



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

“EFECTO DE LA CLOROQUINA SOBRE LA REGULACIÓN  
POR APOPTOSIS DE LA RESPUESTA INMUNE EN  
MALARIA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ADRIANA RAMOS AVILA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA

MARZO DEL 2005



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## DEDICATORIA

- Este trabajo en primer lugar lo dedico a mis padres **Miguel Ramos Rivera** y **Mercedes Avila Hernández** como una muestra de cariño y agradecimiento por una vida de sacrificio y esfuerzo, quiero que sepan que el objetivo logrado también es de ustedes y que la fuerza que me ayudo a conseguirlo fue su apoyo, pero sobre todo que agradezco la comprensión y cariño que me brindaron que me ayudo a sostenerme en cada instante.
- A mis hermanos **Javier, Miguel, Silvia, Maura y Enrique** por contribuir a cumplir una meta más pero fundamental, que sin su ayuda, ánimos y cariño no hubiese podido lograr, muy especialmente a mi hermano **Roberto**, por su apoyo incondicional, por las desveladas compartidas, por enseñarme a confiar en mi y a aceptar las oportunidades de la vida por mas miedo que me de enfrentarlas.
- A **Azael G. Vidal García** por su gran cariño, por impulsarme y enseñarme que todo es posible cuando se cree en uno mismo, y sobre todo por compartir conmigo el inicio y fin de este sueño, por su confianza que es mi fortaleza en cada instante. Te quiero mucho.
- A la **Dra. Martha Legorreta Herrera** por darme la oportunidad de llevar a cabo este proyecto, por la confianza depositada en mi, y por enseñarme que la mejor manera de vencer los miedos, es enfrentándolos.

## AGRADECIMIENTOS

- Agradezco al **Dr. Alejandro Zentella Dehesa** y al **M en C. José Luis Ventura Gallegos** por su apoyo en el desarrollo de esta investigación.
- A los sinodales: **Q. B. P. Gustavo Miranda Contreras, Dra. Martha Legorreta Herrera, Q.F.B. Francisco Javier Parada García, Dra. Maria Isabel Soto Cruz, Q. F.B. Manuel Orduña Sánchez**, gracias por su valiosa ayuda durante la revisión de este trabajo.
- A cada uno de mis amigos de la carrera que fueron parte fundamental en cada momento: Maricela, Ricardo, Ruth, Aurora, Diego, Christian, Jorge, Nancy, Martha que me enseñaron cada uno a su manera a ver la vida con alegría.
- A los laboratoristas: **Elia Rincón Simbrón y Ricardo Gerardo Silvestre** por su valioso apoyo en el mantenimiento y cuidado de los animales.
- Al **M. en C Armando Cervantes Sandoval** por su apoyo en el tratamiento estadístico de los datos
- Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología Molecular de la FES Zaragoza y la parte de citometría de flujo en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y recibió financiamiento de los proyectos CONACYT: 39436 y DGAPA: IN210100, IN221104 y IN205703-3.

# INDICE

Lista de figuras.....	II
Lista de tablas.....	III
1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
3. Fundamentación teórica.....	5
3.1 Generalidades de malaria.....	5
3.2 Ciclo Biológico del parásito.....	5
3.3 Distribución geográfica de la malaria.....	9
3.4 Cuadro Clínico de la enfermedad.....	10
3.5 Inmunidad en malaria.....	10
3.6 Tratamiento en malaria.....	12
3.7 Óxido nítrico en malaria.....	13
3.8 Citocinas en malaria.....	14
3.8.1 IFN- $\gamma$ en malaria.....	14
3.8.2 TNF- $\alpha$ .....	15
3.8.3 TGF- $\beta$ .....	15
3.9 RT-PCR.....	16
4. Apoptosis.....	19
4.1 Generalidades de apoptosis.....	19
4.2 Apoptosis en malaria.....	21
4.3 Detección de apoptosis.....	22
5. Planteamiento del problema.....	23
6. Objetivos.....	24
6.1 Objetivo general.....	24
6.2 Objetivos específicos.....	24
7. Hipótesis.....	25
8. Material.....	26
8.1 Biológico.....	26

8.2 Laboratorio.....	26
8.3 Equipo.....	26
8.4 Reactivos.....	27
9. Metodología.....	30
9.1 Diseño experimental.....	30
9.2 Infección de los ratones.....	30
9.3 Índice esplénico.....	31
9.4 Extracción de RNA.....	31
9.5 Hidratación de RNA.....	32
9.6 Retrotranscripción.....	33
9.7 Amplificación de los genes para citocinas por PCR.....	33
9.8 Electroforesis de los productos de PCR.....	35
9.9 Análisis estadístico.....	35
10. Diagrama de flujo.....	36
11. Resultados.....	37
11.1. Cinética de la parasitemia.....	37
11.2 Pérdida de peso.....	38
11.3 Evaluación del índice esplénico.....	39
11.4 Evaluación de la expresión de genes asociados a la apoptosis.....	40
11.4.1 Expresión de IFN- $\gamma$ .....	41
11.4.2 Expresión de iNOS.....	42
11.4.3 Expresión de TNF- $\alpha$ .....	43
11.4.4 Expresión de Fas.....	44
11.4.5 Expresión de TGF- $\beta$ .....	45
11.5 Apoptosis de células de bazo.....	46
12. Análisis de resultados.....	47
13. Conclusiones.....	52
14. Anexos.....	53
14.1 Soluciones.....	53
14.2 Abreviaturas.....	58
15. Bibliografía.....	59

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida del <i>Plasmodium</i> .....	8
Figura 2. Mapa global de áreas endémicas de malaria.....	9
Figura 3. Representación esquemática de la técnica de PCR.....	18
Figura 4. Cinética de la parasitemia en ratones BALB/c infectados con malaria....	37
Figura 5. Pérdida de peso en ratones BALB/c en ratones infectados con malaria.	38
Figura 6. Efecto de la cloroquina sobre el índice esplénico.....	39
Figura 7. Efecto de la cloroquina sobre la expresión de INF- $\gamma$ en ratones infectados con malaria.....	41
Figura 8. Efecto de la cloroquina sobre la expresión de iNOS.....	42
Figura 9. Efecto de la cloroquina sobre la expresión de TNF- $\alpha$ .....	43
Figura 10. Efecto de la cloroquina sobre la expresión de Fas.....	44
Figura 11. Efecto de la cloroquina sobre la expresión de TGF- $\beta$ .....	45
Figura 12. Efecto de la cloroquina sobre la apoptosis de las células de bazo en ratones infectados con malaria.....	46

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características diferenciales entre las especies de <i>Plasmodium</i> .....	7
--	---

## 1. RESUMEN

La malaria es la enfermedad infecciosa que cobra mayor número de muertes en el mundo, la ocasiona un protozoo parásito del género *Plasmodium*. El tratamiento con antimaláricos ha funcionado, sin embargo, el parásito ha desarrollado resistencia a múltiples fármacos. En este trabajo se estudió la influencia que el tratamiento con cloroquina tiene sobre la apoptosis de las poblaciones de linfocitos y en la expresión de citocinas en un modelo murino infectado con malaria, para ello se utilizaron ratones BALB/c que se separaron en seis grupos, tres de los cuales se infectaron con  $5 \times 10^4$  eritrocitos parasitados de *Plasmodium yoelii* 17XL, en el día siete postinfección al primer grupo se le administró vía oral 0.5 mg de cloroquina (1 dosis), al segundo el vehículo y el tercer grupo se dejó sin tratamiento para utilizarlo como control. Adicionalmente se contó con 3 grupos de ratones sanos que fueron tratados de la misma forma. El día ocho postinfección, los ratones se sacrificaron, se les extrajo el bazo y se evaluó la apoptosis utilizando anexina V y citometría de flujo, además se evaluó la expresión de los genes IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , Fas e iNOs por medio de la técnica RT-PCR (Retrotranscripción -Reacción en cadena de la polimerasa). Los resultados mostraron que el grupo tratado con cloroquina presentó un aumento en el número total de células en apoptosis, además de un incremento en la expresión tanto de iNOS como de TNF- $\alpha$ , ambas moléculas asociadas a una respuesta Th1 y que la muerte por apoptosis que induce la droga se da por un mecanismo que probablemente no involucra el incremento en la expresión de Fas. Este estudio describe de manera general como el tratamiento con cloroquina modifica la apoptosis de los ratones infectados con *Plasmodium*, lo cual proporciona mayor información sobre la relación que existe entre el proceso de apoptosis y la acción del fármaco durante la infección con malaria.



## 2. INTRODUCCION

La malaria es una de las enfermedades crónico infecciosas que mayor número de muertes causa en el mundo, actualmente se considera como uno de los principales problemas de salud pública, se trata de una enfermedad causada por un protozoo parásito que pertenece al género *Plasmodium*. Las especies que infectan al humano son cuatro: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*, las cuales se transmiten por la picadura del mosquito *Anopheles* hembra (Stuart 2000).

El paludismo ocurre principalmente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, en donde el clima es cálido y húmedo. En México las áreas maláricas comprenden un 58% del territorio nacional y más del 95% de los casos de malaria son causados por *P. vivax*, la malaria ocasionada por *P. falciparum* solo se observa en 1 a 3% y los casos por *P. malariae* habitualmente no llegan al 1%, los años en que se observa *P. vivax* produce casos en todo el país, pero *P. falciparum* suele confinarse al sureste en los estados de Chiapas, Campeche, Quintana Roo y Oaxaca (Tay et al, 1993).

Los esfuerzos por eliminar el paludismo han sido intensos en muchas partes del mundo, sin embargo su erradicación se ha dificultado en gran parte por la variabilidad antigénica del parásito, así como su complejo ciclo de vida y la resistencia que han presentado algunos mosquitos a los insecticidas residuales, además de que han surgido cepas de *Plasmodium* resistentes a las drogas antimaláricas existentes. Una estrategia importante para la erradicación del paludismo es el desarrollo de una vacuna efectiva, por lo que es importante conocer los mecanismos de la respuesta inmune que se desarrollan en esta enfermedad, de modo que se pueda intervenir en la proliferación y en la eliminación del parásito.

La apoptosis es un proceso que se puede definir como un conjunto de reacciones bioquímicas que tienen lugar en la célula y cuya finalidad es la muerte de la misma de manera ordenada y silenciosa, su importancia radica en lo fundamental que resulta este proceso no solo para controlar la masa celular de algunos órganos o en la eliminación de ciertas células producidas en exceso o con algún daño en el DNA, sino también es importante por las repercusiones drásticas que puede tener si no se realiza adecuadamente durante el desarrollo embrionario, ya que la falta o exceso de muerte puede conducir a trastornos en el organismo adulto. Así por ejemplo, alteraciones que induzcan muerte celular fuera de tiempo o de lugar producen enfermedades degenerativas, como la enfermedad de Alzheimer o el mal de Parkinson, ambas asociadas a muerte neuronal, mientras que una inhibición de la apoptosis puede ser crítica en el surgimiento de cáncer (Jiménez 2000).

La muerte celular programada puede ser una respuesta a las infecciones extracelulares tanto en los organismos patógenos como en el huésped, el suicidio de una célula infectada se considera como una estrategia de supervivencia por parte del organismo multicelular, sin embargo, al patógeno también puede resultarle útil la muerte de la célula, un ejemplo claro es la inducción de apoptosis a macrófagos del huésped para escapar de la acción microbicida del hospedero. Por lo tanto existe la posibilidad de que el parásito suprima la muerte de las células huésped para prolongar su periodo de multiplicación (Arends & Wyllie, 1991).

En este trabajo se estudió la participación del proceso de apoptosis en la infección con malaria, para observar la contribución de este proceso tanto en el parásito como en el hospedero durante la infección con *P. yoelii* 17XL en un modelo murino, además de buscar la relación que tienen la cloroquina, una droga antimalárica que aparentemente promueve la apoptosis en células T y que tiene aplicaciones en enfermedades autoinmunes donde facilita la apoptosis de las

clonas de células T anormalmente persistentes en la respuesta inmune en malaria (Paris 2004).

Existen varios fenómenos en malaria en los que la apoptosis podría estar involucrada, de hecho en las zonas endémicas los individuos infectados con malaria, muestran un mayor porcentaje de células que sufren apoptosis espontánea que el que presentan los controles sanos de la misma edad y sexo, aunado a esto, en los estudios realizados en modelos murinos, se han encontrado significativamente incrementadas las frecuencias y número absoluto de células apoptóticas en el bazo de los ratones infectados (Hembly et al, 2000).

Este trabajo aporta un mayor conocimiento de los mecanismos de la respuesta inmune contra el paludismo, y de cómo afecta el tratamiento con cloroquina el proceso de apoptosis y la expresión de algunas citocinas durante la infección con *Plasmodium*.

### **3. FUNDAMENTACION TEORICA**

#### **3.1 Generalidades de malaria**

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

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

#### **3.2 Ciclo Biológico del Parásito**

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

El primer encuentro del huésped con la malaria comienza cuando los esporozoitos presentes en las glándulas salivales de la hembra del mosquito *Anopheles* infectada, entran al torrente sanguíneo del humano por medio de la picadura del insecto quien al introducir su proboscis hasta ubicarla en la luz de los vasos, inyecta saliva, depositando así los esporozoitos en el torrente sanguíneo, en los primeros 30 minutos de la inoculación estos esporozoitos invaden a los hepatocitos, en los cuales experimentan el ciclo de desarrollo asexual llamado esquizogonia hepática, dentro de cada hepatocito infectado crece una forma multinucleada de gran tamaño llamado esquizonte, que a continuación se divide y da lugar a los merozoitos. Tanto el tiempo que se requiere para la producción de merozoitos como el número de los mismos varían según la especie de *Plasmodium* (Cuadro 1). Los merozoitos salen de las células hepáticas hacia el torrente sanguíneo donde invaden a los eritrocitos, fijándose a las terminales glucosídicas presentes en la membrana de las glicoforinas A, B y C de los eritrocitos, para penetrar en ellos por medio de un fenómeno que ocurre a manera de una endocitosis, inducido por proteínas secretadas por el parásito que lo internalizan en un saco formado por la membrana del mismo eritrocito (Tay, 1993). Cada especie palúdica invade un subconjunto discreto de eritrocitos (Cuadro 1). Una vez dentro del eritrocito el plasmodio inicia su fase de esquizogonia eritrocítica en la que se alimenta del contenido citoplásmico del eritrocito, que en más de un 30 % es hemoglobina, de cuya molécula utiliza la globina como fuente de aminoácidos, dejando la porfirina como una molécula modificada e insoluble, que se denomina hemozoina y que constituye el pigmento malárico. En la primera parte de esta etapa, el trofozoito almacena una gran cantidad de nutrientes en una vacuola que ocupa casi la totalidad de su citoplasma, y una mancha de cromatina, lo cual le confiere la apariencia de un anillo con un rubí. Por esas características, a esta primera fase se le llama forma anular. El parásito crece, pierde su carácter vacuolado y el citoplasma se vuelve más abundante. Aparecen granulaciones rojizas en el citoplasma de los eritrocitos huéspedes, que reciben el nombre de acuerdo a la especie de *Plasmodium* (Tabla 1).

