



Universidad Nacional Autónoma de México

División de Estudios de Posgrado



Instituto de Investigaciones Biomédicas

“Estrategia de terapia génica en un modelo de malaria”

Tesis que para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biomédicas,
presenta el Médico-Cirujano

Francisco Martínez Flores

Director de Tesis

Dr. Alejandro Zentella Dehesa





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis fue dirigida por el siguiente cuerpo académico.

Director de Tesis

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Investigador y Profesor Titular de Tiempo Completo.
Departamento de Genética y Toxicología Ambiental.

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
**Unidad Periférica en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y
Nutrición “Salvador Zubirán”.**

Comité Tutorial

Dra. Martha Legorreta Herrera

Investigadora y profesora de tiempo completo.
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Dr. Enrique Ortega Soto

Investigador y profesor de tiempo completo.
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles

Investigador y profesor de tiempo completo.
Instituto de Biotecnología, UNAM.

Este proyecto de investigación se desarrolló en los siguientes laboratorios:

Laboratorio de Bioquímica

Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán",
Secretaría de Salud.

Laboratorio de Inmunología Molecular

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza,
Universidad Nacional Autónoma de México.

Laboratorio de Bioterapéutica Molecular

Departamento de Morfología Celular y Molecular del Instituto Nacional de Rehabilitación,
Secretaría de Salud.



Instituciones que financiaron este proyecto de investigación

Universidad Nacional Autónoma de México
Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica
PAPIIT Proyectos: IN-229607, IN-205703

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México
Proyecto CONACYT 45519-M

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”
Departamento de Bioquímica
Secretaría de Salud

Instituto Nacional de Rehabilitación
Programa de Bioterapéutica Molecular
Secretaría de Salud

Instituto de Investigaciones Biomédicas
Departamento Genética y Toxicología Ambiental
Universidad Nacional Autónoma de México

Fundación Gonzalo Río Arronte I.A.P.
INR- 2005

Soporte Académico y Técnico

D. en C. Epifanio Cruz Zaragoza

Investigador de Tiempo Completo del Instituto de Física;
Universidad Nacional Autónoma de México.

D. en C. Hilda Villegas Castrejón

Directora de investigación del Instituto Nacional de Rehabilitación.

Dra. Eréndira Estrada Villaseñor

Departamento de Patología;
Instituto Nacional de Rehabilitación.

Dr. Jaime Mas Oliva

Investigador del Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México.

Dr. Ángel Zaráin Herzberg

Investigador Titular del Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina,
Universidad Nacional Autónoma de México.

Dr. David T. Curiel

Gene Therapy Center, Universidad de Birmingham en Alabama, USA.

Dr. Joanne T. Douglas

Gene Therapy Center, Universidad de Birmingham en Alabama, USA.

Dr. Winnald Guerritsen

División de Terapia Génica. Universidad Libre de Amsterdam, Holanda.

Dres. Ramón Alemany y Cristina Balague

Instituto Catalán de Oncología en la Universidad de Barcelona, España.

M en C. José Luis Ventura

Técnico Académico del IIB-UNAM
Unidad Periférica en el Instituto Nacional Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador
Zubirán".

Al siempre generoso pueblo de México, a mis padres, hermanos y a todos los que han contribuido para hacer de mí mejor persona y ser humano...

Oli Gómez
Katy Machuca
Hugo Sandoval
Criselda Mendoza
Alejandro Jiménez
Eréndira Estrada
Paty Suárez
Ruud Webbeling
Victor W. Beusenchem
Martine Lamfers
Hilde Antoinette
Gladys Ocharán
Ceci Vilca
Christian Lomeli
Leo Bárcenas
Karina G Martínez
Carmen Acuña
Mary
Gaby Alemán
Rodrigo Merino
Alex Martínez
José Alejandro del R
Florentina F, Plata
Jesús Gómez-Navarro
Marcela Del Río
Alejandro Zentella

