamiento con LPS incremento los niveles de **IL-4** el día 11 post-infección, la diferencia fue (★  $P < 0.05$ ) estadísticamente significativa con respecto al día 4 (gráfica 6). Este resultado sugiere que es posible que el óxido nítrico este involucrado en la expresión de **IL-4** lo que favorecería una respuesta tipo TH2 (von der Weid, 1993, Allen, 1997), esto correlaciona con los resultados descritos anteriormente.

**IL-10**. Es una citocina reguladora que suprime las citocinas tipo TH1, además inhibe la actividad microbicida de los macrófagos activados con **IFN- $\gamma$**  (Oswald et. al., 1992). Los tratamientos con LPS y AG no modificaron los niveles de expresión de **IL-10**. Ese resultado podría indicar que el óxido nítrico no regula la expresión de **IL-10**, o bien que como la determinación de **IL-10** no se realizo en el pico del **NO**, los resultados no muestran ningún efecto. Sin embargo, la infección con *Plasmodium* indujo un incremento en la producción de **IL-10**. Los niveles fueron mayores el día 11 que el día 4 (gráfica 6), lo que podría indicar que se está favoreciendo la balanza de la respuesta inmune hacia una tipo TH2. Este hallazgo concuerda con la disminución de la expresión de **TNF- $\alpha$** , probablemente el incremento que se observó en **IFN- $\gamma$**  sea el resultado de tratar de compensar la inactivación de macrófagos por la **IL-10**.

**iNOS**. La enzima óxido nítrico sintetasa es la encargada de sintetizar **NO**, cuya principal fuente son los macrófagos activados con **IFN- $\gamma$** , **TNF- $\alpha$**  o bien algunos productos bacterianos como LPS.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

---

En el presente trabajo los tratamientos con LPS o AG no modificaron los niveles de expresión de la enzima (gráfica 7). Sin embargo, si se modificaron las concentraciones de óxido nítrico. Tanto en el grupo tratado con LPS como en el control infectado, el pico máximo de óxido nítrico se obtuvo el día 12. Dado que los niveles de expresión de la enzima se analizaron el día 11 es probable que esa sea la razón de la inconsistencia en los resultados. Otro resultado interesante es que el LPS únicamente incrementa el nivel máximo de la concentración de NO cercano al pico en las parasitemias, y no inmediatamente después de la administración, lo anterior indica que los niveles de NO están muy regulados.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

---

## CONCLUSIONES

↓ Los resultados obtenidos indican que en nuestro modelo experimental el óxido nítrico no está involucrado en la eliminación directa del *Plasmodium*.

↓ Los niveles de óxido nítrico modulan la expresión de  $INF-\gamma$ ,  $TNF-\alpha$  e IL-4 en el día 11 de la infección, favoreciendo una respuesta inmune TH2.

↓ En nuestro modelo experimental el NO funciona como molécula inmunorreguladora de la respuesta inmune en el día 11 post-infección y no antes.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# ANEXOS

## SOLUCIONES

### I. NADPH 1.25mg/mL:

1.25mg de NADPH se colocaron en un tubo eppendorf y se le adicionó 1mL de PBS 1X, conservar a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### II. NITRATO REDUCTASA (*Aspergillus*) 5U/mL:

La concentración stock es de 20U, se hidrata con 2mL de PBS 1X, se hacen alícuotas de 0.25 mL, se congelan a  $-70^{\circ}\text{C}$ , Cuando se utilice la enzima se lleva a 1 mL, conservar a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### III. SULFANILAMIDA AL 1% EN ACIDO FOSFÓRICO AL 5%:

Se preparan 40 mL para la cual se colocan 0.4 g de sulfanilamida en 37.6 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  más 2.4 mL de ácido fosfórico, conservar a  $-4^{\circ}\text{C}$  en frasco ámbar

### IV. NAFLETELENDIAMINA (NED) AL 0.1% EN $\text{H}_2\text{O}$ ESTERIL:

Se preparan 40 mL, para la cual se colocan 0.04 g de NED en 40 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ , conservar a  $-4^{\circ}\text{C}$  en frasco ámbar.