Luego su núcleo se divide repetidamente produciendo un esquizonte que tiene de 6 a 24 núcleos. El esquizonte se divide y produce merozoitos uninucleados, que salen al lisarse la membrana de la célula madre y a su vez estos lisan la membrana del eritrocito huésped y quedan así libres en el plasma armados para invadir otros eritrocitos. El tiempo en el que el eritrocito tarda en romperse depende de la especie (Cuadro 1). La rápida elevación de la temperatura y los fuertes escalofríos que son característicos de la malaria se producen en el momento en que los eritrocitos se lisan.

Tabla 1. Características diferenciales entre las especies de *Plasmodium*

	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. malariae</i>
Ciclo exoeritrocítico (días)	5.5-7	6-8	9	12-16
No. de merozoitos por hepatocito	40,000	10,000	15,000	2,000
Ciclo eritrocítico (horas)	48	42-48	49-50	72
Preferencia por Células rojas Sanguíneas	Células jóvenes, pero puede invadir células de todas las edades	Reticulocitos	Reticulocitos	Todas las células
Recaídas	No	Si	Si	No
Periodo de fiebre (horas)	48	48	48	72
Longitud de Paroxismos febriles (horas)	16-36 o mas largo	8-12	8-12	8-10
Gránulos citoplásmicos	Ziemann	Schüffner	Schüffner	Maurer

Los merozoitos liberados infectan rápidamente a una nueva población de eritrocitos, iniciando el siguiente ciclo de fiebre y escalofrío. Dentro de algunos eritrocitos, los merozoitos se diferencian dando gametos masculinos y femeninos llamados microgametocitos y macrogametocitos respectivamente, que no rompen la célula hospedera. Estos son ingeridos por el mosquito al alimentarse de sangre. En el intestino del insecto, los eritrocitos se lisan y los gametocitos maduran y se combinan para producir un cigoto, este último se implanta en el epitelio intestinal y da lugar a oocisto, que a su vez madura convirtiéndose en esporozoitos. Finalmente estos emigran a la glándula salival del mosquito en espera de ser inyectados a la piel humana cuando el mosquito pica (Stuart, 2000).

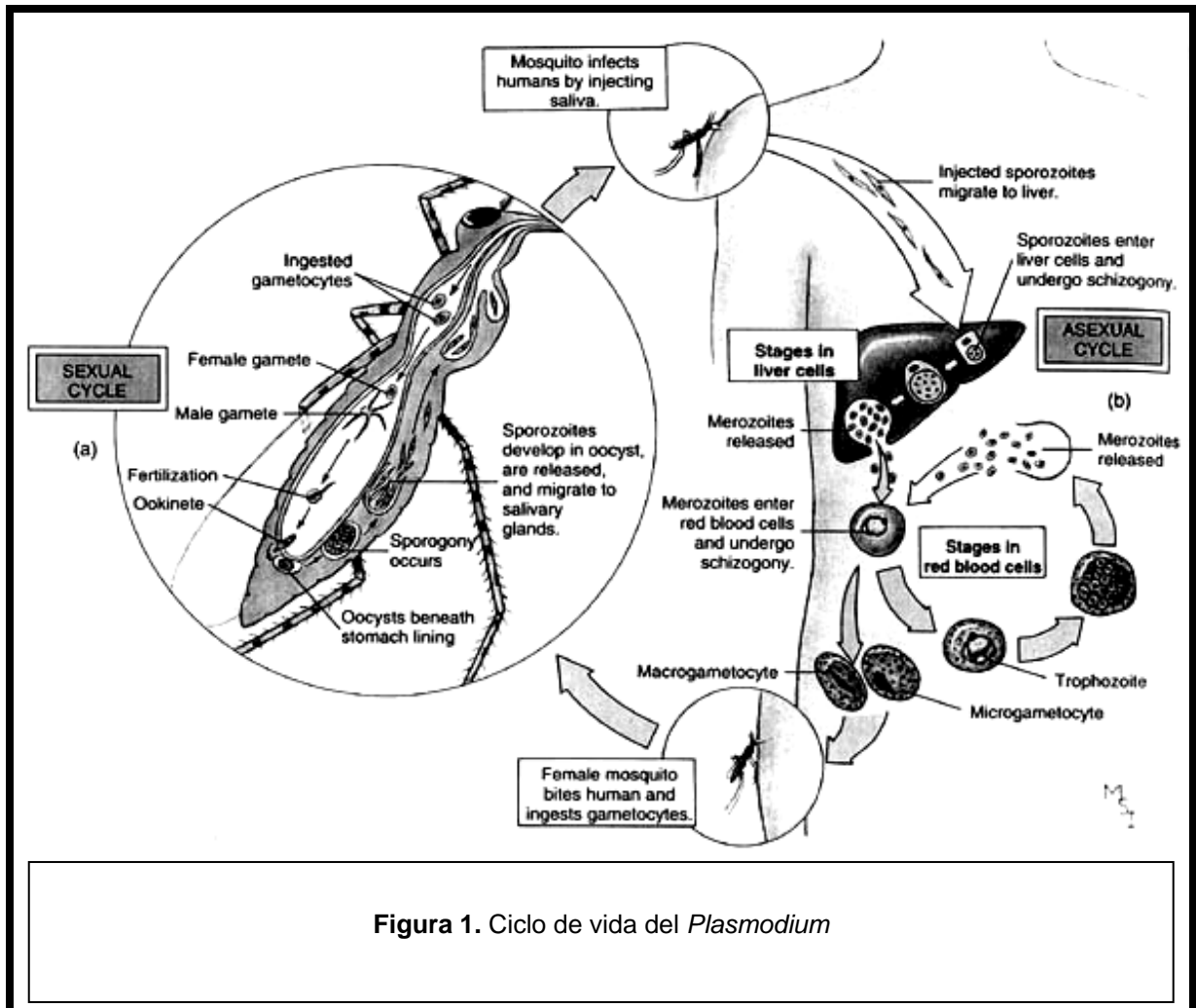
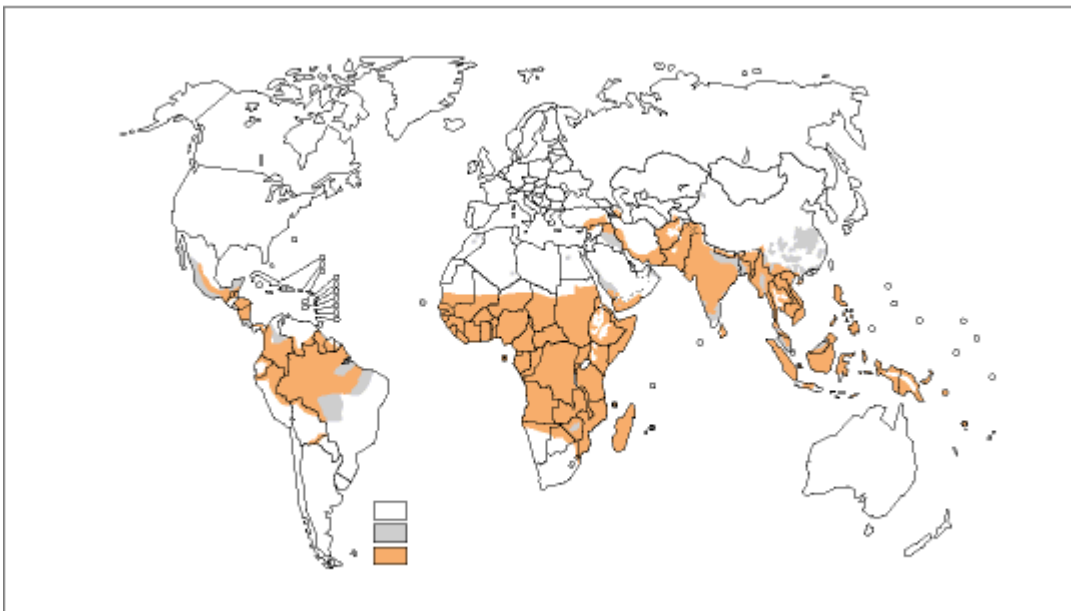


Figura 1. Ciclo de vida del *Plasmodium*

### 3.3 Distribución Geográfica de Malaria

Aproximadamente 40% de la población mundial, alrededor de 500 – 700 millones de personas están expuestas a malaria endémica en África, India, Asia suroriental y América Latina. La organización Mundial de la salud estima en 270-300 millones de nuevos casos de malaria cada año. El 90% de las muertes debidas a malaria ocurren en el sur de África. La malaria mata a un niño africano cada 30 segundos su prevalencia va en aumento debido a que la medidas tomadas para su control no han sido totalmente efectivas por la resistencia que el vector presenta a los insecticidas utilizados, así como a los mecanismos de resistencia que han desarrollado los parásitos a la quimioterapia utilizada (Greenwood, 1997).

En México los estados que continúan reportando mayor número de casos son Chiapas, Oaxaca, Sinaloa y Campeche. La Organización Panamericana de la Salud (2001) clasificó estas áreas de acuerdo a la intensidad de transmisión como: a) Focos hiperendémicos: Guatemala, Oaxaca y Guerrero b) focos hipoendémicos: Nayarit, Sinaloa, Durango, Jalisco y Michoacán.



**Figura 2. Mapa** Global de áreas endémicas de malaria



### **3.4 Cuadro Clínico de la enfermedad.**

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

El paroxismo palúdico se desencadena por la liberación de metabolitos contenidos en el eritrocito parasitado cuando ocurre su lisis. Estos metabolitos se han identificado como proteínas libres termoestables y solubles denominadas toxinas de malaria, las cuales, estimulan la producción de  $TNF-\alpha$ , por células T y macrófagos, que a su vez induce la liberación de IL-1 que es un pirógeno endógeno proveniente de macrófagos y fibroblastos (Tay, 1993).

### **3.5 Inmunidad en Malaria**

El desarrollo de la inmunidad frente a malaria es muy compleja y todavía no se ha explicado de manera completa, ya que el desarrollo de la protección bajo condiciones naturales, requiere de una exposición continua con el parásito durante varios años, se logra solo después de que el individuo se infecta con un gran número de poblaciones de parásitos antígenicamente diferentes, es muy lenta y puede no ser absoluta ya que la parasitemia persiste en ausencia de enfermedad clínica. La variación antigénica es un mecanismo de evasión del sistema inmune y

contribuye a la cronicidad y ocasionalmente a la recaída típica de la infección (Phillips, 1994).

Varios estudios sugieren que la inmunidad está mediada por anticuerpos frente a antígenos que se expresan en la membrana de los glóbulos rojos infectados y que los linfocitos T desempeñan una función primordial en la producción de anticuerpos así como en el establecimiento de una respuesta inmune celular contra el plasmodio. Los mecanismos que proporcionan mayor protección inmune para los estados sanguíneos de malaria aguda están mediados por linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Taylor, 1995). Los antígenos de superficie de los merozoitos, la forma que invade a los eritrocitos, también son un blanco importante de los anticuerpos producidos por el sistema inmune (Greenwood, 1997). Los monocitos/macrófagos son células de importancia para la eliminación del parásito y el IFN- $\gamma$  es un potente activador de esas células. Se ha descrito también que el óxido nítrico y otros intermediarios del nitrógeno producidos por los macrófagos juegan un papel protector durante una infección primaria (Phillips, 1994).

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 las respuesta inmunitaria frente a la fase sanguínea de *P. yoelii*, mientras que en la fase hepática de la infección con *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).

### 3.6 Tratamiento en malaria.

La eficacia de los agentes antipalúdicos depende de la especie del parásito en el cual actúa y la etapa de su ciclo de vida. Además la resistencia de los parásitos a estos fármacos es un problema terapéutico muy importante.

Los medicamentos antipalúdicos también pueden clasificarse por sus acciones selectivas sobre las diferentes fases del ciclo de vida del parásito. Los fármacos que eliminan a los esquizontes tisulares en desarrollo o a los hipnozoitos latentes en el hígado se denominan esquizonticidas tisulares. Aquellos que actúan sobre los esquizontes sanguíneos son los esquizonticidas sanguíneos o agentes supresores (por ejemplo, cloroquina, pirimetamina, amodiaquina, proguanilo, quinina). Los gametocidas son medicamentos que previenen la infección en los mosquitos al destruir los gametocitos en la sangre (Schwartz et al, 1992).

La cloroquina es el medicamento más útil para la inmunosupresión y tratamiento del paludismo, excepto para las cepas de *P. falciparum* que son parcial o completamente resistentes a esta, se trata de una 4-aminoquinilina sintética formulada como la sal de fosfato para uso oral y como clorhidrato para uso parenteral. El mecanismo exacto de la acción antipalúdica no se ha determinado. La cloroquina puede actuar bloqueando la síntesis enzimática del DNA y RNA tanto en células de mamíferos como de protozoarios. Dentro del parásito, el medicamento se concentra en las vacuolas y aumenta el pH de estos organelos, interfiriendo con la capacidad del parásito para metabolizar y utilizar la hemoglobina eritrocítica (Schwartz et al, 1992).

La cloroquina, se absorbe bien por vía oral y las concentraciones pico se alcanzan en 1 a 2 horas, se distribuye ampliamente en los tejidos y se concentra en los eritrocitos.

### 3.7 Óxido nítrico en Malaria

El óxido nítrico (NO) se produce biológicamente a partir de L-arginina y oxígeno, esta reacción la cataliza la enzima óxido nítrico sintetasa (iNOS). La iNOS presenta diferentes propiedades bioquímicas que depende del tejido de donde se obtiene y la síntesis de NO se regula por los niveles de expresión del gen.

Tanto el óxido nítrico como los intermediarios reactivos del nitrógeno se producen como parte de los mecanismos de resistencia a la infección malárica, esas moléculas generan daño en las células además de tener actividad microbicida, en particular el *Plasmodium* es susceptible al efecto del óxido nítrico y sus derivados nitrogenados (Hommel, 1996).

El óxido nítrico inhibe la síntesis de ATP y ADN, por lo que presenta una fuerte acción antimicrobiana contra parásitos intracelulares como *Plasmodium*, *Toxoplasma* y *Trypanosoma* (Roitt et al, 2000).

Existen tres diferentes isoenzimas de la iNOS, la neuronal (nNOS), la endotelial (eNOS) y la inflamatoria o inducible (iNOS) las cuales poseen diferentes propiedades (Titheradge, 1998). La nNOS se produce principalmente en el cerebro, la iNOS se expresa en células del sistema inmune, principalmente macrófagos y neutrófilos y esta isoforma juega un papel importante en la defensa antimicrobiana, y por último la eNOS que se expresa por células del endotelio vascular. Las primeras dos isoformas son las que contribuyen a la formación de óxido nítrico durante la infección a células sanguíneas por *Plasmodium* (Van der Heide, 2000).

