



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FES ZARAGOZA

”EFECTO DE LA CLOROQUINA Y DE LA
PIRIMETAMINA SOBRE LA EXPRESIÓN
DE LOS GENES DE REGULACIÓN DE LA
RESPUESTA INMUNE EN MALARIA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

ADRIANA RAMOS AVILA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARTHA LEGORRETA
HERRERA

COMITÉ TUTOR: DRA. INGEBORG DOROTHEA BECKER FAUSER,
DRA. EMMA BERTA GUTIERREZ CIRLOS MADRID, DRA. MARTHA
LEGORRETA HERRERA, DR. FERNANDO GARCIA TAMAYO Y DRA.
ANA MARIA CEVALLOS GAOS

MÉXICO, D.F.

ABRIL, 2010



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 18 de enero de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **RAMOS AVILA ADRIANA** con número de cuenta **97221609** con la tesis titulada "**Efecto de la Cloroquina y de la Pirimetamina sobre la expresión de los genes de regulación de la respuesta inmune en malaria**", realizada bajo la dirección de la **DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA**:

Presidente: DRA. INGBORG DOROTHEA BECKER FAUSER
Vocal: DRA. EMMA BERTA GUTIERREZ CIRLOS MADRID
Secretario: DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA
Suplente: DR. FERNANDO GARCIA TAMAYO
Suplente: DRA. ANA MARIA CEVALLOS GAOS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 3 de marzo de 2010.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

AGRADECIMIENTOS

- Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.
- A la beca CONACYT No: 203583 CVU: 175795
- A los miembros del comité tutoral por el apoyo para la revisión de este proyecto: Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fauser, Dra. Emma Berta Gutierrez Cirlos Madrid, Dra. Martha Legorreta Herrera, Dr. Fernando García Tamayo, Dra. Ana María Cevallos Gaos.
- Al Dr.Armando Cervantes Sandoval por el apoyo en el tratamiento estadístico de los datos.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología Molecular de la FES Zaragoza, la parte de citometría de flujo en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, se recibió financiamiento de los proyectos CONACYT: 52782 y DGAPA: IN221104 y IN220310.

ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	2
3. Introducción.....	3
3.1 Antecedentes.....	3
3.2 Distribución geográfica de la malaria	3
3.3 Ciclo biológico del <i>Plasmodium</i>	4
3.4 Características clínicas de la malaria.....	5
3.5 Inmunidad en malaria	6
3.5.1 El papel de macrófagos y células dendríticas en la respuesta inmune en malaria	7
3.5.2 La participación de las células T CD4+ y T CD8+ en malaria.....	8
3.5.3 La participación de las células B en malaria.....	8
3.6 Las citocinas y su papel en malaria.....	9
3.6.1 Factor de necrosis tumoral- α (TNF- α)	10
3.6.2 Interferón - γ (INF- γ).....	11
3.6.3 Factor Transformador del Crecimiento- β (TGF- β).....	11
3.6.4 Interleucina - 10	12
3.6.5 Análisis de citocinas por RT-PCR.....	12
3.7 El papel de óxido nítrico en malaria.....	13
3.8 Tratamiento en malaria.....	16
4. Apoptosis.....	18
4.1 Generalidades de apoptosis.....	18
4.2 Genes FAS y BCL-2.....	19
4.3 Apoptosis en malaria.....	19
4.4 Detección de la apoptosis.....	20
5. Planteamiento del problema.....	22
6. Objetivos.....	23
6.1 Objetivo general.....	23
6.2 Objetivos particulares.....	23
7. Hipótesis.....	24

8. Material.....	25
8.1 Material biológico.....	25
8.2 Material de laboratorio.....	25
8.3 Equipo.....	25
8.4 Reactivos.....	26
9. Diseño experimental y metodología.....	28
9.1 Infección de los ratones.....	28
9.2 Tratamiento de los ratones.....	28
9.3 Sacrificio de los ratones y extracción del bazo.....	28
9.4 Evaluación de la parasitemia.....	28
9.5 Detección de la apoptosis con la técnica de Anexina V-FLUOS.....	30
9.6 Evaluación del fenotipo celular.....	30
9.7 Expresión de citocinas en el bazo por la técnica de RT-PCR.....	31
9.7.1 Extracción de ARN.....	31
9.7.2 Retrotranscripción.....	31
9.7.3 Amplificación de los genes por PCR.....	32
9.7.4 Electroforesis de los productos de PCR.....	32
9.8 Determinación de NO.....	33
9.9 Análisis estadístico de los resultados.....	34
10. Resultados.....	35
10.1 Parasitemia.....	35
10.2 Apoptosis en las células de bazo.....	35
10.3 Efecto del tratamiento con cloroquina o pirimetamina sobre los niveles de expresión del ARN mensajero que codifica para genes asociados con la apoptosis (FAS y BCL-2) en ratones infectados con <i>P. yoelii</i> 17XL.....	39
10.4 Expresión del ARN mensajero que codifica para genes asociados con el la respuesta inmune en malaria y con la apoptosis	40
10.4.1 Efecto del tratamiento con cloroquina o pirimetamina sobre los niveles de expresión del ARN mensajero que codifica para TNF- α en ratones infectados con <i>P. yoelii</i> 17XL	41

10.4.2 Niveles de expresión de ARN mensajero que codifica para IFN- γ en ratones infectados con <i>P. yoelii</i> 17XL tratados con cloroquina y pirimetamina.....	41
10.4.3 Efecto del tratamiento con cloroquina o pirimetamina sobre los niveles de expresión del ARN mensajero que codifica para TGF- β e IL-10 en ratones infectados con <i>P. yoelii</i> 17XL	42
10.4.4 Efecto del tratamiento con cloroquina o pirimetamina sobre los niveles de expresión del ARN mensajero que codifica para iNOS en ratones infectados con <i>P. yoelii</i> 17XL	44
11. Discusión de resultados	45
12. Conclusiones.....	51
13. Abreviaturas.....	53
14. Bibliografía.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica de malaria.....	4
Figura 2. Ciclo de vida del <i>Plasmodium</i>	4
Figura 3. Inmunidad en malaria.....	9
Figura 4. Representación esquemática de la técnica de PCR.....	13
Figura 5. Reacción química de Griess.....	16
Figura 6. Estructura química de la cloroquina.....	17
Figura 7. Estructura química de la pirimetamina.....	17
Figura 8. Representación esquemática del diseño experimental.....	29
Figura 9. Representación esquemática del diseño experimental de la técnica de Anexina V y citometría de flujo.....	30
Figura 10. Representación esquemática del diseño experimental de la técnica de RT-PCR.....	33
Figura 11. Representación esquemática del diseño experimental de la técnica de Griess.....	34
Figura 12. Representación esquemática de las conclusiones.....	52

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Efecto del tratamiento con cloroquina o con pirimetamina sobre la parasitemia de ratones BALB/c infectados con <i>P. yoelii</i> 17XL.....	35
Gráfica 2. Efecto del tratamiento con cloroquina o con pirimetamina sobre la apoptosis total de las células de bazo de ratones infectados con <i>P. yoelii</i> 17XL.....	36
Gráfica 3. Efecto del tratamiento con cloroquina o con pirimetamina sobre la apoptosis de las células TCD3+ de bazo de ratones infectados con <i>P. yoelii</i> 17XL.....	37
Gráfica 4. Efecto del tratamiento con cloroquina o con pirimetamina sobre la apoptosis de las células TCD4+ de bazo de ratones infectados con <i>P. yoelii</i> 17XL.....	38
Gráfica 5. Efecto del tratamiento con cloroquina o con pirimetamina sobre la apoptosis de las células TCD8+ de bazo de ratones infectados con <i>P. yoelii</i> 17XL.....	38
Gráfica 6. Efecto del tratamiento con cloroquina o con pirimetamina sobre la apoptosis de las células B de bazo de ratones infectados con <i>P. yoelii</i> 17XL.....	39
Gráfica 7. Efecto del tratamiento con cloroquina y con pirimetamina sobre la expresión de FAS (a) y BCL-2 (b) en las células de bazo de ratones infectados con <i>P. yoelii</i> 17XL.....	40
Gráfica 8. Efecto del tratamiento con cloroquina o con pirimetamina sobre la expresión TNF- α en las células de bazo de ratones infectados con <i>P. yoelii</i> 17XL.....	41
Gráfica 9. Efecto del tratamiento con cloroquina o con pirimetamina sobre la expresión de INF- γ en las células de bazo de ratones infectados con <i>P. yoelii</i> 17XL.....	42
Gráfica 10. Efecto del tratamiento con cloroquina o con pirimetamina sobre la expresión de TGF- β en las células de bazo de ratones infectados con <i>P. yoelii</i> 17XL.....	43
Gráfica 11. Efecto del tratamiento con cloroquina o con pirimetamina sobre la expresión de IL-10 en las células de bazo de ratones infectados con <i>P. yoelii</i> 17XL.....	43
Gráfica 12. Efecto del tratamiento con cloroquina o con pirimetamina sobre la expresión de iNOS (a) en las células de bazo y la concentración de NO (b) en el suero de ratones infectados con <i>P. yoelii</i> 17XL.....	44

1.RESUMEN

El tratamiento con las drogas antimaláricas cloroquina (CLQ) y pirimetamina (PYR) se está utilizando con éxito para el tratamiento de desórdenes inmunológicos como el síndrome linfoproliferativo o la artritis reumatoide. A pesar de que el mecanismo de acción de estos fármacos no está bien dilucidado la mejoría en la sintomatología del paciente se atribuye a que ambas drogas son capaces de inducir apoptosis en los linfocitos y de modular la producción de las citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias. Puesto que ambas drogas continúan utilizándose como drogas antimaláricas y dada la relevancia que tienen los linfocitos en la respuesta inmune contra *Plasmodium*, en este trabajo, consideramos importante estudiar como afecta el tratamiento con estos fármacos la apoptosis total y la de las subpoblaciones de linfocitos T (CD3+, CD4+, CD8+) y B de las células de bazo así como que efecto tienen sobre la expresión de algunos genes asociados con la respuesta inmune y apoptosis en malaria. Grupos de ratones BALB/c se infectaron con 5×10^4 eritrocitos parasitados de *Plasmodium yoelii* 17XL. En el día 7 post-infección los ratones, se trataron con dosis terapéuticas de cloroquina o pirimetamina y 24 horas más tarde se sacrificaron y las células de bazo se utilizaron para evaluar la apoptosis por Anexina-V y la expresión del RNAm de los genes FAS, BCL-2, TNF- α , IFN- γ , TGF- β , IL-10, iNOS y la producción de NO. Los resultados indican que cloroquina y pirimetamina no solo eliminan al parásito, sino además estos fármacos inducen apoptosis de las células de bazo y modulan la expresión de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias.

2.ABSTRACT

Treatment with antimalarial drugs chloroquine (CLQ) and pyrimethamine (PYR) have been used successfully as therapy of autoimmune diseases like systemic lupus erythematosus or rheumatoid arthritis. Even the mechanism of action is not well understood it has been proposed that these drugs induce apoptosis in lymphocytes and the balance of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines which has been associated with the improvement in patient's symptomatology. As CLQ and PYR are still used as antimalarial drugs and these lymphocytes are central to control the infection in malaria, in this work we study how treatment with both drugs modify the apoptosis of spleen cells and mRNA gene expression of some genes associated with the immune response and apoptosis in *Plasmodium yoelii* 17XL infected mice. Groups of BALB/c mice were infected with 5×10^4 parasitized erythrocytes with *Plasmodium yoelii* 17XL. On day 7 post-infection, mice were treated with a therapeutic dose of chloroquine and pyrimethamine 24 hrs later, mice were sacrificed and the spleen cells were used to evaluate apoptosis using Annexin V and the mRNA expression of FAS, BCL-2, TNF- α , INF- γ , TGF- β , IL-10 and iNOS by RT-PCR. The results indicate that chloroquine and pyrimethamine not only eliminate the parasite, but also they induce apoptosis of spleen cells and modulate the expression of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines during a malaria infection.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Antecedentes.

La malaria es una enfermedad infecciosa causada por un protozoo parásito del género *Plasmodium*, que se transmite al humano a través de la picadura del mosquito *Anopheles* hembra infectada. Diversas especies de este parásito causan infecciones en aves, reptiles y mamíferos, pero solo cuatro de ellas infectan al ser humano: *Plasmodium falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax* y *P. ovale*. Las características de esta enfermedad, son su naturaleza cíclica y los paroxismos febriles que aumentan y disminuyen de intensidad con una periodicidad predecible dependiendo de la especie de parásito que se trate (Stuart, 2000).

3.2 Distribución geográfica de la malaria.

Esta enfermedad se considera como uno de los mayores problemas de salud pública. Se estima que el 40% de la población mundial esta expuesta a malaria endémica en zonas como África, Asia y América Latina (figura 1). La Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta de 500 a 700 millones de personas infectadas por malaria en el mundo y de 3 a 5 millones de muertes cada año. África es el continente más afectado registra el 90% de los casos conocidos de malaria, de los cuales el 75 % corresponde a niños menores de 5 años (Good, *et. al* 2004).

Las estrategias implementadas para la erradicación de esta enfermedad no han resultado totalmente efectivas y desafortunadamente estas cifras continúan en aumento, algunos de los principales problemas para el desarrollo de una solución real son: la dificultad para controlar eficientemente al mosquito vector, el limitado conocimiento con respecto a los mecanismos de desarrollo de la inmunidad protectora contra el parásito (Marsh y Kinyanjui, 2006), su complejo ciclo de vida, la resistencia que ha adquirido a la mayoría de las drogas antimaláricas existentes y los mecanismos de evasión de la respuesta inmune que ha desarrollado, así como la variación antigénica y el polimorfismo genético (Good, *et. al.* 2005, Jason, *et. al.* 2001).

La sintomatología más severa de esta enfermedad la genera *P. falciparum* que es el responsable del 90% de las muertes asociadas con esta infección (Good, *et. al.* 2005). *P. falciparum* es endémico en la mayor parte de África Subsahara. La infección por *P. vivax* es menos frecuente y se presenta principalmente en Asia y Sud América. Finalmente, las infecciones por *P. malariae* y *P. ovale* son aún menos frecuentes y se presentan en Asia (Stevenson y Riley, 2004).

En México, los estados que reportan mayor número de casos de infecciones por *Plasmodium* son Chiapas, Oaxaca, Guerrero y Campeche, con una incidencia menor se encuentran: Sinaloa, Durango, Jalisco y Michoacán. *Plasmodium vivax* causa más del 99% de los casos de malaria en nuestro país y los vectores principales son *Anopheles albimanus* y *Anopheles pseudopuntipennis* (Tay, *et. al.* 1993).

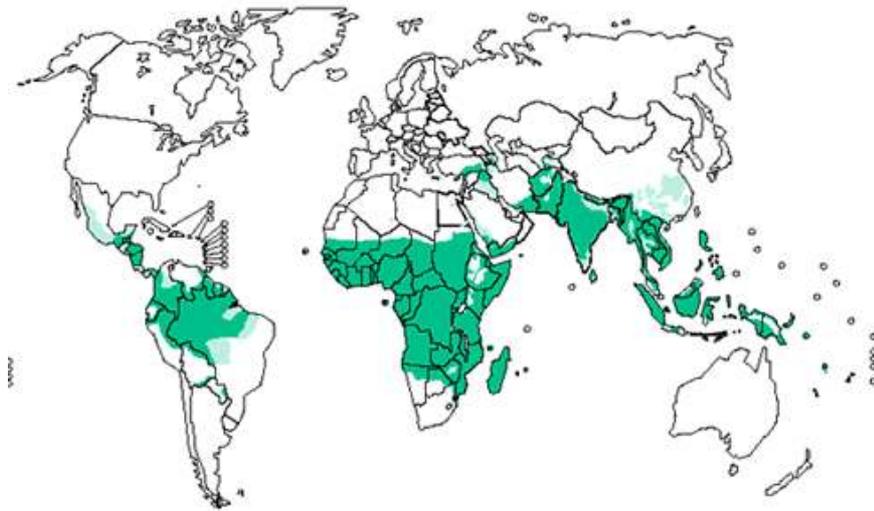


Figura 1. Distribución geográfica de malaria (OMS 2004)

3.3 Ciclo biológico del *Plasmodium*.

El ciclo biológico del parásito es sumamente complejo. Se presenta en dos fases: la fase sexual ó esporogonia que ocurre en el tracto gastrointestinal del mosquito y la fase esquizogonia que se lleva a cabo en el humano (figura 2) (Good, *et al.* 2005).

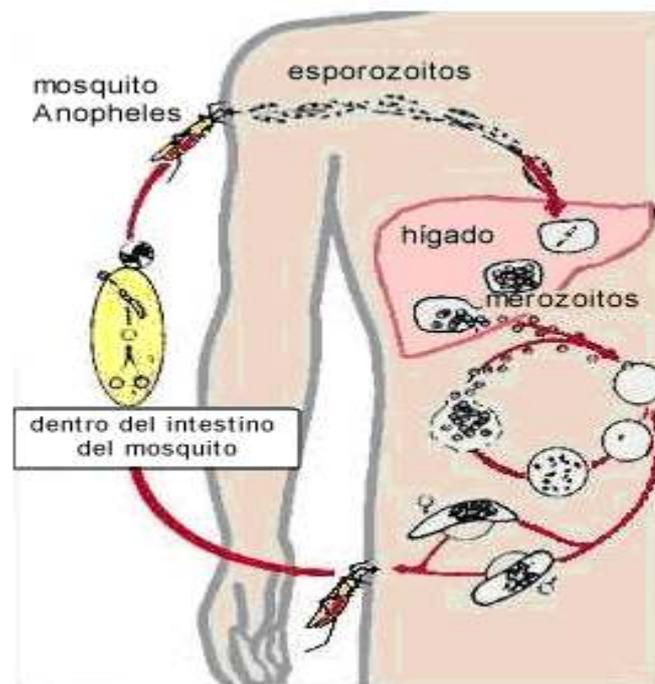


Figura 2. Ciclo de vida del *Plasmodium* (Modificado de Good, *et al.* 2004)

El primer encuentro del huésped con el parásito comienza cuando los esporozoitos presentes en las glándulas salivales de la hembra del mosquito *Anopheles* entran al torrente sanguíneo del humano por medio de la picadura del insecto, en los primeros 30 minutos después de la inoculación estos esporozoitos invaden a los hepatocitos, en los cuales experimentan el ciclo de desarrollo asexual llamado esquizogonia hepática, donde crece una forma polinucleada denominada esquizonte dentro de cada hepatocito infectado, la cual 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*. Dos especies en particular, *Plasmodium vivax* y *Plasmodium ovale* pueden producir una forma latente en el hígado denominada hipnozoito que es responsable de las recaídas de la enfermedad años más tarde. En el caso de *P. falciparum* y *P. malariae* 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 una vesícula formado por la membrana del mismo eritrocito. 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 que permite ver solo 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 que pierde su carácter vacuolado cuando el parásito crece y el citoplasma se vuelve más abundante, es entonces cuando aparecen granulaciones rojizas en el citoplasma de los eritrocitos huéspedes que reciben el nombre de acuerdo a la especie de *Plasmodium* de la que se trate. Después 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. 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 y varían de 24, 48 y 72 horas dependiendo de igual manera de la especie de *Plasmodium* de la que se trate. Los merozoitos liberados infectan rápidamente a una nueva población de eritrocitos, iniciando así el siguiente ciclo de fiebre y escalofrío (Good, *et al* 2005).

En el interior de algunos eritrocitos, los merozoitos se diferencian en gametos masculinos y femeninos que se denominan microgametocitos y macrogametocitos respectivamente, cuando el mosquito se alimenta de sangre, los ingiere. Una vez en el intestino del insecto, los eritrocitos se lisan, los gametocitos se liberan, maduran y se fusionan lo que conduce a una recombinación de su material genético para producir un cigoto, este último se implanta en el epitelio intestinal y da lugar al oocisto, que a su vez madura convirtiéndose en esporozoito. Finalmente este estadio emigra a la glándula salival del mosquito en espera de inyectarse a la piel humana cuando el mosquito pica y continúe el ciclo de infección (Good, *et al* 2005).

3.4 Características clínicas de la malaria.

Los síntomas clínicos y la patología de esta enfermedad los causa la etapa eritrocítica del parásito. La severidad depende en gran parte de las características genéticas del huésped y de las interacciones de su sistema inmune con el protozoario (Good y Doolan, 1999). El paciente tras un periodo de incubación aproximado de 10 a 17 días,

experimenta síntomas de tipo gripal con dolor de cabeza y muscular, fotofobia, anorexia, náusea y vómito. 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 los individuos sin tratamiento, los síntomas pueden evolucionar rápidamente a malaria cerebral, anemia, falla severa en órganos e incluso en ocasiones si el paciente no se diagnostica a tiempo puede morir a causa de la enfermedad (Good, *et. al.* 2005).

La patología es el resultado de la destrucción de eritrocitos, de hecho, se cree que la malaria severa es por lo menos en parte una enfermedad mediada por la respuesta inmune (Stevenson y Riley, 2004).

3.5 Inmunidad en malaria.

Se han hecho enormes esfuerzos para entender las características de la respuesta inmune protectora contra el *Plasmodium*, sin embargo, los factores que la regulan no están completamente dilucidados debido principalmente al complejo ciclo biológico del parásito y a los diferentes estados de diferenciación del *Plasmodium* que involucran diferentes mecanismos inmunes (Good y Doolan, 1999). En las regiones endémicas se ha evidenciado que la inmunidad protectora contra malaria en humanos se desarrolla muy lentamente y se establece únicamente después de que el individuo se infecta con un gran número de poblaciones de parásitos antigénicamente diferentes y que para conservarla se requiere mantener una exposición continua, y aun así, la inmunidad esterilizante nunca es completa, ya que en ausencia de enfermedad clínica la parasitemia persiste, lo que convierte al huésped en una fuente potencial de transmisión (Phillips, *et.al.* 1994).

A diferencia de otras infecciones con patógenos intracelulares como virus, bacterias y algunos protozoarios, en los cuales la respuesta inmune innata y adquirida están bien descritas, en el caso de la malaria, se requiere mayor investigación sobre el papel de la respuesta inmune tanto en ratones como en humanos (Stevenson y Riley, 2004). Se sabe que tanto la respuesta inmune innata como la adquirida juegan un papel importante. La respuesta inmune innata contribuye al control de la infección primaria ya que limita la primera fase de la replicación del parásito controlando su densidad y dando tiempo para el desarrollo de la respuesta inmune adquirida, la cual puede limitar el pico de la parasitemia, prevenir la patología y reducir la carga de células circulantes infectadas. Sin embargo, ambas respuestas fallan en eliminar completamente la infección, permitiendo la persistencia de la parasitemia que aunque generalmente esta a bajo del límite de detección por microscopia puede persistir por meses o años. (Stevenson y Riley, 2004).

La mayor parte del conocimiento de los principios generales de activación de la respuesta inmune en malaria se basa en los resultados obtenidos a partir de los modelos experimentales en ratón, puesto que el acceso a los órganos linfoides humanos es limitado (Stephens y Langhorne, 2006). Son cuatro las especies de parásitos que infectan a los ratones *P. chabaudi*, *P. berghei*, *P. yoelii* y *P. vinckei* las cuales se utilizan para investigar los mecanismos inmunes, la patogénesis, los genes que regulan

susceptibilidad a malaria y además el desarrollo de vacunas y quimioterapia- (Stevenson y Riley, 2004).

En estos modelos se ha reportado que el bazo es el órgano de mayor importancia durante la infección con *Plasmodium* puesto que es un sitio clave para la remoción de los glóbulos rojos parasitados y para la generación de inmunidad protectora (Alves, *et. al.* 1996, Yap y Stevenson, 1992, Engwerda, *et. al.* 2005), en el bazo es donde tanto los mecanismos humorales como los mediados por células juegan un papel muy importante en el control del parásito (Podoba y Stevenson, 1991, Riley, *et. al.* 2006). La etapa eritrocítica de la infección es la responsable de los síntomas clínicos de la enfermedad y por lo tanto la que se ha estudiado más intensamente, esta etapa se ha analizado mejor en el modelo murino infectado con *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS. La infección con este parásito no letal se caracteriza por una respuesta inicial de tipo Th1 (pro-inflamatoria) con la producción de citocinas pro-inflamatorias INF- γ , TNF- α e IL-2 que activa a otras células efectoras como macrófagos para que secreten intermediarios reactivos de oxígeno, nitrógeno y óxido nítrico que inducen la muerte e inactivación del parásito. Posteriormente, se presenta un cambio a la respuesta Th2 (anti-inflamatoria) en el pico de la parasitemia que se caracteriza por la producción de IL-4, IL-5 e IL-10 cuyo papel es la activación de los linfocitos B involucrados en el control final y la eliminación del parásito (Langhorne, *et. al.* 1989, Stevenson y Tam, 1993, Taylor, *et. al.* 1993). En la infección con la cepa letal *P. yoelii* 17XL (la cual se utilizó para la realización de este proyecto) se ha observado que tanto la respuesta Th1 como la Th2 están involucradas, pero la activación temprana de las células Th2 se asocia con un incremento en la susceptibilidad a la infección (Angulo y Fresno, 2002).