### V. ÁCIDO TRICLOROACÉTICO AL 10%:

Se preparan 100 mL para la cual se colocan 10 g de ácido tricloroacético en 100 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ , conservar a  $-4^{\circ}\text{C}$  en frasco ámbar

### VI. NITRATO DE SODIO ( $\text{NaNO}_2$ ) AL 0.7 mM:

Se preparan 40 mL para la cual se colocan 0.001932 g de  $\text{NaNO}_2$

### VII. ACETATO DE SODIO 3M, pH = 6 :

ACETATO DE SODIO

24.61 g

AGUA DEPC

cbp 100 mL

NOTA: Ajustar el pH con ácido acético.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### VIII. ACRIL-BISACRILAMIDA AL 30%

ACRILAMIDA	29.0 g
BISACRILAMIDA	1.0 g
AGUA BIDESTILADA	cbp 100 mL

NOTA: La acrilamida es neurotóxica, usar guantes y cubrebocas para su manipulación.

### IX. AMORTIGUADOR DE CARGA 5X:

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN
TRIS, pH= 8	50 mM
EDTA, pH= 8	75 mM
SDS	0.5% p/v
SACAROSA	30.0% p/v
FICOLL	10.0% p/v
AZUL DE BROMOFENOL	0.12% p/v
XILENCIANOL	0.12% p/v

NOTA: Guardar a temperatura ambiente.

TESIS CON  
PALLA DE ORIGEN

### X. GEL DE ACRILAMIDA AL 5%:

REACTIVOS	100 mL (2 GELES)
AGUA BIDESTILADA	72.2 mL
TBE 10X	10.0 mL
ACRILAMIDA / BISACRILAMIDA 30%	16.8 mL
APS 10%	950 $\mu$ L
TEMED	40 $\mu$ L

**XI. AMORTIGUADOR DE PCR 10X CON Mg<sup>+2</sup>:**

STOCK	REACTIVO	[FINAL] EN EL TUBO DE Rx= PCR 1X	10mL PCR 10X	[ 10X ]
1M	MgCl <sub>2</sub>	2 mM	0.2 mL	20 mM
2.5M	KCl	50 mM	2.0 mL	500 mM
2.0M	TRIS, pH = 8.3	10 mM	0.5 mL	1000mM
20 mg/mL	GELATINA	0.1 mg/mL	0.5 mL	1 mg/mL
	AGUA MILLIPORE		6.8 mL	

**NOTA:** Distribuir el amortiguador de PCR 10X en tubos eppendorf de 500  $\mu$ L.

**XII. SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS):**

REACTIVOS	CANTIDAD
NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24 g
AGUA MILLIPORE	cbp 1000 mL

**NOTA:** Es para extracción de RNA, libre de calcio y magnesio, alícuotar en frascos de 250 mL y esterilizar.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

**XIII. PERSULFATO DE AMONIO (APS) AL 10%:**

PERSULFATO DE AMONIO	10.0 g
Agua bidestilada	cbp 100 mL

**NOTA:** Preparar alícuotas de 500  $\mu$ L y guardar en el congelador.

**XIV. AMORTIGUADOR TRIS-ÁCIDO BÓRICO-EDTA (TBE) 10X:**

REACTIVO	CANTIDAD
TRIS 1M	121.10 g
ACIDO BÓRICO 1M	61.83 g
EDTA 50 mM	14.61 g
AGUA BIDEDESTILADA	cbp 1000 mL

NOTA: Calentar la solución para disolver más rápido los reactivos.