Una vez difundido el NO, activa a la enzima guanidil ciclasa y ésta provoca un aumento intracelular de GMPc, el cual es un mediador de los efectos fisiológicos. La actividad del óxido nítrico va a depender de la cantidad y del lugar donde se produce, anexando el estado de óxido-reducción del medio en donde va a actuar,

por lo tanto es de suma importancia la concentración de radical libre de oxígeno ( $O_2^-$ ) que exista, pues a partir de éste se llevara a cabo la formación de mayores o menores cantidades de peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), que es un radical libre oxidante con un papel fundamental en la lesión tisular (Rodella et al, 1999).

### **3.8 Citocinas en malaria.**

Se denominan citocinas al conjunto de proteínas que secretan diferentes células, fundamentalmente del sistema inmune, como respuesta a una estimulación inmunológica o como señal intercelular tras la estimulación de una de ellas. Las citocinas presentan gran variedad de funciones y son importantes en la respuesta inmune, tanto natural o innata como adquirida, se trata de proteínas de bajo peso molecular (8 a 80 kDa) que estimulan o inhiben la proliferación, diferenciación o la función de las células inmunitarias que suelen actuar de forma autocrina (sobre la misma célula productora) o paracrina (sobre células cercanas). Desde un punto de vista funcional las citocinas se agrupan de la siguiente forma:

- \* Mediadoras de la inmunidad natural y de la inflamación
- \* Mediadoras de la Hematopoyesis
- \* Mediadoras de la quimiotaxis
- \*Mediadores de la activación, proliferación, diferenciación y muerte de los linfocitos T.

En la actualidad se conocen más de 100 citocinas humanas distintas y se siguen descubriendo más a gran velocidad. A continuación, se describirán las características generales de cada una de las citocinas que se analizaron durante este trabajo.

#### **3.8.1 Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ).**

Es una citocina producida por los linfocitos T CD8+ y TCD4+ en respuesta específica a antígenos así como por células NK de forma no específica (Schofield et al, 1987). Es la principal linfocina de células Th1 considerada pluripotente,

activa macrófagos, aumentando la expresión de moléculas del MHC clase II, incrementa la fagocitosis, induce la producción del factor necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y metabolitos reactivos de oxígeno. Se sabe que el principal blanco del IFN- $\gamma$  durante la infección con malaria son los monocitos-macrófagos (Bate et al, 1998) y los neutrófilos ya que están asociados a la respuesta principal durante una primera infección por *Plasmodium* (Phillips et al, 1995). Además, en modelos murinos, se ha demostrado que para controlar la infección se requiere tempranamente INF- $\gamma$  (Jasón, 2001).

### **3.8.2 Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ).**

Es una citocina multifactorial que posee numerosas actividades biológicas, producida por las células NK (asesinas naturales) y macrófagos activados por toxinas del parásito del estadio sanguíneo, participa en la respuesta de la fase aguda durante una infección o daño, así como la regulación del crecimiento y diferenciación celular, además es clave en la activación de los macrófagos (Castro et al, 2003). Esta citocina se produce en la fase pre-eritrocítica estimulada por antígenos parasitarios en el tiempo de ruptura del esquizonte, y en la fase eritrocítica durante la liberación de los merozoitos de los glóbulos rojos infectados. Este factor junto con las citocinas IL-1, IL6, IL-12 e IFN- $\gamma$  están involucrados en la disminución de la parasitemia en malaria, ya que son capaces de eliminar a gametocitos intraeritrocíticos, así como inactivar parásitos intraeritrocíticos indirectamente, induciendo la producción de intermediarios reactivos del nitrógeno (RNI) (Long, 1993).

### **3.8.3 Factor Transformador de crecimiento $\beta$ (TGF- $\beta$ ).**

El TGF- $\beta$  es una citocina inmunoreguladora producida por una diversidad de células, incluyendo macrófagos, células T, células NK y linfocitos B: en concentraciones bajas actúa como citocina inflamatoria, teniendo la capacidad de reclutar monocitos, células T y neutrófilos al sitio de inflamación temprano; en

concentraciones altas actúa como anti-inflamatoria suprimiendo la producción de TNF- $\alpha$  y NO en macrófagos, inhibe la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  de las células NK (Taylor-Robinson & Smith, 1999).

El análisis de citocinas en el laboratorio puede realizarse mediante bioanálisis que es la medición de las citocinas biológicamente activas utilizando animales vivos o líneas celulares (Thorpe et al, 1993); inmunoanálisis que mide la citocina biológicamente activa e inactiva como el RIA y el ELISA o RT-PCR, este último método fue el utilizado para el desarrollo de este trabajo, en el cual se analiza la expresión del gene para cada citocina a partir del RNA mensajero. Es altamente sensible, ya que identifica pequeños cambios en la expresión de genes que serían indetectables por los métodos anteriores (Gause y Adamovicz, 1995).

### **3.9 Retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).**

RT-PCR, es una técnica que utiliza la amplificación de RNA mensajero (RNAm) a través de la síntesis previa de su DNA complementario (DNAc) por transcripción reversa, que después se amplifica por PCR. Este método tiene una enorme capacidad de detección para la evaluación de la expresión génica *in vitro*, es decir, es de gran utilidad para estudiar los cambios en la expresión de los genes a nivel de RNA. 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 comienza con la síntesis de una hebra de DNAc por la acción de la transcriptasa inversa, una polimerasa de DNA dirigida por RNA, el DNAc permanece unido al molde como duplex RNA: DNAc. En la segunda etapa se desnaturaliza el duplex y comienza la amplificación según el mecanismo de una PCR normal: la hebra de DNA liberada actúa como molde para una segunda hebra de DNAc y luego el duplex se amplifica en sucesivos ciclos. La estrategia para analizar cambios en la expresión de genes específicos a nivel de RNA es 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 RNA total de una misma muestra biológica, a partir de la cual se efectúa la transcripción inversa para obtener el DNAc total (Panduro, 2000).

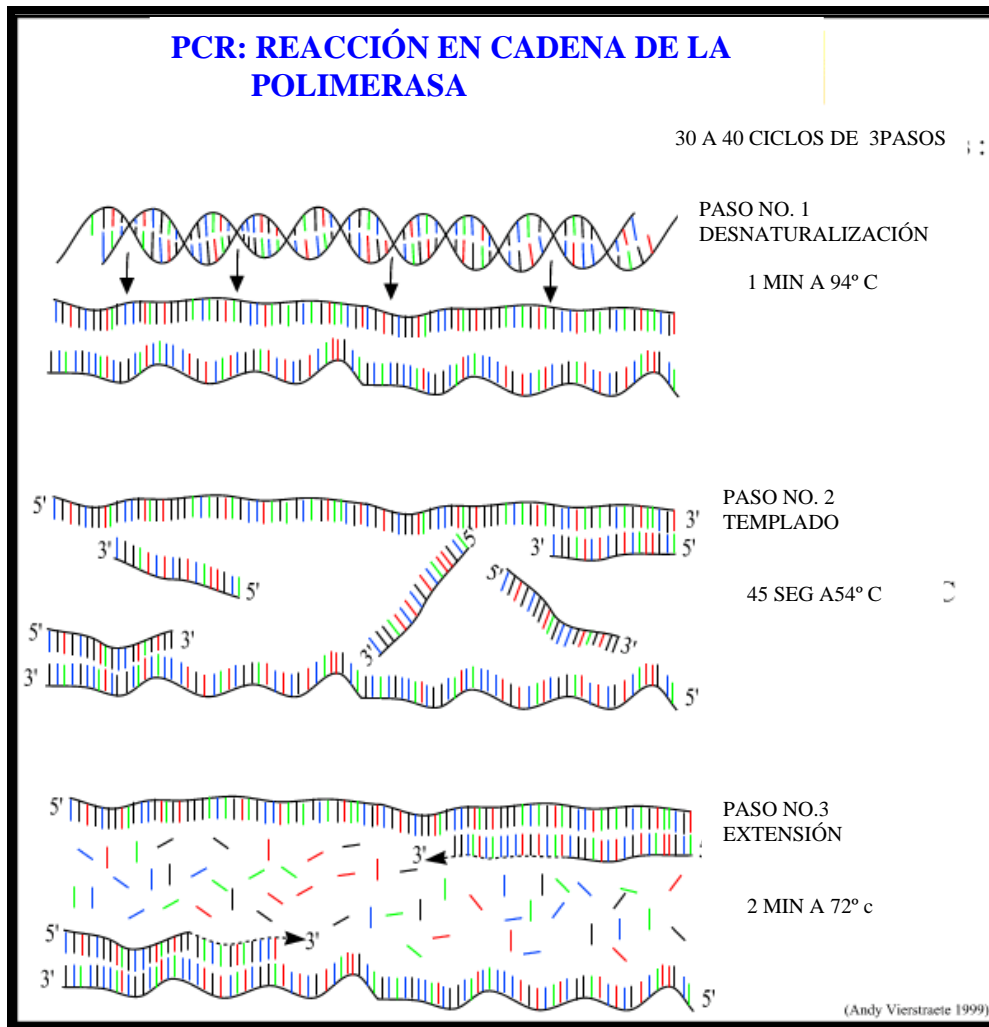
Cada ciclo de una PCR consta de tres etapas (Figura 3):

1. Desnaturalización. Calentamiento para la separación de las dos hebras del DNA, mediante una incubación breve a una temperatura de 94°C, que produce una rotura de los puentes de hidrógeno y por tanto la separación de ambas cadenas.
2. Templado (o hibridación). Enfriamiento rápido a 54°C de forma que se permita la hibridación de las hebras sencillas del DNA de interés con los oligos cebadores.
3. Elongación (o replicación). Etapa de amplificación propiamente dicha (72°C), en la que la DNA polimerasa termoestable elonga los cebadores, empleando como molde ambas hebras originales. La replicación transcurre en dirección 5' → 3' empleando como sustratos 4 dNTPs hasta terminar la lectura del molde o hasta que se comience una nueva etapa de desnaturalización (ciclo siguiente).

El ciclo se repite una vez y otra vez, dando como resultado el doble número de DNA por cada ciclo. Después de 30 ciclos se producen alrededor de un billón de copias de DNA entre los dos oligonucleótidos cebadores. Esta cantidad de DNA es suficiente para detectarlo directamente por electroforesis de acrilamida, en donde se tiñe el gel con bromuro de etidio (Hoffee, 1998).

La técnica de PCR requiere conocer la secuencia de nucleótidos de los extremos del fragmento que se quiere amplificar. Estas secuencias se utilizan para diseñar 2 oligonucleótidos sintéticos de DNA complementario a cada porción de cada una de las dos cadenas de la doble hélice.





**Figura 3.** Representación esquemática de la técnica de PCR.

En la práctica, se requiere un control preciso de las variables que condicionan este triple proceso (secuencia, diana, cebador, enzimas y restos de componentes), además de instrumentos adecuados (termocicladores de DNA) para establecer las condiciones de cada etapa y repetirlas cíclicamente (tiempo, temperatura, número de ciclos). Se consigue así amplificar secuencias de tamaños diversos, comprendidos entre 50 pb y 2.5 kb.

Para la realización práctica se precisan en la mezcla de reacción los siguientes reactivos:

- a) dNTPs en exceso, como sustratos para la síntesis de las innumerables copias de DNA. Para ser reconocidos por la polimerasa, deben ir acompañados de  $Mg^{2+}$ .
- b) Dos oligonucleótidos de cadena sencilla (“oligos”), generalmente sintéticos, de 18 a 30 nucleótidos. Sus secuencias deben ser complementarias, respectivamente a los dos extremos 3' de la región diana, uno en cada hebra, de modo que los oligos puedan funcionar como cebadores para la replicación de las dos hebras en la región diana.
- c) Una DNA polimerasa termoestable, es decir, enzimáticamente activa a temperaturas relativamente altas (72°C). Esta característica permite su función en sucesivos ciclos sin inactivarse. Dicha enzima se aísla de una bacteria termófila, denominada *Thermophilus aquaticus*, que es capaz de crecer a temperaturas elevadas de entre 78°C a 85°C (Gause y Adamovicz, 1995).

## 4. APOPTOSIS

### 4.1 Generalidades de apoptosis.

Durante el desarrollo de los organismos, se eliminan ciertas células, ya sea por haberse producido en exceso, o porque forman parte de estructuras transitorias durante la formación del organismo adulto. Dicha eliminación ocurre por un proceso que involucra muerte celular que se denomina apoptosis.

La muerte celular programada o apoptosis es uno de los dos tipos fundamentales de muerte celular, las cuales han sido definidas morfológica y químicamente como apoptosis y necrosis. En la muerte celular programada, un estímulo ambiental, activa un programa genético para implementar series específicas de eventos que culminan con la muerte y distribución eficiente de una célula. Los primeros cambios morfológicos que ocurren durante la apoptosis incluyen la pérdida de los contactos celulares y estructuras membranales especializadas (por ejemplo microvellosidades), así como la formación de protuberancias. También hay una translocación de fosfatidilserina de la capa interna de la membrana plasmática hacia la capa externa, como consecuencia de un incremento de la actividad de la flipasa. Por otro lado, la cromatina se condensa, se fosforila y desensambla la lamina nuclear; posteriormente se fragmenta el núcleo mientras que el retículo endoplásmico se dilata y forma vesículas que se fusionan con la membrana plasmática. Finalmente la célula se rompe en varias vesículas (llamadas cuerpos apoptóticos) que contienen organelos intactos y fragmentos nucleares, los cuales son fagocitados. A nivel bioquímico, ocurre la activación de proteasas específicas denominadas caspasas, a consecuencia de lo cual se activa una endonucleasa que degrada paulatinamente el DNA, generando inicialmente fragmentos de más de 50 Kb y luego multímeros de nucleosomas (Jiménez, 2000).

En contraste, la necrosis no presenta ninguno de los cambios morfológicos característicos de la apoptosis y ocurre rápidamente luego del daño inicial (Kiechle

y Zhang, 1998). En la mayoría de los casos la apoptosis, tiene un significado biológico, principalmente una función homeostática en el desarrollo y regulación del crecimiento. La apoptosis en algunas situaciones es un mecanismo protector contra enfermedades puesto que elimina células no requeridas, dañadas, precancerosas o viejas (Arends y Wyllie, 1991), sin embargo la apoptosis también está relacionada con procesos patológicos.

Por lo tanto, las terapias que modulan la regulación de apoptosis proporcionan una nueva oportunidad para el tratamiento de numerosas enfermedades incluyendo: cáncer, patogénesis viral, degeneración neuronal, linfoproliferación, inflamación e inmunodeficiencias, entre otras. En estos procesos la inducción y en algunos casos la inhibición de apoptosis se espera sea benéfica. Por eso existe la necesidad de entender e identificar tanto los reguladores tanto positivos como negativos de la apoptosis y las moléculas que modulan esa función (White, 1996).