3.5.1 El papel de macrófagos y células dendríticas en la respuesta inmune en malaria.

Los macrófagos y las células dendríticas forman parte de la primera línea de defensa contra el huésped. Los macrófagos son células efectoras esenciales en la defensa contra la malaria aguda, están presentes en todos los tejidos y poseen la habilidad de detectar y eliminar muchos microorganismos patógenos a través del reconocimiento de moléculas microbicidas por los receptores sobre su membrana, pueden activar a las células T por presentación de antígeno en un contexto de moléculas MHC (Complejo principal de histocompatibilidad)- clase II y pueden eliminar a los glóbulos rojos parasitados por fagocitosis (figura 3) (Ndungu, *et.al.* 2005).

En adición a la función de los macrófagos, las investigaciones realizadas en humanos y en ratones demuestran que las células presentadoras de antígeno (CPA) tienen un papel importante en la inmunidad innata en malaria, debido a su habilidad de fagocitar a los eritrocitos infectados en la ausencia de opsonización del antígeno por anticuerpos específicos contra malaria (Stevenson y Riley, 2004). Los macrófagos y las células B aisladas de ratones inmunes poseen la capacidad de procesar y presentar el antígeno a las células T durante la infección con *Plasmodium* (Stevenson y Riley, 2004).

Las células dendríticas también poseen la capacidad de activar a los linfocitos T por medio de la presentación de antígeno, se localizan en tejidos como células inmaduras con alta capacidad fagocítica y después de su activación migran a los órganos linfoides donde presentan el antígeno a las células T CD4 + y T CD8 + (Bruña y Rodríguez, 2001). Estas células son presentadoras de antígeno y también se activan en el bazo donde fagocitan y procesan a los eritrocitos parasitados, para posteriormente presentar

los péptidos del antígeno a los linfocitos T CD4 + lo que estimula la producción de las citocinas pro-inflamatorias (Langhorne, *et. al.* 2004).

3.5.2 La participación de las células T CD4+, T CD8+ en malaria.

La infección con malaria es capaz de estimular a las células T CD4+ y T CD8+ que son fundamentales para el establecimiento de la respuesta inmune humoral y celular. Ambos tipos de linfocitos ejercen efectos protectores en diferentes fases de la infección (Süss, *et. al.* 1988).

En la etapa sanguínea de la infección por *Plasmodium* los linfocitos T CD4+ juegan un papel importante en la inmunidad contra el parásito (Brown, *et. al.* 1986, Kumar, *et. al.* 1989) esto se ha demostrado en experimentos en ratones donde con anticuerpos monoclonales se elimina *in vivo* a las células CD4 y también por transferencia adoptiva (Good, *et. al.* 2005, Süss, *et. al.* 1988, Kumar, *et. al.* 1989). Estas células se clasifican en los subtipos Th1 y Th2 de acuerdo con las citocinas que secretan después de su activación. Los linfocitos Th1 producen citocinas como INF- γ , IL-2, y TNF- α a través de las cuales estimulan a los macrófagos. Los linfocitos Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, que proveen la estimulación para que las células B se conviertan en células plasmáticas y como consecuencia produzcan anticuerpos (Mosmann y Coffman, 1989, Taylor, *et. al.* 1995). La subpoblación Th1 favorece una respuesta de tipo celular y la subpoblación Th2 una respuesta de tipo humoral (figura 3) (Taylor, *et. al.* 1995). En las infecciones con *P. chabaudi*, el control de la parasitemia primaria esta asociada con la respuesta Th1, mientras que las células Th2 participan en la resolución final de la infección (Langhorne, *et. al.* 1989).

Aunque los linfocitos T CD8+ están involucrados en la protección de ratones durante la fase pre-eritrocítica de la infección dado que interactúan en un contexto de MHC clase I con los hepatocitos, su papel durante la etapa eritrocítica del parásito aún no esta claro porque los eritrocitos carecen de este complejo. Algunos autores han descrito que en la etapa sanguínea de la infección con *P. chabaudi adami*, estas células protegen eficientemente por transferencia adoptiva en modelos de ratón, lo que sugiere que podrían estar involucradas en la regulación de malaria aguda (Podoba y Stevenson, 1991), probablemente debido a su capacidad de secretar citocinas como INF- γ (Angulo y Fresno, 2002).

3.5.3 Participación de las células B en malaria.

En la infección con *Plasmodium*, el parásito se localiza generalmente dentro de las células del huésped (hepatocitos y eritrocitos). Sin embargo, por periodos cortos ciertos estados de diferenciación del *Plasmodium* (esporozoito y merozoito) son vulnerables a la muerte directa por anticuerpos. En la etapa pre-eritrocítica del parásito se generan anticuerpos contra los esporozoitos los cuales evitan el proceso de invasión a los hepatocitos, estos anticuerpos están dirigidos principalmente contra la proteína de superficie de los esporozoitos denominada circosporozoítica (CSP). En la etapa eritrocítica de la infección los mecanismos inmunes involucran anticuerpos dirigidos contra las proteínas de superficie de los merozoitos (MSP1) y anticuerpos que reconocen las variantes antigénicas que se expresan sobre la superficie de las células rojas infectadas, de las cuales la que se conoce mas es la PfEMP1 (Zhang, *et. al.* 2002). Las proteínas de superficie (CSP, MSP1) se pueden liberar al torrente sanguíneo o al

medio extracelular como complejos solubles (Stephens y Langhorne, 2006) para los que también se generan anticuerpos. La principal función de las inmunoglobulinas es evitar la invasión de las células del huésped (eritrocitos y hepatocitos), para lo cual promueven la opsonización de los esporozoitos y merozoitos, facilitando la fagocitosis de los macrófagos y también inducen la lisis mediada por complemento después de la unión del anticuerpo a los antígenos del parásito que se expresan sobre la superficie de los eritrocitos infectados o de los merozoitos libres. Además de estos efectos protectores, los anticuerpos también se han asociado con la patogénesis de la malaria cerebral ya que se sugiere que median la citoadherencia a un gran número de ligandos sobre las células endoteliales (Marsh y Kinyanjui, 2006; Taylor, 1995).

En la infección por *Plasmodium* se ha descrito un incremento en la participación de anticuerpos de tipo IgM e IgG en relación a IgA. Sin embargo, solo una pequeña porción del total de anticuerpos que se producen es específica para *Plasmodium* mientras que la inmensa mayoría no reaccionan con el parásito (Freeman y Jones, 1972).

Las células T son esenciales ya que regulan la formación de anticuerpos e inducen la inmunidad celular, por lo tanto, la adquisición y mantenimiento de la inmunidad protectora contra malaria depende de esta estirpe celular así como de las citocinas que producen. También se ha descrito que determinan el curso de la infección con el parásito de malaria (Troye, 1994), en esta enfermedad el balance entre la respuesta inmune de tipo Th1 y la de tipo Th2 determina la resolución de la parasitemia (Jason, *et.al.* 2001).

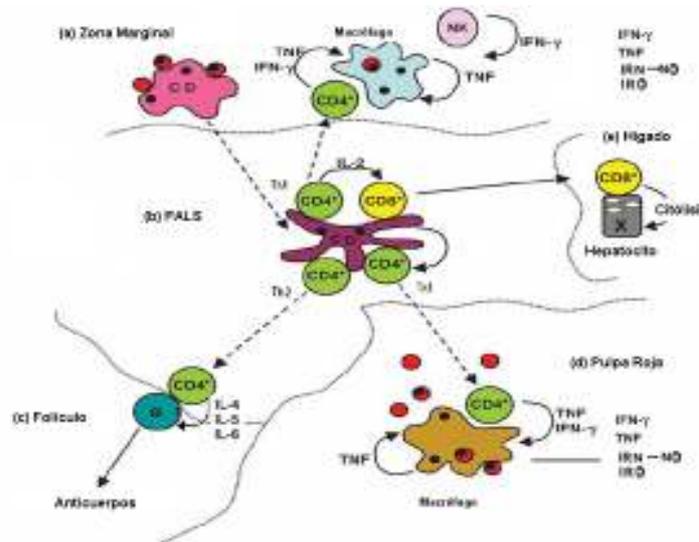


Figura 3. Inmunidad en malaria. (Tomado y modificado de Good *et. al.* 2004). (a) El antígeno del parásito es capturado por una Célula dendrítica en la zona marginal (b) la célula dendrítica migra a la vaina linfocítica periarteriolar (PALS), donde ellas realizan la presentación del antígeno a las células T CD4+ por contexto MHC clase II. Estas células a través de la producción de IL-2 generan ayuda para el reconocimiento del parásito por las células CD8+ en un contexto MHC clase I (c) Las células TC4+ pueden migrar al borde de la zona PALS y con la producción de citocinas ayudar a coestimular la producción de anticuerpos específicos contra el parásito por las células B. (d) Las células T CD4+ parásito específicas migran a la pulpa roja donde los glóbulos rojos parasitados se eliminan por macrófagos de la zona. (e) las células T CD4+ y TCD8+ parásito específicas pueden migrar a otros órganos donde existen otras etapas de vida del parásito y contribuir a su eliminación.

3.6 Las citocinas y su papel en malaria.

Se denominan citocinas al conjunto de proteínas que secretan diferentes células, fundamentalmente del sistema inmune, como respuesta a una estimulación inmunológica. Las citocinas presentan una gran variedad de funciones y son

importantes en la respuesta inmune, tanto natural o innata como en la adquirida, se trata de proteínas de bajo peso molecular (8 – 80 kDa) que estimulan o inhiben la proliferación, diferenciación o la función de las células de la respuesta inmune, suelen actuar de forma autócrina (sobre la misma célula productora) o parácrina (sobre células cercanas). Desde un punto de vista funcional, las citocinas se agrupan de la siguiente forma: (1) Mediadoras de la inmunidad natural y de la inflamación, (2) Mediadoras de la hematopoyesis (3) Mediadoras de la quimiotaxis y (4) Mediadoras de la activación, la proliferación, la diferenciación y la muerte de los linfocitos T (Angulo y Fresno 2002).

En malaria se ha descrito que las citocinas son un factor muy importante ya que determinan la severidad y curso de la infección con *Plasmodium* y por tanto son blancos potenciales para intervenciones terapéuticas. Algunos autores sugieren que el balance entre las citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , INF- γ , IL-2, IL-8) y las anti-inflamatorias (IL-4, IL-6, IL-10) determina el grado de la parasitemia, el nivel de anemia, la severidad clínica de la enfermedad y su curso (Jason, *et.al.* 2001, Winkler, *et. al.* 1998, Urquhart, 1994).

3.6.1 Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α)

El factor de necrosis tumoral- α es una citocina pro-inflamatoria producida por las células NK (Natural Killer por sus siglas en inglés: Asesinas naturales), los macrófagos, los neutrófilos, los basófilos y los eosinófilos después de una estimulación con endotoxinas, con mediadores inflamatorios ó con algunas citocinas como IL-1. El TNF- α posee numerosas actividades biológicas que varían dependiendo de su concentración, el tiempo de la exposición celular y de la presencia de otros mediadores que pueden actuar en sinergismo con esta citocina. El TNF- α participa en procesos benéficos como la activación de la defensa del huésped contra la infección y el cáncer, la inmunidad y homeostasis de tejidos, sin embargo, un exceso en su producción puede originar eventos patológicos como caquexia, e inflamación (Camussi, *et. al.* 1991). A nivel celular es capaz de provocar un incremento en la expresión de moléculas de adhesión y de citocinas en las células endoteliales, epiteliales e inflamatorias (Richards, 1997). Los efectos celulares del TNF- α se inician por la interacción con dos tipos de receptores de superficie celular llamados receptor TNF1 (TNF1R) y receptor TNF2 (TNF2R). La mayoría de los efectos citotóxicos del TNF- α los media TNF1R (Kazuyoshi y Nobuyuki, 2000). Es capaz de modular la sobrevivencia y activa genes a través de varios intermediarios, incluyendo protein cinasas, protein fosfatasa, intermediarios reactivos de oxígeno, fosfolipasas, proteasas y factores de transcripción (Szatmary, 1999).

En malaria el TNF- α se produce cuando las células NK y los macrófagos se exponen a los antígenos del parásito como las toxinas que se liberan durante el ciclo de vida del *Plasmodium*, participa en la respuesta de la fase aguda de la infección y además es clave en la activación de los macrófagos (Bate, *et. al.* 1988). 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 en humano (Kern, *et. al.* 1989, Kwiatkowski, *et. al.* 1990). En el ratón se sintetiza durante la liberación de los merozoitos de los glóbulos rojos infectados (Clark, *et. al.* 1997). Este factor junto con las citocinas IL-1, IL-6, IL-12 e IFN- γ están involucrados en la disminución de la parasitemia en malaria, 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).

El TNF- α juega un papel importante en el control de infecciones con *Plasmodium*. Está descrito que esta citocina es capaz de inhibir la infección con el parásito *in vivo* (Clark, *et. al.* 1987) e *in vitro* (Haidaris, *et. al.* 1983). Los niveles elevados de TNF- α en el bazo se relacionan con resistencia a *Plasmodium chabaudi AS* y pueden contribuir a la eliminación de *P.yoelii* y *P. vinckei* en la etapa aguda, posiblemente a través de la inducción de mediadores como NO e intermediarios reactivos de oxígeno. Por otro lado, el TNF- α está claramente implicado en la patología en malaria ya que el exceso en su actividad se relaciona con la patogénesis de esta enfermedad (Kern, *et. al.* 1989, Grau, *et. al.* 1987), así como con el desarrollo de malaria cerebral en el ratón y el humano (Li y Langhorne, 2000), ya que provoca un incremento en la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1, VCAM-1, y PECAM-1 en las células endoteliales del cerebro (Good, *et. al.* 2005), sus efectos dañinos son en gran parte debido a la habilidad de estimular la producción de otros factores como IL1, IL-6, INF- γ , intermediarios reactivos del oxígeno o del nitrógeno (Richards, 1997).

3.6.2 El Interferón- γ (INF- γ).

El interferón- γ es un importante factor activador de los macrófagos que está involucrado en la respuesta inmune contra *Plasmodium*, se trata de una citocina producida por los linfocitos T CD8+ y T CD4+ activados en respuesta específica a antígenos así como por las células NK (Natural killer) de forma no específica (Schofield *et al.*, 1987), juega un papel importante en la defensa del huésped por sus actividades sobre diferentes células. Es la principal linfocina de las células Th1, se considera pluripotente y es capaz de activar a los macrófagos, aumentando la expresión de moléculas del MHC II sobre su superficie, también incrementa la fagocitosis, induce la producción del factor necrosis tumoral (TNF- α) y de metabolitos reactivos del oxígeno y del nitrógeno, así como también de TGF- β , IL-1 e IL-6. Estos compuestos individualmente o en combinación tienen la capacidad de matar e inhibir el crecimiento del parásito *in vitro*. Se sabe que el principal blanco del IFN- γ durante la infección por *Plasmodium* son los monocitos-macrófagos (Bate *et al.*, 1988) y los neutrófilos ya que están asociados a la respuesta de fagocitosis durante una primera infección por *Plasmodium* (Phillips, *et. al.* 1994). Además, en modelos murinos, se ha demostrado que para controlar la infección se requiere de INF- γ durante los primeros días de la infección (Jason, *et.al* 2001). El IFN- γ y el TNF- α actúan sinérgicamente para inducir la muerte del parásito dentro de las células fagocíticas (Omer, *et.al.* 2003).

3.6.3 El Factor transformador de crecimiento- β (TGF- β).

El factor transformador de crecimiento- β (TGF- β) pertenece a una familia de proteínas que regula funciones celulares como la proliferación, la apoptosis, la diferenciación, la migración, y tiene un papel clave en el desarrollo del organismo (Engel, *et. al.* 1998), además está involucrado en algunas patologías humanas, incluyendo desórdenes autoinmunes, enfermedades fibróticas y el cáncer. Esta proteína la producen los macrófagos, las células T, las células NK y los linfocitos B, se trata de una citocina con características reguladoras importantes. A concentraciones bajas actúa como una citocina pro-inflamatoria con la capacidad de reclutar macrófagos, células T y neutrófilos al sitio de inflamación temprano. A concentraciones altas actúa como una

citocina anti-inflamatoria suprimiendo la producción de TNF- α y del óxido nítrico (NO) en macrófagos, y la producción de IFN- γ y de TNF- α de las células NK (Taylor y Smith, 1999), por lo tanto es importante en el mantenimiento del balance entre el control-eliminación del parásito por un lado y en la prevención de la patología por el otro (Omer, *et. al.* 2000).

3.6.4 Interleucina-10 (IL-10)

La interleucina-10 es un factor inhibidor de la síntesis de citocinas, proviene de células Th2 e induce la proliferación de linfocitos B, la diferenciación de células plasmáticas y la producción de inmunoglobulinas. Inhibe la liberación de citocinas pro-inflamatorias (Th1), incluyendo TNF- α de monocitos y neutrófilos humanos e inhibe la secreción de INF- γ producidos por Th1, pero inclina el equilibrio regulador a favor de las respuestas inmunitarias humorales, su efecto predominante es reducir la inflamación debido en parte a que inhibe la función de las APC al suprimir la expresión de moléculas clase II del MHC en células dendríticas y macrófagos. La IL-10 se ha detectado en el plasma de pacientes con malaria aguda (Deloron, *et. al.* 1994). En infecciones por *P. chabaudi* las concentraciones bajas de esta citocina correlacionan con el desarrollo de malaria cerebral y de anemia (Li, *et. al.* 1999) mientras que las concentraciones altas protegen a los ratones infectados con *P. berghei* del desarrollo de malaria cerebral por una regulación de INF- γ y TNF- α . En infecciones por *P. chabaudi* los ratones hembras que tienen el gen IL-10 inactivado, tienen aumentados los niveles de TNF- α e INF- γ (Li, *et. al.* 2003). La IL-10 al desactivar a los macrófagos suprime la producción de intermediarios reactivos del oxígeno, óxido nítrico y proteínas de adhesión (Roitt, 2000).

3.6.5 Análisis de citocinas por RT-PCR.

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

Este proceso comienza con la síntesis de una hebra de ADNc (ADN complementario) a partir del ARN por la acción de una transcriptasa inversa, una polimerasa de ADN dirigida por ARN, el ADNc permanece unido al molde como duplex ARN:ADNc. En la segunda etapa se desnaturaliza el duplex y comienza la amplificación: la hebra de ADN liberada actúa como molde para una segunda hebra de ADNc y luego el duplex se amplifica en sucesivos ciclos. La estrategia para analizar cambios en la expresión de genes específicos a nivel de ARN es llevar a cabo una PCR doble, es decir, que identifique al mismo tiempo dos ARNm 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 en una misma muestra biológica como la β -actina, a partir de la cual se efectúa la transcripción inversa para obtener el ADNc total (Panduro, 2000). Cada ciclo de una PCR consta de tres etapas (Figura 4): (1) Desnaturalización. Calentamiento para

la separación de las dos hebras del ADN, mediante una incubación breve a una temperatura de 94° C, que produce una rotura de los puentes de hidrógeno y por lo tanto la separación de ambas cadenas. (2) En la hibridación, primero se induce un enfriamiento rápido a 54°C de forma que se permita la hibridación de las hebras sencillas del ADN de interés con los oligos cebadores. (3) Elongación (o replicación) es la etapa de amplificación (72° C), en la que la ADN polimerasa termoestable elonga los cebadores, empleando como molde ambas hebras originales. La replicación transcurre en dirección 5'- 3' utiliza como sustratos 4 dNTPs hasta terminar la lectura del molde o hasta que comience una nueva etapa de desnaturalización (ciclo siguiente). El ciclo se repite una y otra vez, dando como resultado el doble número de ADN por cada ciclo. Después de 30 ciclos se producen alrededor de un billón de copias de ADN entre los dos oligonucleótidos cebadores. Esta cantidad de ADN es suficiente para detectarlo directamente por electroforesis de acrilamida, en donde se tiñe el gel con bromuro de etidio (Hoffe, 1998).

PCR: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

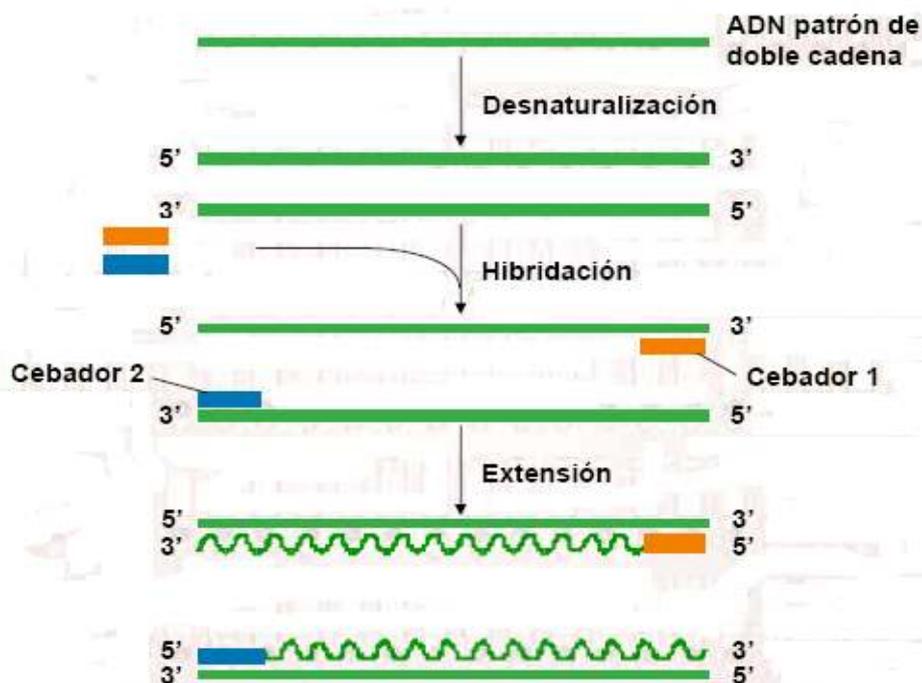


Figura 4. Representación esquemática de la técnica de PCR (modificado Griffiths et al., 1996)

3.7 El papel del óxido nítrico en malaria.

El óxido nítrico (NO por sus siglas en inglés) es un radical libre de vida corta producto de la conversión de L-arginina a L-citrulina por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), esta involucrado en funciones tanto fisiológicas como patológicas (Nathan y Xie, 1994). Las actividades fisiológicas del NO involucran: mantenimiento de la fisiología vascular, participación en la comunicación intracelular, la neurotransmisión y la citotoxicidad celular, mientras que su actividad patológica promueve enfermedades inflamatorias

crónicas como artritis, hepatitis y algunos desórdenes autoinmunes (Grisham, *et. al.* 1999).

Este radical libre es una molécula muy reactiva que en presencia de oxígeno molecular se oxida a una gran variedad de compuestos biológicamente activos conocidos como intermediarios reactivos del nitrógeno (IRN) (Nahrevanian y Dascombe 2002). Estas moléculas incluyen: peroxinitrilo (OONO^\cdot) y sus formas oxidadas nitratos (NO_3^-) y nitritos (NO_2^-) las cuales poseen actividades antibacterianas y antivirales *in vitro* que pueden causar daño al ADN así como inhibir una gran variedad de enzimas o iniciar la lipoperoxidación (Rockett, *et. al.* 1991).

La química del NO es sumamente compleja, para simplificar su entendimiento los aspectos fisiológicos de este radical libre se pueden dividir en dos: efectos directos e indirectos. Los efectos directos son aquellos en los cuales el NO interactúa directamente con una molécula biológica bajo condiciones fisiológicas normales, es decir, cuando la producción de NO es baja. Generalmente este tipo de reacciones pueden ser reguladoras y/o anti-inflamatorias. Los efectos indirectos del NO son aquellos en los que las reacciones se llevan a cabo por los intermediarios derivados de este radical (OONO^\cdot , NO_3^- y NO_2^-) que se producen cuando se incrementa el flujo de NO y este tipo de reacciones predominan durante la inflamación activa, cuando los niveles de NO son altos (Grisham, *et.al* 1999).