TRIS CON  
BOLA DE ORIGEN



## BIBLIOGRAFÍA

- 1) Abu-Sound, HM, & Stuehr, DJ, Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer. Proc Natl Acad Sci USA 90, 10769-10772.
- 2) Allen LR, Tumor necrosis factor and associated cytokines in the host's response to malaria, Inter J Parasitol, 1997; 27:1251-1263.
- 3) Arnold W.P., Mittal C.K, Katsuki S. Murad F., Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74:3203-3207.
- 4) Ashton DS, Palmer RMJ, & Moncada S, Vascular endothelial cell synthesize nitric oxide from L-arginine, Nature 1988; 333:664-666.
- 5) Assreuy J, Cunha FQ, Liew FY et al. Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. Br. J. Pharmacol. 1993;108:833).
- 6) Babu BR, and Griffith OW, Design of isoform-selective inhibitors of nitric oxide synthase, Chem. Biol, 1998; 2:491-500.
- 7) Baek KJ, Thiel BA, Lucas S, & Stuehr DJ, Macrophage nitric oxide synthase subunits, J Biol Chem. 268, 21120-21129.
- 8) Bate C.A.W., Taverne J. & Play fair J.H.L., Malaria parasites induce TNF production by macrophages, Immunol 1988; 64:227-231.
- 9) Bates, J.N., Baker M.T. Guerra R. Jr. Harrison D.G., Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reductions of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. Biochem Pharmacol 1991;42:157-165.
- 10) Brake D. A., Long C.A. & Wedanz W. P. Adoptive Protection against *Plasmodium chabaudi adami* malaria in athymic nude mice by a cloned T cells line. J Immunol, 1988;140: 1989-1993.
- 11) Bredt DS, Synder SH. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. Neuron 1992; 8:3-11.
- 12) Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide a physiologic messenger molecule. Ann Rev Biochem 1994; 63:175-195.

- 13) Brooks G.F., Jawetz, Melnick and Aldeberg's, Medical Microbiology, 19E. Norwak, Connecticut, Appleton & Lange, 1991:558.
- 14) Bruce-Chwatt LJ: The challenge of malaria vaccine: trials and tribulations, Lancet 1987;5:568-580
- 15) Bryk R, Wolff DJ, Pharmacological modulation of nitric oxide synthesis by mechanism-based inactivators and related inhibitors, Pharmacology & Therapeutics 1999;84:157-178.
- 16) Castro L, Rodríguez M, Radi R. Aconitase is readily inactivated by peroxyxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide. J. Biol. Chem. 1994; 269:294.
- 17) Clark IA and Rockett KA. Nitric oxide and parasitic disease. Adv Parasitol 1996; 37: 1-58.
- 18) Corbett JA, Tilton RG, Chang K, Aminoguanidine, a novel inhibitor of nitric oxide formation, prevents diabetes vascular dysfunction. Diabetes 1992; 41:552-558.
- 19) Corbett JA, and McDaniel ML, Selective inhibition nitric oxide synthase by aminoguanidine, Methods in Enzymology, 1996; 268:398-408.
- 20) Durante W, Kroll MH, Vanhoutte PM, Endothelium-derived relaxing factor inhibits thrombin-induced platelet aggregation by inhibiting platelet phospholipase. C. Blood 1992; 79:110-116.
- 21) Eizirik D.L., Bjorklund A., Welsh N., Interleukin-1-induced expression of nitric oxide synthase in insulin-producing cell preceded by c-fos induction and depends on gene transcription and protein synthesis, FEBS Lett 1993;317:62-66.
- 22) Elliott, T.G., Cockcroft, J.R., Groop P-H, Viberti G.C., Ritter, J.M., Inhibition of nitric oxide synthesis in forearm vasculature of insulin dependent diabetic patients. Clin Sci; 1993, 85: 687-693.
- 23) Favre N, Ryffel B, and Rudin W, The development of murine cerebral malaria does not require nitric oxide production, Parasitology, 1999;118:135-138
- 24) Favre N, Ryffel B, and Rudin W, Parasite killing in murine malaria does not require nitric oxide production, Parasitology, 1999; 118:139-143.