Aunque el mecanismo exacto por el cual se inicia la apoptosis *in vivo* no está bien dilucidado, se sabe que la respuesta depende del disparo de cascadas de reacciones y es específica del tipo celular estudiado. La transducción de la señal puede ocurrir por dos distintas vías: a) vía extrínseca o mediada por receptor; b) vía intrínseca o mediada por la mitocondria (Kiechle y Zhang, 2002).

La vía mediada por receptor o también llamada extrínseca, requiere de la unión de un ligando a un receptor de muerte en la superficie celular. La molécula FasL/C95L se une al receptor de muerte Fas/CD95, el cual recluta dos moléculas transductoras de la señal TRADD del inglés (TNF R1- Associated Death Domain Protein) y FADD (Fas Associated protein with Death Domain). Este complejo denominado DISC se une a procaspasa 8 para activar caspasa 8 e iniciar una cascada de proteasas que generan la apoptosis (Kiechle y Zhang, 2002).

La vía intrínseca se regula por la liberación mitocondrial de citocromo c. Esta vía puede activarse cuando el DNA con daño no es percibido y reparado por los

genes control. El inicio de la apoptosis puede ocurrir inmediatamente o de manera retardada luego del daño en el DNA. Adicionalmente, la apoptosis se ha reconocido como un importante mecanismo de defensa contra diversos parásitos desde virus hasta nematodos, durante la inmunidad innata y adaptativa, ya que en algunos casos el sacrificio de células del hospedero infectadas puede facilitar la sobrevivencia del organismo disminuyendo la producción de parásitos viables (Williams, 1994).

## **4.2 Apoptosis en malaria**

Existen varios fenómenos en malaria en los cuales podría estar involucrada la apoptosis de las células linfoides, la apoptosis podría ser parte de un mecanismo normal para reducir el número de células y como consecuencia, el tamaño del bazo. En las zonas endémicas los individuos infectados con malaria, muestran un mayor porcentaje de células que sufren apoptosis espontánea que en los controles sanos de la misma edad y sexo, además las infecciones agudas con *P. falciparum* se asocian con un incremento en la apoptosis de células TCD4+, células TCD8+ y linfocitos B (Toure-Balde et al, 1996).

## **4.3 Detección de la Apoptosis**

Existen varios métodos para detectar apoptosis e identificar a las células apoptóticas por microscopía, se basan en los cambios morfológicos que se presentan durante la muerte celular programada que engloban un modelo característico de la condensación de la cromatina: tinción con merocianina 540, tinción con anexina V, inmunoquímica para citocromo c, tinción para DNA mitocondrial, reacción de TUNEL.

La fragmentación del DNA es rápida y común en todas las células que sufren apoptosis, de modo que es fácilmente cuantificable usando DNA marcado con haptenos o radioactividad, tinción de fluorocromos y citometría de flujo (White,

1996). Los métodos de citometría de flujo se basan en la determinación del contenido de DNA celular y las células apoptóticas se detectan por tinción con fluorocromos que se unen al DNA.

Normalmente fosfatidilserina esta confinada en la cara citoplasmática de la membrana, y durante la apoptosis se transloca a la superficie de la célula, lo que permite además de que las células sean reconocidas por macrófagos para su fagocitosis, además que se una específicamente por medio de los fosfolípidos cargados negativamente a la anexina V acopada a isotiocianato de fluoresceína, lo que se puede detectar por el microscopio de fluorescencia y/o citometria de flujo.

## 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La malaria es la enfermedad infecciosa que cobra el mayor número de muertes en el mundo, el desarrollo de resistencia por parte del vector a los insecticidas y del parásito a los medicamentos disponibles, incrementan el problema y hacen importante la investigación sobre los mecanismos de respuesta inmune que detienen la proliferación y generan la eliminación del parásito, con el propósito de diseñar una vacuna efectiva.

En nuestro grupo de investigación hemos observado que en un modelo experimental de malaria murina, se incrementan los mecanismos de regulación de la respuesta inmune como lo son la apoptosis de linfocitos T y B, sin embargo, se desconoce si este fenómeno es parte del silenciamiento normal de la respuesta inmune o bien si es un fenómeno inducido por el parásito para evadir los mecanismos inmunes que lo atacan. Además una droga antimalárica, como la cloroquina, se administra con éxito en las enfermedades con desórdenes inmunes como la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico y el síndrome linfoproliferativo para inducir apoptosis en linfocitos, por lo anterior es importante investigar como esta droga que puede inducir una inmunosupresión en individuos normales, podría afectar a la respuesta inmune de un individuo que cursa con una infección malárica. La infección experimental con *Plasmodium* en humanos no se puede llevar a cabo por cuestiones tanto éticas como técnicas, por lo que el empleo de un modelo experimental murino en malaria es útil para evaluar como la cloroquina puede afectar a la respuesta inmune en los individuos infectados con *Plasmodium*.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar como afecta el tratamiento con cloroquina la expresión de los genes Fas, TNF- $\alpha$ , iNOS, TGF- $\beta$  e INF- $\gamma$  y la apoptosis de los linfocitos de bazo en ratones BALB/c infectados con *P. yoelii* 17 XL.

### 6.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

- Evaluar la cinética de la parasitemia en los ratones infectados con *P. yoelii* 17XL que se trataron con cloroquina, con el vehículo y en los ratones sin tratamiento.
- Determinar el efecto del tratamiento con cloroquina sobre la pérdida de peso.
- Evaluar el efecto de la cloroquina en la apoptosis de los ratones infectados con malaria empleando la técnica de anexina V.
- Determinar el índice esplénico en ratones infectados con plasmodio y tratados con cloroquina.
- Evaluar el efecto del tratamiento con cloroquina sobre la expresión de los genes Fas, TNF- $\alpha$ , iNOS, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  en los ratones infectados con *P. yoelii* 17XL utilizando la técnica de RT-PCR.



## 7. HIPÓTESIS

La cloroquina esta involucrada en la inducción de apoptosis de las células de bazo en ratones infectados con *Plasmodium yoelii* 17XL lo que impactará la expresión de los genes involucrados en la respuesta inmune tanto humoral como celular.

## **8. MATERIAL**

### **8.1 Material Biológico**

- Ratones BALB/c machos de 8 semanas de edad mantenidos en condiciones libres de patógenos específicos
- Eritrocitos parasitados de ratón con la cepa *Plasmodium yoelii* 17XL y criopreservados en nitrógeno líquido.

### **8.2 Material de laboratorio.**

- Portaobjetos
- Tijeras de disección guantes de hule de látex
- Pipetas Pasteur de vidrio
- Gradillas para tubos Falcon
- Gradillas para tubos eppendorf
- Malla de acero inoxidable estéril
- Gorros y botas para áreas estériles
- Tubos Falcon: 15mL, 50mL, nuevos y estériles.
- Cajas petri de 10 cm de diámetro, de plástico, nuevas y estériles.
- Tubos Eppendorf: 1.5mL, 250 $\mu$ L, nuevas y estériles.
- Puntas para micropipetas: 1.5  $\mu$ L, 2.5 $\mu$ L, 10  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L, nuevas y estériles

### **8.3 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
- Microcentrífuga, Eppendorf 5415C
- Micropipetas Eppendorf: 2.5  $\mu$ L, 10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 1000  $\mu$ 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, Legacy Refrigeration System
- Autoclave, Tuttnauer Brinkmann 2540M

#### **8.4 Reactivos**

- Aceite mineral, Sigma.
- Agua destilada, Hidropura.
- Acrilamida USB/Amersham.
- Albúmina sérica bovina, Sigma.
- Amortiguador para retrotranscripción 5X (5X first strand buffer), Gibco BRL.
- Azul de bromofenol, Sigma
- Bis acrilamida, Sigma.
- Bromuro de etidio, Sigma.
- Citrato de sodio Sigma.
- Cloroformo, Burdick-Jackson.
- Cloruro de magnesio, Sigma.
- Colorante de Giemsa, Sigma.
- Dietilpirocarbonato, Sigma.
- dNTP's (desoxirribonucleótidos de trifosfato), Pharmacia.
- Ditioeritritol (dTT), Gibbco BRL.

- EDTA, Sigma.
- Etanol absoluto, Merck.
- Éter, JT Baker.
- Fenol ácido, 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.
- Gelatina sigma.
- Glicerol, 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'asa, Gibco BRL
- Marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb Gibco
- 2-mercaptoetanol, Sigma
- Metanol, JT Baker
- Oligo dT
- Persulfato de amonio, Sigma
- Retrotranscriptasa MMLV-RT
- Sacarosa, Sigma
- Sarcosil, Sigma
- Sulfanilamida (p-aminobenzenesulfonamida) 99%, Sigma
- SDS (Dodecilsulfato de sodio), Sigma
- Taq polimerasa (AmpliTaq DNA polimerase), Perkin Elmer
- TEMED, Sigma
- TriZol, invitrogen
- Tris base, Sigma
- Xilencianol, Sigma
- Primers u oligos para los genes a detectar, invitrogen
- Oligonucleótidos iniciadores para la amplificación de los genes:  $\beta$ -actina, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , iNOS, TGF- $\beta$ .
- 1.  $\beta$ -actina (Gibco BRL)

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

2. IFN- $\gamma$

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

2. TNF- $\alpha$

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

3. TGF- $\beta$

3' GAC CGC AAC AAC GCC ATC TA  
5' GGC GTA TCA GTG GGG GTC AG

4. iNOS

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

5. Fas

5' ATT GCT GAA GAC ATG ACA ATC CAG GA 3'  
5' AAC AGA AGC AGT CC TGG AAC CTG 3'

## **9. METODOLOGIA.**

### **9.1 DISEÑO EXPERIMENTAL.**

Se utilizó un modelo experimental de malaria murina. Los parásitos de la cepa *Plasmodium yoelii* 17XL se prepararon a partir de estabilizados criopreservados. Se utilizaron ratones singénicos BALB/c machos de alrededor de 8 semanas de edad que se separaron en 6 grupos, 3 de los cuales se infectaron vía intravenosa con  $5 \times 10^4$  eritrocitos parasitados con la cepa antes mencionada y 3 se dejaron sin infectar para utilizarlos como control. Diariamente se evaluó la parasitemia y el peso de los ratones infectados.

El día 7 postinfección los ratones infectados y los ratones control se trataron de la siguiente manera, al primer grupo se le administró vía oral 0.5 mg de cloroquina, al segundo grupo únicamente se le administro el vehículo, y finalmente el último grupo se dejó sin tratamiento como control.

El día ocho postinfección los ratones se sacrificaron, se les extrajo el bazo y se evaluó la apoptosis de las células del bazo utilizando anexina V y citometría de flujo, además de que se evaluó la expresión de los genes IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , Fas e iNOs por medio de la técnica RT-PCR (Retrotranscripción -Reacción en cadena de la polimerasa).

### **9.2 Infección de los animales.**

- Los ratones BALB/c se infectaron intravenosamente con  $5 \times 10^4$  eritrocitos parasitados de *Plasmodium yoelii* 17 XL.
- Diariamente se tomaron muestras de sangre de la cola de los ratones para evaluar la parasitemia en frotis teñidos con Giemsa.
- Se contaron el número de eritrocitos parasitados por cada 200 eritrocitos y cuando en un campo el número de eritrocitos parasitados era menor de 2,

se evaluaron 50 campos.

### 9.3 Índice esplénico.

- Se registro el peso a cada ratón al cual se le iba a realizar la determinación.
- Se sacrificó al ratón en una cámara de éter.
- Se Humedeció al ratón con etanol al 70%, se le extrajo el bazo y se pesó.

Índice esplénico = peso del bazo / peso del ratón.

### 9.4 Extracción De RNA.

- Se sacrificó a cada ratón
- Se humedeció la parte abdominal del ratón con alcohol al 70 % .
- Cerca de la flama de un mechero cortar la piel con el apoyo de pinzas y tijeras de disección, se procedió a la extracción del bazo.
- Se colocó el bazo en una caja petri estéril conteniendo medio de cultivo RPMI frío
- En una campana de flujo laminar, se maceró el bazo con el embolo de una jeringa, pasándolo a través de una malla de acero inoxidable y enjuagándolo con PBS libre de calcio y magnesio.
- Se pasó el contenido de la caja petri a un tubo Falcon y se centrifugó a 3,000 rpm durante 5 min.
- Se eliminó el sobrenadante
- A la suspensión de tejido obtenida, se le adicionaron 500µl de Trizol y se agito vigorosamente.
- En un tubo eppendorf se colocaron 500µL del lisado y se le adicionaron: 100 µl de la mezcla cloroformo: alcohol isoamilico (49:1), se mezcló en vortex por 10 min.
- Se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min.

- Se pasó la fase acuosa a otro tubo evitando la interfase
- Se adicionó un volumen igual de isopropanol previamente enfriado a -20° C
- Se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm durante 15 min.
- Se desechó el sobrenadante y se le adicionaron 500 µl de etanol al 80% en agua DEPC enfriado previamente a -20° C
- Se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm durante 15 min.
- Se desechó el sobrenadante con una micropipeta.
- Se destaparon los tubos y se cubrieron con papel parafilm, al que se le realizaron pequeños agujeros con una aguja (limpia y estéril)
- Se colocaron los tubos en un lugar limpio y a temperatura ambiente, dejándolos secar durante 24 horas o en el termociclador a 60° C por 5 min.

### 9.5 Hidratación y cuantificación del RNA

- Las muestras se hidrataron con 20 µl de agua DEPC al 0.1% estéril.
- Se agitó durante 5 min y se mantuvieron las muestras en refrigeración (4° C) de 1- 2 horas, agitando en vortex cada 30 min.
- Se centrifugaron a 14,000 rpm durante 5 seg.
- Se colocó en un tubo eppendorf 1µl de RNA puro y se adicionaron 199µl de agua calidad milipore (dilución 1:200).
- Se leyó la absorbancia de la solución de RNA a 260 nm.
- Se determinó la concentración del RNA por medio de la siguiente formula

$$\text{RNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{Absorbancia}_{260 \text{ nm}} \times \frac{40\mu\text{g}}{1000\mu\text{l}} \times \text{Dilución.}$$



## 9.6 Retrotranscripción

- Se retrotranscribieron 1.5 µg de RNA
- En un tubo eppendorf se colocaron: agua DEPC, el Oligo dT y el RNA de acuerdo a los cálculos realizados
- se incubó a 65°C por 10 min y se utilizó el termociclador
- Se colocó en hielo durante 5 min y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 5 seg.
- Se colocaron en hielo y se adicionaron en 10 µl de la mezcla de reacción:

Mezcla de reacción de retrotranscripción:

Reactivos	1Rx
Amortiguador de retrotranscripción 5X	4.0µl
0.1mM de dTT	2.0µl
Enzima M-MLV RT	1.0µl
Inhibidor de RNAsa	0.1µl
Agua DEPC	1.0µl
Volumen final	10.1µl

- Se incubó a 33°C durante 1 hora en el termociclador
- Se incubó a 95°C por 5 min.
- Se colocaron en hielo durante 5 min y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 5 seg.
- Se adicionaron 50 µl de agua DEPC fuera de la campana, se agitó con vortex y se guardó en el congelador (-20°C) hasta su uso.