Se han identificado tres isoformas de la enzima que cataliza la síntesis de NO. La óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), la endotelial (eNOS) y la inducible (iNOS), las tres son similares en composición pero diferentes en su localización y función (Xie y Nathan, 1994). La enzima nNOS es una isoforma constitutiva que se expresa principalmente en el sistema nervioso central y periférico, se regula por iones calcio (Ca^{2+}) y calmodulina, normalmente genera pequeñas cantidades de NO para señalización intracelular. La enzima eNOS es una isoforma constitutiva con baja producción de NO, esta regulada por (Ca^{2+}) y calmodulina, se encuentra en el endotelio vascular donde se activa por estímulos hormonales. Finalmente, la enzima iNOS es una isoforma no constitutiva independiente de calcio que produce NO en varias células nucleadas como parte de la función citotóxica de las mismas, lo cual contribuye al control de la replicación o muerte de patógenos intracelulares (Nahrevanian y Dascombe 2002). Entre las estirpes celulares que producen NO se encuentran: los macrófagos (Drapier, 1997) los neutrófilos (McCall, *et. al.* 1989), los hepatocitos (Priego, *et. al.* 2006) y las células cebadas (Salvemini, *et. al.* 1990), las cuales incrementan la expresión de iNOS en condiciones inflamatorias, los estímulos más relevantes son citocinas como IFN- γ , TNF α y algunas endotoxinas (Brunet, *et. al.* 2001).

En las últimas décadas, se ha incrementado significativamente el número de investigaciones sobre el papel que juega el NO en la respuesta inmune contra malaria, lo que ha revelado que este radical posee tanto efectos benéficos como perjudiciales, dependiendo entre otras cosas, del tiempo en que se produce, la cepa de *Plasmodium*, el tipo de tejido, el día de la infección, el nivel de la parasitemia, la cantidad producida y el medio biológico en el cual se esta liberando. Los investigadores que le atribuyen un papel protector al NO, encontraron que es esencial en la defensa contra algunos plasmodios puesto que se ha evidenciado que esta involucrado en la muerte intraeritrocítica de: *Plasmodium falciparum* (Anstey, *et. al.* 1996, Rockett, *et. al.* 1991), *Plasmodium yoelii* (Nüssler, *et. al.* 1991), *Plasmodium chabaudi* (Rockett, *et. al.* 1991) y *Plasmodium berghei* (Mellouk, *et. al.* 1991) como respuesta a la secreción de

citocinas entre las que se encuentran: el INF- γ , el TNF- α y la IL-6 producidas por linfocitos T y células NK. Los niveles elevados de IRN están asociados con efectos de curación clínica y parasitológica rápida en humanos y ratones (Kremsner, *et.al.* 1996). Según Hommel *et. al.*, 1996, tanto el óxido nítrico como los intermediarios reactivos del nitrógeno se producen como parte de los mecanismos de respuesta a la infección malarica, dado que estas moléculas poseen actividad oxidante tóxica para el *Plasmodium*. En contraste, algunos investigadores han propuesto que el NO contribuye al desarrollo de malaria severa y complicada, ya que se ha observado que un exceso en la producción de este radical involucra inmunosupresión (Ahvazi, *et. al.* 1995; Rockett, *et. al.* 1996) o a la patogénesis de malaria cerebral (Brunet, *et al.*, 2001, Clark, *et. al.* 1997, Polat, *et. al.* 2002, Thumwood, *et. al.* 1989). Sin embargo de manera general la mayoría de los autores coinciden con el hecho de que un incremento en la producción de NO se relaciona con una rápida eliminación del parásito mientras que un exceso en su producción esta relacionado con patogénesis.

Los IRN pueden reaccionar de diferentes maneras para generar la muerte del *Plasmodium*. Una vez que estos difunden dentro de los eritrocitos la formación de grupos nitrosotioles sobre las proteínas podría desencadenar la inactivación o cambios en la función de las mismas. En el eritrocito un blanco del ataque de los IRN es la oxihemoglobina. El nitrito reacciona con esta molécula para formar meta hemoglobina o nitrosotiol hemoglobina y el producto de la última reacción es el peróxido de hidrógeno que por si mismo es tóxico para el parásito de malaria (Rockett, *et. al.* 1991).

Algunas de las citocinas que juegan un papel importante en la defensa contra malaria también están involucradas en la inducción de la síntesis de IRN. Después de la infección de ratones con *Plasmodium*, los niveles de TNF- α generan incremento en la producción de IRN en plasma que son tóxicos en los cultivos de *P. falciparum*. Esto sugiere que el TNF- α podría contribuir a los efectos antimaláricos *in vivo* (Rockett *et. al.* 1991). El efecto antimalárico podría ser el resultado de los IRN o de una reacción sinérgica con los IRN y las Especies Reactivas del Oxígeno (EROS) que también son tóxicos para el plasmodio (Rockett, *et. al.* 1991). Por otro lado, el lipopolisacárido bacteriano o las toxinas derivados de *Plasmodium* actúan sinérgicamente con el INF- γ para inducir la producción *in Vitro* de grandes cantidades de NO por los macrófagos (Ding, *et. al.* 1988, Rockett, *et. al.* 1996). Finalmente, el INF- γ solo o junto con el TNF- α tienen la capacidad de inducir un incremento en la síntesis de NO *in vivo* (Jacobs, *et. al.* (b) 1996).

El ensayo más utilizado para medir indirectamente la producción de NO es la reacción de Griess, este es un método espectrofotométrico que se basa en el análisis de un compuesto colorido azo obtenido después de la reacción de la muestra biológica con el reactivo de Griess (Sulfanilamida, N-naftiletildiamina, ácido fosfórico). Los resultados así obtenidos, se emplean como medida de los IRN (Giustarini, *et. al.* 2004).

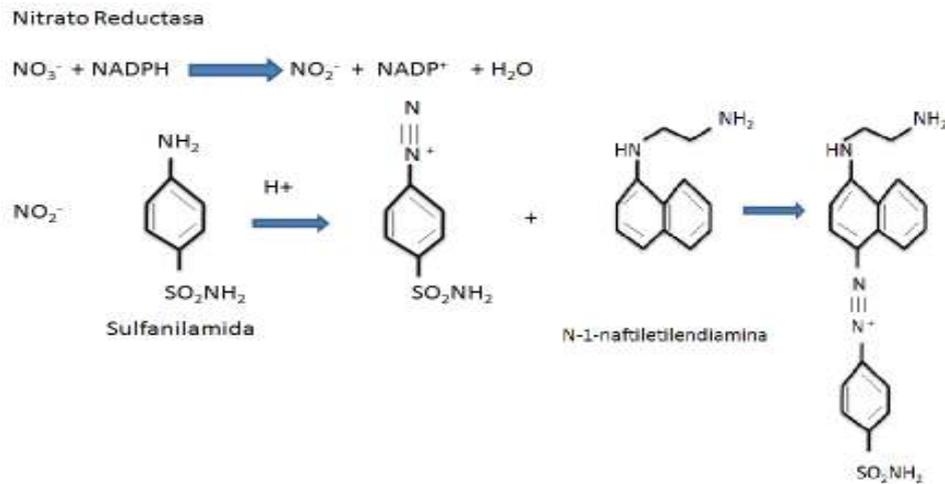


Figura 5. La reacción química de Griess. (Tomado de Graham, 1998)

Durante la fase sanguínea de malaria la isoforma de NOS que más contribuye a la producción de NO en ratones y humanos es la iNOS (Heyde, 2000). El análisis de los niveles de expresión del RNAm para iNOS también es un método que se utiliza para evaluar la producción de NO. En malaria la expresión de este gene puede generar resultados diversos ya que dependen del tejido del que proviene la muestra, la cepa del *Plasmodium* y el nivel de la parasitemia (Navhrevanian y Dascombe, 2002).

3.8 Tratamiento en malaria.

Existen una gran variedad de medicamentos útiles para el tratamiento y profilaxis de la infección con *Plasmodium*, se pueden clasificar de acuerdo con la fase del ciclo de vida del parásito sobre la cual actúan. Los fármacos que eliminan a los esquizontes tisulares en desarrollo o a los hipnozoitos latentes en el hígado se denominan esquizonticidas tisulares como la primaquina y el proguanil. Aquellos que actúan sobre los eritrocitos parasitados son los esquizonticidas sanguíneos dentro de los cuales se encuentran la quinina, la cloroquina (CLQ), la pirimetamina (PYR) y la amodiaquina. Finalmente, los gametocidas son medicamentos que eliminan a los gametocitos en sangre con lo que previenen la infección en los mosquitos.

La cloroquina es una 9-aminoquinolina sintética (figura 6) descubierta desde 1934 como un agente antimalárico, es uno de los medicamentos más útiles para el tratamiento y profilaxis contra *Plasmodium*, por su alta tolerabilidad y su bajo costo, se formula como la sal de fosfato para uso oral y como clorhidrato para uso parenteral. El mecanismo exacto de su acción no se ha determinado, sin embargo, se han propuesto diversos mecanismos para explicar la actividad antimalárica de esta droga, entre los cuales se encuentran: Su capacidad de bloquear la síntesis enzimática del ADN y del ARN tanto en células de mamíferos como de protozoarios y la de concentrarse en las vacuolas del parásito aumentando el pH de estos organelos lo que interfiere con la capacidad del *Plasmodium* para metabolizar y utilizar la hemoglobina eritrocítica (Schwartz, 1992). Se ha propuesto también que actúa formando un complejo con la hematina ó también llamada ferritroporfirina IX que impide la destoxicación de este metabolito dañino para el parásito, lo que conlleva a una lesión generalizada de las membranas del mismo (Hasting, *et.al* 2002). Existen datos que sugieren la posibilidad de que la toxicidad de la Cloroquina (CLQ) contra los parásitos de malaria involucra su efecto sobre el ADN (Kwakyne y Meshnick, 1990). Sin embargo su utilidad se limita para la cepa *P.*

falciparum que es parcial o completamente resistente a esta droga, por lo que desafortunadamente su uso se está limitando debido a la continua aparición de cepas resistentes.

Además de su ya conocido efecto antimalárico, esta droga tiene propiedades bioquímicas interesantes que han permitido su aplicación en algunas infecciones virales como flavivirus, retrovirus y coronavirus así como en el tratamiento de enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide y el síndrome linfoproliferativo donde esta droga es utilizada con éxito ya que disminuye el progreso de dichas enfermedades y presenta toxicidad limitada (Savarino, *et. al.* 2003).

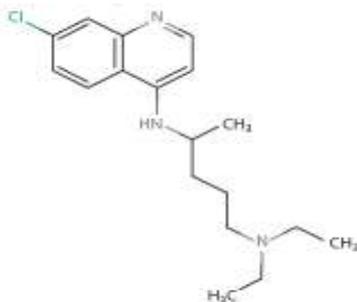


Figura 6. Estructura química de la cloroquina. (Tomado de Goodman y Gilman, 2003)

La pirimetamina es un esquizonticida eritrocítico que pertenece al grupo de las diaminopirimidinas (5,4-clorofenil-6-etil-2,4-pirimidindiamina) (figura 7). Se ha utilizado en combinación con una sulfonamida, usualmente sulfadoxina o dapsona, posiblemente es activa contra las formas pre-eritrocíticas del parásito e inhibe el desarrollo del esporozoito. Es efectiva contra las 4 formas de malaria humana, aunque han surgido cepas resistentes a esta droga (WHO, 2006).

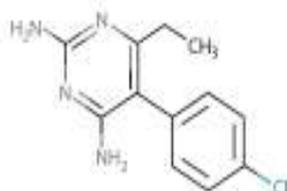


Figura 7. Estructura química de la pirimetamina (Tomado de Goodman y Gilman, 2003)

Se ha propuesto como su mecanismo de acción la inhibición de la enzima dihidrofolato reductasa plasmodial, de manera que indirectamente bloquea la síntesis de ácidos nucleicos en el parásito (WHO, 2006).

La cloroquina y la pirimetamina son dos medicamentos utilizados ampliamente como drogas antimaláricas, interesantemente se les han encontrado diversas aplicaciones terapéuticas en el tratamiento de desordenes inmunológicos como la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico y el síndrome linfoproliferativo, en estas enfermedades la mejoría en el cuadro clínico del paciente se ha atribuido a la actividad pro-apoptótica que tienen las drogas ((Meng *et. al.* 1997; Potvin, *et. al.* 1997).

4. APOPTOSIS.

4.1 Generalidades de apoptosis.

La apoptosis o muerte celular programada es un mecanismo genéticamente controlado en el que la célula por un estímulo ambiental, activa una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que culminan con la muerte y formación de cuerpos apoptóticos que se eliminan eficientemente (Kiechle y Zhang, 2002), este proceso está implicado en diferentes eventos patológicos y fisiológicos. En algunas situaciones la apoptosis se describe como un mecanismo protector contra la enfermedad por eliminar células no requeridas, dañadas, precancerosas, excesivas o viejas así como que posee funciones homeostáticas en la regulación del desarrollo y crecimiento celular (Arends y Wyllie, 1991). Adicionalmente, este proceso se ha reconocido como un importante mecanismo de defensa contra diversos parásitos, desde virus hasta nemátodos. En contraste, investigaciones recientes sugieren que la apoptosis podría estar involucrada en el desarrollo de algunos padecimientos como el cáncer, las inmunodeficiencias, la degeneración neuronal, la linfoproliferación, la inflamación, las enfermedades degenerativas y las enfermedades autoinmunes (Touré-Balde, *et. al.* 1996). En estos procesos la inducción y en algunos casos la inhibición de la apoptosis suele ser benéfica, por lo tanto, las terapias que modulan la apoptosis proporcionan una nueva oportunidad para el tratamiento de numerosas enfermedades (White, *et. al.* 1996).

Los cambios morfológicos que ocurren durante este proceso incluyen: la pérdida del contacto celular y de las estructuras membranales especializadas como las microvellosidades, así como la formación de protuberancias en la membrana y la 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), la condensación de la cromatina; la fragmentación del 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 (denominadas cuerpos apoptóticos) que contienen organelos intactos y fragmentos nucleares, los cuales son rápidamente reconocidos y fagocitados por macrófagos o células epiteliales adyacentes (Touré-Balde, *et. al.* 1996).

Los cambios bioquímicos que se presentan durante este proceso involucran la activación de las caspasas (cistein proteasas) que se encuentran en estado latente y que se activan como respuesta a diversos estímulos. Existen básicamente dos vías de activación: la vía intrínseca de la apoptosis que se caracteriza por la liberación del citocromo c de las mitocondrias, en la que se activa la caspasa-9; y la vía extrínseca mediada por receptores de muerte que se unen a su ligando sobre la superficie de la membrana celular, estos receptores incluyen: receptor TNF, FAS, DR (death receptor) 3, DR4, DR5 y DR6, mientras que los ligandos de muerte incluyen TNF, linfotoxinas, Fas-L, Apo3L y TRAIL en esta vía se activa la caspasa-8. Ambas vías culminan con la activación de la caspasa-3 lo que da como consecuencia la activación de una endonucleasa que degrada paulatinamente el ADN, generando multímeros de aproximadamente 180 a 200 pb (pares de bases) (Rossi y Daigiano, 2003, Jiménez y Merchant, 2003).

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 (Arends y Wyllie, 1991).

La muerte celular programada o apoptosis también se considera como un mecanismo importante que regula el desarrollo, maduración y activación de los linfocitos, ya que los linfocitos pueden morir por falta de estimulación propia o bien por un proceso activo como la señalización a través de receptores de muerte o bien a través de citocinas como TNF- α (Parijs y Abbas, 1998). La eliminación de las células autoreactivas se presenta en los linfocitos T inmaduros en el timo. La unión del receptor T a la célula T inmadura provoca en ellas una respuesta de autodestrucción a través de apoptosis. Aunque no hay una evidencia directa de que este proceso se lleve a cabo en las células B, se cree que también involucra apoptosis de manera similar a las células T (Williams, 1994).

4.2 Genes *FAS* y *BCL-2*.

Diversas moléculas regulan la apoptosis en las células del sistema inmune dentro de las cuales se encuentra FAS o CD95 que es un miembro de la familia de receptores TNF y es un potente inductor de apoptosis, cumple un papel importante en la homeostasis del sistema inmune dado que participa en la eliminación de los linfocitos potencialmente autoreactivos y regula la respuesta inmune reduciendo el número de células T y B antígeno-específicas tras la eliminación del patógeno. El mecanismo mediante el cual se genera este proceso comienza cuando la molécula de FAS se une al receptor de muerte FASL ó CD95L, el cual recluta dos moléculas transductoras de la señal llamadas TRADD (TNF R1- Associated Death Domain Protein) y FADD (Fas Associated protein Death Domain). El complejo formado se denomina DISC, el cual se une a la procaspasa 8 para activarla e iniciar la cascada de proteasas característica del proceso de apoptosis (Kiechle y Zhang, 2002).

Por otro lado, el gene BCL-2 es otra de las moléculas que participa en la regulación de la apoptosis, se trata de uno de los primeros miembros de una familia de oncogenes cuya principal función es incrementar la sobrevivencia celular e inhibir el proceso de apoptosis, es por tanto uno de los más estudiados y mejor caracterizados, se trata de una proteína integral de membrana de 26 kD que se localiza en las mitocondrias, el retículo endoplásmico liso y en la membrana nuclear. BCL-2 se caracteriza funcionalmente por inhibir la muerte celular programada por la vía mitocondrial en una amplia variedad de tipos celulares ya que previene la activación de las caspasas que llevan a cabo este proceso. Estudios de mutagénesis dirigida en el gene BCL-2 indican que su función inhibidora de la apoptosis y su capacidad de interactuar con otras proteínas, se encuentra localizada principalmente en dos dominios, conocidos como BH1 y BH2 (Williams, 1994).

4.3 Apoptosis en malaria.

Existen varios fenómenos en la malaria en los que podría estar involucrada la apoptosis, 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 (Hembly, *et. al.* 2000), aunado a esto, en los estudios realizados en modelos en ratón, se han encontrado significativamente incrementadas las frecuencias y números absolutos de células apoptóticas en el bazo de

los ratones infectados (Hembly, *et. al.* 2000), además las infecciones agudas con *P. falciparum* se asocian con un incremento en la apoptosis de células TCD4+, células TCD8+ y linfocitos B en este mismo órgano (Touré-Balde *et.al.* 1996).

Un incremento en la apoptosis de células linfoides ha sido también descrito durante la infección de ratón con microorganismos como virus (Razvi, *et. al.* 1995), bacterias (Fuse, *et. al.* 1997), helmintos (Fallon, *et. al.* 1998) y protozoarios (Liesenfeld, *et. al.* 1997, Lopes, *et. al.* 1995). Las preguntas relevantes en estos sistemas son en primer lugar si el parásito utiliza las señales apoptóticas para interferir con la respuesta inmune y establecerse en el huésped o si el incremento de la apoptosis durante la infección está asociado con un silenciamiento normal de la respuesta inmune contra el parásito. En la malaria no se ha respondido esta incógnita, algunos autores proponen que los altos niveles de apoptosis en el bazo podrían ser un mecanismo de defensa del huésped para limitar la excesiva respuesta inflamatoria o bien una medida por parte del parásito para evadir la respuesta inmune (Touré-Balde, *et. al.* 1995, Touré-Balde, *et. al.* 1996).

El óxido nítrico también puede promover o inhibir el proceso de apoptosis en algunas células (Chung, *et. al.* 2001). Los efectos anti-apoptóticos del NO se han demostrado en células como los hepatocitos donde su efecto involucra la inhibición de la caspasa-8 lo que impide la liberación mitocondrial del citocromo c. (Kim, *et. al.* 2000). Los efectos pro-apoptóticos del NO son complejos e involucran una gran variedad de vías de señalización (Williams y Djamgoz, 2005). En muchos tipos celulares el NO puede formar IRN y directamente dañar el ADN (Wink y Mitchell, 1998) y dependiendo de su concentración y del tipo de célula, este daño puede promover el proceso de apoptosis. Se ha evidenciado el efecto pro-apoptótico del óxido nítrico en células neuronales (Wei, *et. al.* 2000), células epiteliales (Li, *et. al.* 2001), macrófagos (Lu, *et. al.* 2003), células vasculares de músculo liso (Chae, *et. al.* 2004). El mecanismo mediante el cual el óxido nítrico induce apoptosis involucra la participación de mecanismos mitocondriales, ya que este radical es capaz de inducir un decremento en el potencial transmembrana mitocondrial, el cual es seguido por la liberación del citocromo c al citosol, lo que provoca la activación de la caspasa-3 (Pérez, *et. al.* 2007).

4.4 Detección de la Apoptosis.

Durante el proceso de apoptosis las células comienzan a sufrir una serie de cambios morfológicos y bioquímicos característicos, los cuales permiten su determinación por una gran variedad de técnicas orientadas a cuantificar el proceso entre las cuales podemos mencionar: La electroforesis de ADN en gel de agarosa, que es una técnica en la cual se observa el rompimiento del ADN en fragmentos con pesos moleculares en múltiplos de 180 pb como un típico patrón en escalera en geles de agarosa característico de las poblaciones de células apoptóticas. La técnica de TUNEL (terminal deoxytransferase-mediated bio-dUTP nick-end labelling) se fundamenta en la determinación de la presencia de ADN fragmentado en las células apoptóticas que incorporan nucleótidos biotinilados en el extremo de las hebras libres el cual se visualiza mediante inmunohistoquímica. Esta técnica requiere especial cuidado en su interpretación, ya que las hebras de ADN de células necróticas pueden producir resultados falsos positivos. Por último la citometría de flujo que es la técnica que se utilizó para la realización de este proyecto de investigación que a continuación se describe y fundamenta.

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular que permite la medición rápida de ciertas características físicas y químicas de células o partículas, una de las características analíticas más importantes de esta técnica es su capacidad de medir múltiples parámetros celulares, como el tamaño, forma y complejidad y además, cualquier componente celular o función que se pueda marcar con un fluorocromo. El fundamento de este método se basa en hacer pasar una suspensión de partículas (generalmente células) alineadas y de una en una por un haz de láser focalizado, es una tecnología que permite la medida simultánea de múltiples características de una sola célula a una velocidad de 500 a 4000 células por segundo, a través del aparato de medida en una corriente de fluido. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que corresponden a diferentes parámetros celulares y que se capturan por distintos detectores fluorescentes, los cuales los convierten en señales electrónicas que posteriormente se digitalizan para permitir la medida simultánea de varios parámetros en una misma célula. Los parámetros que típicamente se miden de forma simultánea por cada célula son: tamaño celular, complejidad de la célula e intensidades de fluorescencia a diferentes longitudes de onda. La apoptosis se cuantifica por este método cuando se usa la tinción con fluorocromos como la de Merocianina-540 (MCN 540) (Kiechle y Zhang, 2002) o la Anexina-V. (White, 1996), dicho proceso se basa en la determinación de la translocación de la fosfatidilserina, esta molécula que normalmente está confinada en la cara interna de la membrana celular, durante la apoptosis se transloca a la cara externa, lo que permite que la Anexina-V (una proteína de unión a fosfolípidos acoplada a isotiocianato de fluoresceína) se una específicamente a esta molécula y dicha unión se puede detectar por la intensidad de fluorescencia con el citómetro de flujo. Esta técnica se considera como una de las más sofisticadas puesto que es extremadamente sensible y aunque su costo es muy alto (Nyati, *et. al.* 2006), sus aplicaciones y utilidad son considerables, de hecho en este trabajo además de utilizarla para la detección de apoptosis también se utilizó para determinar de manera simultánea el fenotipo celular por medio de anticuerpos monoclonales anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 y anti-B220 acoplados con Ficoeritrina.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La malaria es la enfermedad infecciosa que cobra 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 regulación de la respuesta inmune que detienen la proliferación y promueven la eliminación del parásito ya que a pesar de varias décadas de intensa investigación en el campo, los conocimientos al respecto son sorprendentemente limitados. Diversos autores han demostrado que los linfocitos T y B son indispensables para el control de la infección (Fell y Smith 1998, Kumar, *et.al* 1989, Süss, *et.al* 1988, Brake, *et.al* 1988; Taylor, *et.al* 1993). Por otro lado, las drogas antimaláricas cloroquina y pirimetamina se están utilizando con éxito para el tratamiento de desórdenes inmunológicos como el síndrome linfoproliferativo, la artritis reumatoide y el lupus eritematoso sistémico (Nishimura, *et.al.* 1998, Landewe, *et.al.* 1992), estas enfermedades poseen características en común como lo es el fenómeno de autoinmunidad, problemas en los linfocitos activados para sufrir apoptosis y la pérdida del balance entre las citocinas pro- y anti-inflamatorias. La mejoría en la sintomatología del paciente se atribuye a que ambas drogas son capaces de inducir apoptosis en los linfocitos y de esa forma modular la producción de las citocinas. Puesto que ambas drogas inducen apoptosis de linfocitos y dada la relevancia que tienen estas células en la respuesta inmune contra *Plasmodium*, consideramos importante estudiar como afecta el tratamiento con estas drogas la apoptosis total y la de las subpoblaciones de linfocitos T (CD3+, CD4+, CD8+) y B de las células de bazo ya que este es el sitio donde se lleva a cabo la eliminación del parásito y donde existe la mayor activación de linfocitos en ratones BALB/c infectados con *Plasmodium yoelii* 17XL, además analizamos como el tratamiento con estas drogas modifica la expresión de los genes que regulan la respuesta inmune tal como FAS, BCL-2, TNF- α , IFN- γ , TGF- β , IL-10, iNOS y la producción de NO.