Abreviaciones

aa	: aminoácidos.
ADN	: Acido desoxinucleico.
AMP	: Ampicilina.
ARNm	: Ácido ribonucleico mensajero.
AU	: Unidad de apertura de microscopio confocal.
BCL-2	: Proteína BCL-2.
CDC	: Centro de control de enfermedades (del anglo C ontrol D isease C enter).
cDNA	: ADN complementario.
CHSS	: Sulfato de condroitina sal sodica.
DDT	: Dicloro Difenil Tricloroetano.
DEET	: N,N-Diethyl-Toluamida.
DEPC	: Dietilpirocarbonato.
DMEM/F12	: Medio esencial modificado de Dulbecco y nutrientes F12 en relación 1:1.
DNA Pol II	: Polimerasa II dependiente de ADN.
E1A.	: Subunidad A de la unidad trascricional temprana E1 de un virus.
EDTA	: Acido Etilen Diamino Tetracético.
GFP	: Proteína verde fluorescente (del anglo G reen F luorescent P rotein).
Giga prep	: Cultivo de bacterias de más de 1 litro.
H&E	: Hematoxilina y eosina.
H₂O₂	: Peróxido de hidrógeno.
HBSS	: Solución salina con amortiguador de HEPES.
HEK-293	: Células embrionarias de riñón (H uman E mbrionic K idney 293).
IER	: Índice entomológico de infección.
KD	: Kilodaltones.
LB	: Medio Luria Bertani.
MMLV-1	: Virus Malooney de la leucemia murina.
MTT	: 4,5-Dimethylthiazol-2-bromuro de tetrazoleo.
nm	: Nanometros.
pb	: pares de bases.
PB	: Polibreno (bromuro de hexadimetrina).
PBS	: Solución salina con amortiguador de fosfatos.
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa.
PMN	: Polimorfonucleares.
IL-2	: Interleucina 2 recombinante.
RPM	: Revoluciones por minuto.
RPMI	: Medio RPMI-1640.
RT	: Transcripción reversa.
RT-PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa a partir de un producto de RT.
RV	: Vector retroviral.
SDS	: Duodecil sulfato de sodio.
SFB	: Suero fetal bovino.
TA	: Temperatura ambiente.
TCA	: Tratamiento combinado con artemisina.
UFC	: Unidad formadora de colonias.
UV	: Ultravioleta.
VAA	: Virus adeno asociado.
VAd	: Vector adenoviral.
WB	: Western Blot.

ÍNDICE

I. RESUMEN	10
II. ANTECEDENTES	12
II.1. Epidemiología de la malaria	12
II.2. Distribución geográfica	13
II.3. El vector de la malaria	14
II.4. El ciclo de vida de <i>Plasmodium</i>	15
II.5. Fisiopatogénesis de la malaria	17
II.5.1. Fiebre palúdica	17
II.5.2. Paludismo grave	17
II.6. Características clínicas de la malaria	18
II.6.1. Paludismo no complicado	18
II.6.2. Paludismo grave	18
II.7. Alteraciones en pruebas de laboratorio con el paludismo	18
II.8. Diagnóstico de la malaria	19
II.8.1. Sospecha clínica	19
II.8.2. Pruebas de confirmación	19
II.9. Terapia farmacológica y tratamiento para la malaria	20
II.9.1. Mecanismo de acción de los fármacos antimaláricos	20
A) Quinina y derivados	20
B) Sulfonamidas y sulfonas	21
C) Pirimetamina	21
II.9.2. El tratamiento del paludismo no complicado	22
II.9.3. El tratamiento de la malaria severa	23
II.10. La inmunidad contra la malaria.	23
II.10.1. Protección en los niños	24
II.10.2. La malaria y la genética humana	24
II.11. La prevención de la malaria	25
II.11.1. El tratamiento preventivo intermitente	26
II.11.2. El control del mosquito vector.	26
II.12. La vacuna contra la malaria	27
II.13. Aspectos moleculares de la inmunopatología de la malaria	28
II.13.1. La apoptosis en la malaria	29
II.13.2. Vías de activación de la apoptosis	30
II.13.3. La familia de proteínas BCL-2 como reguladoras esenciales de la apoptosis celular	31
II.13.4. La proteína BCL-2	33
II.14. Aspectos generales de la apoptosis de linfocitos	33
II.14.1. Apoptosis de linfocitos inducida por agentes infecciosos.	34
II.15. La terapia génica como una estrategia terapéutica de enfermedades Humanas	35
II.15.1. Métodos para la transferencia de genes	36
II.15.2. Los métodos virales	37
II.16. Los retrovirus como el vector ideal para infectar células hematopoyéticas	38

II.17. Terapia génica para enfermedades parasitarias	39
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	40
IV. HIPÓTESIS	42
V. OBJETIVO GENERAL	42
VI. OBJETIVOS PARTICULARES	43
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	44
VII.1. Generación de retrovirus recombinantes con la construcción bicistónica de GFP-Bcl-2, (RV-GFP-Bcl-2)	45
VII.1.1. El sistema Retromax	45
VII.1.2. Generación los plásmidos pCL-Eco-1 y pCNRX a gran escala (gigaprep)	46
VII.1.3. Cultivo de células HEK-293 (ATCC)	49
VII.1.4. Condiciones de cultivo de células HEK-293	49
VII.1.5. Generación de partículas retrovirales	49
VII.2. Infección ex vivo de los esplenocitos totales	51
VII.3. Determinación de la eficiencia de infección y sobreexpresión del gen Bcl-2 y GFP	52
VII.4. Modelo animal de trasplante	52
VII.4.1. Irradiación subletal y cuidado de ratones singénicos	52
VII.4.2. Infección por <i>Plasmodium chabaudi</i>	53
VII.4.3. Trasplante <i>in vivo</i> con esplenocitos infectados ex vivo a los ratones irradiados (Receptor)	53
VII.5. Identificación de linfocitos utilizando marcadores de superficie y citometría de flujo	53
VII.6. Valoración de la parasitemia por <i>Plasmodium</i>	53
VII.7. Análisis de ARN mensajero y proteínas	54
VII.7.1. Extracción de ARN mensajero	54
VII.7.2. Obtención de proteínas totales	55
VII.8. Análisis histopatológico	55
VIII. RESULTADOS	56
VIII.1. Determinación de la dosis óptima de IL-2 para la replicación de linfocitos	56
VIII.2. Infección de esplenocitos y vectores retrovirales	57
VIII.2.1. Determinación del MOI óptimo para la infección de linfocitos por RV	57
VIII.3. Localización <i>in situ</i> de GFP reveló la colonización de células trasplantadas al bazo en los ratones receptores por células trasplantadas..	60
VIII.4. La expresión del ARNm mensajero BCL-2 y la proteína en el bazo de los ratones trasplantados	61
VIII.5. Disminución de la susceptibilidad al estrés oxidativo en las células que expresan BCL-2 tanto <i>in vitro</i> como <i>in vivo</i>	62
VIII.6. Evaluación histopatológica de los bazos de ratones trasplantados con células transformadas	64
VIII.6.1. Análisis histológico y morfométrico del bazo.	64
VIII.7. El trasplante de células transducidas en animales infectados con <i>P chabaudi</i> reduce la parasitemia	68
IX. DISCUSIÓN	70
X. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	75
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
XII. ANEXOS	84
XIII APÉNDICES	97