## 9.7 Amplificación de los genes por PCR

- Se preparó la mezcla de reacción considerando que el volumen final en un tubo de reacción debe ser de 20µl (todos los reactivos y mezcla de reacción deben mantenerse en hielo):

### Mezcla de Reacción de la Amplificación:

Reactivo	Concentración/Reacción	$\mu\text{l/Rxn}$
10xAmortiguador de PCR	1X	2.0 $\mu\text{l}$
25mM $\text{MgCl}_2$	2mM	1.6 $\mu\text{l}$
5Mm dNTP's	0.2mM	0.8 $\mu\text{l}$
20 $\mu\text{M}$ Oligo $\beta$ -actina	0.1 $\mu\text{M}$	0.1 $\mu\text{l}$
20 $\mu\text{M}$ Oligo FAS-L	0.1 $\mu\text{M}$	0.1 $\mu\text{l}$
5U/ $\mu\text{l}$ taq polimerasa	0.5U	0.1 $\mu\text{l}$
Agua para PCR		12.3 $\mu\text{l}$
	Volumen final	17.0 $\mu\text{l}$

- Se mezcló en vortex y se distribuyeron en cada tubo 17 $\mu\text{l}$  de la mezcla de reacción.
- Se adicionaron 50 $\mu\text{l}$  de aceite mineral.
- Se depositaron 3 $\mu\text{l}$  de DNAC o retrotranscrito.
- Se colocaron los tubos en el termociclador cuando este tenga 94°C y se siguió el programa:

1. 94°C por 6 min.
2. 55°C por 2 min.
3. 72°C por 2 min.
4. 94°C por 2 min.
5. se repite 30 veces del paso 2-4
6. 55°C por 2 min.
7. 72°C por 7 min.
8. 20°C por 1 hora
9. fin.

## 9.8 Electroforesis de los productos de PCR

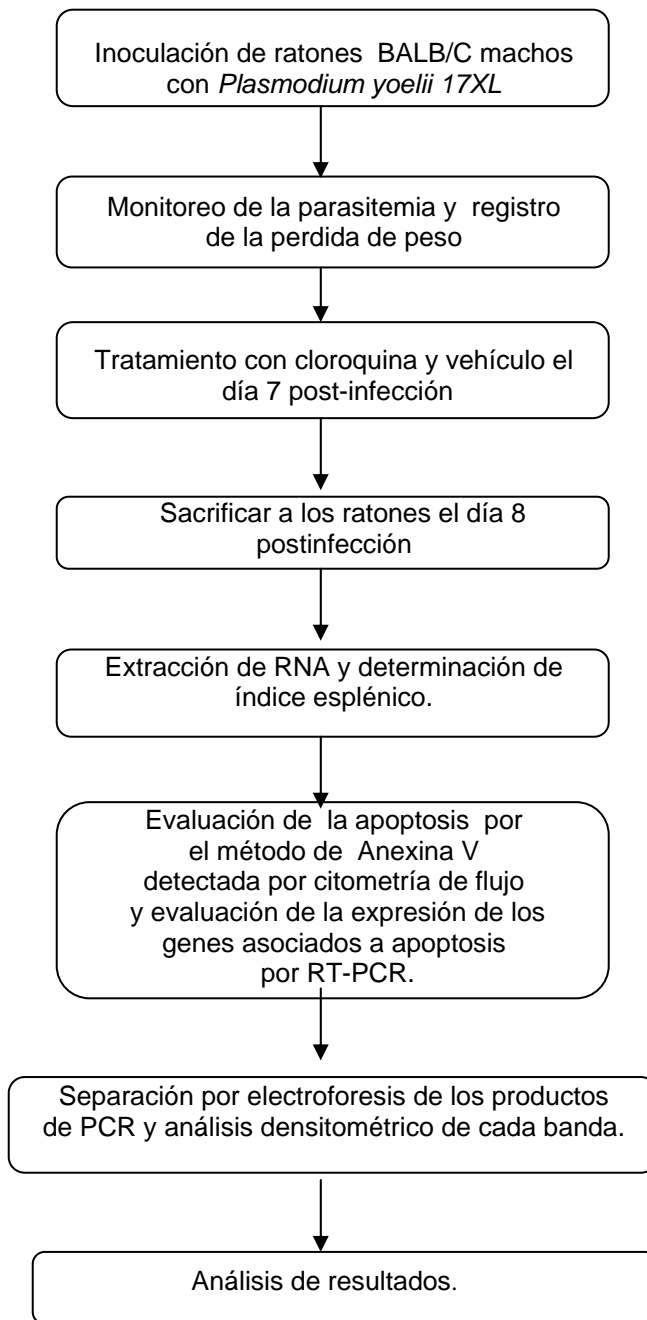
- Se prepararon geles de acrilamida al 5% en TBE1X (Tris- Acido Bórico- EDTA)
- Se adicionaron a cada muestra 10µl de amortiguador de carga, y se mezcló la fase acuosa, sin hacer emulsiones con el aceite. Se depositaron 10µl de la muestra con amortiguador en cada pozo, se utilizó un pozo por muestra
- Se colocó en un pozo de los extremos 10µl del marcador de peso molecular de 100 pares de bases
- Se corrió la electroforesis a 190 volts por 2 horas, en TBE 1X
- Se procedió a teñir los geles con bromuro de etidio, se utilizaron 20µl de una solución 10mg/ml en 200ml de TBE1X y se agitó suavemente durante 5 minutos
- Se destiñó en agua destilada durante 5 min.
- Se colocó el gel en el equipo analizador de geles.
- Se utilizó el software del equipo para determinar la densidad óptica de los productos de PCR y se realizó el gráfico para la expresión de la citocina en relación a la expresión del gen constitutivo.

Resumiendo, la metodología realizada se representa en un diagrama de flujo en la siguiente página.

## 9.9 Análisis estadístico

Se realizaron cinco repeticiones de cada unidad experimental. El análisis de varianza se realizó bajo diseño de one-way (una vía). Los resultados se presentaron en medias más el error estándar, se considera como valor significativamente diferente cuando  $P < 0.05$ .

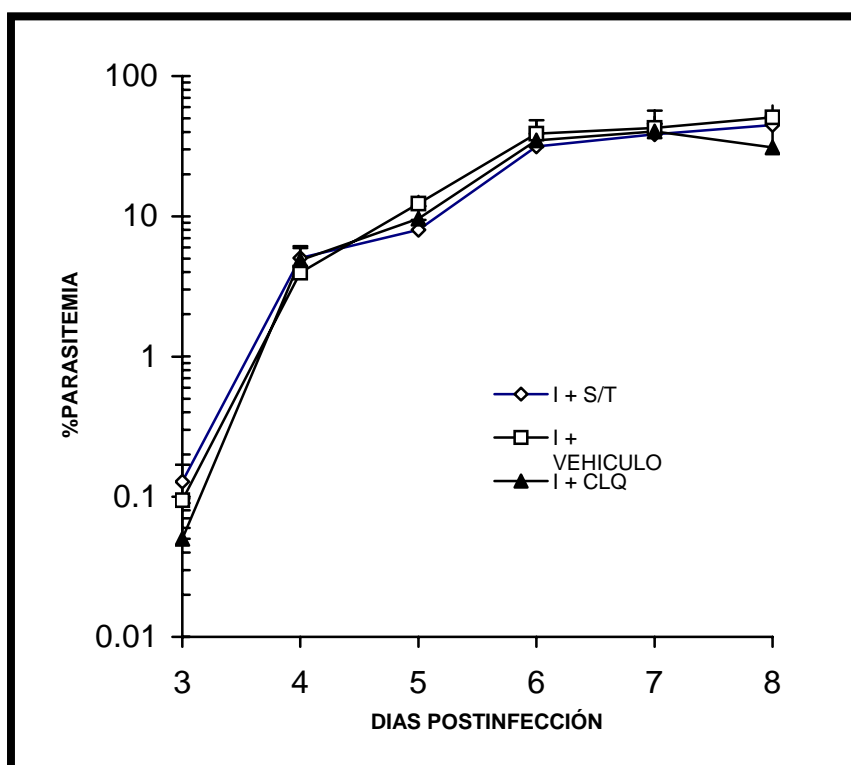
## 10. DIAGRAMA DE FLUJO



## 11. RESULTADOS

### 11.1 Cinética de la parasitemia

Se infectaron 3 grupos de ratones BALB/c por inyección intravenosa utilizando con *P. yoelii* 17XL por ratón. El primer grupo se dejó sin tratamiento como control de la infección (I + S/T), al segundo grupo se le administró únicamente el vehículo al día 7 post infección (I + vehículo) y al tercer grupo se le trató con cloroquina (I + CLQ) en el mismo día. La parasitemia se determinó diariamente en cada uno de los grupos a partir del día 3 después de la infección. Cada punto en la gráfica representa la media geométrica de los resultados obtenidos por día en cada grupo. La parasitemia en los tres grupos fue muy similar hasta el día 7 post-infección que fue cuando en el grupo tratado se administró la cloroquina. El tratamiento con la droga disminuyó la parasitemia (Figura 4).



**Figura 4. Cinética de la parasitemia en ratones BALB/c infectados con *P. yoelii* 17XL.** Ratones infectados sin tratamiento (I+S/T), ratones infectados y en los tratados con vehículo (I + vehículo) y los ratones infectados y tratados con cloroquina (I + CLQ). La administración del medicamento fue el día 7 post-infección.

## 11.2 Pérdida de peso

Este análisis se desarrollo para evaluar si el tratamiento con cloroquina podría modificar la pérdida de peso en los ratones infectados con *Plasmodium yoelii* 17XL. Los grupos de ratones infectados se pesaron diariamente durante todo el experimento. El peso corporal registrado un día antes de la infección se consideró como el 100%, la pérdida de peso se calculo en relación al 100%. En todos los grupos se observó que a medida que avanzó la parasitemia los ratones mostraron un decremento en aproximadamente un 15% de su peso corporal y aunque se observaron pequeñas diferencias entre los grupos no fueron estadísticamente significativas cuando se compararon con el grupo tratado con cloroquina (Figura 5).

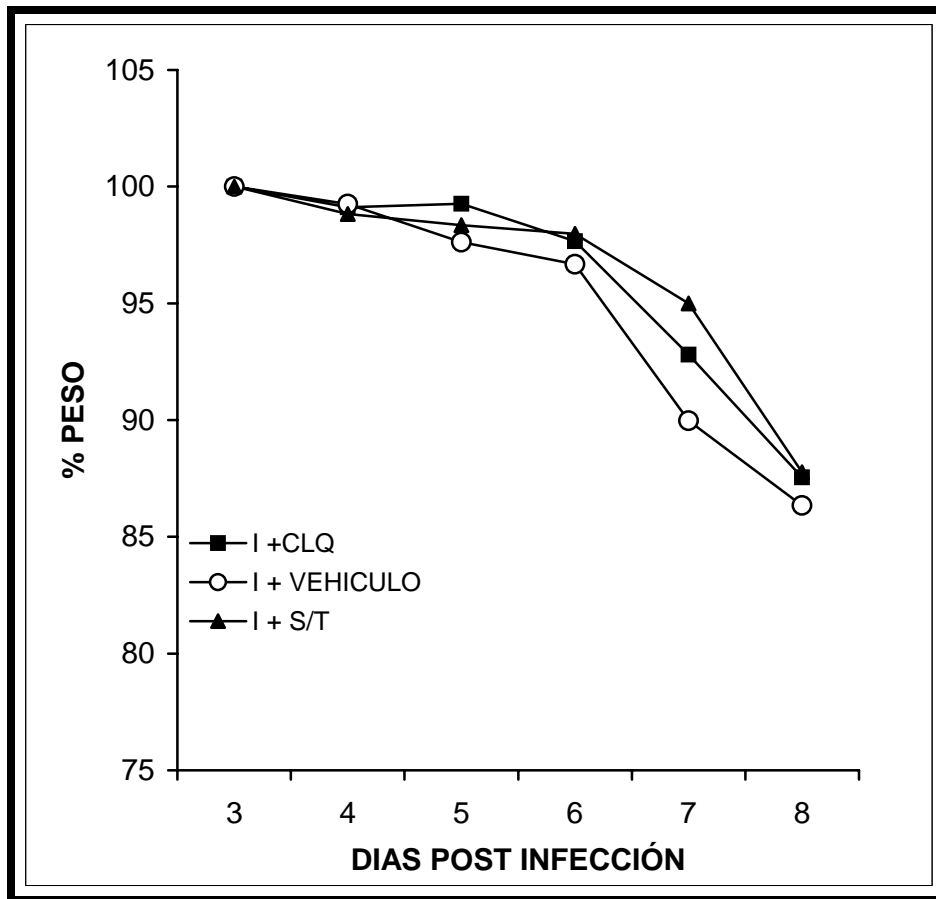
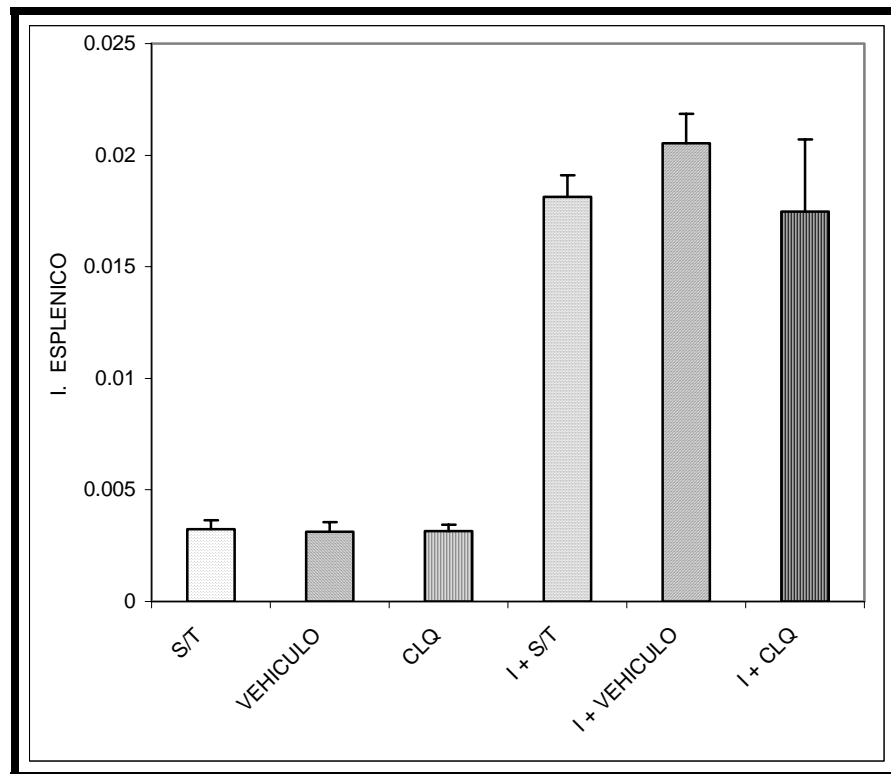


Figura 5. Pérdida de peso de ratones infectados con *P. yoelii* 17 XL tratados con cloroquina en el día 7 post-infección

### 11.3 Evaluación del índice esplénico.

Para evaluar como la cloroquina influía sobre el tamaño del bazo se formaron 6 grupos de ratones; El grupo 1 se utilizó como control (S/T), el grupo 2 recibió únicamente el vehículo (VEH); el grupo 3 recibió una sola dosis de cloroquina (CLQ) un día antes del sacrificio. Los 3 grupos restantes se infectaron con *P. yoelii* 17XL, el grupo 4 se trató con cloroquina (I + CLQ), al grupo 5 se le administró el vehículo (I + VEH) y al tercer grupo se le dejó sin tratamiento (I + S/T) como control, el índice esplénico únicamente se determinó el día 8 post-infección que fue el día del sacrificio de todos los ratones. La infección con el *P. yoelii* 17XL indujo un incremento muy importante en el índice esplénico, el mayor aumento se presentó en los ratones tratados con el vehículo. La cloroquina disminuyó el índice esplénico sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 6).