6. OBJETIVOS.

6.1 OBJETIVO GENERAL.

Dado que el tratamiento con cloroquina o pirimetamina en pacientes con enfermedades autoinmunes además de modificar los niveles de apoptosis, también modula la producción de las citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, se decidió evaluar como afecta el tratamiento con cloroquina y pirimetamina el proceso de apoptosis de los linfocitos T (CD3+, TCD4+, T CD8+) y B, así como los niveles de expresión de genes que codifican para las citocinas (pro- y anti-inflamatorias) asociadas con la respuesta inmune en malaria y con la apoptosis como los son: FAS, BCL-2, TNF- α , INF- γ , TGF- β , IL-10, iNOS en las células de bazo de ratones infectados con *Plasmodium yoelii* 17XL.

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

- Evaluar la cinética de la parasitemia en los ratones infectados con *P. yoelii* 17XL tratados con cloroquina, pirimetamina o con el vehículo.
- Investigar el efecto del tratamiento con cloroquina y pirimetamina sobre la apoptosis total de células de bazo y a la de las subpoblaciones de linfocitos T CD3+, T CD4+, T CD8+ y B de ratones que cursan una infección con *Plasmodium*.
- Determinar si el tratamiento con cloroquina o pirimetamina modifica la expresión de los genes FAS, BCL-2, TNF- α , IFN- γ , TGF- β , IL-10, iNOS y la concentración de NO en suero de ratones infectados con *P. yoelii* 17XL.

7. HIPÓTESIS.

El tratamiento con los antimaláricos cloroquina y pirimetamina modificará la apoptosis y la expresión de los genes involucrados en la regulación de la respuesta inmune de los ratones infectados con *Plasmodium yoelii 17XL*.

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 17 XL* 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 libres de nucleasas y estériles.

Cajas petri de 10 cm de diámetro, de plástico, nuevas y estériles.

Tubos Eppendorf: 1.5mL, 250mL, nuevos y estériles.

Puntas para micropipetas: 1.5 μ L, 2.5 μ L, 10 μ L, 200 μ L, 1000 μ 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).

Centrifuga Eppendorf 5804 R

Espectrofotómetro UV (WPA).

Equipo analizador de geles (Gel Doc 1000, BIO-RAD).

Microcentrífuga (Eppendorf 5415C).

Micropipetas (Eppendorf: 2.5 μ L, 10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 1000 μ L).

Micropipeta (Eppendorf 8 x 200 mL).

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).

Congelador (Nieto)

Legaci refrigeration System.

Autoclave tuttner (Brinkmann 2540M).

Citómetro de flujo FACSCalibur, Software Cell Quest™ (Beckton Dickinson)

8.4 Reactivos

Aceite mineral (Sigma).
Agua desionizada (Hidropura).
Acrilamida (USB/Amersham).
Albúmina sérica bovina (Sigma).
Alcohol isoamilico
Amortiguador para retrotranscripción 5X (5X first strand buffer) Gibco BRL.
Amortiguador para apoptosis por Anexina V
(10mM de HEPES/NaOH, pH 7.4; 140 mM NaCl; y 5mM CaCl₂)
Amortiguador de FACS (0.1% albúmina sérica bovina, 0.1% azida de sodio/PBS
Anexina-V FLUOS (Roche, Diagnostic)
Anticuerpos monoclonales anti-CD3,-CD4,-CD8 o -B220 anti-ratón acoplados a
Ficoeritrina (BD Pharmingen)
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), (Farmacia).
Ditioeritritol (dT) (Gibco BRL).
EDTA (Sigma).
Etanol absoluto (Merck).
Éter (JT Baker).
Fenol ácido (Sigma).
Fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄) (USB/Amersham).
Fosfato de sodio monobásico (Na₂HPO₄), (USB/Amersham).
Gelatina (Sigma).
Glicerol (Sigma).
Fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄) (USB/Amersham).
Fosfato de sodio monobásico (Na₂HPO₄) (USB/Amersham).
Heparina de sodio (Sigma).
Inhibidor de ARNsa (Gibco BRL).
Isopropanol (JT Baker)
Ioduro de propidio
Marcador de peso moléculas ADN Ladder 100 pb (Gibco).
2-mercaptoetanol (Sigma).
Metanol (JT Baker).
Nitrato reductasa: Roche
Oligo dT.
Persulfato de amonio (Sigma)
Retrotranscriptasa MMLV-RT.
Reactivo de Griess: (1% sulfanilamida (sigma), 0.1% N-naftil etilendiamina (sigma) y
ácido sulfúrico)
Sacarosa (Sigma).
Sarcosil (Sigma).
Sulfanilamida (p-aminobenzenesulfonamida) 99% (Sigma).

Solución Amortiguadora de fosfatos (NaCl 8.0 g, KCl 0.2g, Na₂HPO₄ 1.44 g , KH₂PO₄ , 0.24 g, Agua millipore cpb 1000 mL) Realizar en alícuotas de 250mL y esterilizar.

SDS (Dodecilsulfato de sodio) (Sigma).

Taq polimerasa (AmpliTaQ ADN 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: TNF- α , IFN- γ , IL-10, TGF- β , iNOS, FAS, BCL-2.

Gen	Secuencia de los oligonucleótidos utilizados
FAS	5' ATT GCT GAA GAC ATG ACA ATC CAG GA 3' 5' AAC AGA AGC AGT CCC TGG AAC CTG 3'
BCL-2	5' TCA TGA AGA CAG GGG CCT TTT 3' 5' TGG AGC TGC AGA GGA TGA TTG 3'
TNF- α	5' ATG AGC ACA GAA AGC ATG ATC CGC 3', 5' CCA AAG TAG ACC TGC CCG GAC TC 3'
INF- γ	5' TGCATC TTG GCT TTG CAG CTC TTC CTC ATG GC 3' 5' TGG ACC TGTGGG TTG TTG ACC TCA TTG GC 3'
TGF- β	5' GAC CGC AAC AAC GCC ATC TA3' 5'GGC GTA TCA GTG GGG GTC AG 3'
IL-10	5' ATG CAG GAC TTT AAG GGT TAC TTG GGT T 3' 5' ATT TCG GAG AGA GGT ACA AAC GAG GTT T 3'
iNOS	5' CAG GAT GCT AAC GTA GAC CTT G 3' 3' CAG CTC CAC AAG CTG GCT CG 5'
β -actina	5' GTG GGC CGC TCT AGGCAC CAA 3' 3' CTC TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC 5'

9. DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA.

9.1 Infección de los ratones.

Se utilizaron 40 ratones singénicos BALB/c machos de alrededor de 8 semanas de edad que se separaron en 8 grupos con 5 ratones cada uno, 4 de los grupos se infectaron vía intravenosa con 5×10^4 eritrocitos parasitados con *P. yoelii* 17XL y 4 grupos se dejaron sin infectar para utilizarlos como control (figura 8).

9.2 Tratamiento de los ratones.

El día 7 post-infección los ratones infectados y los ratones control se trataron por vía oral con dosis terapéuticas de los fármacos de la siguiente manera: al primer grupo se les administraron 25 mg/kg de CLQ en 50 μ L de aceite de maíz, el segundo grupo se trató con 10 mg/kg de PYR en 50 μ L de aceite de maíz, al tercer grupo únicamente se le administró 50 μ L de aceite de maíz (Vehículo VEH) y finalmente al cuarto grupo se le dejó sin tratamiento como control. Los 4 grupos de 5 ratones restantes se utilizaron como control adicional no se infectaron y se trataron de la misma manera el día 7 (figura 8).

9.3 Sacrificio de los ratones y extracción de bazo.

El día ocho post-infección los ratones se sacrificaron, se les extrajo la sangre del corazón a partir de la cual se separó el suero que se almacenó a -20° C hasta la determinación de NO por la reacción de Griess. Además, se extrajo el bazo en condiciones estériles, el tejido se hizo pasar por una malla de nylon utilizando PBS (solución buffer de fosfatos) y las células se lavaron con 5 ml de esta solución. Las células se centrifugaron a 3,000 rpm durante 5 min. y se eliminó el sobrenadante. Se evaluó la apoptosis de los linfocitos T y B a partir de estas células utilizando la técnica de Anexina-V y citometría de flujo (figura 8) de las células restantes se obtuvo el ARN para determinar la expresión de los genes por la técnica de RT-PCR.

9.4 Evaluación de la parasitemia.

Diariamente a partir del día 3 de post-infección se tomaron muestras de sangre de la cola de los ratones para evaluar la parasitemia en frotis teñidos con Giemsa. Se evaluó 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. El curso de la infección en cada grupo de ratones se muestra como la media geométrica del porcentaje de parasitemia.

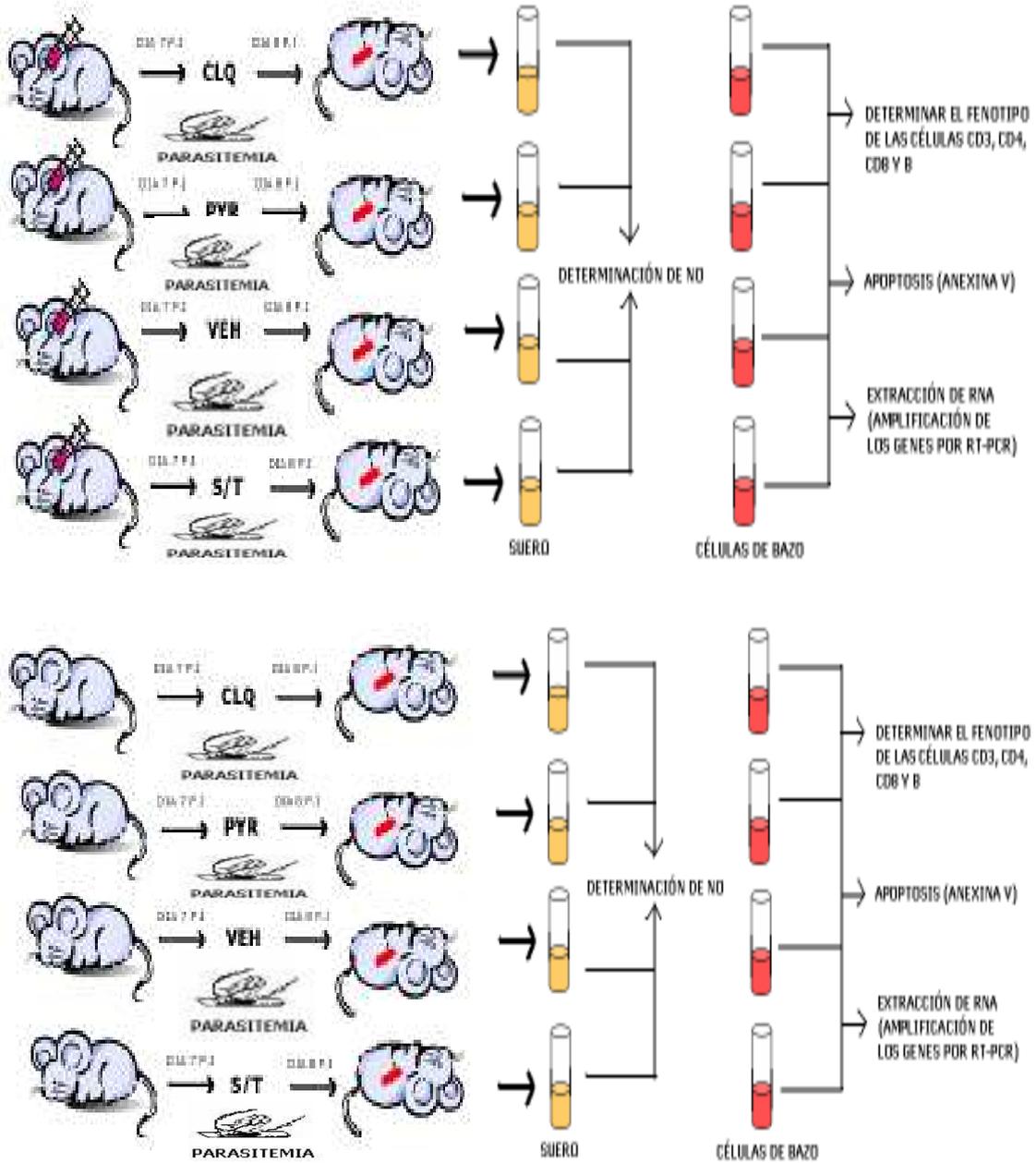


Figura 8. Representación esquemática del diseño experimental.

9.5 Detección de la apoptosis con la técnica de Anexina V-FLUOS

Se evaluó la apoptosis de los linfocitos T y B a partir de las células de bazo de cada ratón para lo cual se contaron en un hematocitómetro y la suspensión se ajustó a 1×10^6 de estas células, posteriormente se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos y se colocaron en un tubo Eppendorf donde se resuspendieron con 200 μ l de amortiguador de reacción (10 mM de HEPES/NaOH, pH 7.4; 140 mM NaCl; y 5 mM CaCl_2). Se adicionaron 2 μ l de Anexina-V FLUOS en cada uno de los tubos y se incubaron por 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente, las células se lavaron con el amortiguador de reacción (que contenía 10 μ g de yoduro de propidio) y se resuspendieron en 400 μ L del mismo. La fluorescencia se detectó por citometría de flujo analizándose en cada muestra 40,000 eventos. Se excluyeron las células necróticas del análisis, utilizando yoduro de propidio, el porcentaje de células apoptóticas en relación a su fenotipo se calculó utilizando el software del citómetro de flujo (figura 9).

9.6 Evaluación del fenotipo celular.

Para la evaluación del fenotipo celular, se colocaron 1×10^6 células de bazo en un tubo de citómetro de flujo y se lavaron con 1000 μ L de PBS, posteriormente se tiñeron con las diluciones (1:500) de anticuerpos monoclonales anti-CD3,-CD4,-CD8 o -B220. Las células se incubaron 30 min. a 4° C en la oscuridad y se lavaron una vez con el amortiguador de FACS (0.1% albúmina sérica bovina, 0.1% azida de sodio/PBS). Se resuspendieron en 100 μ L del mismo amortiguador y se tiñeron con Anexina- V Fluos como se indicó anteriormente, después de 10 minutos se lavó con solución de PBS y se colocó en hielo, la fluorescencia se detectó por citometría de flujo para cada muestra se analizaron 40,000 eventos (figura 9). Como control positivo se utilizaron células de bazo de ratones BALB/c tratados 12 h antes con dexametasona.

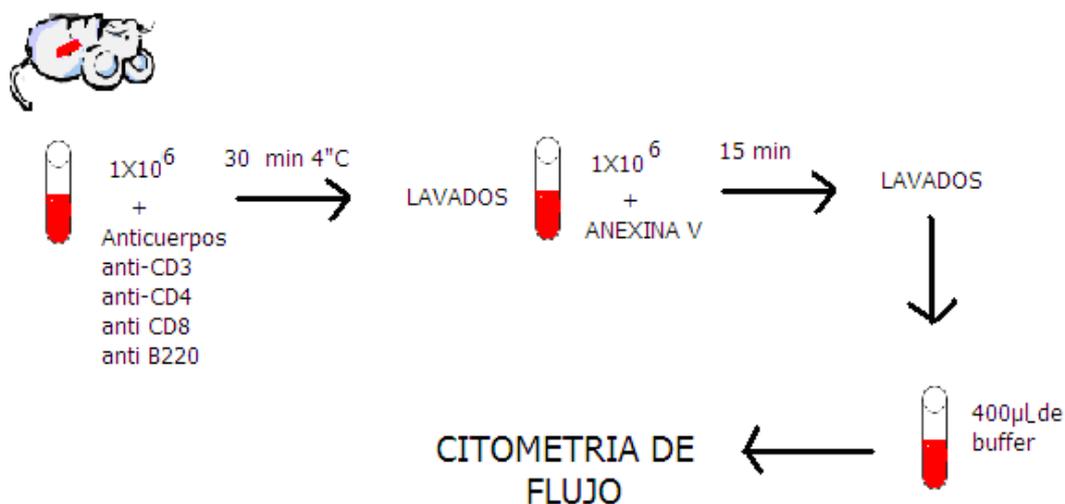


Figura 9. Representación esquemática del diseño experimental de la técnica de Anexina-V y citometría de flujo.

9.7 Expresión de citocinas en el bazo por la técnica de RT-PCR.

9.7.1 Extracción de ARN.

Las células de bazo restantes se centrifugaron a 3,000 rpm y se les eliminó el sobrenadante, al botón celular se le adicionaron 500 µL del reactivo comercial de Trizol para obtener el ARN. En un tubo eppendorf se colocaron 500 µL del lisado y se le adicionaron 100 µL de la mezcla cloroformo: alcohol isoamilico (49:1), se mezcló en vortex por 10 min y se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 min. La fase acuosa se transfirió a otro tubo y se le adicionó un volumen igual de isopropanol a -20° C. Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm durante 15 min, se desechó el sobrenadante y al botón se le adicionaron 500 µL de etanol al 80% en agua DEPC (Diethylpircarbonato 1%) enfriado previamente a -20° C. Se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm durante 15 min y posteriormente se desechó el sobrenadante, los tubos se cubrieron con papel parafilm, al que se le realizaron pequeños agujeros con una aguja (limpia y estéril). Se dejó secar durante 24 horas o en el termociclador a 60° C por 5 min y finalmente las muestras se hidrataron con 20 µL de agua DEPC al 0.1 % estéril y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 5 seg para posteriormente cuantificar el ARN de la siguiente manera: en un tubo Eppendorf se colocó 1 µL de ARN puro y se adicionó 199 µL de agua bidestilada (dilución 1:200). Se leyó la absorbancia de la solución de ARN a 260 nm y se determinó su concentración por medio de la siguiente formula

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

9.7.2 Retrotranscripción.

Se colocaron 1.5 µg del ARN previamente cuantificado en un tubo eppendorf al cual se le adicionó agua DEPC y Oligo dT. Esta solución se incubó a 65°C por 10 min, después se colocó en hielo durante 5 min y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 seg. Posteriormente, se colocó en hielo y se le adicionaron 10 µL de la mezcla de reacción de retrotranscripción que contenía lo siguiente:

Mezcla de reacción de retrotranscripción	1Rx
Amortiguador de retrotranscripción 5X	4.0 µL
0.1mM de dTT	2.0 µL
dNTPs	2.0 µL
Enzima M-MLV RT	1.0 µL
Inhibidor de ARNsa	0.1 µL
Agua DEPC	1.0 µL
Volumen final	10.1 µL

Después se incubó en el termociclador a 37°C durante 1 hora y a 95°C por 5 min. Finalmente se le adicionaron 50 µL de agua DEPC fuera de la campana y el ADNc o retrotranscrito se guardó en el congelador (-20° C) hasta su uso.

9.7.3 Amplificación de los genes por PCR.

El ADNc así obtenido se utilizó para amplificar el gene de β -actina y simultáneamente en el mismo tubo cada uno de los siguientes genes: TNF- α , IFN- γ , TGF- β , IL-10 e iNOS (figura 10). Se preparó la mezcla de reacción de la siguiente forma considerando que el volumen final en el tubo debía ser de 20 μ L (todos los reactivos y mezcla de reacción se mantuvieron en hielo).

Mezcla de reacción de amplificación	Concentración/ Reacción	μ L/Rxn
10xAmortiguador de PCR	1X	2.0 μ L
25 mM MgCl ₂	2 mM	1.6 μ L
5 mM dNTP's	0.2 mM	0.8 μ L
20 μ M Oligo β -actina	0.1 μ M	0.1 μ L
20 μ M Oligonucleótido que corresponda (FAS; BCL-2, TNF- α , INF- γ , TGF- β , IL-10 e iNOS)	0.1 μ M	0.1 μ L
5U/ μ L taq polimerasa	0.5 U	0.1 μ L
Agua para PCR		12.3 μ L
	Volumen final	17.0 μ L

Posteriormente se distribuyeron en cada tubo 17 μ L de la mezcla de reacción previamente preparada y se le adicionó 50 μ L de aceite mineral y también 3 μ L de ADNc o retrotranscrito.

Se colocaron los tubos en el termociclador cuando la temperatura se encontraba a 94° C y se corrió el siguiente 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

Los productos de PCR así obtenidos se separaron por electroforesis en geles de acrilamida al 5%.

9.7.4 Electroforesis de los productos de PCR.

A cada producto de PCR se le adicionaron 10 μ L de amortiguador de carga en la fase acuosa, se mezcló evitando hacer emulsiones con el aceite mineral. En cada uno de los pozos del gel de acrilamida al 5% previamente preparado se depositaron 10 μ L de esta mezcla y en el último pozo 10 μ L del marcador de peso molecular de 100 pares de bases. La electroforesis del gel se corrió a 190 Volts por 2 horas. Posteriormente, los geles se tiñeron con 20 μ L bromuro de etidio (10 mg/mL) durante 5 min, se lavaron con agua destilada y las bandas se visualizaron con la ayuda de una cámara de video acoplada a un transiluminador de luz UV, se utilizó el software del analizador de geles

(Gel doc 100) para evaluar la densidad óptica de cada banda, el resultado de cada muestra se calculó en base a la densidad óptica de la banda correspondiente al gene constitutivo β -actina (Figura 10).

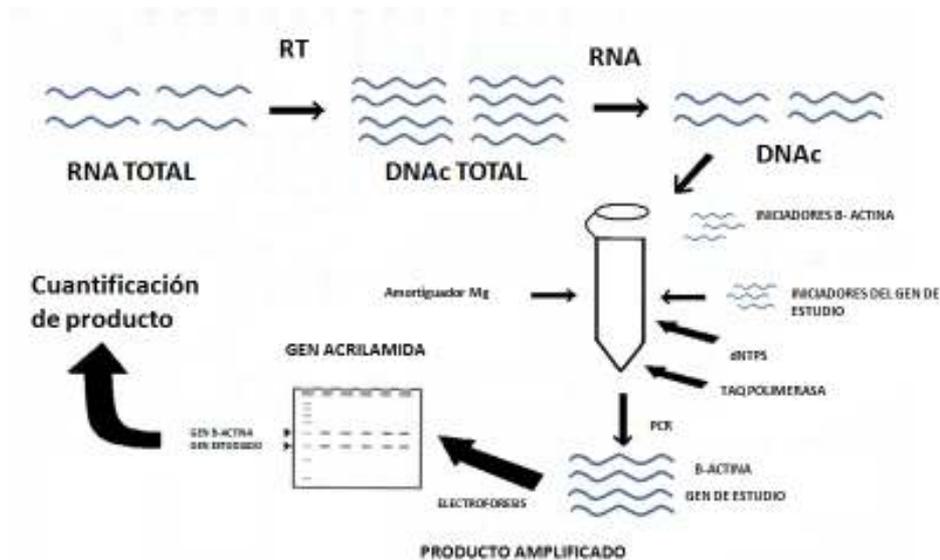


Figura 10. Representación esquemática del diseño experimental de la técnica de RT-PCR.

9.8 Determinación de NO.

Se preparó una curva estándar de nitrato de sodio utilizando para cada punto 15 μ L de un pool de suero normal de ratón BALB/c y se le adicionaron 5 μ L de estándar de nitratos a concentraciones que variaron desde 7.81 μ M hasta 500 μ M. Cada muestra de suero se analizó por duplicado. Se adicionaron 15 μ L de suero a un tubo eppendorf a cada una de las muestras problema se les adicionaron 5 μ L del estándar que corresponde a una concentración de 62.4 μ M y a todos los tubos se les trato de la siguiente manera: se les adicionó 15 μ L de NADPH (1.25 mg/mL), 5 μ l de la enzima nitrato reductasa (5 U/ml en agua destilada). Todos los tubos se incubaron protegidos de la luz a temperatura ambiente durante 15 min después de los cuales se les adicionaron 10 μ L de sulfanilamida (solución saturada en etanol), 100 μ L del reactivo de Griess (1% sulfanilamida, 0.1% de NED, 1% de ácido fosfórico en agua destilada).y 100 μ L de ácido tricloroacético (TCA 10%), se mezclaron perfectamente antes de la centrifugación a 14000 rpm por 5 min y finalmente 100 μ L del sobrenadante se transfirieron a una placa de 96 pozos para medir la absorbancia a 540 nm. Los tubos control se prepararon con agua destilada y con suero normal de ratón y se procesaron de la misma forma.