- 
- 25) Feelisch M, Noack E.A. Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. *Eur J. Pharmacol* 1987; 139: 19-30.
  - 26) Fell AH & Smith NC. Immunity to asexual blood stages of *Plasmodium*: is resistance to acute malaria adaptive or innate? *Parasitol Today* 1998;14:364-368.
  - 27) Fossati L., Merino J, Izuis. CD4+ Tcell play a major role for IgM and IgG anti-DNA production in mice infected with plasmodium yoelii. *Clin Exp Immunol*, 1990; 79:291-296.
  - 28) Giha NH, Cohn JN, Kulic ME, Treatment of refractory heart failure with infusion of nitroprusside, *N Engl J Med*, 1974;291:587-592.
  - 29) Gilliam, B.M., Michael P. Sherman, Jeanette M. Griscavage, and Louis J. Ignarro, A Spectrophotometric Assay for Nitrate Using NADPH Oxidation by *Aspergillus* Nitrate Reductase. *Analytical Biochemistry*; 1993; 212: 359-365.
  - 30) Good MF, A malaria vaccine strategy based on the induction of cellular immunity, *Immunol Today*, 1992; 13:126-129.
  - 31) Graham Ellis, Adatia Ian, Mehrdad Yazdanpanah, and Sinikka K. Makela. Nitrite and Nitrate Analyses: A Clinical. *Biochemistry Perspective. Clinical Biochemistry* 1998; 31; 4:195-220.
  - 32) Grant SK, Green, BG, Stiffey-Wilusz, J., Durette, P.L., Shah, S.K., Kozarich, J.W., Structural requirements for human inducible nitric oxide synthase substrates and substrate analogue inhibitors. *Biochemistry* 1998;37;4174-4180.
  - 33) Greenwood BM. The epidemiology of malaria. *Ann Trop Med* 1997; 91:763-769.
  - 34) Gross BB, Jaffe EA, Levi R, Kilbourn RG, Cytokine activated endothelial cell express an isotype of nitric oxide synthase which is tetrahydrobiopterin-dependent, calmodulin-independent and inhibited by arginine analogs with a rank-order of potency characteristic of activated macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 170:823-829.
  - 35) Grima G, Benz B, Do KQ. Glial-derived arginine, the nitric oxide precursor, protects neurons from NMDA-induced excitotoxicity. *Eur. J Neurosci* 2001;14(11):1762-70.

- 
- 36) Hevel JM, White KA, Marletta MA. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase: identification as a flavoprotein. *J Biol.Chem.* 1991; 266: 22789-22791.
  - 37) Hirunpetcharat C, Finkelman F, Clark IA, Good MF, Malaria parasite-specific Th1-like T cells simultaneously reduce parasitemia and promote disease, *Parasite immunol*, 1999; 21:319-329.
  - 38) Hoffman SL, *Malaria Vaccine Development*. Washington, DC: ASM Press; 1996.
  - 39) Hommel M., *Immunology of malaria*. WHO, Health Co-Operation Papers, Quaderni Di Cooperation Sanitaria. Geneva: WHO; 1996; 15:53-70.
  - 40) Ignarro LJ, GMB, Wood KS, Endothelium-derived relasing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 9265.
  - 41) Ignarro LJ. Endothelium-derived nitric oxide: action and properties. *FASEB* 1989; 3:31.
  - 42) Ignarro LJ. Nitric oxide: a novel signal transduction mechanismo for transcellular communication. *Hypertension* 199016(5):477-83.
  - 43) James SL, The effector function of nitrogen oxides in host defense against parasites, *Exp Parasitol*. 1991; 73:223-226.
  - 44) Janssens SP, Shimouchi A, Quertermous T. Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *J Biol. Chem.* 1992; 267: 14519-14522.
  - 45) Jones IW, Thomsen LL, Knowles R., Gutterdge WE, Butcher GA, Sinden RE, Nitric oxide synthase activity in malaria infected mice. *Parasite Immunol* 1996; 18: 535-538.
  - 46) . Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide as a signal in blood vessels. *TIBS* 1992; 17: 399-402.
  - 47) Koneman EW, Stephen D. Allen, William M. Janda, Paul C. Schreckenberger, Washington C. Winn, (h)., *Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas Color*, Editorial Medica Panamericana, Quinta Edición, 1999: 12-15, 29-30.
  - 48) Kumaratilake LM, Ferrante A. & Rzepczyk C. 1991. The role of T lymphocytes in immunity to *Plasmodium falciparum*. Enhancement of neutrophil-mediated