**Figura 6. Efecto de la cloroquina sobre el índice esplénico.**- Tres grupos de ratones se infectaron con *P. yoelii* 17XL, un grupo se trató con cloroquina (I + CLQ), otro se le administró vehículo (I +VEH) y un tercero se dejó sin tratar (I + S/T); los otros 3 grupos se dejaron sin infectar: a uno se le administró cloroquina (CLQ), otro se trató con el vehículo (VEH) y el tercer grupo se dejó sin tratamiento (S/T). Cada barra representa el promedio de 5 ratones por grupo.

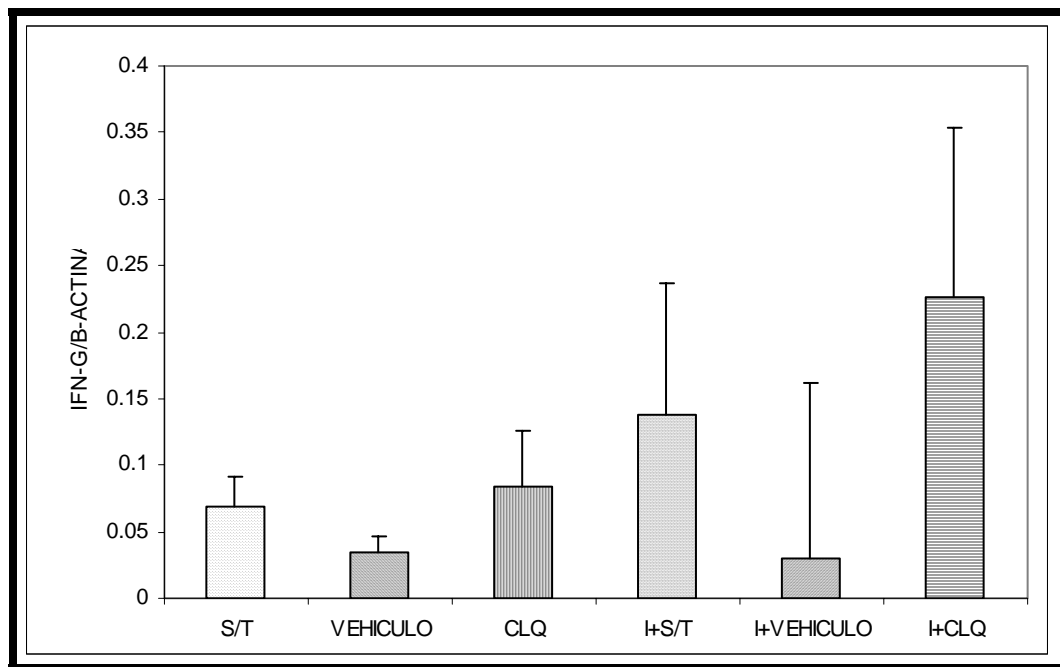
#### **11.4 Evaluación de la expresión de genes asociados a la apoptosis.**

Estos ensayos se desarrollaron para investigar si el tratamiento con cloroquina podría modificar los niveles de expresión de algunos genes asociados con la apoptosis, para lo cual se utilizó el bazo que se extrajo de los grupos de ratones descritos en el punto anterior. El día 8 post-infección se sacrificaron todos los grupos de ratones, se les extrajo el bazo y se obtuvo el RNA mensajero, se retrotranscribió y el DNA complementario obtenido, se utilizó para amplificar por PCR simultáneamente el gene constitutivo  $\beta$ -actina y el gene a evaluar. Se utilizó electroforesis en gel de acrilamida al 5% para separar los amplicones. El gel se tiñó con bromuro de etidio y las bandas se visualizaron con un transiluminador de luz ultravioleta acoplado a una cámara de video. La imagen se digitalizó y la densidad de cada banda se cuantificó con el software del analizador de geles Gel Doc. Con los valores de densitometría se construyeron graficas y la expresión de cada gene se calculó en relación a la expresión del gen constitutivo.



### 11.4.1 Expresión de IFN- $\gamma$ .

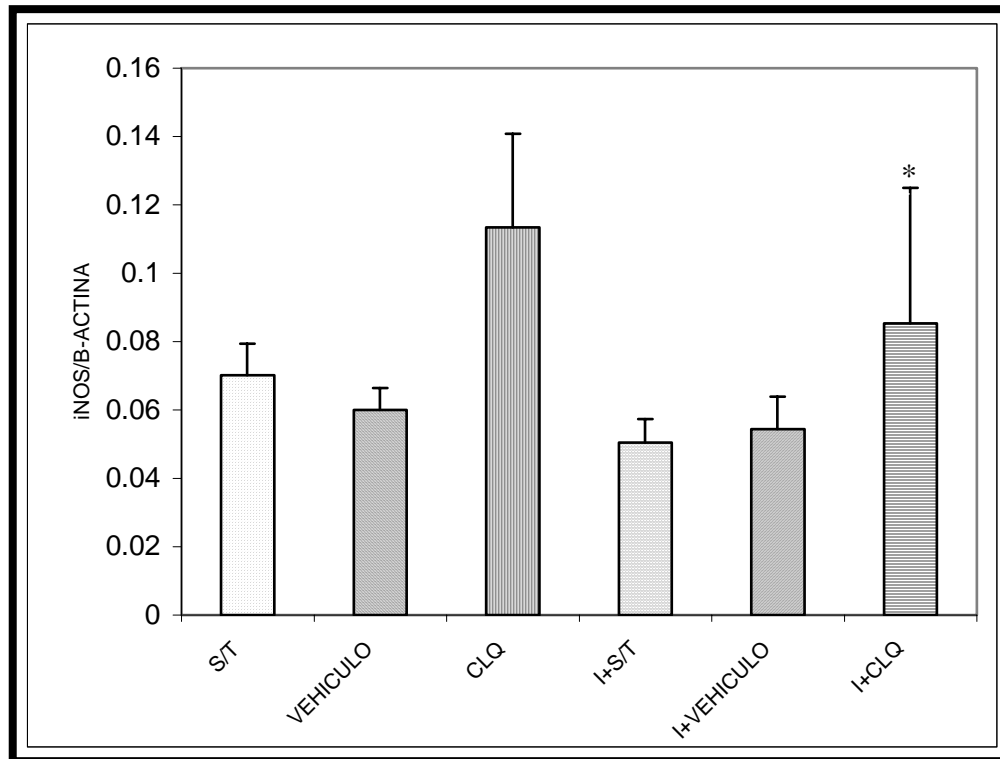
La infección con *Plasmodium* incrementó los niveles de expresión de IFN- $\gamma$ , puesto que en los grupos infectados los valores fueron mayores y con mayor variación que en los grupos no infectados. La cloroquina incrementó los niveles de expresión de IFN- $\gamma$  tanto en el grupo de ratones infectados como en el de los sanos (Figura 7).



**Figura 7. Efecto de la cloroquina sobre la expresión de IFN- $\gamma$  en ratones infectados con *P. yoelii* 17XL.** Grupo infectado y tratado con cloroquina (I + CLQ); grupo infectado tratado con vehículo (I + VEH) y grupo infectado sin tratamiento (I + S/T); otros 3 grupos se dejaron sin infectar: a uno se le administró cloroquina (CLQ), otro se trató con el vehículo (VEH) y el tercer grupo se dejó sin tratamiento (S/T). Cada barra representa el promedio de la expresión de IFN- $\gamma$  en relación a la expresión del gene constitutivo  $\beta$ -actina en 5 ratones por grupo.

### 11.4.2 Expresión de iNOS.

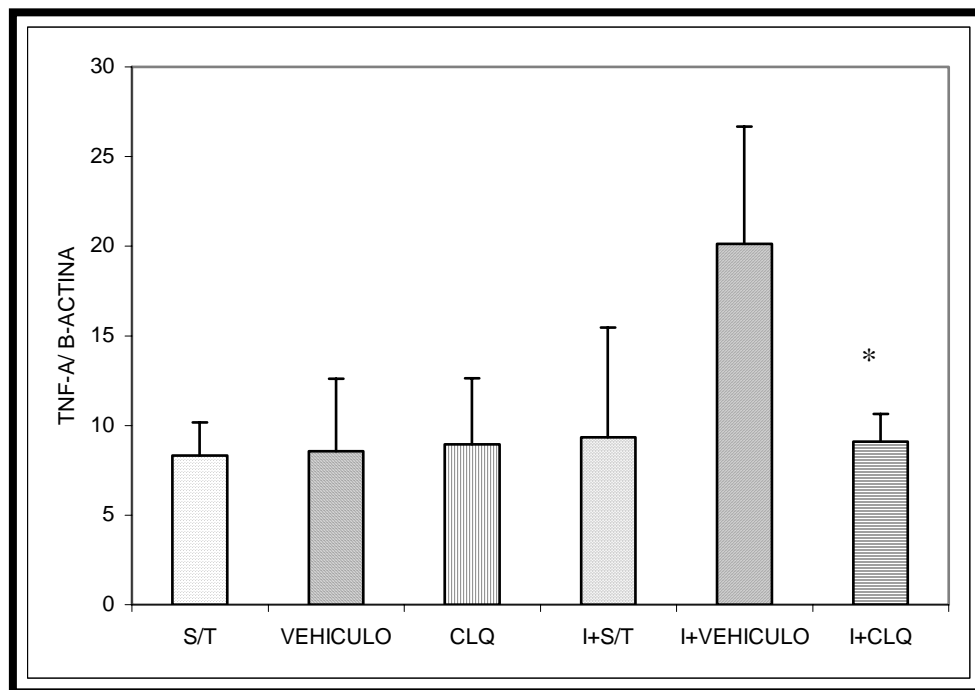
La infección con *Plasmodium yoelii* 17XL disminuyó la expresión de iNOS. El tratamiento con cloroquina indujo un incremento en la expresión del gene tanto en ratones sanos como en los infectados, sin embargo el aumento en estos últimos fue menor que en los controles, la diferencia en la expresión de iNOS del grupo tratado con cloroquina y el grupo control infectado y tratado con vehículo fue estadísticamente significativa como lo designa el asterisco (Figura 8).



**Figura 8. Efecto de la cloroquina sobre la expresión de iNOS en ratones infectados con *P. yoelii* 17XL.** Grupo infectado y tratado con cloroquina (I + CLQ); grupo infectado tratado con vehículo (I +VEH); grupo infectado sin tratamiento (I + S/T); 3 grupos se dejaron sin infectar: a uno se le administró cloroquina (CLQ), otro se trató con el vehículo (VEH) y el tercer grupo se dejó sin tratamiento (S/T). Cada barra representa el promedio de la expresión de iNOS en relación a la expresión del gene constitutivo β-actina en 5 ratones por grupo. El \* denota diferencia estadísticamente significativa con relación al grupo infectado y tratado con vehículo y el tratado con cloroquina.

### 11.4.3 Expresión de TNF- $\alpha$ .

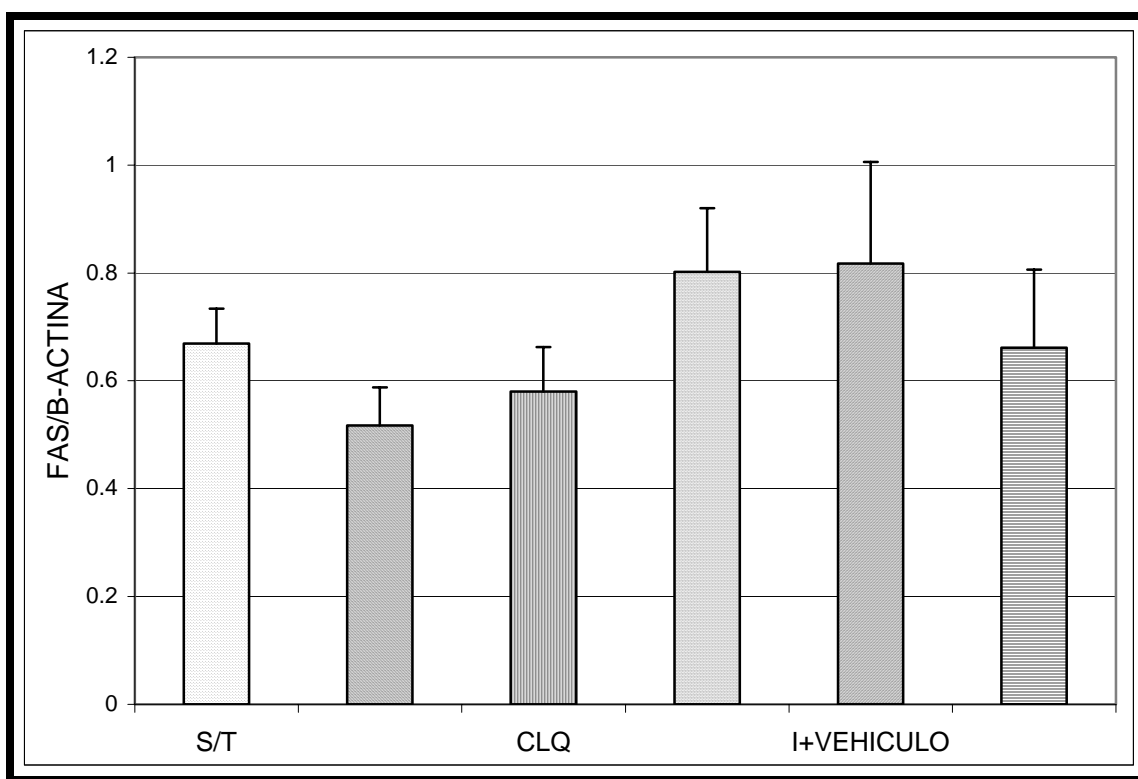
La infección con *Plasmodium yoelii* 17XL incrementó los niveles de expresión del gene que codifica para TNF- $\alpha$  en el grupo de ratones que se trató con el vehículo. Cuando esos valores se compararon con los niveles que alcanzaron los ratones infectados y tratados con cloroquina se observó que la droga disminuyó la expresión del gene en los ratones infectados y esa diferencia fue estadísticamente significativa, sin embargo, los niveles de expresión de TNF- $\alpha$  en los ratones infectados y sin tratar no se modificaron en relación a los grupos no infectados (Figura 9).