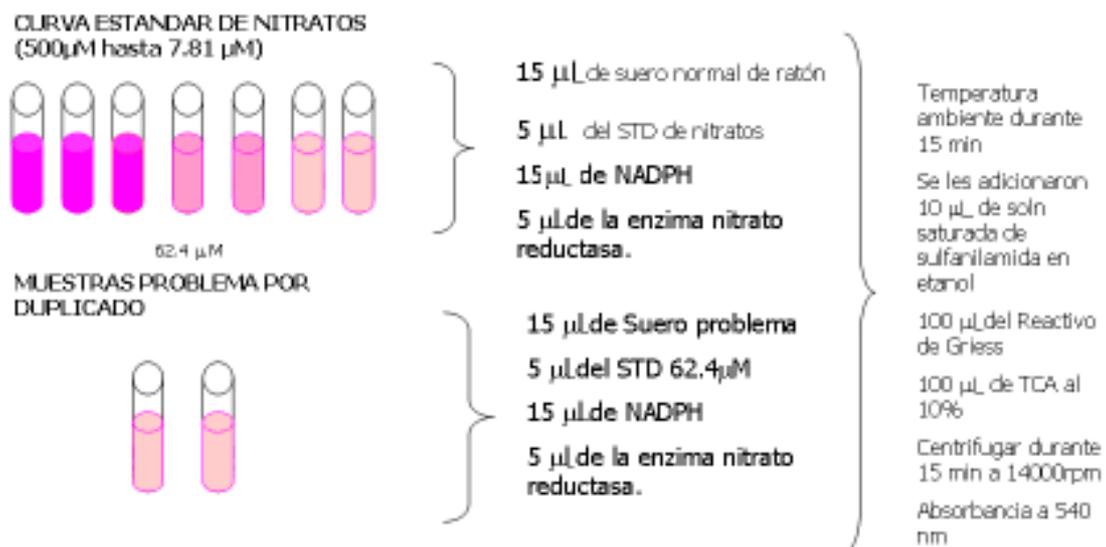


Figura 11. Representación esquemática del diseño experimental de la técnica de Griess.

9.9 Análisis estadístico de los resultados.

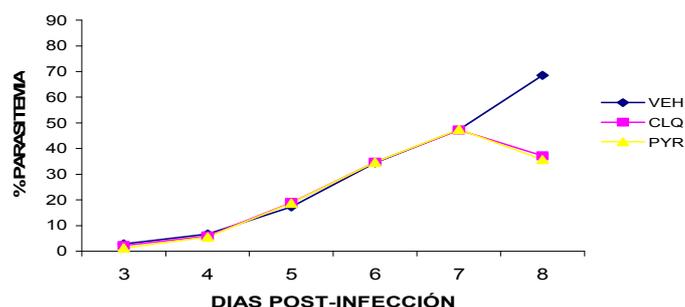
Cada gráfica de resultados es la más representativa de uno de los tres experimentos que se realizaron. Las diferencias estadísticas se determinaron por medio de análisis de varianza de una vía con el programa Statgraphics. Se considero diferencia estadísticamente significativa cuando el valor de $p < 0.05$.

10. RESULTADOS.

10.1 Parasitemia.

A partir del día 4 post-infección se evaluó la parasitemia en frotis sanguíneos teñidos con Giemsa a los 4 grupos de ratones BALB/c infectados con *P. yoelii* 17XL el día 7 post-infección se trataron con cloroquina (CLQ), pirimetamina (PYR) o únicamente con el vehículo (VEH) vía oral utilizando las dosis previamente descritas en la metodología. Los resultados se muestran en la gráfica 1, cada punto representa la media geométrica de la parasitemia obtenida por día. Los datos de los ratones infectados sin tratamiento (S/T) se omitieron en todas las pruebas realizadas debido a que no presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo de ratones tratados con el vehículo (VEH), por lo que únicamente se utilizó este último grupo como control.

La parasitemia fue similar entre los tres grupos de ratones hasta el día en que se administraron los fármacos (día 7 post-infección), ya que un día después del tratamiento se observó que tanto cloroquina como pirimetamina disminuyeron la parasitemia a un 30%, mientras que el grupo tratado con el vehículo presentó una parasitemia un poco mayor del 70%.



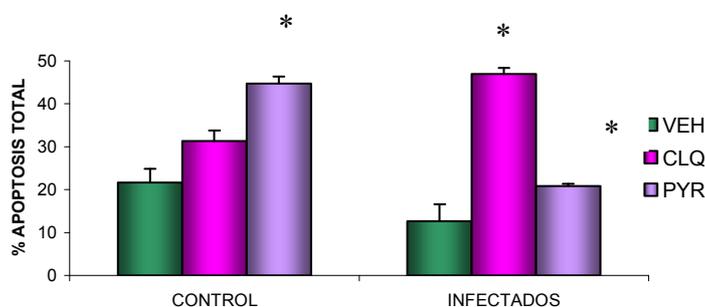
Gráfica 1. Efecto de la cloroquina y la pirimetamina sobre la parasitemia de ratones BALB/c infectados con *P.yoelii* 17XL. Cada punto en la gráfica representa la media geométrica de la parasitemia obtenida por cada grupo de 5 ratones que se trataron el día 7 post-infección con cloroquina (CLQ), pirimetamina (PYR) o vehículo (VEH). La gráfica muestra los resultados representativos de uno de los tres experimentos que se realizaron.

10.2 Apoptosis en las células de bazo.

Para evaluar si en la malaria el tratamiento con cloroquina o pirimetamina modifica los niveles de apoptosis en los linfocitos, se infectaron 3 grupos de ratones BALB/c con *Plasmodium yoelii* 17XL en el día 7 post-infección se trataron con cloroquina, pirimetamina o vehículo como se describe en materiales y métodos (como controles, 3 grupos sin infección se trataron de la misma forma), al día siguiente se sacrificaron y se obtuvieron las células del bazo para evaluar tanto la apoptosis total, como la de los linfocitos T (CD3+, CD4+, y CD8+) y B (B220) utilizando tinciones simultáneas con anticuerpos monoclonales (anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 y anti-B220 acoplados a

ficoeritrina) y con Anexina V marcada con FITC que se analizaron por citometría de flujo. Los resultados se muestran de la gráfica 2 a la 5.

Los ratones infectados con *P. yoelii* 17XL tratados con VEH (ratones control) presentaron una disminución en los niveles de apoptosis total de las células de bazo en comparación con los ratones sanos sin infectar tratados con el vehículo. En contraste, el tratamiento con cloroquina indujo un incremento estadísticamente significativo en la apoptosis total tanto en el grupo de ratones infectados como en el grupo de ratones sanos. Interesantemente este incremento fue notoriamente mayor en el grupo de ratones infectados. En los ratones sanos el tratamiento con pirimetamina incrementó la apoptosis aún más que la cloroquina, mientras que en los ratones infectados el tratamiento con pirimetamina incrementó la apoptosis en comparación con el grupo infectado tratado con vehículo. Sin embargo, la apoptosis fue estadísticamente menor en los ratones parasitados con *P. yoelii* 17XL que en los ratones sanos (gráfica 2).

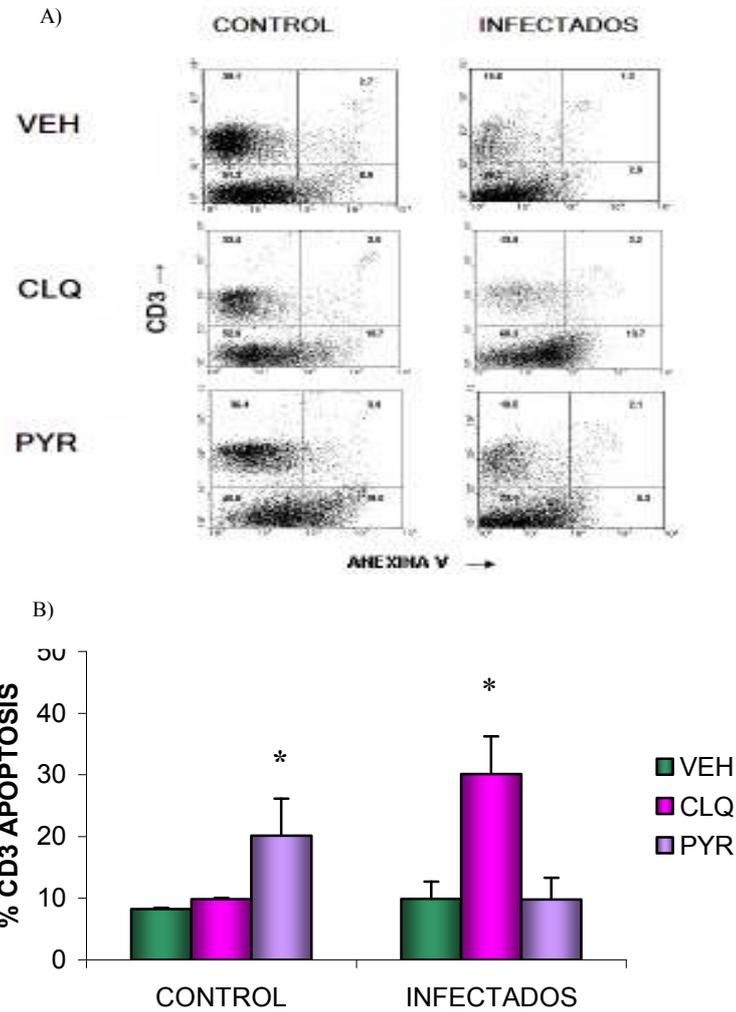


Gráfica 2. Efecto del tratamiento con cloroquina o con pirimetamina sobre la apoptosis total de las células de bazo en ratones infectados con *P. yoelii* 17XL. Se infectaron grupos de ratones BALB/c con *P. yoelii* 17XL, el día 7 post-infección se trataron con: cloroquina (CLQ) barras lilas, pirimetamina (PYR) barras moradas o con el vehículo (VEH) barras verdes. Como controles se utilizaron grupos de ratones no infectados tratados de la misma manera. El día 8 post-infección se sacrificaron, se les extrajo el bazo y se analizó la apoptosis total utilizando la tinción con Anexina V y citometría de flujo. Cada barra representa el promedio de los valores obtenidos por grupo de 5 ratones. El (*) denota una diferencia estadísticamente significativa con una $p < 0.05$.

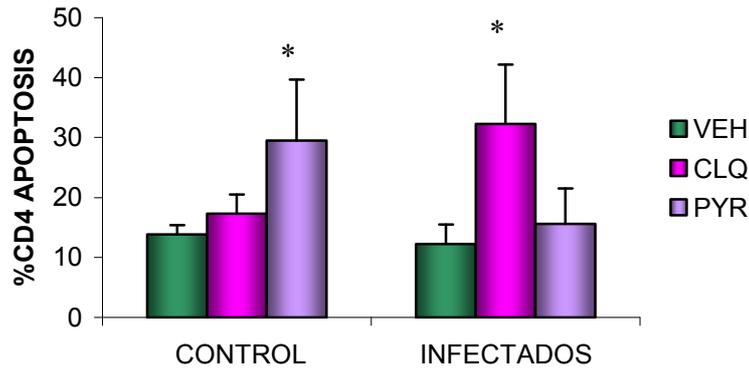
Los niveles de apoptosis de los linfocitos T (CD3+ gráfica 3, CD4+ gráfica 4 y CD8+ gráfica 5) en los grupos de ratones infectados con *P. yoelii* 17XL que se trataron con el vehículo, no se modificaron de forma estadísticamente significativa en comparación con sus controles sanos. Por el contrario, la apoptosis de las células B (gráfica 6) presentó una clara disminución del proceso de muerte celular en el grupo de ratones parasitados tratados con el vehículo en comparación con el grupo sano tratado de la misma forma.

En los ratones infectados con *Plasmodium* el tratamiento con cloroquina incrementó la apoptosis de las subpoblaciones de linfocitos T CD3+, T CD4+, T CD8+ y B, mientras que en los ratones sanos únicamente se incrementó la apoptosis en los linfocitos T CD8+ (Gráficas 3, 4, 5 y 6). Por el contrario, en los ratones sin infección el tratamiento con pirimetamina no incrementó los niveles de apoptosis de los linfocitos T CD3+, T CD4+, T CD8+, únicamente provocó un aumento en la subpoblación de linfocitos B de los ratones infectados. Nuestros resultados indican que los linfocitos B de los ratones infectados tratados con pirimetamina (gráfica 6) son las células que más contribuyen a

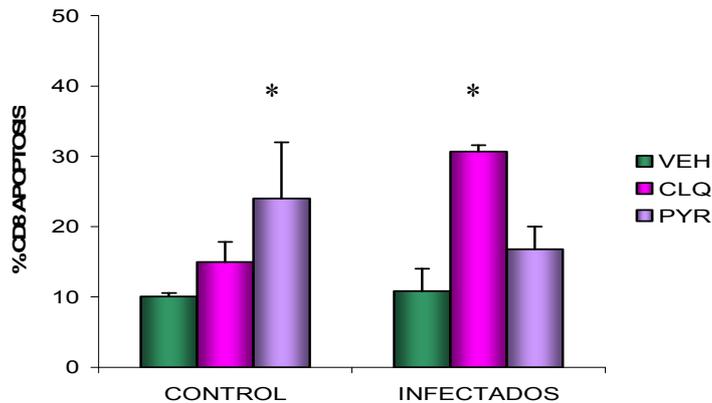
los niveles de apoptosis total, puesto que presentaron niveles notoriamente superiores a los de los linfocitos T (gráficas 3, 4, 5).



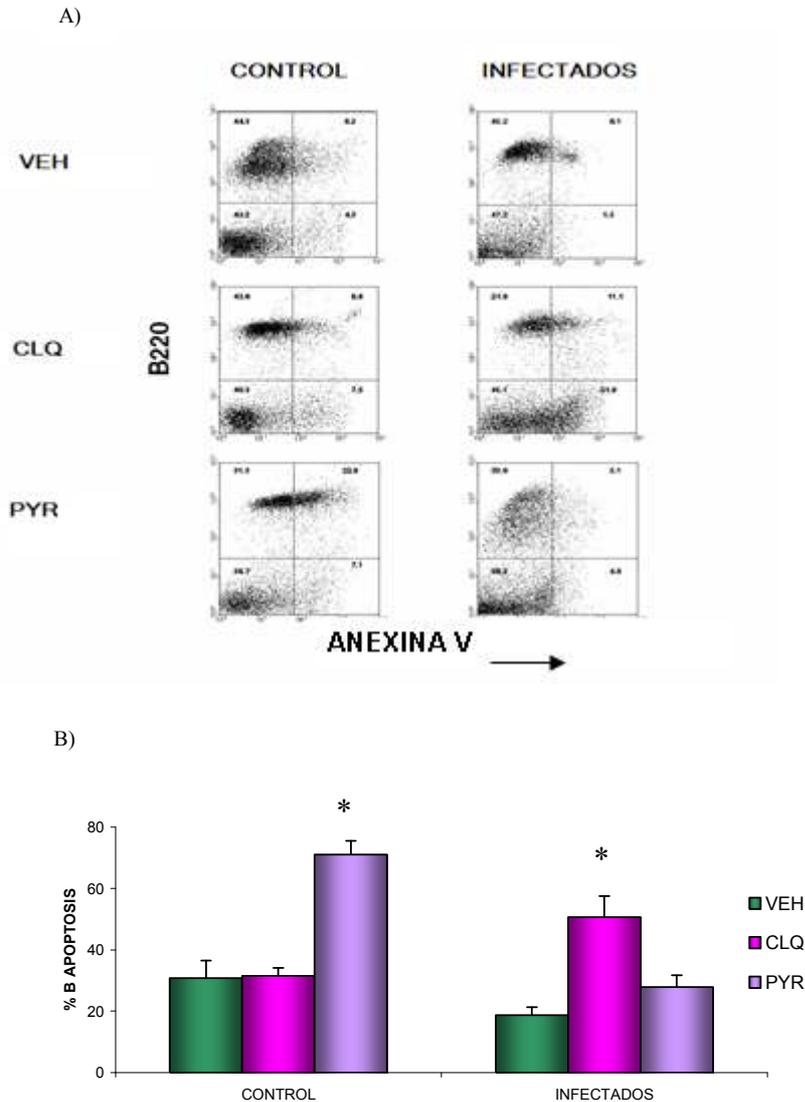
Gráfica 3. Efecto del tratamiento con cloroquina o con pirimetamina sobre la apoptosis de las células T CD3+ de bazo de ratones infectados con *P. yoelii* 17XL. Se infectaron grupos de ratones BALB/c con *P. yoelii* 17XL, el día 7 post-infección se trataron con: cloroquina (CLQ) barras lilas, pirimetamina (PYR) barras moradas o con el vehículo (VEH) barras verdes. Como controles se utilizaron grupos de ratones no infectados tratados de la misma manera. El día 8 post-infección los ratones se sacrificaron, para evaluar la apoptosis, se extrajeron las células del bazo y se realizaron tinciones dobles: con el anticuerpo anti-CD3 marcado con ficoeritrina y con anexina V, las muestras se analizaron por citometría de flujo. A) La gráfica de puntos que reobtuvo con el software del citómetro que presenta los resultados de un ratón representativo de cada uno de los grupos. B) Cada barra representa el promedio de los valores obtenidos por grupo (\pm una desviación estándar). El (*) denota una diferencia estadísticamente significativa al compararse con el control tratado con el vehículo con una $p < 0.05$ en el análisis de varianza de una vía con el programa Stathgraphics.



Gráfica 4. Efecto del tratamiento con cloroquina o con pirimetamina sobre la apoptosis de las células T CD4+ de bazo de ratones infectados con *P. yoelii* 17XL. Se infectaron grupos de ratones BALB/c con *P. yoelii* 17XL, el día 7 post-infección se trataron con: cloroquina (CLQ) barras lilas, pirimetamina (PYR) barras moradas o con el vehículo (VEH) barras verdes. Como controles se utilizaron grupos de ratones no infectados y tratados con cloroquina (CLQ), pirimetamina (PYR) o con el vehículo (VEH). El día 8 post-infección, los ratones se sacrificaron, para evaluar la apoptosis se extrajeron las células del bazo y se realizaron tinciones dobles con el anticuerpo anti-CD4 marcado con ficoeritrina y con anexina V. Las muestras se analizaron por citometría de flujo. Cada barra representa el promedio de los valores obtenidos por grupo de ratones. El (*) denota una diferencia estadísticamente significativa con una $p < 0.05$ en el análisis de varianza de una vía con el programa Stathgraphics.



Gráfica 5. Efecto del tratamiento con cloroquina o con pirimetamina sobre la apoptosis de las células T CD8+ de bazo de ratones infectados con *P. yoelii* 17XL. Se infectaron grupos de ratones BALB/c con *P. yoelii* 17XL, el día 7 post-infección se trataron con: cloroquina (CLQ), pirimetamina (PYR) o con el vehículo (VEH). Como controles se utilizaron grupos de ratones no infectados y tratados con cloroquina (CLQ), pirimetamina (PYR) o con el vehículo (VEH). El día 8 post-infección, los ratones se sacrificaron, para evaluar la apoptosis se extrajeron las células del bazo y se realizaron tinciones dobles con el anticuerpo anti-CD8 marcado con ficoeritrina y con anexina V, los resultados se evaluaron por citometría de flujo. Cada barra representa el promedio de los valores obtenidos por grupo de ratones. El (*) denota una diferencia estadísticamente significativa con una $p < 0.05$ en el análisis de varianza de una vía con el programa Stathgraphics.

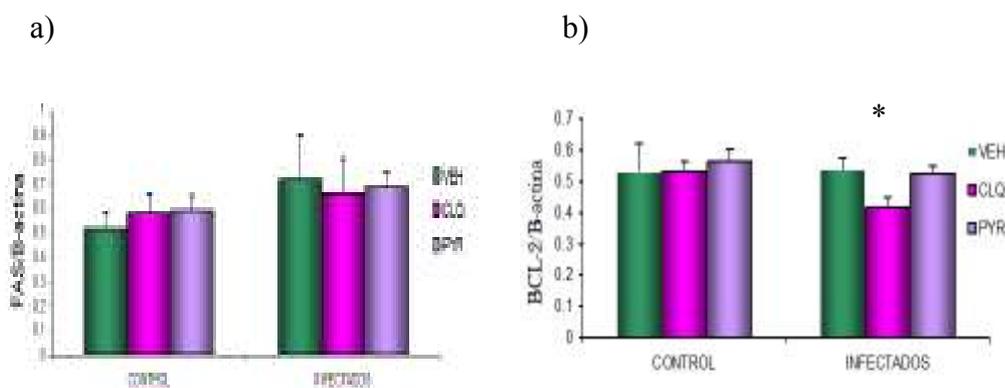


Gráfica 6. Efecto del tratamiento con cloroquina o con pirimetamina sobre la apoptosis de las células B de bazo de ratones infectados con *P. yoelii* 17XL. Se infectaron grupos de ratones BALB/c con *P. yoelii* 17XL, el día 7 post-infección se trataron con: cloroquina (CLQ), pirimetamina (PYR) o con el vehículo (VEH). Como controles se utilizaron grupos de ratones no infectados y tratados con cloroquina (CLQ), pirimetamina (PYR) o con el vehículo (VEH). El día 8 post-infección, los ratones se sacrificaron, para evaluar la apoptosis se extrajeron las células del bazo y se realizaron tinciones dobles con utilizando el anticuerpo anti-B220 marcado con ficoeritrina y con anexina V, los resultados se evaluaron por citometría de flujo. A) La gráfica de puntos que se obtuvo con el software del citometro que presenta los resultados de un ratón representativo de cada uno de los grupos. B) Cada barra representa el promedio de los valores obtenidos por grupo. El (*) denota una diferencia estadísticamente significativa con una $p < 0.05$ en el análisis de varianza de una vía con el programa Stathgraphics.

10.3 Efecto del tratamiento con cloroquina o pirimetamina sobre los niveles de expresión del ARNm que codifica para genes asociados con la apoptosis (FAS y BCL-2) en ratones infectados con *P. yoelii* 17XL.

Para analizar si el incremento en los niveles de apoptosis que presentaron los grupos de ratones tratados con los fármacos está asociado con la expresión de FAS y BCL-2, se analizó la expresión del ARNm de ambos genes por RT-PCR. Los resultados mostraron que la infección con *P. yoelii* 17XL incrementó ligeramente la expresión de FAS, sin

embargo este aumento no fue estadísticamente significativo. Por otro lado, el tratamiento con una sola dosis de cloroquina ó pirimetamina en los grupos de ratones infectados con *Plasmodium yoelii* 17XL no modificó de forma estadísticamente significativa la expresión del gen FAS en comparación con los grupos de ratones sanos tratados con los fármacos. El tratamiento con cloroquina indujo una disminución de la expresión del gen BCL-2 en el grupo de ratones infectados con el parásito que si tuvo significancia estadística (gráfica 7a y 7b).



Gráfica 7. Efecto del tratamiento con cloroquina o con pirimetamina sobre la expresión de FAS Y BCL-2 en las células de bazo de ratones infectados con *P. yoelii* 17XL. Se infectaron grupos de ratones BALB/c con *P. yoelii* 17XL, el día 7 post-infección se trataron con: cloroquina (CLQ), pirimetamina (PYR) o con el vehículo (VEH). Como controles se utilizaron grupos de ratones sanos tratados de la misma manera. El día 8 post-infección se sacrificaron, se extrajo ARN de las células del bazo, se retrotranscribió y se amplificó por PCR con un juego de oligonucleótidos específicos para FAS (a) ó BCL-2 (b). Los productos de PCR se resolvieron en geles de acrilamida al 5%, se tiñeron con bromuro de etidio, se visualizaron en un transiluminador de luz UV y se analizaron con el software del analizador de geles. Los resultados muestran la densidad de la banda para FAS en relación a la densidad de la banda del gen constitutivo β -actina. El (*) denota una diferencia estadísticamente significativa con una $p < 0.05$ en el análisis de varianza de una vía con el programa Stathgraphics.

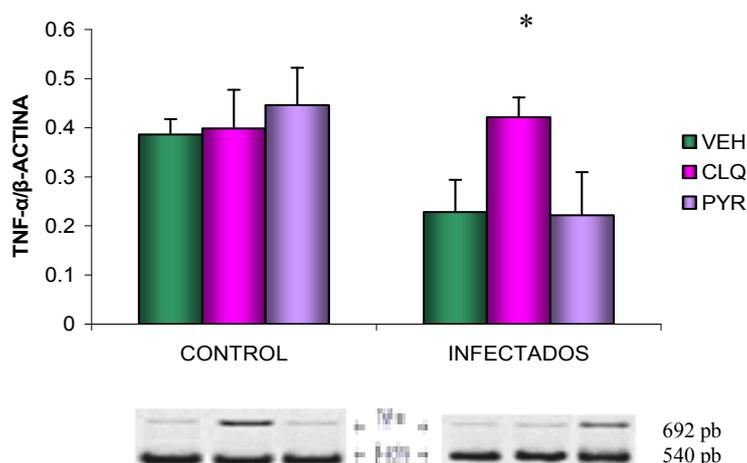
10.4 Expresión del ARN mensajero que codifica para genes asociados con la respuesta inmune en malaria y con la apoptosis.

Dado que el tratamiento con cloroquina o pirimetamina en pacientes con enfermedades autoinmunes además de modificar los niveles de apoptosis (Nishimura, *et.al.* 1998, Landewe, *et.al.* 1992), también modula la producción de las citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, se decidió investigar el efecto del tratamiento con estos fármacos sobre los niveles de expresión de genes asociados con la respuesta inmune en malaria y con apoptosis como los son: TNF- α , INF- γ , TGF- β , IL-10 e iNOS en los ratones BALB/c infectados con *Plasmodium yoelii* 17XL.