- parasite killing by lymphotoxin and IFN- $\gamma$ : Comparisons with tumor necrosis factor effects. *J Immunol.* 1991; 146: 762-767.
- 49) Kurtzhals JAL, Adabayeri V, Quarm GB. Low plasma concentrations of interleukin 10 in severe malarial anaemia compared with cerebral and uncomplicated malaria. *Lancet* 1998; 351: 1768-1772.
- 50) Lamas S, Marsden PA, Li GK,. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 1992; 89: 6348-6352.
- 51) Lambert LE, French JF, Whitten JP, Baron B.M., McDonald I.A., Characterization of cell selectivity of two novel inhibitors of nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol* 1992;
- 52) Langhorne J. The response to the blood stages of *Plasmodium* in animals models. *Immunol Lett* 1994; 41: 99-102.
- 53) Legorreta-Herrera M y Sánchez-Cruz P. La respuesta inmune celular contra el *Plasmodium*: agente etiológico de la malaria. *Vertientes* 1999; 2: 3-8.
- 54) Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM, Principios de bioquímica, Segunda edición, Ediciones Omega, S.A., 1993.
- 55) Liu X, Miller MJS, Joshi M, Sadowska-Krowicka H, Clark DA, and Lancaster JR Jr. Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes. *J Biol. Chem.* 1998; 273:18709-18713.
- 56) Long CA. Immunity to blood stages of malaria. *Curr Opin Immunol* 1993; 5:548-556.
- 57) López-Jaramillo P, González MC, Palmer RMJ, Moncada S. The crucial role of physiological Ca<sup>2+</sup> concentrations in the production of endothelial nitric oxide and the control of vascular tone. *Br J Pharmacol* 1990; 101: 489-93.
- 58) Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide a physiologic messenger. *Ann Intern Med* 1994;120:227-237
- 59) Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem.* 1993; 268: 12231-12234.
- 60) Meding SJ, Cheng SCh, Simon-Haarrhaus B, Langhorne J. Role of gamma interferon during infection with *Plasmodium chabaudi chabaudi*. *Infect Immun* 1990; 58: 3671-3678.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SE  
DEBIA DE ACEPTAR