**Figura 9. Efecto de la cloroquina sobre la expresión de TNF- $\alpha$  en ratones infectados con *P. yoelii* 17XL.** Grupo infectado y tratado con cloroquina (I + CLQ); grupo infectado tratado con vehículo (I +VEH); grupo infectado sin tratamiento (I + S/T); 3 grupos se dejaron sin infectar: a uno se le administró cloroquina (CLQ), otro se trató con el vehículo (VEH) y el tercer grupo se dejó sin tratamiento (S/T). Cada barra representa el promedio de la expresión de TNF- $\alpha$  en relación a la expresión del gene constitutivo  $\beta$ -actina en 5 ratones por grupo. El \* denota diferencia estadísticamente significativa con relación al grupo infectado y tratado con vehículo y el tratado con cloroquina.

#### 11.4.4 Expresión de Fas.

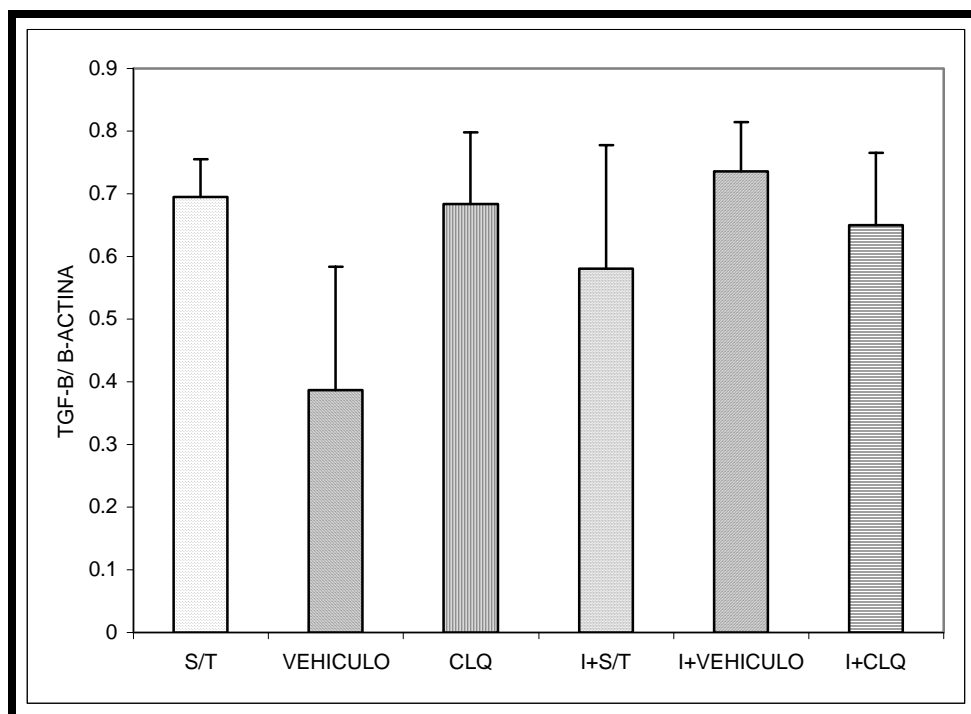
La infección con *Plasmodium yoelii* 17XL incremento los niveles de expresión del gene proapoptótico Fas. El tratamiento con cloroquina disminuyó la expresión del gene en los ratones infectados, sin embargo esa disminución no fue estadísticamente significativa (Figura 10).



**Figura 10. Efecto de la cloroquina sobre la expresión de Fas en ratones infectados con *P. yoelii* 17XL.** Grupo infectado y tratado con cloroquina (I + CLQ); grupo infectado tratado con vehículo (I +VEH); grupo infectado sin tratamiento (I + S/T); 3 grupos se dejaron sin infectar: a uno se le administró cloroquina (CLQ), otro se trató con el vehículo (VEH) y el tercer grupo se dejó sin tratamiento (S/T). Cada barra representa el promedio de la expresión de Fas en relación a la expresión del gene constitutivo  $\beta$ -actina en 5 ratones por grupo.

#### 11.4.5. Expresión de TGF- $\beta$

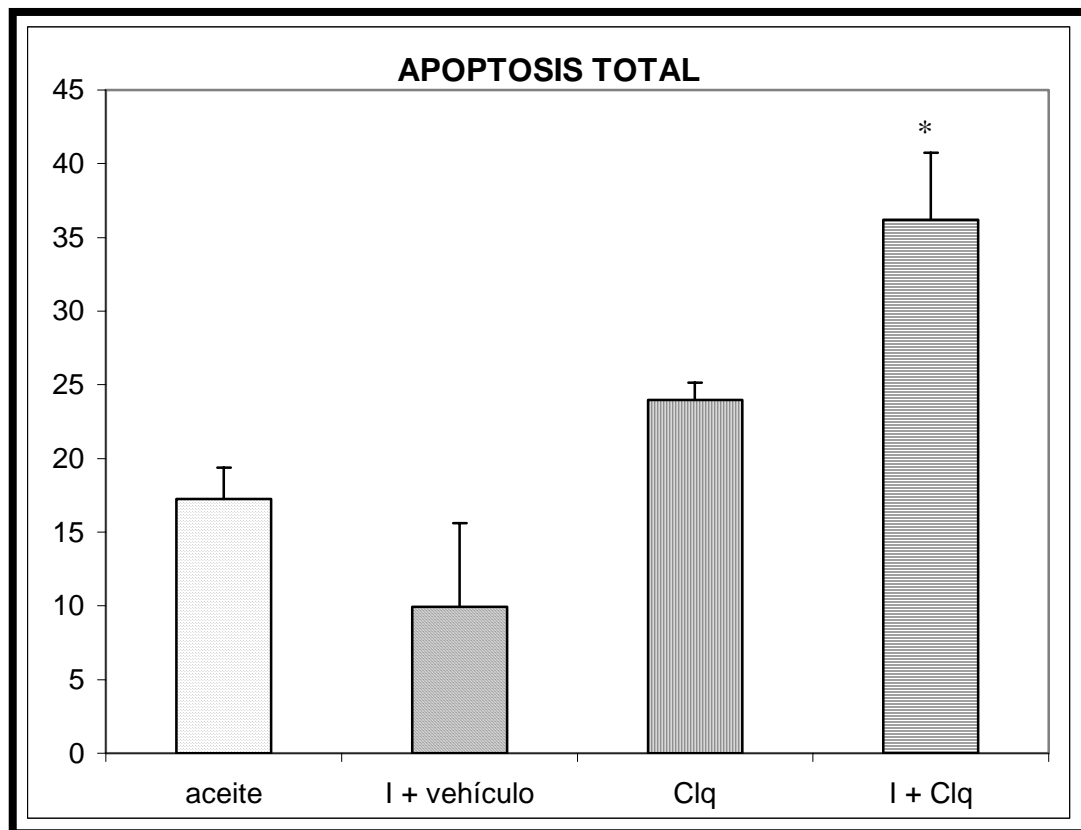
La infección con *Plasmodium* incremento los niveles de expresión de TGF- $\beta$  en los ratones a los que se les administró el vehículo, pero esta diferencia no resultó estadísticamente significativa. El tratamiento con cloroquina no modificó los niveles de expresión de TGF- $\beta$  en los ratones no infectados, mientras que en los parasitados los niveles disminuyeron, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 11).



**Figura 11. Efecto de la cloroquina sobre la expresión de TGF- $\beta$  en ratones infectados con *P. yoelii* 17XL.** 3 grupos se dejaron sin infectar: a uno se le administró cloroquina (CLQ), otro se trató con el vehículo (VEH) y el tercer grupo se dejó sin tratamiento (S/T). Grupo infectado y tratado con cloroquina (I + CLQ); grupo infectado y tratado con vehículo (I +VEH); grupo infectado sin tratamiento (I + S/T); Cada barra representa el promedio de la expresión de TGF- $\beta$  en relación a la expresión del gene constitutivo  $\beta$ -actina en 5 ratones por grupo.

### 11.5 Apoptosis en las células de bazo.

Puesto que la cloroquina es un fármaco que induce apoptosis, realizamos esta determinación para evaluar como la droga podría afectar la apoptosis de las células de bazo en los ratones infectados con *Plasmodium yoelii* 17XL. Se utilizaron 4 grupos de ratones, dos se infectaron con *P. yoelii* uno se trató con la droga y el otro solo con el vehículo. Como controles se utilizaron otros dos grupos de ratones sin infectar y tratados con el vehículo o con cloroquina. Los ratones se sacrificaron el día 8 post-infección, se extrajo el bazo y la apoptosis se evaluó por citometría de flujo utilizando la técnica de anexina V. El *Plasmodium yoelii* 17XL inhibe la apoptosis en las célula de bazo, mientras que el tratamiento con cloroquina aumentó de manera significativa la apoptosis total tanto en el grupo de ratones infectados como en los controles (Figura 12).



**Figura 12. Efecto de la cloroquina sobre la apoptosis de las células de bazo en ratones infectados con *P. yoelii* 17XL.** A un grupo se le administró el vehículo (VEH), a otro le trató cloroquina (CLQ), el tercer grupo se infectó con el plasmodio y se le administró el vehículo (I + VEH) y el cuarto grupo se infectó con el plasmodio y se trató con cloroquina (I + CLQ). La apoptosis se evaluó por citometría de flujo con la técnica de anexina V.

## 12. ANALISIS DE RESULTADOS

La cloroquina es un medicamento que se ha utilizado ampliamente como droga antimalárica, interesantemente, la cloroquina resultó ser muy versátil y se le han encontrado diversas aplicaciones terapéuticas en el tratamiento de desordenes inmunológicos como la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico o el síndrome linfoproliferativo (Meng et al, 1997; Potvin et al, 1997), en estas enfermedades la mejoría en el cuadro clínico del paciente se ha atribuido a la actividad pro-apoptótica que tiene la droga. Dado que la apoptosis es un mecanismo de regulación de la respuesta inmune y que en malaria se ha descrito un aumento de linfocitos en apoptosis, consideramos importante estudiar el efecto de la cloroquina sobre la expresión de diferentes genes que codifican para moléculas relacionadas con la apoptosis, en un modelo experimental de malaria murina. Elegimos el bazo porque es en ese órgano donde se ha descrito se lleva a cabo la destrucción del *Plasmodium* y donde existe una intensa activación de linfocitos.

Lo primero que estudiamos fue la parasitemia y se observó que aunque el tratamiento con la droga fue solo un día, la droga eliminó una buena parte de la carga parasitaria. La cinética de las parasitemias de los ratones que recibieron tratamiento con cloroquina con respecto a la de los ratones controles parasitados muestra diferencia en el día 8 post-infección (Figura 4), este resultado se complementó con la disminución en el índice esplénico de los ratones infectados y que se trataron con cloroquina (Figura 6).

Relacionado con la parasitemia, está la pérdida de peso puesto que la infección genera la producción de moléculas tales como el TNF- $\alpha$  e IL-1 ambas asociadas con la caquexia en los individuos infectados, además el TNF- $\alpha$  también esta involucrado en la señalización para muerte por apoptosis. En nuestros resultados no pudimos observar diferencia estadísticamente significativa en relación a la pérdida de peso (Figura 5), probablemente porque la droga se administró solamente un día, sin embargo dado que la droga disminuye la parasitemia

teóricamente la estimulación inmunológica debería disminuir y con ello se esperarían un decremento en el TNF- $\alpha$  y que como consecuencia los ratones recuperasen peso.

La infección por *Plasmodium* activa de forma intensa al sistema inmune y por lo tanto, se desencadena entre otros fenómenos una elevada activación y proliferación de las células del bazo, razón por la cual en nuestros experimentos evaluamos el índice esplénico que nos permite conocer en relación al peso total del ratón, el tamaño del bazo y por lo tanto, es una medida de la activación y proliferación celular. En nuestros experimentos, los resultados mostraron que los ratones infectados incrementaron en aproximadamente 4 veces su índice esplénico en relación a los controles no infectados. El tratamiento con cloroquina disminuyó el índice esplénico, sin embargo esta diferencia no resultó estadísticamente significativa (Figura 5).

Diversos investigadores han mostrado que en malaria se incrementa la apoptosis (Hembly et al, 2000; Sánchez-Torres, 2001), y dado que la cloroquina es una droga pro-apoptótica decidimos investigar como el tratamiento con esta droga podría modificar la expresión de diferentes genes asociados con apoptosis.

Estudiamos el efecto del tratamiento con cloroquina sobre la expresión de IFN- $\gamma$ . Esta molécula es una citocina inflamatoria que presenta una considerable actividad *in vitro* e *in vivo* sobre *Plasmodium sp* especialmente al infectar a los hepatocitos (Sedegah et al, 1994) además de que es una molécula esencial para la resolución de la parasitemia por su capacidad de activar macrófagos (Winkler et al, 1998). Nuestros resultados sugieren que la droga incrementa la síntesis de IFN- $\gamma$  (Figura 7), lo cual discrepa de lo descrito por otros autores (Landewe et al 1992; Maheshwari et al, 1990) quienes describen que cloroquina inhibe la producción de IFN- $\gamma$ . Probablemente las diferencias en los resultados se deban en el primer caso a que nosotros utilizamos un sistema *in vivo* y no cultivos celulares



*in vitro* y en el segundo caso a que nuestros estudios se realizaron en ratón con una cepa de *Plasmodium* diferente.

La iNOS se expresa principalmente por células del sistema inmune como, macrófagos y neutrófilos que juegan un papel importante en la defensa antimicrobiana produciendo óxido nítrico (NO). El papel del NO en la respuesta inmune en malaria aún está muy controvertido, mientras algunos autores proponen que ayuda a eliminar la parasitemia (Taylor y Smith, 1999) otros no le dan importancia (Favre et al, 1999; Van der Heyde et al, 2000). Sin embargo, se ha descrito que el NO puede modular la expresión de diferentes genes involucrados en apoptosis, por lo tanto decidimos analizar si la cloroquina puede modificar los niveles de expresión de la iNOS que es la enzima que lo sintetiza en los ratones infectados con malaria. Nuestros resultados indican que la infección con *Plasmodium yoelii* 17XL (un parásito letal) inhibe la expresión de iNOS y que el tratamiento con cloroquina incrementa la expresión del gene (Figura 5). En experimentos realizados en nuestro grupo de trabajo (Hernández-Ruiz, 2003) hemos observado que el inhibir la síntesis de óxido nítrico con aminoguanidina, no modifica la parasitemia pero sí incrementa la mortalidad de los ratones por lo que los resultados sugieren un probable papel inmunomodulador del NO.