Para ello, a partir del tejido del bazo se extrajo el ARN total, se cuantificó y se retrotranscribió para obtener el ADN complementario que se utilizó para amplificar por PCR los genes que codifican para TNF- α , INF- γ , TGF- β , IL-10 e iNOS se amplificó además el gene constitutivo β -actina para realizar los cálculos de expresión en relación a este.

10.4.1 Efecto del tratamiento con cloroquina o pirimetamina sobre los niveles de expresión del ARNm que codifica para TNF- α en ratones infectados con *P. yoelii* 17XL.

En los ratones BALB/c infectados con *P. yoelii* 17XL que se trataron con el vehículo se disminuyó la expresión de TNF- α de forma estadísticamente significativa con respecto al grupo de ratones sanos tratados de la misma forma. La administración de cloroquina al grupo de ratones infectados no modificó los niveles de expresión del gene TNF- α con respecto al grupo de ratones sanos control. Sin embargo, se detectó un incremento estadísticamente significativo entre el grupo de ratones infectados y tratado con el fármaco con respecto al grupo control infectado. Finalmente, el tratamiento con pirimetamina incrementó los niveles de expresión de TNF- α en los ratones no infectados pero este incremento no resultó estadísticamente significativo. En los ratones infectados tratados con PYR se observó un decremento estadísticamente significativo de la expresión del gene con respecto al grupo sano tratado con el fármaco, sin embargo, no se detectó modificación en la expresión de este gen en los ratones infectados y tratados con pirimetamina en comparación con el grupo de ratones infectados a los que se les administró vehículo (gráfica 8).

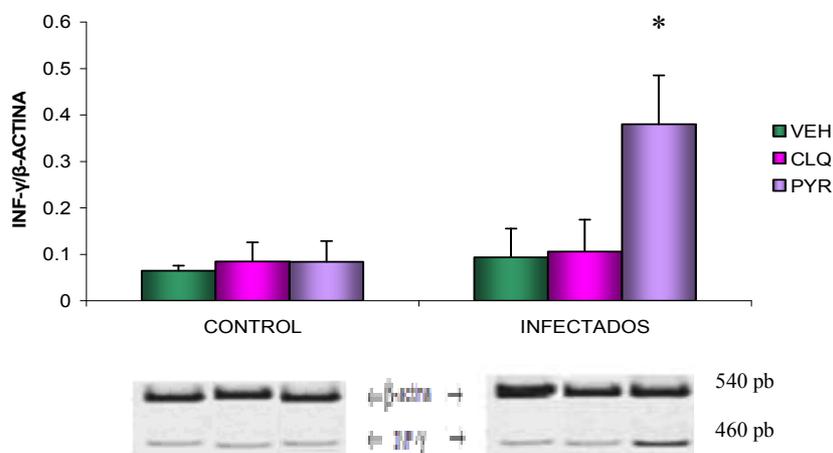


Gráfica 8. Efecto del tratamiento con cloroquina o con pirimetamina sobre la expresión de TNF- α en las células de bazo de ratones infectados con *P. yoelii* 17XL. Se infectaron grupos de ratones BALB/c con *P. yoelii* 17XL, el día 7 post-infección se trataron con: cloroquina (CLQ), pirimetamina (PYR) o con el vehículo (VEH). Como controles se utilizaron grupos de ratones no infectados tratados de la misma manera. El día 8 post-infección se sacrificaron, se extrajo ARN de las células del bazo, el cual se retrotranscribió y se amplificó por PCR con un juego de oligonucleótidos específicos para TNF- α , los productos de PCR se resolvieron en geles de acrilamida al 5%, se tiñeron con bromuro de etidio, se visualizaron en un transiluminador de luz UV y se analizaron con el software del analizador de geles. Los resultados muestran la densidad de la banda para TNF- α en relación a la densidad de la banda generada por gene constitutivo B-actina. El (*) denota una diferencia estadísticamente significativa con una $p < 0.05$ en el análisis de varianza de una vía con el programa Stathgraphics.

10.4.2 Niveles de expresión del ARNm que codifica para IFN- γ en los ratones infectados con *P. yoelii* 17XL tratados con cloroquina o pirimetamina.

La infección con *P. yoelii* 17XL incrementó los niveles de expresión de IFN- γ en el día 8 post-infección, este aumento no resultó estadísticamente significativo con respecto al grupo no infectado. El tratamiento con cloroquina no indujo cambio en los niveles de

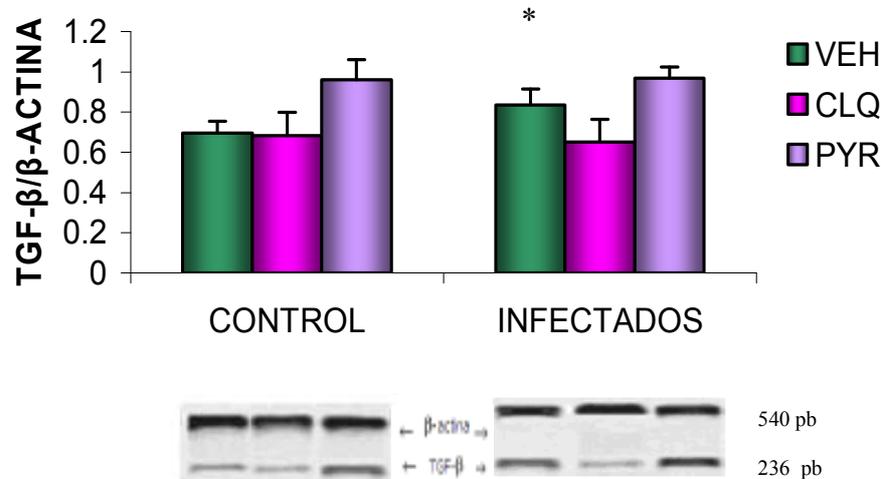
expresión de este gene en ninguno de los grupos. En contraste, en los ratones infectados con *P.yoelii* 17XL el tratamiento con pirimetamina indujo un incremento estadísticamente significativo en la expresión de INF- γ que no se detectó en los ratones sin infectar tratados con el mismo fármaco (gráfica 9).



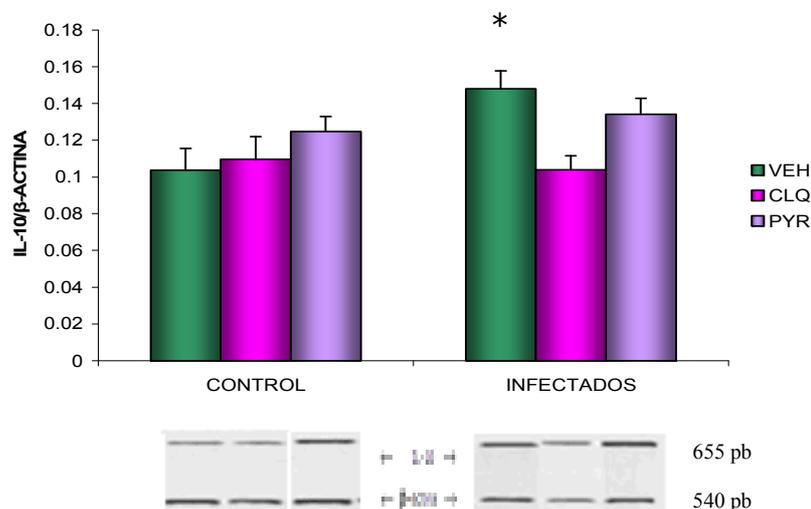
Gráfica 9. Efecto del tratamiento con cloroquina o con pirimetamina sobre la expresión de INF- γ en las células de bazo de ratones infectados con *P. yoelii* 17XL. Se infectaron grupos de ratones BALB/c con *P. yoelii* 17XL, el día 7 post-infección se trataron con: cloroquina (CLQ), pirimetamina (PYR) o con el vehículo (VEH). Como controles se utilizaron grupos de ratones no infectados tratados de la misma manera. El día 8 post-infección se sacrificaron, se extrajo ARN de las células del bazo, el ARN se retrotranscribió y se amplificó por PCR con un juego de oligonucleótidos específicos para INF- γ los productos de PCR se resolvieron en gels de acrilamida al 5%, se tiñeron con bromuro de etidio, se visualizaron en un transiluminador de luz UV y se analizaron con el software del analizador de gels. Los resultados muestran la densidad de la banda para INF- γ en relación a la densidad de la banda correspondiente al gene constitutivo β -actina. El (*) denota una diferencia estadísticamente significativa con una $p < 0.05$ en el análisis de varianza de una vía con el programa Stathgraphics.

10.4.3 Efecto del tratamiento con cloroquina o pirimetamina sobre los niveles de expresión del ARNm que codifica para TGF- β e IL-10 en ratones infectados con *P. yoelii* 17XL.

La infección con *Plasmodium yoelii* 17XL generó un incremento estadísticamente significativo en la expresión de los genes TGF- β e IL-10. La administración de CLQ no modificó la expresión de TGF- β (gráfica 10). El tratamiento con pirimetamina generó un incremento significativo en la expresión de TGF- β tanto en los ratones infectados como en el grupo control no infectado. Al evaluar la expresión de IL-10 se detectó lo siguiente: la infección con *P. yoelii* 17XL generó un incremento significativo de este gene; la administración de cloroquina no modificó los niveles de IL-10, mientras que el tratamiento con pirimetamina indujo un incremento significativo únicamente en los ratones no infectados (gráficas 10 y 11). En los ratones infectados con *P. yoelii* 17XL tratados con CLQ se detectó una disminución estadísticamente significativa en la expresión de las citocinas anti-inflamatorias TGF- β e IL-10 comparando con el grupo de ratones infectados tratados con el vehículo (gráficas 10 y 11).



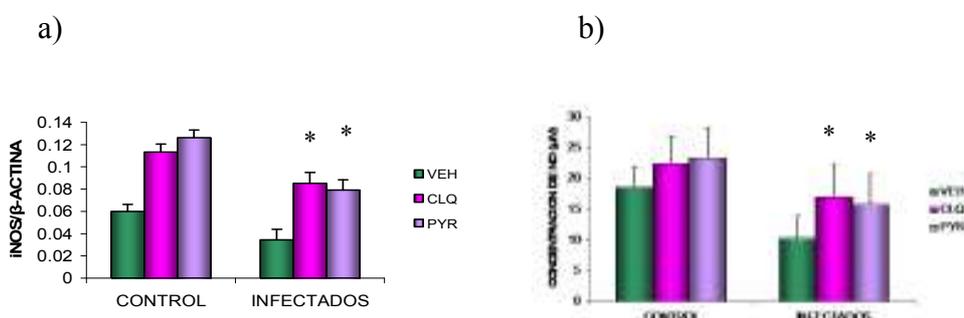
Gráfica 10. Efecto del tratamiento con cloroquina o con pirimetamina sobre la expresión de TGF- β en las células de bazo de ratones infectados con *P. yoelii* 17XL. Se infectaron grupos de ratones BALB/c con *P. yoelii* 17XL, el día 7 post-infección se trataron con: cloroquina (CLQ), pirimetamina (PYR) o con el vehículo (VEH). Como controles se utilizaron grupos de ratones no infectados tratados de la misma manera. El día 8 post-infección se sacrificaron, se extrajo el ARN de las células del bazo, el ARN así obtenido se retrotranscribió y se amplificó por PCR con un juego de oligonucleótidos específicos para TGF- β , los productos de PCR se resolvieron en geles de acrilamida al 5%, se tiñeron con bromuro de etidio, se visualizaron en un transiluminador de luz UV y se analizaron con el software del analizador de geles. Los resultados muestran la densidad de la banda para TGF- β en relación a la densidad de la banda del gene constitutivo β -actina. El (*) denota una diferencia estadísticamente significativa con una $p < 0.05$ en el análisis de varianza de una vía con el programa Stathgraphics.



Gráfica 11. Efecto del tratamiento con cloroquina o con pirimetamina sobre la expresión de IL-10 en las células de bazo de ratones infectados con *P. yoelii* 17XL. Se infectaron grupos de ratones BALB/c con *P. yoelii* 17XL, el día 7 post-infección se trataron con: cloroquina (CLQ), pirimetamina (PYR) o con el vehículo (VEH). Como controles se utilizaron grupos de ratones no infectados tratados de la misma manera. El día 8 post-infección se sacrificaron, se extrajo el ARN de las células del bazo, el ARN así obtenido se retrotranscribió y se amplificó por PCR con un juego de oligonucleótidos específicos para IL-10, los productos de PCR se resolvieron en geles de acrilamida al 5%, se tiñeron con bromuro de etidio, se visualizaron en un transiluminador de luz UV y se analizaron con el software del analizador de geles. Los resultados muestran la densidad de la banda para iNOS en relación a la densidad del gene constitutivo β -actina. El (*) denota una diferencia estadísticamente significativa con una $p < 0.05$ en el análisis de varianza de una vía con el programa Stathgraphics.

10.4.4 Efecto del tratamiento con cloroquina o pirimetamina sobre los niveles de expresión del ARNm que codifica para iNOS en ratones infectados con *P. yoelii* 17XL.

La infección con *Plasmodium yoelii* 17XL disminuyó los niveles de expresión del ARNm para iNOS (gráfica 12a) y la concentración de NO en suero (gráfica 12b). El tratamiento con CLQ o PYR generó un incremento en los niveles de expresión de iNOS (gráfica 12a) y de óxido nítrico en el suero (gráfica 12a) en relación a los niveles de los grupos tratados con el vehículo, en los ratones infectados como en los no infectados. Los ratones que recibieron el tratamiento con cloroquina o con pirimetamina ya sea infectados o no infectados, incrementaron la concentración sérica de óxido nítrico, sin embargo, aunque se conservó la misma tendencia que en la expresión de iNOS, el incremento en la concentración de NO generado por la administración de las drogas no resultó estadísticamente significativo (gráfica 12b).



Gráfica 12. Efecto del tratamiento con cloroquina o con pirimetamina sobre la expresión de iNOS (a) en las células de bazo y la concentración de NO (b) en suero de ratones infectados con *P. yoelii* 17XL. Se infectaron grupos de ratones BALB/c con *P. yoelii* 17XL, el día 7 post-infección se trataron con: cloroquina (CLQ), pirimetamina (PYR) o con el vehículo (VEH). Como controles se utilizaron grupos de ratones no infectados tratados de la misma manera. El día 8 post-infección se sacrificaron, se extrajo el ARN de las células del bazo, se retrotranscribió y se amplificó por PCR utilizando oligonucleótidos específicos para la enzima iNOS, los productos de PCR se resolvieron en geles de acrilamida al 5%, se tiñeron con bromuro de etidio, se visualizaron en un transiluminador de luz UV y se analizaron con el software del analizador de geles. Los resultados muestran la densidad de la banda para iNOS (a) en relación a la densidad de la banda correspondiente al gene constitutivo β -actina. (b) La concentración de óxido nítrico se determinó por medio de la reacción de Griess. El (*) denota una diferencia estadísticamente significativa en relación al grupo testigo tratado con vehículo con una $p < 0.05$ en el análisis de varianza de una vía con el programa Stathgraphics.

11. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Los fármacos CLQ y PYR además de poseer efectos antimaláricos, son dos agentes terapéuticos utilizados en el tratamiento para desórdenes autoinmunes como: el lupus eritematoso sistémico (Wozniacka, *et. al.* 2006), el síndrome linfoproliferativo (Werff Ten Bosch, *et. al.* 2002) y la artritis reumatoide (Khraishi y Singh, 1996). Estos desordenes se caracterizan por problemas de los linfocitos activados para sufrir muerte celular programada o apoptosis, lo que repercute directamente en la homeostasis de los mismos (Jackson y Puck, 1999). Aunque el mecanismo inmunomodulador de estas drogas no esta bien definido, el efecto benéfico en estos desordenes se atribuye a la inducción de apoptosis en los linfocitos T (Meng, *et. al.* 1997, Pierdomicini, *et. al.* 2005, Lai, *et. al.* 2001). En malaria existen algunos fenómenos en los cuales la apoptosis de las células linfoides podría estar involucrada, dado que el bazo es el órgano en donde se elimina al parásito (Alves, *et. al.* 1996, Grun, *et. al.* 1985, Engwerda, *et. al.* 2005), se sabe que en él se desarrolla una proliferación muy intensa de los linfocitos T y asociado a ello una esplenomegalia severa, dado que una activación de esa magnitud no puede permanecer a ese nivel por mucho tiempo, se cree que la apoptosis podría ser parte del mecanismo por el cual se mantiene en equilibrio la densidad de la población celular de este órgano (Werff Ten Bosch y Abbas, 1998), lo que limitaría el daño al huésped causado por la respuesta inmune, ya que los linfocitos activados producen citocinas tanto pro-inflamatorias como anti-inflamatorias que además de estar involucradas en la eliminación del parásito también causan patología cuando se producen en exceso (Day, *et. al.* 1999).

En la malaria se propone que la apoptosis es un mecanismo de regulación inmunológica importante, sin embargo no hay suficiente investigación al respecto, además es frecuente que en las regiones endémicas se administre cloroquina o pirimetamina en los pacientes que cursan con la enfermedad, por tal motivo dadas las implicaciones terapéuticas de estos fármacos, en este trabajo se decidió evaluar si la administración de cloroquina o pirimetamina que se sabe induce apoptosis en desordenes autoinmunes puede modificar este proceso en ratones infectados con una cepa letal de *Plasmodium* además de investigar si el tratamiento con estos fármacos podría modificar la respuesta inmune contra este parásito

La estrategia inicial fue analizar el efecto antimalárico de una sola dosis de cloroquina o pirimetamina sobre la cinética de la parasitemia en los grupos de ratones BALB/c infectados con *P. yoelii* 17XL. Los resultados mostraron que un día después de administrar los fármacos (día 8 post-infección) ambas drogas tuvieron un efecto similar ya que disminuyeron a un 30% la carga parasitaria, mientras que en los ratones infectados tratados únicamente con vehículo la parasitemia fue de alrededor del 70% (gráfica 1). Los niveles de parasitemia que presentó el grupo control fueron similar a los descritos previamente por otros autores con la misma cepa de *Plasmodium* donde además también se ha informado que el día 8 post-infección es el día en el que los ratones infectados sin ningún tratamiento comienzan a morir (Hirunpetcharat, *et. al.* 1999, Wykes, *et. al.* 2006), lo cual corrobora lo previamente observado por nuestro grupo de investigación y es la razón por la cual se evaluó el efecto de ambas drogas el día 8 postinfección que es el punto en el cual todavía se puede contar con un grupo de ratones control.

Lo siguiente que realizamos fue determinar si la infección con *P.yoelii* 17XL modifica la apoptosis y si la administración de una sola dosis de CLQ o PYR tenía efecto sobre los niveles de apoptosis total en el bazo. Encontramos que la infección con *P. yoelii* 17XL en los ratones BALB/c inhibe de forma estadísticamente significativa la apoptosis total de las células de bazo (gráfica 2) lo cual resulta contrastante con lo descrito previamente en infecciones con el parásito no letal *P.chabaudi chabaudi AS*, los ratones infectados con ese *Plasmodium* presentan un incremento en los niveles de apoptosis de los linfocitos T (Riccio *et. al.* 2003; Helmbly *et. al.* 2000; Sánchez *et. al.* 2001). En este trabajo se utilizó a un parásito cuya infección es letal (*Plasmodium yoelii* 17XL), eso podría explicar las diferencias encontradas en ambos grupos de trabajo, ya que es probable que la disminución de la apoptosis que se observó con este parásito, sea un fenómeno que esté asociado con la patología que genera *P. yoelii* 17XL como consecuencia de la misma respuesta inmune no controlada.

El tratamiento con cloroquina generó un incremento en los niveles de apoptosis total de las células de bazo tanto en los grupos de ratones infectados como en los grupos de ratones sin infección, el efecto fue mayor en los grupos de ratones infectados.

Sorprendentemente, el tratamiento con pirimetamina indujo mayor apoptosis en los ratones control, mientras que en los ratones infectados evitó que los niveles de apoptosis disminuyeran al nivel del grupo de ratones infectados tratados con el vehículo, se detectó una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos. (gráfica 2), lo cual podría ser una ventaja inmunológica para el huésped ya que el incremento en la apoptosis que tiene lugar en el bazo se puede relacionar con un mecanismo benéfico porque contribuye a la homeostasis celular impidiendo así el daño característico del incremento celular exagerado durante la infección con malaria (Hembly, *et. al.* 2000).

A continuación se evaluó si el tratamiento con CLQ o con PYR tenía efecto diferencial sobre la apoptosis de las diferentes subpoblaciones de linfocitos en el bazo. Para lo cual se utilizaron tinciones dobles para medir la apoptosis y la población de linfocitos simultáneamente por citometría de flujo. En cada una de las subpoblaciones de linfocitos evaluadas, el tratamiento con cloroquina o con pirimetamina modificó los niveles de apoptosis de los linfocitos: T CD3+, T CD4+, T CD8+ y B-220 de manera distinta (gráficas 3-6). La CLQ incrementó la apoptosis en los ratones infectados, mientras que la PYR tuvo mayor efecto incrementando la apoptosis en los ratones no infectados, la apoptosis es un mecanismo que limita el daño al huésped por reacciones inmunes dado que elimina células auto reactivas, por lo tanto resulta sumamente importante que CLQ y PYR incrementen los niveles de apoptosis de las células de bazo en los ratones parasitados porque esto sugiere que ambos fármacos podrían contribuir a regular a la respuesta inmune vía apoptosis.

Se ha descrito el efecto pro-apoptótico de la cloroquina en diferentes modelos y cultivos celulares entre los cuales están las células endoteliales (Potvin, *et. al.* 1997), las células B de pacientes con leucemia linfocítica crónica (Lagneaux, *et. al.* 2001), en las líneas celulares de fibrosarcoma (Saadat, *et. al.* 2005), así como en cultivos de células mononucleares de sangre periférica *in vitro* de pacientes infectados con *Plasmodium falciparum*, (Helmbly, *et. al.* 2000). El efecto pro-apoptótico de la pirimetamina se observó por primera vez en pacientes con síndrome linfoproliferativo en los que el tratamiento con esta droga dió como resultado la activación y normalización de dicho proceso (Pierdominici, *et. al.* 2005).

Dado que la principal vía que conduce a la apoptosis de los linfocitos esta asociada con un incremento en la expresión del receptor de Fas y su ligando (Ju, *et. al.* 1995) y que BCL-2 esta involucrado en la inhibición de este proceso (Helmbly, 2000), se decidió evaluar si el incremento de apoptosis que generaban los tratamientos con CLQ ó PYR esta asociado con cambios en la expresión de estos dos genes involucrados en la vía extrínseca (FAS) e intrínseca BCL-2 de la apoptosis respectivamente. Nuestros resultados mostraron que el incremento en la apoptosis inducido por CLQ y PYR es independiente de la expresión del gene FAS (gráfica 7a), lo que esta de acuerdo con lo descrito por (Lai, *et al* 2001) en cultivos de linfocitos T a los que adicionaron CLQ y determinaron que la vía involucrada en la apoptosis era independiente de FAS. El mecanismo por el cual la pirimetamina induce apoptosis no se conoce, algunos autores proponen que dicho proceso involucra la vía mitocondrial (Werff Ten Bosh, *et. al.* 2002), lo cual concuerda con las alteraciones observadas en la expresión de genes mitocondriales después de la incubación con pirimetamina, e interesantemente ocurre independiente de FAS (Pierdominici, *et. al.* 2005). La apoptosis inducida por el tratamiento con CLQ en los ratones infectados según nuestros resultados podría estar asociada con la disminución en la expresión de BCL-2 (gráfica 7b), sin embargo, aun falta conocer el mecanismo molecular exacto de su actividad pro-apoptótica.

En pacientes con enfermedades autoinmunes se ha detectado que los niveles de citocinas Th1 (pro-inflamatorias) y Th2 (anti-inflamatorias) circulantes están en desequilibrio (Gómez, *et. al* 2004). En la infección por *Plasmodium* se modifican los niveles de las citocinas pro- y anti-inflamatorias para tratar de eliminar al parásito, sin embargo su producción excesiva también conduce al desarrollo de patología (Clark, *et. al.* 2006).

Dado que el balance de las citocinas pro y anti inflamatorias es importante en ambos tipos de patologías (malaria y enfermedades autoinmunes), se decidió evaluar si en los ratones infectados con *Plasmodium yoelii* 17XL el tratamiento con cloroquina o pirimetamina modifica la expresión de las citocinas: IFN- γ , TNF- α , TGF- β , IL-10 y del gene iNOS centrales en la defensa inmune contra el *Plasmodium* que están asociados con la inducción de apoptosis en diversos sistemas experimentales (Kazuyoshi y Nobuyaki 2000, Kim, *et. al.* 2000, Kwang y Suk, 2001).