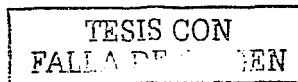
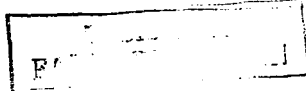
- 61) Middendorf R, Muller D, Wichers A, Holstein F and Davidoff MS. Evidence for production and functional activity of nitric oxide in somniferous tubules and blood vessels of the human testis. *J Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997; 82:4154-61.
- 62) Misko, WM, Moore, TP, Kasten, GA, Nickols, JA, Corbett, RG, Tilton ML, McDaniel, JR, Williamson, and Currie MG, *Eur. J. Pharmacol.* 1993;223:119
- 63) Moncada S, López-Jaramillo P. Actividad Biológica del endotelio vascular. *Investigación y Ciencia* 1991; 176: 60-66.
- 64) Moncada S, Higgs E.A., The L-arginina-nitric oxide pathway, *New Engl J Med* 1993;329:2002-2012.
- 65) Morris, SM, Jr, Arginine synthesis, metabolism, and transport: regulators o nitric oxide synthesis. In: Laskin, J.D., Laskin, D.L. (eds.), *Cellular and Molecular Biology o Nitric Oxide*. Marcel Dekker, New York, 1999, 57-85.
- 66) Mosmann TR, Cytokine secretion patterns and cross regulation of T cell subsets. *Immunology Research* 1991; 10: 183-188.
- 67) Ockenhouse CF, Schulman S. & Shear HL, induction of crisis forms in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* by  $\gamma$ -interferon-activated, monocyte-derived macrophages *Journal of Immunology*, 1984;133:1601-1608.
- 68) Oliveira DM, Silva-Teixeira DN, Carmon SA, Goes AM, Role of nitric oxide on human schistosomiasis mansoni: upregulation of *in vitro* granuloma formation by N omega-nitro-L- arginine methyl ester. *Nitric Oxide Biol Chem.* 1998; 2: 57-65.
- 69) Oswald IP, Wynn TA, Sher A, James SL. Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor  $\alpha$  required as a costimulatory factor for interferon  $\gamma$ -induced activation. *Immunology* 1992; 89: 8676-8680.
- 70) Palmer RMJ, Rees DD, Moncada S. L-arginine is physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium dependent relaxacion. *Biochem Biophys Res Comm.*, 1988; 153: 231-37.
- 71) Palmer RMJ, Moncada S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989; 158: 348-355.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- 
- 72) Panduro Arturo, *Biología Molecular en la Clínica*, Editorial McGraw-Hill Interamericana, 2000, pp. 31-43.
- 73) Philippe J, Danuta R, and Stevenson MM, Nitric oxide expression in the spleen, but not in the liver, correlates with resistance to blood-stage malaria in mice, *J Immunol*, 1995; 155:5306-5313.
- 74) Phillips RS, Brannan LR, Balmer P & Neuville P. Antigenic variation during malaria infection-the contribution from than murine parasite *Plasmodium chabaudi*. *Parasite immunol* 1997; 19: 427-434.
- 75) Phillips RS, Mathers KE & Taylor-Robinson AW. T cells in immunity to *Plasmodium chabaudi chabaudi*: operation and regulation of different pathway of protection. *Res Immunol* 1994;145:406-411
- 76) Pollock JS, Forstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HW, Nakane M. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl acad Sci USA* 1991;
- 77) Pou S, Pou W, Bredt DS Snyder SH, Rosen GM. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol. Chem.* 1992; 267: 24173-24176.
- 78) Rees D, Palmer RMJ, Schuls R, Characterization of three inhibitor of endothelial nitric oxide synthase *in vitro* and *in vivo*. *Br. J. Pharmacol.* 1990; 101; 746-760.
- 79) Rieckmann KH, *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine? *Lancet* 2:1183-1184, 1989.
- 80) Rockett KA, Awburn MM, Cowden WB, Clark IA, Killing of *Plasmodium falciparum* *in vitro* by nitric oxide derivates, *Infect Immun* 1991;59:3280-3283.
- 81) Rockett KA., Cowden WB., Awburn MM., Clark IA, In *Biology of Nitric Oxide: 2 Enzymology, Biochemistry and Immunology*, end Moncada S., Martella M.A., Hibbs Jr J.B., Higgs E.A., London: Portland Press 1992; 135-137.
- 82) Rockett KA, Melissa MA, Rockett EJ, Cowden WB, & Clark IA, Possible role of nitric oxide in malarial immunosuppression, *Parasite Immunol*, 1994;16;243-249.
- 83) Rockett KA, and Clark IA, Nitric oxide and parasitic disease, *Adv Parasitol* 1996; 37:1-58.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- 
- 84) Rodella L, Rezzani R, Agostini C, Bianchi R. Expression of NADPH-diaphorase and colocalization with in the brain neurons of the rat following visceral noxious stimulation. *Brain Res.* 1999; 834: 173-177.
  - 85) Roitt Ivan, Jonathan Brostoff, David Male, *Immunology*, 5<sup>a</sup> editions, Editorial Harcourt, Londres 2000.
  - 86) Rose, W.C., The nutritive significance o the amino acids and certain related compounds, *Science* 1937; 86: 298-300.
  - 87) Schwartz IK: Prevention of malaria, *Infect Dis Clin North Am* 6:313-331, 1992.
  - 88) Schofield L, Villaquiran J, Ferreira A, Schellekens H, Nussenzweig R. & Nussenzweig V. Interferon, CD8+ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites. *Nature* 1987; 330: 664-666.
  - 89) Sedegah M, Finkelman F. & Hoffman S. L. Interleukin 12 induction of interferon  $\gamma$ -dependent protection against malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1994; 91:10700-10702.
  - 90) Stevenson MM & Tam MF. Differential induction of helper T cell subsets during blood-stage *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS infection in resistant and susceptible mice. *Clin Exp Immunol* 1993; 92: 77-83.
  - 91) Stuehr D.J., Griffith O.W., Mammalian nitric oxide synthases. *Adv. Enzymol Relat areas Mol Biol.* 1992;
  - 92) Taverne J., Un raveling the cytokine network in malaria. *Parasitol Today* 1993; 9: 38-39.
  - 93) Taylor-Robinson AW, Phillips RS, Severn A, Moncada S, Liew FY, The role of TH1 and TH2 cell in a rodent malaria infection, *Science* 1993;260:1931-1934.
  - 94) Taylor-Robinson AW, Liew FY, Severn A, Xu D, McSorley SJ, Garside P, Padron J, and Phillips RS, Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type 1 and T helper type 2 cells. *Eur J. Immunol.* 1994; 24:980-984.
  - 95) Taylor-Robinson AW, Regulation of immunity to malaria: valuable lessons learned from murine models. *Parasitol Today* 1995; 11: 335-341.
  - 96) Taylor- Robinson AW, Kinetics of nitric oxide production during infection and reinfection of mice with *Plasmodium chabaudi*, *Parasite Immunol*, 1996; 18:425-430.