La infección con *Plasmodium yoelii* 17XL activa tanto a los linfocitos Th1 como a los Th2. En los ratones que sobreviven a la infección, se ha observado que se inicia con una respuesta tipo Th1 que hace un cambio a Th2 al final de la infección, si se conserva una respuesta tipo Th1 a lo largo de la infección los ratones no pueden controlar la parasitemia y por lo tanto mueren (Legorreta-Herrera et al, 2004). En este trabajo estudiamos la expresión de TNF- $\alpha$  en ratones infectados con *Plasmodium* y tratados con cloroquina, porque es una molécula involucrada en la señalización para apoptosis y porque su síntesis se incrementa en malaria. Nuestros resultados indican que la infección con *P. yoelii* 17XL incrementa la expresión de TNF- $\alpha$  y que el tratamiento con cloroquina revierte ese incremento de forma estadísticamente significativa (Figura 9).

Existe evidencia que la infección con malaria incrementa la expresión de Fas y Fas ligando en el bazo y que una importante proporción de la población de linfocitos muere por apoptosis (Riccio EK, 2003). Nuestros resultados muestran una ligera disminución en su expresión, lo cual podría explicarse si consideramos que la apoptosis es un proceso algunas veces imperceptible por la rapidez con la que se desarrolla y que, dependiendo del tiempo en el que se detecte, la célula pudiera estar expresando el receptor Fas o bien ya se eliminó por apoptosis; otra probable explicación es que la muerte por apoptosis se lleva a cabo por un vía independiente de Fas como lo propone Austin Taylor et al, 2000 (Figura 10).

El factor transformador del crecimiento  $\beta$ , se caracteriza por su actividad reguladora negativa de la inmunidad y la hematopoyesis, inhibe la proliferación y activación de los linfocitos T y B, de los macrófagos y de las células endoteliales, además de suprimir la producción de la mayor parte de las linfocinas y monocinas (Abbas, 2001). Se considera un moderador esencial de la inflamación en la malaria inducida en ratones (Omer et al, 2003). Los ratones infectados y tratados con cloroquina mostraron una disminución en la expresión de TGF- $\beta$  que no resulto estadísticamente significativa (Figura 11), sin embargo, este fenómeno ya se ha descrito por otros autores en casos de malaria severa (Li et al, 2003; Chaiyaraj et al, 2004).

El incremento en la expresión IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e iNOS después de la administración de cloroquina en los ratones infectados sugiere que esta droga modula la respuesta inmune en malaria inclinando la respuesta hacia el tipo Th1.

Finalmente, con respecto a la determinación de la apoptosis, nuestros resultados indican que el *P. yoelii* 17XL inhibe la apoptosis en las células de bazo (Figura 12), este resultado es interesante puesto que se ha descrito que la infección con *P. falciparum* y *P. chabaudi* AS inducen apoptosis de linfocitos T en humanos y ratones respectivamente ( Riccio EK et al, 2003; Helmby et al, 2000; Sánchez-

Torres et al, 2001), en nuestros experimentos utilizamos otro *Plasmodium*, en una cepa de ratones diferente (BALB/c) y cuya infección es letal, lo que podría explicar las diferencias encontradas. En los ratones infectados el tratamiento con cloroquina incrementa la apoptosis, este resultado correlaciona con lo descrito en la literatura donde se describe que la cloroquina posee la habilidad de inducir apoptosis (Picot, 1997), todo lo anterior sugiere que la apoptosis podría estar involucrada en la acción de la cloroquina sobre el parásito.

### 13. CONCLUSIONES.

- La infección con *Plasmodium yoelii* 17XL inhibe la apoptosis de las células de bazo.
- El tratamiento con cloroquina induce apoptosis en las células de bazo tanto en ratones normales como en los ratones infectados con *Plasmodium yoelii* 17XL.
- La cloroquina induce apoptosis por una vía que es independiente de Fas, dado que no se encontraron diferencias en la expresión de este gen en relación al grupo control.
- La cloroquina incrementó la expresión de IFN- $\gamma$ , iNOS, TNF- $\alpha$  y Fas, pero disminuyó la expresión de TGF- $\beta$ , por lo tanto el tratamiento con esta droga favorece una respuesta inmune tipo Th1.

## 14. ANEXOS

### 14.1 SOLUCIONES

- Acril-Bisacrilamina al 30%

Acrilamida	29.0 g
Bisacrilamida	1.0 g
Agua bidestilada cbp	100ml

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

- Agua DEPC 0.1%

Dietilpirocarbonato	1 g
Agua bidestilada	cbp 1000ml

NOTA. Distribuir en frascos de 250ml, dejar actuar el DEPC durante 4-12 horas y remover el DEPC por esterilización.

- Amortiguador de carga 5 X

Reactivo	Concentración final.
TRIS pH= 8	50mM
EDTA PH=8	75mM
SDS	0.5% P/V
Sacarosa	30% P/V
Ficoll	10.0% P/V
Azul de bromofenol	0.12% P/V
Xilencianol	0.12% P/V

NOTA: Guardar a temperatura ambiente.

- Amortiguador de PCR 10X con Mg

Stock	Reactivo	[Final] en el tubo	10 ml PCR 10X	[10X]
De Rx = PCR 1X				
1M	MgCl <sub>2</sub>	2mM	0.2ml	20mM
2.5M	KCl	50mM	2,0ml	500mM
2.0M	Tris pH =8.3	10mM	0.5ml	100mM
20mg/ml	Gelatina	0.1 mg/ml	0.5ml	1mg/ml
	Agua millipore		6.8ml	

NOTA. Distribuir el amortiguador de PCR 10X en tubos eppendorff de 1000µl.

- Gel de acrilamida al 5%

	100ml (2 geles 16X16)
Agua bidestilada	72.2ml
TBE 10X	10.0ml
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	16.8ml
APS 10%	950µl
TEMED	100µl

- PBS (solución amortiguadora de fosfatos)

NaCl	8.0g
KCl	0.2g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24g
Agua millipore	cbp 1000ml

NOTA. Hacer alícuotas en frascos de 250ml y esterilizar

- Persulfato de amonio (APS) al 10%

Persulfato de amonio	10.0g
Agua bidestilada	cbp 100ml

NOTA : Preparar alícuotas de 500  $\mu$ l y guardar en el congelador a -20°C

- TBE (amortiguador Tris –Ácido Bórico – EDTA )10x .

Tris 1M	121.10g
Acido borico 1 M	61 .83g
EDTA 50 m M	14.61g
Agua bidestilada	cbp 1000ml

NOTA : Calentar la solución para disolver mas rápido los reactivos

## 15. BIBLIOGRAFÍA

- Arend MJ & Wyllie AH. Apoptosis: mechanics and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol.* 1991 223:254.
- Austin Taylor M, Bennett M, Kumar V, Schatzle JD. Functional defects of NK cells treated with chloroquine mimic the lytic defects observed in perforin-deficient mice. *J Immunol.* 2000 165: 5048-5053.
- Castro-Gomez, Taype A, Espinoza J. Producción de TNF- $\alpha$  por monocitos de pacientes con formas clínicas diversas de tuberculosis y polimorfismo genético con el locus humano- 308 TNF- $\alpha$  en el Perú. *Enf del Tórax.* 2003; 46: 1027-2674.
- Chaiyaroj SC, Rutta AS, Muenthaisong K, Watkins P, Na Ubol M, Looareeuan S. Reduced level of transforming growth factor- $\beta$  1, inteleukin 12 and increased migration inhibitory factor are associated with severe malaria. *Acta Trop.* 2004 89:319-327.
- Favre N, Ryffel B, and Rudin W, Parasite killing in murine malaria does not require nitric oxide production. *Parasitology.* 1999 118:139-143.
- Gause WC & Adamovicz. Use of PCR to quantitative relative deferences in gene expression. En: Diefenbach CW & Dveksler GS, PCR primer: a laboratory manual. United States of America: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995; 293-311
- Good MF, Xu H, Wykes M, Engwerda CR. Development and Regulation or Cell-Mediated Immune Responses to the Blood Stages of Malaria: implications for Vaccine Research. *Inmunology* 2005. 23:69-99.



- Greenwood BM. The epidemiology of malaria. *Ann Trop Med.* 1997 91: 763-769.
- Helmbj H, Jonson G and Troye-Blomberg M. Cellular changes and apoptosis in the spleens and peripheral blood of mice infected with blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS. *Infect Immun.* 2000 65: 1485-1490.
- Hernández-Ruiz J. Participación del oxido nítrico y la apoptosis en la regulación de la respuesta inmune en malaria murina. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. UNAM-Facultad de Estudios Superiores Zaragoza México D.F. 2004.
- Hoffe P. *Medical Molecular Genetics.* Fence Creek Publishing. Baltimore 1998: 119-126.
- Hommel M; *Immunology of malaria.* WHO, Heath Co-Operation Papers, Quaderni, Di Coperation Sanitaria. Geneva: WHO 1996 15: 53-70.
- Ingraham John L, Ingraham Catherine A., *Introduction to Microbiology.* Ed Brooks/Cole, segunda edición, Estados Unidos 2000: 741-743.
- Jason J, Archibald L, Nwanyanwu O, Bell M, Buchanan I, Larned J, et al. *Citokynes and Malaria Parasitemia.* *Clin Immunol* 2001 100: 208-218.
- Kiechle FL & Zhang X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications *Clin Chem Acta.* 2002 326: 27-45.
- Koneman EW, Stephen D, Allen WM, Janda P, Scheckenberger C, Washington C, Winn H. *Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas a Color,* Editorial Panamericana, Quinta Edición, 1999: 1092-1094.

- Landewe RB, Miltenburg AM, Breedveld FC, Daha MR, Dijkmans BA. Cyclosporine and chloroquine synergistically inhibit the interferon-gamma production by CD4 positive and CD8 positive synovial T cell clones derived from a patient with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1992 19: 1353-1357.
- Li C, Sanni LA, Omer F, Riley E, Langhorne J. Pathology of *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection and mortality in interleukin-10-deficient mice are ameliorated by anti-tumor necrosis alpha and exacerbated by anti-transforming growth factor beta antibodies. *Infect Immun.* 2003 71:4850-4856.
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM, Principios de Bioquímica, Segunda edición, Ediciones Omega, S. A 1993.
- Legorreta-Herrera M, Ventura Ayala ML, Licon-Chavez RN, Soto-Cruz I. & Hernández-Clemente FF. Early treatment during a primary malaria infection modifies the development of cross immunity. *Parasite Immunol.* 2004, 26, 7-17.
- Long CA, Immunity to blood stages of malaria. *Curr Opin Immunol* 1993 5:548-556.
- Maheshwari RK, Srikantan V, Bhartiya D, Puri SK, Dutta GP, Dhawan BN. Effects of interferon in malaria infection. *Immunol Lett.* 1990 25: 53-57.
- Meng XW, Feller JM, Ziegler JB, Pittman SM, Ireland CM. Induction of apoptosis in peripheral blood lymphocytes following treatment in vitro with hydroxycloquine. *Arthritis Rheum.* 1997 40: 927-935.
- Panduro Arturo, Biología Molecular en la Clínica, Editorial Mc.Graw-Hill Interamericana, 2000, pp. 31-43.

- Paris George E. Hypothesis links emergence of chloroquine-resistant malaria and other intracellular pathogens and suggests a new strategy for treatment of diseases cause by intracellular parasites. *Medical Hypotheses* (2004) 62, 354-357.
- Phillips RC, Mathers KE & Taylor-Robinson AW. T. cells in immunity to *Plasmodium chabaudi chabaudi*: operation and regulation of diferent pathways of protection. *Res Immunol* 1994; 145: 405-411.
- Potvin F, Petitclerc E, Marceau F, Poubelle PE. Mechanisms of action of antimalarials in inflammation: induction of apoptosis in human endothelial cells. *J Immunol*. 1997 158: 1872-1879.
- Riccio EK, Junior IN, Riccio LR, das Gracias-Alecrim M, Corte-Real S, Morgado M, Daniel-Ribeiro CT & de Fatima-Ferreira-Da-Cruz M. Malaria associated apoptosis is not significantly correlated with Either parasitemia or the number of previous malaria attacks. *Parsitol. Res.* 2003 90: 9-18.
- Rodella L, Rezzani R, Agostini C, Bianchi R. Expresión of NADPH-diaphorase and localization with in the brain neurons of the rat following visceral noxious stimulation. *Brain Res.* 1999 834: 173-177.
- Rodríguez-Dominguez J. las enfermedades transmitidas por vector en México. *Rev Fac Med UNAM* 2002 3: 126-130.
- Roitt Ivan, Jonathan Brostoff, David Male, *Inmunology*, 5a Edition, Editorial Harcourt, Londres 2000: 338-340

- 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.
- Rojas O. Inmunología de Memoria. Panamericana 2ed, México; 2001: 24-30.
- Sánchez-Torres L, Rodríguez-Ropón A, Aguilar-Medina M & Favila-Castillo L. Mouse splenic CD4+ and CD8 T cells undergo extensive apoptosis during a *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS infection. Parasite Immunol. 2001 23:617-626.
- 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.
- Schwatz IK: Prevention of malaria, Infect This Clean North Am. 1992 6:313-331.
- Stainer RY, Ingraham JL, Wheelis, Painte PR. Editorial Reverte S.A. Segunda edición. Barcelona 1996: 694-696.
- Stuart Walker T. Microbiología, Editorial Mc-Graw-Hill Interamericana, Quinta edición, México 2000: 464-470.
- Tay Zavala J, Méndez-Cervantes F, Méndez-Oteo F. Microbiología y Parasitología Médicas, Segunda edición, México 1993: 374-389
- Taylor-Robinson AW, Regulation of immunity to malaria: valuable lessons learned from murine models. Parasitol Today 1995 11 335-341.

- Taylor-Robinson A, Kinetics of nitric oxide production during infection and reinfection of mice with *Plasmodium chabaudi*, Parasite Immunol. 1990 18: 425-430.
- Taylor-Robinson A & Phillips RS. Th1 and Th2 CD4+ T cell clones specific for *Plasmodium chabaudi* but not for unrelated antigen protect against blood stage *P. cabaudi* infection, J. Immunol. 1994 24: 158-164
- Titheradge M. Nitric Oxide Protocols. Humana Press, New Jersey; 1998: 75-79.
- Thorpe R, Wadhwa M, Bird CR & Mire-Sluis AR. Detection and measurement of cytokines. Blood Rev 1993; 15: 133-148.
- Toure- Balde A, Sarthour JL, Aribot G, Michel P, Trape JF, Rogier C & Roussilhon C. *Plasmodium falciparum* induces apoptosis in human mononuclear cells. Infect Immun. 1996 64: 744-750.
- 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.
- White E. Overview of apoptosis, Ingleterra: Amersham life science, 1996: 8-15.
- Williams GT. Programmed cell death: a fundamental protective response to pathogens. Trends Microbiol. 1994 2: 463-464.