Detectamos que en los ratones BALB/c infectados con *Plasmodium yoelii* 17XL, los niveles de expresión de los genes TNF- α e INF- γ no se modificaron de manera estadísticamente significativa con respecto al grupo de ratones control sin infección (gráficas 8 y 9), lo que corrobora lo descrito por (De Souza, *et. al.* 1997, Stevenson, 1990) ellos demostraron que en las infecciones con cepas letales (*P. yoelii* 17XL, *P. berghei*) no se incrementaron los niveles de IFN- γ o TNF- α durante la fase temprana de la infección, a diferencia de lo que ocurre con las infecciones con las cepas no letales (*P. chabaudi* y *P. yoelii* 17XNL) durante la fase temprana de la infección, lo que se relaciona con la inhibición de la proliferación del parásito. En este trabajo el tratamiento con CLQ en ratones BALB/c infectados con *P. yoelii* 17XL moduló positivamente la expresión de TNF- α en comparación con el grupo que recibió el vehículo (gráfica 8), este resultado sugiere que los niveles de TNF- α que induce la cloroquina podrían promover la eliminación del parásito dado que se ha descrito por otros autores que los niveles elevados de esta citocina en el bazo, se han asociado con la resistencia a la infección con *Plasmodium chabaudi* y con *P. vinckei* (Ching y Langhorne, 2000).

Además, en nuestros experimentos detectamos que el tratamiento con pirimetamina induce un aumento en la expresión de INF- γ en las células de bazo de ratones infectados con *P. yoelii* 17XL (gráfica 9) por lo que podría contribuir con el efecto antimalárico del fármaco dado que otros autores han descrito que el INF- γ puede contribuir a la eliminación del parásito (Clark, et. al., 1987, Bienzle, et. al 1988, Meding, et. al. 1990 y Favre et. al 1997).

Además, se ha informado que el INF- γ puede inducir apoptosis en diferentes tejidos (Kano, et. al. 1999, McCulough, et. al. 2006). En malaria, el incremento de los niveles de esta citocina se ha asociado con un aumento de la apoptosis de los linfocitos T activados (Xu, et al., 2002). En nuestros experimentos, la administración de pirimetamina incrementó la apoptosis de los linfocitos T (gráfica 1), lo anterior sugiere que la pirimetamina modula la respuesta inmune induciendo un incremento de INF- γ que conduce a incrementar la apoptosis de los linfocitos T activados. Es importante indicar que si bien la inmunidad mediada por células puede matar al parásito, también puede causar inmunopatología, incluyendo malaria cerebral, pérdida de peso y anemia (Good, et. al. 2005). La patología en malaria no es causa directa de los productos del parásito sino de los componentes normales de la respuesta inmune, principalmente de citocinas como TNF- α e INF- γ producidas en exceso, las cuales son mediadores que se liberan de los macrófagos del huésped en respuesta a la estimulación por productos del parásito (Clark, et. al. 1989). Lo anterior denota la importancia que tiene la modulación de la respuesta inmune en malaria.

La actividad biológica del TNF- α y del INF- γ en la infección con *Plasmodium* depende del tiempo, y sitio de su expresión, además de la presencia de citocinas que regulen su producción (Jacobs, et. al. (a) 1996) como es el TGF- β y la IL-10, por ello se decidió evaluar la expresión de estas citocinas en los grupos de ratones BALB/c en estudio. En este trabajo, los ratones sin tratamiento infectados con *P. yoelii* 17XL incrementaron significativamente la expresión de TGF- β (gráfica 10) con respecto al grupo control no infectado, lo que explicaría la disminución de TNF- α en este grupo de ratones. Este resultado esta de acuerdo con lo descrito por otros autores (Omer, et. al. 2003, Good, et. al. 2005) quienes en ratones C57BL/6 infectados con *P. yoelii* 17XL detectaron un incremento en la síntesis de TGF- β lo que se acompañó de una disminución de los niveles de expresión de TNF- α e INF- γ que originaba una deficiente eliminación del parásito y por lo tanto mortalidad del 100%, por lo que concluyeron que el TGF- β regula la producción de citocinas pro-inflamatorias y determina el curso de la infección con *P. yoelii* 17XL.

Por el contrario, el tratar con CLQ a los ratones infectados con *P. yoelii* 17XL disminuyó la expresión de TGF- β (gráfica 10) e incremento la expresión de TNF- α , en relación al grupo control infectado, lo cual concuerda con lo descrito por otros autores quienes han evidenciado que el TGF- β regula la producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α en los macrófagos (Maeda, et al., 1995), lo cual resulta muy importante para la resolución de la infección con malaria. Nuestros resultados sugieren que el tratamiento con cloroquina modula el balance entre la respuesta inmune de tipo Th1 (pro-inflamatoria) y la de tipo Th2 (anti-inflamatoria), lo que también está de acuerdo con lo descrito por Jason et. al. 2001, quienes describen que el balance la respuesta tipo Th1 y Th2 es uno de los factores que determina la resolución de la parasitemia, la severidad y el curso de la enfermedad.

En nuestros experimentos detectamos que la infección con *P. yoelii* 17XL induce un incremento en la expresión de IL-10 (gráfica 11) lo que probablemente reguló negativamente la expresión de TNF- α (gráfica 8), este hallazgo concuerda con lo descrito por Kobayashi, *et. al.* 1996 quienes detectaron un incremento importante de IL-10 durante la primera semana de infección, en las células del bazo de ratones infectados con *P. yoelii* 17XL, mientras que en la infección con la cepa no letal *P. yoelii* 17NL no se produjeron niveles detectables de esta citocina lo que asociaron con la resolución de la infección, también sugirieron que la IL-10 es una citocina reguladora asociada con el agravamiento de la enfermedad en ratones infectados con *P. yoelii* 17XL (Kobayashi, *et. al.* 1996). En nuestros experimentos el tratamiento con CLQ disminuyó la expresión de IL-10 lo que podría estar relacionado con el aumento de los niveles de expresión de TNF- α (gráfica 8) y probablemente también con la resolución de la infección, por lo que se sugiere que la cloroquina modula el balance entre citocinas reguladoras como IL-10 y TGF- β y las citocinas inflamatorias como INF- γ y TNF- α lo que es importante para la sobrevivencia en la infección de los ratones que cursan una infección con *Plasmodium*.

Tanto cloroquina como pirimetamina lograron de manera distinta modificar la expresión de las citocinas en estudio, lo interesante fue que provocaron un incremento en la expresión de citocinas pro-inflamatorias de forma más intensa que la que se presenta en los ratones infectados con esta cepa de *Plasmodium* sin tratamiento.

Se ha descrito que la producción preferencial de citocinas pro-inflamatorias genera un incremento en la síntesis de NO, el cual media la protección del huésped a través de la muerte directa del *Plasmodium* o bien limitando su crecimiento (Taylor y Smith, 1999). Dado que el tratamiento con CLQ ó PYR en los ratones infectados con *P. yoelii* 17XL incrementó los niveles de expresión de las citocinas TNF- α e INF- γ respectivamente, dos moléculas que son los principales estímulos para la síntesis de NO por los macrófagos (Mellouk, *et. al.* 1991; Nüssler, *et. al.* 1991, Rosner, *et al.*, 2006, Jacobs, *et. al.* 1995), se decidió evaluar el efecto de estas drogas sobre la producción de este radical libre en los grupos de ratones infectados con *P.yoelii* 17XL y tratados con CLQ o PYR, dado que el óxido nítrico se ha relacionado con la inducción de apoptosis (Perrotta, *et. al.* 2005; Volbracht, *et al.* 2005), lo que explicaría el incremento en los niveles de apoptosis asociados con la administración de pirimetamina o cloroquina. Para evaluar lo anterior, se determinó la expresión de ARNm para iNOS en bazo y se cuantificó la concentración de óxido nítrico en el suero en los ratones infectados con *P. yoelii* 17XL tratados con cloroquina o con pirimetamina.

El incremento en la síntesis de NO durante la infección en la fase sanguínea de malaria se ha asociado con la eliminación de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium berghei* y *Plasmodium chabaudi* (Anstey, *et. al.* 1996, Jacobs, *et. al.* 1995, Mellouk, *et. al.* 1991, Rockett, *et. al.* 1991), se ha evidenciado que la habilidad del huésped para producir NO puede ser muy importante puesto que un incremento en la producción de este radical corresponde al pico de parasitemia y con la eliminación eficiente del parásito (Taylor y Smith, 1999) además los niveles de nitratos y nitritos en plasma tienden a aumentar con la severidad de la enfermedad y están asociados con una eliminación del parásito (Kresmner, *et. al.* 1996). En nuestros resultados la expresión de iNOS (gráfica 12a) y la producción de NO (gráfica 12b) disminuyeron considerablemente y de manera estadísticamente significativa en los grupos de ratones infectados con *Plasmodium yoelii* 17XL tratados con el vehículo, lo que sugiere que la infección con este parásito inhibe el incremento de NO en el pico de la parasitemia y

por lo tanto evita su actividad microbicida contra el estado sanguíneo de malaria, por lo que es probable que el crecimiento descontrolado del parásito aunado con la disminución de la apoptosis sea un fenómeno asociado a la falta en la regulación de la respuesta inmune y como consecuencia a la muerte de los ratones. Es probable que el parásito posea mecanismos capaces de eliminar a dicho radical como eficientes sistemas antioxidantes que incluyen a las enzimas glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y tioredoxin (Müller, *et. al.* 2001, Becuwe, *et al* 1993, Gamain, *et. al.* 1996).

El tratamiento con cloroquina o pirimetamina incrementó los niveles de expresión iNOS (gráfica 12a) y la producción de NO (gráfica 12b) en los ratones control sin infección mientras que en los ratones infectados con *Plasmodium yoelii* 17XL ambos fármacos lograron mantener los niveles de expresión y evitaron que la expresión decrementara al nivel que alcanzó el grupo control infectado, este resultado podría ser una ventaja que confieren los fármacos cloroquina y pirimetamina ya que al regular positivamente los niveles de óxido nítrico podrían ejercer un efecto positivo en la eliminación de esta especie de *Plasmodium* y también en la apoptosis que se observó cuando los ratones infectados con *P. yoelii* 17XL se trataron con cloroquina o con pirimetamina. Nuestros resultados están acorde con lo descrito por otros autores (Prada, *et. al.* 1996), en ratones infectados con *Plasmodium berghei* donde el tratamiento con cloroquina influye en la producción de intermediarios reactivos del oxígeno y del nitrógeno este efecto se ha evidenciado también en cultivos de células endoteliales murinas, porcinas y humanas in Vitro (Ghigo, *et. al.* 1998). Existen evidencias en modelos de infecciones con protozoarios como en la toxoplasmosis y la leishmaniasis que sugiere que la producción preferencial de citocinas pro-inflamatorias genera un incremento en la síntesis de NO, el cual media la protección del huésped a través de la muerte directa del *Plasmodium* o limitan su crecimiento (Taylor y Smith, 1999).

En resumen, el tratamiento con cloroquina generó un incremento en la expresión de TNF- α en los ratones infectados mientras que la administración de pirimetamina aumentó los niveles de expresión de INF- γ , lo cual sugiere que ambas drogas son capaces de modificar la expresión de citocinas pro-inflamatorias lo que conduce a un incremento en los niveles de expresión de iNOS, enzima que genera un incremento en el óxido nítrico, esta molécula puede estar involucrada tanto en la eliminación de *P.yoelii* 17XL como en el incremento en la apoptosis, lo que como resultado modula la repuesta inmune en este modelo experimental de malaria.

12. CONCLUSIONES.

Los resultados de la infección con *Plasmodium yoelii* 17XL sugieren que la letalidad del parásito probablemente se asocia con la habilidad de regular negativamente el proceso de apoptosis e incrementar los niveles de expresión de TGF- β e IL-10 lo que da como resultado la disminución de la expresión de TNF- α , iNOS y de la producción de NO que son de suma importancia para la eliminación del parásito. Es probable que la disminución de la apoptosis con este parásito, sea un fenómeno que este asociado a la falta de regulación de la respuesta inmune dando como resultado la alta mortalidad que genera este parásito en los ratones.

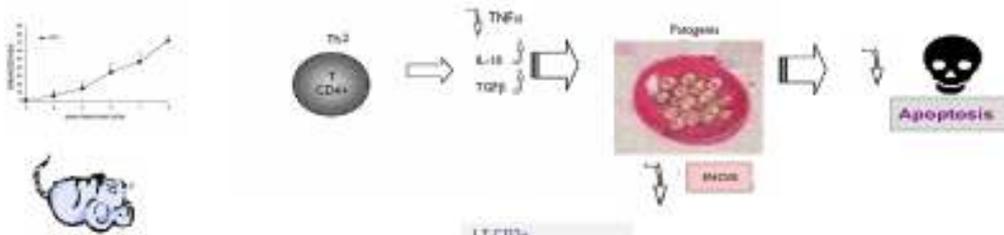
El tratamiento con cloroquina o pirimetamina a ratones parasitados con *Plasmodium yoelii* 17XL modula la apoptosis positivamente, además de influir sobre la expresión de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias por mecanismos diferentes. CLQ incrementó los niveles de apoptosis en los grupos de ratones infectados con *Plasmodium yoelii* 17XL probablemente mediante la modulación en la expresión del gene BCL-2, TNF- α e iNOS y en la producción de NO, mientras que PYR moduló la apoptosis en ratones infectados probablemente por la regulación en la expresión de INF- γ , iNOS y la producción de NO.

Finalmente, además del efecto antimalárico de la cloroquina y la pirimetamina, estos fármacos también regulan la respuesta inmune en los ratones infectados con *P.yoelii* 17XL, ya que modulan positivamente la expresión de TNF- α e INF- γ respectivamente, que son citocinas importantes en el incremento de la producción de los niveles de óxido nítrico, molécula que participa en la inducción del proceso de apoptosis y en la eliminación del parásito.

Nuestros resultados ayudan a entender los mecanismos mediante los cuales las drogas antimaláricas cloroquina y pirimetamina modulan la respuesta inmune, estos hallazgos podrían utilizarse para diseñar estrategias de regulación de la respuesta inmune en malaria.

CONCLUSIONES

a)



b)

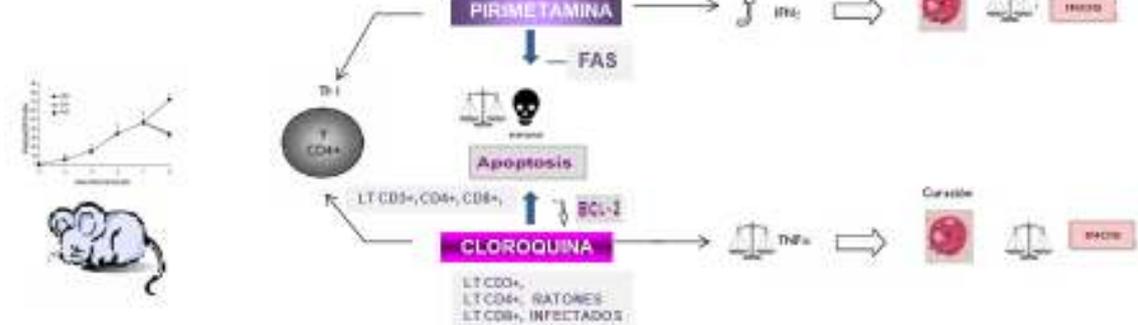


Figura 12. Representación esquemática de las conclusiones. Los resultados de este proyecto de investigación evidenciaron que la infección con el parásito letal *Plasmodium yoelii* 17XL favorece una respuesta inmune de tipo Th2 (a) que se demostró con el incremento (↑) estadísticamente significativo de la expresión de las citocinas anti-inflamatorias IL-10 y TGF-β y con el decremento (↓) de la expresión de la citocina pro-inflamatoria TNF-α lo que se relaciona con la alta mortalidad (☠) de los ratones BALB/c que cursan por una infección con *Plasmodium yoelii* 17XL aunado también a la disminución de la apoptosis total de las células de bazo y de la concentración de NO en suero. Los fármacos CLQ y PYR modularon (⚖) de forma positiva la expresión de citocinas que favorecen una respuesta inmune tipo Th1 a través de la modulación de las citocinas pro-inflamatorias como INF-γ (PYR) y TNF-α (CLQ), ambas drogas incrementaron los niveles de NO así como inducción de apoptosis (CLQ y PYR).

13. ABREVIATURAS

APC	Células presentadoras de antígeno
APS	Persulfato de amonio
DEPC	Dietilpirocarbonato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
dNTP's	Desoxirribonucleotidos trifosfato
dTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
IFN- γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IRN	Intermediarios reactivos del oxígeno
IRO	Intermediario reactivos del nitrógeno
Mg ⁺²	Ion magnesio
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
M-MLVRT	Retrotranscriptasa del virus de leucemia murina Molones
mM	Milimolar
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato
ng	Nanogramo
NK	Asesina natural (Natural killer)
nM	Nanomolar
NO	Oxido nítrico
NOS	Oxido nítrico sintetasa
eNOS	Oxido nítrico sintetasa endotelial
iNOS	Oxido nítrico sintetasa inducible
nNOS	Oxido nítrico sintetasa neuronal
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
Oligo	Oligonucleotido
OMS	Organización mundial de la salud.
ONOO ⁻	Peroxinitrito
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Retrotranscripción PCR
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
Th	Célula T cooperadora
TBE	Tris – ácido bórico – EDTA
TEMED	N,N,N',N', Tetrametiletildiamina
TGF	Factor de crecimiento transformante
TNF	Factor de necrosis tumoral
μ g	Micro gramo
μ M	Micro molar
μ L	Micro litro

14. BIBLIOGRAFÍA.

Ahvazi BC, Jacobs P, Stevenson MM. 1995. Role of macrophage-derived nitric oxide in suppression of lymphocyte proliferation during blood-stage malaria. *Journal Leukoc Biol.* 58:23-31.

Alves HJ, Weidanz W, Weiss L. 1996. The spleen in murine *Plasmodium chabaudi chabaudi adami* malaria: stromal cells, T lymphocyte and haematopoiesis. *Am. Journal of Tropical Medicine and Hygiene*55:370-378.

Angulo I, Fresno M. 2002. Cytokines in the pathogenesis of and protection against malaria. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 202:1145-1152.

Anstey NM, Weinberg JB, Hassanali MY, Mwaikambo ED, Manyenga D, Misukonis MA, Arnelle DR, Hollis D, McDonald MI, Granger DL. 1996. Nitric oxide in Tanzanian children with malaria: inverse relationship between malaria severity and nitric oxide production/ nitric oxide synthase type 2 expression. *Journal. Exp Med.* 184:557-567.

Arends MJ, Wyllie. 1991. Apoptosis: mechanism and roles in pathology. *Int. Rev. Pathol.* 32.223:254.

Bate CA, Taverne J, Playfair JH. 1988. Malaria parasites induce TNF production by macrophages. *Immunology.* 64:227-231.

Becuwe P, Slomianny C, Camus D, Dive D. 1993. Presence of an endogenous superoxide dismutase activity in three rodent malaria species. *Parásitology Response* 79:497-498.

Bienzle U, Fritsch K.G, Hoth G, Rozkzinski E, Kohler K, kalinowski M, Kresmer P, Rosenkaimer F and Feldmeier H. 1988. Inhibition of *Plasmodium vinckei*-malaria in mice by recombinant murine interferon- γ . *Acta Trop.* 45: 289-290.

Brake DA, Goldring JPD, Weidanz WP and Long CA. 1988. Characterization of cellular and humoral responses in T lymphocyte reconstituted athymic mice infected with *Plasmodium chabaudi adami*. *Fed. Proc.* 46:618.

Brown J, Greenwood BM, Terry RJ. 1986. Cellular mechanisms involven in recovery from acute malaria in Gambian childrend. *Parasite Immunology.*8:551.

Brunet LR. 2001. Nitric oxide in parasitic infection. *International Immunopharmacology.* 1:1457-1467.

Bruña RO, Rodríguez A. 2001. Dendritic cells can initiate protective immune responses against malaria. *Infection and Immunity.* 69: 5173-5176.

Camussi G, Albano E, Tetta C, Bussolino F. 1991. The molecular action of tumor necrosis factor alpha. *European Journal of Biochemistry.* 202: 3-14.

Chae IH, Park KW, Kim HS, Oh VH. 2004. Nitric oxide induced apoptosis is mediated by Bax/Bcl-2 gene expression, transition of cytochrome c, and activation of caspase-3 in rat vascular smooth muscle cells. *Clinical Chem. Acta.* 341:83-91.

Ching Li, Langhorne J. 2000. Tumor necrosis factor alpha p55 receptor is important for development of memory responses to Blood-Stage malaria infection. *Infection and Immunity.* 68: 5724-5730.

Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR. 2001. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 282:1075-1079.

Clark IA, Hunt NH, Butcher GA, Cowden WB. 1987. Inhibition of murine malaria (*Plasmodium chabaudi*) in vivo by recombinant interferon- gamma or tumor necrosis factor, and its enhancement by butylated by droxyamisole. *Journal of Immunology.* 139: 3493-3496.

Clark IA, Chaudhri G, Cowden WB. 1989. Roles of tumour necrosis factor in the illness and pathology of malaria. *Trans. A. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83: 436-440.

Clark IA, Rockett KA, Cowden WB. 1991. Proposed link between cytokines and nitric oxide and human cerebral malaria. *Parásitology Today.* 7: 205-207.

Clark IA, Al Yaman FM, Jacobson LS. 1997. The Biological Basis of Malarial Disease. *International Journal for Parasitology.* 27: 1237-1249.

Clark IA, Budd AC, Alleva LM, Cowden WB. 2006. Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. *Malaria Journal.* 5:1-32.

Day NPJ, Hien TT, Schollaardt T. 1999. The prognostic and pathophysiologic role of pro- and anti-inflammatory cytokines in severe malaria. *Journal of Infectious Diseases.* 180: 1288-1297.

De Souza JB, Williamson KH, Otani T, Playfair JH. 1997. Early gamma interferon responses in lethal and nonlethal murine blood stage malaria. *Infect. Immun.* 65: 1593-1598.

Deloron P, Dumont N, Nyongabo T, Aubry P, Astagneau P, Ndarugirire F, menetrier CC, Buidin N, Brelivet JC, Peyron F. 1994. Immunologic and biochemical alterations in severe falciparum malaria: relation to neurological symptoms and outcome. *Clinical Infectious Diseases.* 19:480-485.

Ding A, Nathan CF, Stuehr DJ. 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *Journal of Immunology.* 141:2407-2412.

Drapier JC. 1997. Nitric oxide and macrophages. *Patol. Biol.* 45(2):110-114.

- Engel ME, Datta PK, Moses HL. 1998. Signal transduction by transforming growth factor beta: a cooperative paradigm with extensive negative regulation. *Journal Cell. Biochem. Suppl.* 30: 111-122.
- Engwerda CR, Beattie L, Amante FH. 2005. The importance of the spleen in malaria. *Trends Parasitol.* 21:356-357
- Favre N, Ryffel B, Bordmann G and Rudin W. 1997. The course of *Plasmodium chabaudi chabaudi* infections in interferon-gamma receptor deficient mice. *Parasite Immunol.* 19: 375-383.
- Fallon PG, Smith P, Dunne DW. 1998. Type 1 and type 2 cytokine-producing mouse CD4+ and CD8+ T cells in acute *Schistosoma mansoni* infection. *European Journal Immunol.* 28:1408-1416.
- Fell AH, Smith NC. 1998. Immunity to asexual blood stages of *Plasmodium*: is resistance to acute malaria adaptive or innate? *Parasitology Today.* 14:364-369
- Freeman RR, Jones VE. 1972. Immunity to *Plasmodium berghei* in rats; maximum levels of protective antibody activity are associated with eradication of infection. *Parasitology.* 64:117-127.
- Fuse Y, Nishimura H, Maeda k, Yoshikai Y. 1997. CD95 (Fas) may control the expansion of activated T cells after elimination of bacteria in murine listeriosis. *Int. immun.* 65:1883-1891.
- Gamain B, Arnaud J, Favier A, Camus D, Dive D, Slomianny C. 1996. Increase in glutathione peroxidase activity in malaria parasite after selenium supplementation. *Free Radis. Biol. Med.* 21:559-565.
- Gause WC, Adamovicz E, Diefenbach CW, Dveksler GS. 1995. Use of PCR to quantitative relative differences in gene expression, PCR primer: a laboratory manual. United States of America. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 293-311
- Ghigo D, Aldeieri E, Todde R, Costamagna C, Garbarino G, Pescarmona G, Bosia A. 1998. Chloroquine stimulates nitric oxide synthesis in murine, porcine, and human endothelial cells. *Journal Clin. Invest.* 102:595-605.
- Giustarini D, Dalle DI, Colombo R, Milzani A. 2004. Adaptation of the Griess reaction for detection of nitrite in human plasma. *Free Radical Research.* 38: 1235-1240.
- Gómez D, Correa PA, Gomez LM, Cadena J, Molina JF, Anaya JM. 2004. Th1/Th2 cytokines in patients with systemic lupus erythematosus: is tumor necrosis factor alpha protective?. *Semin Arthritis Rheum.* 33:404-11.
- Good MF, Doolan DL. 1999. Immune effector mechanisms in malaria. *Current Opinion in Immunology.* 11:412-419.