- 
- 97) Taylor- Robinson AW, Smith EC, A dichotomous role for nitric oxide in protection against blood stage malaria infection, *Immunol Lett*, 1999: 1-9.
  - 98) Troy-Blomberg M. Human T-cell responses to blood stage antigens in *Plasmodium falciparum* malaria. *Immunol Lett* 1994; 41: 103-107.
  - 99) Vallance P., Leone A., Calver A., Moncada S., Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992; 339:572-583.
  - 100) Van der Heyde HC, Gu Y, Zhang Q, Sun G, and Grisham MB, Nitric oxide is neither necessary nor sufficient for resolution of *Plasmodium chabaudi* malaria in mice, *J Immunol*, 2000; 165:3317-3323.
  - 101) Vaughn MW, Kuo L, Liao JL. Effective diffusion distance of nitric oxide in the microcirculation. *Heart Circ Physiol* 1998; 43: 1705-1714.
  - 102) White E. Overview of apoptosis, *Inglaterra: Amersham life science*, 1996:8-15.
  - 103) von der Weid, and Langhorne Jean, The roles of cytokines produced in the immune response to the erythrocytic stages of mouse malaras, *Immunobiol*;1993;189:397-418.
  - 104) Wolff JD, and Lubeskie A, Aminoguanidine is an isoform-selective, mechanism-based inactivator of nitric oxide synthase, *Archives of Biochem and Biophy* 1995; 316:290-301.
  - 105) Yap GS, Jacobs P & Stevenson MM. TH cell regulation of host resistance to blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS. *Res Immunol* 1994; 145: 419-422.
  - 106) Youmans, PG, Paterson, YP, Sommers MH, *Infectología clínica, Segunda Edición*, Nueva editorial interamericana, 1984, Pág. 799-810.
  - 107) Young TE, Magnum BN, *A manual of drugs used in neonatal care*, 2000.

TESIS CON  
FALLA DE TIPO GEN