Good MF, Stanistic D, Xu H, Wykes M. 2004. The Immunological challenge to developing a vaccine to the blood stages of malaria parasites. *Immunological Reviews*. 201: 254-267

Good MF, Xu H, Wykes M, Engwerda CR. 2005. Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. *Annu. Immunol.* 23:69-99.

Goodman, Gilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 2003. 9ª Ed. Mc Graw Hill. México D. F. 1:1017-1023.

Grau GE, Fajardo LF, Piguel PF, Allet B, Lambert PH, Vassalli P. 1987. Tumour necrosis factor as an essential mediator in murine cerebral malaria. *Science*. 237:1210-1212.

Griffiths, A.J.F., J.H. Miller, D.T. Suzuki, R.C. Lewontin y W.M. 1996. *An introduction to genetic analysis*. W.H. Freeman y Co., NY, E.U.

Grisham MB, Jourdeuil D, Wink DA. 1999. Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am Journal Physiology*. 276:315-321.

Grun JL., Long CA, Weidanz WP. 1985. Effects of splenectomy on antibody-independent immunity to *Plasmodium chabaudi adami malaria*. *Infect. Immun.* 48:853-858.

Haidaris CG, Haynes D, Meltzer MS, Allison AC. 1983. Serum containing tumor necrosis factor is cytotoxic for the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Infection and immunity*. 42:385-393.

Hasting IM, Bray PG, Ward SA. 2002. A requiem for chloroquine. *Science*. 298: 74-75.

Helmby H, Jonsson G, Troye BM. 2000. Cellular changes and apoptosis in the spleens and Peripheral Blood of Mice Infected with Blood-Stage *Plasmodium chabaudi chabaudi AS*. *Infection and Immunity* 68:1485-1490.

Hirunpetcharat C, Vukovic P, QinLiu X, Kaslow DC, Millar LH, Good MF. 1999. Absolute requirement for an active immune response involving B cells and Th cells in immunity to *Plasmodium yoelii* passively acquired with antibodies to 19KDa carboxy-terminal fragment of merozoites surface protein-1. *Journal of Immunology*. 162:7309-7314.

Hoffe P. 1998. *Medical Molecular Genetics*. Fence Creek Publishing. Baltimore: 119-126.

Hommel M. 1996. *Immunology of malaria*. WHO, Heath Co-Operation Papers, Quaderni, Di Cooperazione Sanitaria. Geneva: WHO.15: 53-70.

Jackson CE, Puck JM. 1999. Autoimmune lymphoproliferative syndrome, a disorder of apoptosis. *Curr. Opin. Pediatr.* 11: 521-7.

Jacobs P, Radzioch D, Stevenson MM. 1995. Nitric oxide expression in the spleen, but not in the liver correlates with resistance to blood stage malaria in mice. *Journal of Immunol.* 1995. 155:5306-5313.

Jacobs P, Radzioch D, Stevenson MM. (a). 1996. A Th1 associated increase in tumor necrosis factor alpha expression in the spleen correlate with resistance to blood stage malaria in mice. *Infect. Immun.* 64:235-41.

Jacobs P, Radzioch D, Stevenson MM. (b). 1996. In vivo regulation of nitric oxide production by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon but not by interleukin-4, during blood estage malaria in mice. *Infect. Immun.* 64:44-9.

Jason J, Archibald LK, Nwanyanwu OC, Bell M, Buchanan I, Larned J, Kazembe PN, Dobbie J, Parekh B, Byrd MG, Eick A, Han A, Jarvis WR. 2001. Cytokines and malaria parasitemia. *Clinical immunology.* 122:208-218.

Jimenez LF, Merchant H. 2003. *Biología Celular y Molecular.* Pearson Educación Mexico. 617-667.

Ju ST, Panka DJ, Cui H, Ettinger R, el-Khatib M, Ser DH, Stanger BZ, Marshak RA. 1995. Fas/FasL interactions required for programmed cell death after T cell activation. *Nature.* 373:385-386.

Kano A, Haruyama T, Akaike T, Watanabe Y. 1999. IRF-1 is an essential mediator in IFN-gamma-induced cell cycle arrest and apoptosis of primary cultured hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257:672-677.

Kazuyoshi K, Nobuyuki H. 2000. Signal Transduction Pathways of apoptosis and inflammation induced by the Tumor Necrosis Factor Receptor familiy. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 22:147-149.

Kern P, Hemmer CJ, Van Damme J, Gruss HJ, Dietrich M. 1989. Elevated tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 serum levels as marker for complicated *Plasmodium falciparum* malaria. *American Journal of Medicine.* 87: 139-143.

Khraishi MM, Singh G. 1996. The role of antimalarials in rheumatoid arthritis the American experience. *Lupus.* 1:S41-S44.

Kiechle FL and Zhang X. 2002. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications *Clin. Chim. Acta.* 326: 27-45.

Kim YM; Kim TH, Cheng HT, Talanian RV, Yin YM. 2000. Nitric oxide prevents tumor necrosis factor alpha-induced rat hepatocyte apoptosis by the interruption of mitochondrial apoptotic signaling through S-nitrosylation of caspasa-8. *Hepatology.* 32:770-778.

Kobayashi F, Morii T, Matsui T, Fujino T, Watanabe y, Weidanz WP, Tsuji M. 1996. Production of interleukin-10 during malaria caused by lethal and nonlethal variants of *Plasmodium yoelii yoelii*. *Parásitol Res.* 82: 385-391.

Kremsner PG, Winkler S, Wildling E, Prada J, Bienzle U, Graninger W, Nüssler AK. 1996. High plasma levels of nitrogen oxides are associated with severe disease and correlate with rapid parasitological and clinical cure in *Plasmodium falciparum* malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 90:44-47.

Kumar S, Good MF, Dontfraid F, Vineta JM, Miller LH. 1989. Interdependence of CD4+T cells and malarial spleen in immunity to *Plasmodium vinckei vinckei*. Relevance to vaccine development. *Journal of Immunol.* 143:2017-2023.

Kwang YL and Suk CB. 2001. TGF- β dependent Cell Growth Arrest and Apoptosis. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 35:1: 47-53.

Kwakye BF, Meshnick S. 1990. Sequence of chloroquine binding to ADN and prevention of Z-ADN formation. *Mol Biochem. Parasitol.* 39: 257-258.

Kwiatkowski D, Hill AVS, Sambou I, Twumasi P, Castracane J, Manogue KR, Cerami A, Brewster DR, Greenwood BM. 1990. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet.* 336:1201-1204.

Lagneaux L, Delforge A, Carlier S, Massy M, Bernier M, Bron D. 2001. Early induction of apoptosis in B chronic Lymphocytic leukaemia cells by hydroxychloroquine: activation of caspase-3 and no protection by survival factors. *Br. Journal Haematol.* 112:344-352.

Lai JH, Ho LJ, Lu KC, Chang DM, Shaio MF, Han SH. 2001. Western and Chinese antirheumatic drug-induced T cell apoptotic ADN damage uses different caspase cascades and is independent of Fas/FasL interaction. *Journal of Immunology* 166: 6914-6924.

Landewe RB, Miltenburg AM, Breedveld FC, Daha MR, Dijkmans BA. 1992. 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. *Journal Rheumatol.* 19:1353-1357.

Langhorne J, Gillard S, Simon B, Slade S, Eichmann K. 1989. Frequencies of CD4+T cells reactive with *Plasmodium chabaudi chabaudi*: distinct response kinetics for cells with Th1 and Th2 characteristics during infection. *Int. Immunol* 1:416-424.

Langhorne j, Albano FR, Hensmann M, sanni L, cadman E, Voisine C, Sponaas AM. 2004. Dendritic cells, pro-inflammatory responses, and antigen presentation in a rodent malaria infection. *Immunol. Rev.* 201:35-47.

Li C, Corraliza I, Langhorne J. 1999. A defect in interleukine-10 leads to enhanced malarial disease in *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection in mice. *Infection and Immunity.* 67: 4435-4442.

Li C, Langhorne J. 2000. Tumor necrosis factor alpha p55 receptor is important for development of memory responses to blood-stage malaria infection. *Infection and Immunity.* 10: 5724-5730.

- Li HY, Chang SP, Yuan CC, Chao H, Ng HT, 2001. Nitric oxide induces extensive apoptosis in endometrial epithelial cells in the presence of progesterone: involvement of mitogen-activated protein kinase pathways. *Mol. Hum. Reprod.* 7: 755-763.
- Li C, Sanni LA, Omer F, Riley E, Langhorne J. 2003. 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. *Infection and Immunity.* 71:4850-4856.
- Liesenfeld OJ, Kosek JC, Susuki Y. 1997. Gamma interferon induces Fas-dependent apoptosis of Peyer's patch T cells in mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity.* 65:4682-4689.
- Long CA. 1993. Immunity to blood stages of malaria. *Curr. Opin. Immunol.* 5:548-556.
- Lopes MF, Velga VF, Santos AR, Fonseca MEF, DosReis GA. 1995. Activation-induced CD4+ T cell death by apoptosis in experimental Chagas disease. *Journal of Immunology.* 154:744-752.
- Lu J, Móchala S, Shirhan M, Ng KC, Tan MH. 2003. Nitric oxide induces macrophage apoptosis following traumatic brain injury in rats. *Neurosci. Lett.* 339:147-150.
- Maeda H., Kuwahara H, Ichimura Y, Ohtsuki M, Kurakata S and Shiraishi A. 1995. TGF- β enhances macrophage ability to produce L-10 in normal and tumor bearing mice. *Journal of Immunology* 155: 4926-32.
- Malaguarnera L, Musumeci S. 2002. The immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. *Lactt. Infect. Dis.* 2: 472-478.
- Meding SJ, Cheng SC, Simon- Haarhaus B and Langhorne J. 1990. Role of endogenous gamma interferon during infection with *Plasmodium chabaudi chabaudi*. *Infect. Immun.* 58: 3671-3678.
- Marsh K, Kinyahjui S. 2006. Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunology.* 28: 51-60.
- McCall TB, Broughton-Smith NK, Palmer RMJ, Whittle BJR, Moncada S. 1989. Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils: release and interaction with superoxide anion. *Biochem. Journal.* 261: 293-296.
- McCullough CT, Tura BJ, Harrison DJ. 2006. Growth factor attenuation of IFN gamma-mediated hepatocyte apoptosis requires p21 waf-1. *Int. J. Exp. Pathol.* 87:257-81.
- Mellouk S, Green SJ, Nacy CA, Hoffman SL. 1991. IFN-gamma inhibits development of *Plasmodium berghei* exoerythrocytic stages in hepatocytes by an L-arginine dependent effector mechanism. *Journal of Immunology* 146:3971-3976.

Meng XW, Feller JM, Ziegler JB, Pittman SM, Irelan CM. 1997. Induction of apoptosis in peripheral blood lymphocytes following treatment in vitro with hydroxycloquine. *Arthritis Rheum.* 40: 927-935.

Mossmann TR, Coffman RL. 1989. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology.* 7:145-173.

Müller S, Gilberger TW, Krnajski Z, Lüersen K, Meierjohann S, Walter RD. 2001. Thioredoxin and glutathione system of malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Protoplasma.* 217: 43-49.

Nahrevanian H, Dascombe MJ. 2002. Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA in target organs of lethal and non-lethal strains of murine malaria. *Parasite Immunology.* 24:471-478.

Nathan C, Xie Q. 1994. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *The Journal of biological chemistry.* 269:13725-13728.

Ndungu FM, Urban BC, Marsh K, Langhorne J. 2005. Regulation of immune response by *Plasmodium*-infected red blood cells. *Parasite Immunology.* 27: 373-384.

Nikaeo A, Bhuvanath S, Praputbut S, Wisessomat S. 2006. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in JAR trophoblast by antimalarials drugs. *Biomed. Res* 27: 131-137.

Nishimura M, Hidaka N, Akaza T, Tadokoro K, Jujuy T. 1998. Immunosuppressive effects of chloroquine: potencial effectiveness for treatment of post-transfusion graft-versus-host disease. *Transf. Med.* 8:169-172.

Nüssler A, Drapier JC, Réñia L, Pied S, Miltgen F, Gentilini M, Mazier D. 1991. L-arginine-dependent destruction of intrahepatic malaria parasites in response to tumor necrosis factor and/or interleukin 6 stimulation. *European Journal of Immunology.* 21:227-230.

Nyati MK, Feng FY, Kanade VD, Nayak R. 2006. Chloroquine treatment of 5-fluorouracil-induced apoptosis index in vivo. *Mol. Imaging.* 5:148-152.

Omer FM, Kurtzahls JA, Riley EM. 2000. Maintaining the immunological balance in parasitic infections: a role for TGF-beta?. *Parásitology Today.* 16:358-359.

Omer FM, Souza JB, Riley EM. 2003. Differential induction of TGF- β regulates proinflammatory cytokine production and determines the outcome of lethal and nonlethal *Plasmodium yoelii* infections. *Journal of Immunology.* 171:5430-5436.

Oswald IP, Wynn TA, Sher A, James SL. 1994. NO as an effector molecule of parasite killing modulation of its synthesis by cytokines. *Comp. Biochem. Physiol. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 108: 11-18.

Panduro A. 2000. *Biología Molecular en la Clínica*, Editorial Mc.Graw-Hill Interamericana. 31-43.

Perez RR, Fuentes MP, Oliván AM, Martínez PA, Roncero C, González MP, Oset GMJ. 2007. Mechanisms of nitric oxide-induced apoptosis in bovine chromatin cells. Role of mitochondria and apoptotic proteins. 85: 2224-2238.

Perrotta C, De Palma C, Falcone S, Sciorati C, Clementi E. 2005. Nitric oxide, ceramide and sphingomyelinase-coupled receptors: A tale of enzymes and messengers coordinating cell-death, survival and differentiation. Life Science. 77:1732-1739.

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

Pierdominici M, Giammarioli AM, Gambardella L, De FM, Quinti I, Ladobini M, Carbonari M, Malorni W, Giovanneti A. 2005. Pyrimethamine (2,4- diamino-5-chlorophenyl-6-etil-pyrimidine) induces apoptosis of freshly isolated human T lymphocytes, Byassin CD95/Fas molecule but involving its intrinsic pathway. Journal Pharmacol. Exp. Ther. 315:1046-1057.

Podoba JE, Stevenson MM. 1991. CD4+ and CD8+ T lymphocytes both contribute to acquired immunity to blood-stage *Plasmodium chabaudi AS*. Infection and Immunity. 59:51-58.

Polat G, Aslan G, Eskandari GH, Delialoglu N, Bagdatogh O, Atik U. 2002. The role of nitric oxide and lipid peroxidation in patients with *Plasmodium vivax* malaria. Parasite. 9:371-4.

Potvin F, Petitclerc E, Marceau F, Poubelle PE. 1997. Mechanisms of action of antimalarials in inflammation: induction of apoptosis in human endothelial cells. Journal of Immunology. 158: 1872-1879.

Prada J, Muller S, Bienzle U, Kremsner PG. 1996. Upregulation of reactive oxygen and nitrogen intermediates in *Plasmodium berghei* infected mice after rescue therapy with chloroquine or artemether. Journal Antimicrobiol. Chemother. 38: 95-102.

Priego T, Granado M, Castellero E, Martín AI, Villanúa MA, López Calderón A. 2006. Nitric oxide production by hepatocytes contributes to the inhibitory effect of endotoxin on insulin-like growth factor I. Gene expression. 190: 847-856.

Razvi ES, Jiang Z, Woda BA, Welsh RM. 1995. Lymphocyte apoptosis during the silencing of the immune response to acute viral infections in normal, 1pr and Bcl-2 transgenic mice. Am. Journal. Pathol. 147:79-91.

Riccio EK, Junior IN, Riccio LR, Gracas AM, Corte-Real S, Morgado M, Daniel-Ribeiro CT, Fatima F, Da CM. 2003. Malaria associated apoptosis is not significantly correlated with Esther parasitemia or the number of previous malaria attacks. Parasitol. Res. 90: 9-18.

Richards AL. 1997. Tumour necrosis Factor and associated cytokines in the host's response to malaria. International Journal for parasitology. 27:1251-1263.

Riley EM, Wahl S, Perkins DJ, Schoefield L. 2006. Regulating immunity to malaria. *Parasite immunology* 28: 35-49.

Rockett KA, Awburn MM, Cowden WB, Clark IA. 1991. Killing of *Plasmodium falciparum* in Vitro by nitric oxide derivatives. *Infection and Immunity*: 59:3280-3.

Rockett KA, Kwiatkowski D, Bate CA, Awburn MM, Rockett EJ, Clark IA. 1996. In vitro induction of nitric oxide by an extract of *Plasmodium falciparum*. *Journal Infect.* 32:187-196.

Roitt Ivan, Brostoff J, Male D. 2000. *Immunology*. 5a Edition. Editorial Harcourt. Londres. 1:338-340.

Rosner D, Stoneman V, Littlewood T. 2006. Interferon-gamma induces Fas trafficking and sensitization to apoptosis in vascular smooth muscle cells via a p21 waf and Akt-dependent mechanism. *Am. Journal Pathol.* 168: 2054-63.

Rossi D, Gaidano G. 2003. *Haematologia*. Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. 88: 212-8.

Saadat F, Khorramizadeh MR, Mirshafiey A. 2005. Chemoprevention by pyrimethamine. *Immunopharmacol. Immunotoxicology.* 27:233-240.

Salvemini D, Masini E, Anggard E, Mannaioni PF, Vane J. 1990. Synthesis of nitric oxide-like factor from L-arginine by rat serosal mast cells: stimulation of guanylate cyclase and inhibition of platelet aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169: 596-601.

Sanchez TL, Rodriguez RA, Aguilar MM, Favilla CL. 2001. Mouse splenic CD4+ and CD8+ T cells undergo extensive apoptosis during a *Plasmodium chabaudi chabaudi AS* infection.

Savarino A, Boelaert JR, Cassone A, Majori G, Cauda R. 2003. Effects of chloroquine on viral infections: and old drug against today's diseases?. *Infectious diseases.* 3. 722-723.

Schofield L, Villaquiran j, Ferreira A, Schellekens H, Nussenzweig R, Nussenzweig V. 1987. γ Interferon, CD8+ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites. *Nature.* 330.664:666.

Schwartz IK: Prevention of malaria. 1992. *Infect This Clean North Am.* 6:313-331.

Stephens R, Langhorne J. 2006. Priming of CD4+ T cells and development of CD4+ T cell memory; lesson for malaria. *Parasite. Immunology.* 28:25-30.

Stevenson MM, Tam MF, Nowotarski M. 1990. Role of interferon-gamma and tumor necrosis factor in host resistance to *Plasmodium chabaudi AS*. *Immunol. Lett.* 24: 115-121.

Stevenson MM, Tam MF. 1993. Differential induction of helper T cell subsets during blood-stage *Plasmodium cabaudi AS* infection in resistant and susceptible mice. Clin. Exp. Immunol. 92:77-83.

Stevenson MM, Riley EM. 2004. Innate immunity to malaria. Nature review 4: 169-179.

Stuart WT. 2000. Microbiología. Editorial Mc-Graw-Hill Interamericana. Quinta edición. México. 464-470.

Süss G, Eichmann K, Kury E, Linke A, Langhorne J. 1988. Roles of CD4+-and CD8+-bearing T lymphocytes in the immune response to the erythrocytic stages of *Plasmodium chabaudi*. Infect Immun. 56:3081-3088.

Szatmary Z. 1999. Tumor necrosis factor-alpha: molecular-biological aspects minireview. Neoplasma. 46:257-266.

Tay ZJ, Mendez CF, Mendez OF. 1993. Microbiología y parasitología medicas, Segunda edición. México. 374-389.

Taylor RAW, Phillips RS, Severn A, Moncada S, Liew FY. 1993. The role of Th1 and Th2 cells in a rodent malaria infection. Science. 260:1931-1934.

Taylor RAW. 1995. Regulation of immunity to malaria: valuable lessons learned from murine models. Parasitology Today. 11 335-341.

Taylor RAW, Smith EC. 1999. A dichotomous role for nitric oxide in protection against blood stage malaria infection. Immunology Letters. 67:1-9.

Thorpe R, Wadhwa M, Bird CR, Mire-Sluis AR. 1993. Detection and measured of cytokines. Blood Rev. 15: 133-148.

Thumwood CM, Hunt NH, Cowden WB, Clark IA. 1989. Antioxidants can prevent cerebral malaria in *Plasmodium berghei*-infected mice. British Journal of Experimental Pathology. 70: 293-303.

Touré- Balde A, Sarthour JL, Roussilhon C. 1995. Acute *Plasmodium falciparum* infection is associated with increased percentages of apoptotic cells. Immunol. Lett. 46:59-62.

Touré- Balde A, Sarthour JL, Aribot G, Michel P, Trape JF, Rogier C, Roussilhon C. 1996. *Plasmodium falciparum* induces apoptosis in human mononuclear cells. Infect Immun. 64: 744-750.

Troye BM. 1994. Human T-cell responses to blood stage antigens in *Plasmodium falciparum* malaria. Immunology letters. 41:103-107.

Urquhart AD. 1994. Putative pathophysiological interactions of cytokines and phagocytic cells in severe human falciparum malaria. Clin. Infect. Dis. 1:117-31.

Van der Heyde H, Gu Y, Zhang Q, Sun G, Grisham MB. 2000. Nitric oxide is neither necessary nor sufficient for resolution of *Plasmodium chabaudi* malaria in mice. *The Journal of immunology*. 165:3317-3323.

Van der Werff Ten Bosch, Schotte P, Ferster A, Azzi N, Boehler T, Laurey G, Arola M, Demanet C, Beyaert R, Thielemans K, Otten J. 2002. Reversion of autoimmune lymphoproliferative syndrome with an antimalarial drug; preliminary results of a clinical cohort study and molecular observations. *Br. Journal Haematol*. 117:176-88.

Van Parijs L, Abbas AK. 1998. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science*. 280:243-248.

Vodovotz, Y. 1993. Suppression of macrophage effector functions by macrophage deactivating factor, transforming growth factor- β , interleukins-4 and -10, and bacterial lipopolysaccharide. PhD. Thesis, Cornell University Graduate School of medical Science. 88-89.

Volbracht C, Chua BT, Ng CP, Bahr BA, Hong W, Li P. 2005. The critical role of calpain versus caspase activation in excitotoxic injury induced by nitric oxide. *Journal Neurochem*. 93:1280-92.

Wei T, Chen C, Hou J, Xin W, Mori A. 2000. Nitric oxide induces oxidative stress and apoptosis in neuronal cells. *Biochim. Biophys. Acta*. 1498:72-79.

White E. 1996. Overview of apoptosis. *Inglaterra: Amersham life science*. 8-15.

Williams GT. 1994. Programmed cell death: a fundamental protective response to pathogens. *Trends Microbiol*. 2: 463-464.

Williams EL, Djamgoz MBA. 2005. Nitric oxide and metastatic cell behaviour. *Bio. Essays*. 27: 1228-1238.

Wink DA, Mitchell JB. 1998. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic and cytoprotective mechanism of nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med*. 25:434-456.

Winkler S, Willheim M, Bater K, Schmid D, Alchelburg A, Graninger W, Kremsner PG. 1998. Reciprocal regulation of Th1 and Th2- cytokine producing T cells during clearance of parasitemia in *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect. Immune*. 66: 6040-6044.

World Health Organization. 2006. Guidelines for the treatment of malaria. 87-115.

Wozniacka A, Lesiak A, Narbutt J, McCauliffe DP, Sysa JA. 2006. Chloroquine treatment influences proinflammatory cytokine levels in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*. 15: 268-75.

Wykes MN, Zhou YH, Liu XQ, Good MF. 2006. *Plasmodium yoelii* can ablate vaccine-induced long-term protection in mice. *The Journal of immunology*. 175:2510-2516

Xie Q and Nathan C. 1994. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *Journal of Leukocyte Biology*. 56:576-580.

Xu H, Wipasa J, Yan H, Zeng M, Madobongo MO, Findelman FD, Celso A, Good MF. 2002. The mechanism and significance of deletion of parasite-specific CD4⁺ T cells in malaria infection. *J. Exp. Med.* 195:881-892.

Yap GS, Stevenson MM. 1992. *Plasmodium chabaudi* AS: erythropoietic responses during infection in resistant and susceptible mice. *Exp. Parasitol.* 75:340-352.

Zhang W, Liu QX, Xu H, Good M. 2002. Polyspecific malaria antibodies present at the time of infection inhibit the development of immunity to malaria but antibodies specific for the malaria merozoite surface protein, MSP1, facilitate immunity. *Parasite Immunology*. 24:233-241.