ESTRATEGIA DE TERAPIA GÉNICA EN UN MODELO DE MALARIA

I. RESUMEN

Introducción. La malaria es una de las enfermedades infecciosas más devastadoras de todo el mundo. Algunos estudios indican que anualmente se presentan más de 1 millón de muertes por su causa. Durante la infección aguda, la activación de la respuesta inmune y la eliminación del parásito por el bazo, constituyen los dos principales mecanismos de defensa por parte del huésped. Sin embargo, la activación inmunológica está ligada a la apoptosis temprana de los linfocitos, lo que compromete la respuesta inmune del huésped en los casos de malaria, contribuyendo al desarrollo en la progresión de la enfermedad.

En el último lustro, los progresos de la terapia génica en las diferentes áreas de las ciencias médicas, incluyendo algunas enfermedades parasitarias, permiten explorar nuevas estrategias terapéuticas, mediante la introducción de genes codificantes para alguna proteína que permita adquirir, bloquear, restaurar o amplificar una función celular, fase de ciclo o muerte celular.

En este contexto, el bloqueo de la muerte celular mediada por algunas proteínas con función antiapoptótica, tales como Bcl-2, se ha explorado en diferentes modelos de trasplante *in vivo* empleando una estrategia de terapia génica, donde se ha demostrado un cierto efecto citoprotector. Por lo anterior, el presente trabajo, explora los efectos de la sobreexpresión de la proteína Bcl-2, en ratones trasplantados con esplenocitos transformados en un modelo murino de malaria (infectados por *Plasmodium chabaudi*), se analizaron los cambios histológicos inducidos por las células transformadas así como sus efectos sobre la evolución de la parasitemia.

Materiales y Métodos. Vectores retrovirales: Se diseñó y produjo un retrovirus ecotrópico de cassette bicistrónico, que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) y la de Bcl-2 (**RV-GFP/Bcl-2**); un segundo retrovirus que se usó como control, permitió la expresión de la proteína GFP (**RV-GFP**). Ambos vectores se empaquetaron en células HEK-293 para su producción en gran escala, previa transfección por el método de fosfato de calcio para la generación de los viriones que se usaron para transducir los genes externos a los esplenocitos y conferir una expresión estable.

Modelo experimental ex vivo: Los vectores retrovirales se usaron para infectar células de bazo y se constituyeron 3 grupos receptores de ratones singénicos CBA/Ca fueron trasplantados con 2×10^7 de esplenocitos totales, los cuales fueron

infectados con cada uno de los vectores retrovirales y con células control sin infectar, constituyendo: (1) el **grupo control** (n=6 ratones trasplantados con células sin transducir); 2) **grupo GFP** (n=6 ratones trasplantados con células transducidas por RV-GFP); y 3) **grupo Bcl-2** (n=6 ratones trasplantados con células transducidas por RV-GFP-Bcl-2). Dos horas más tarde, los tres grupos de ratones receptores se infectaron con 5×10^4 eritrocitos parasitados con *Plasmodium chabaudi* AS, para evaluar el efecto de los genes sobre la infección del parásito. Posteriormente, la parasitemia se evaluó cada 24 horas; y siete días después de la infección, se analizó la histología esplénica y la expresión de Bcl-2 a través de RT-PCR y WB para la identificación del mensajero y la proteína respectivamente. También se analizó la protección contra la apoptosis inducida por H_2O_2 en esplenocitos totales aislados. Adicionalmente, la eficiencia de la transducción por retrovirus y la expresión de Bcl-2 y/o el gen reportero GFP, se confirmó por microscopía de fluorescencia, RT-PCR y WB.

Resultados. Efecto de la expresión de Bcl-2 en el desarrollo de la malaria. La parasitemia en los ratones trasplantados con esplenocitos transducidos con RV-GFP disminuyó de manera transitoria 10 veces en el día cinco después de la infección por *Plasmodium chabaudi* AS, y aún más, cuando los ratones se trasplantaron con esplenocitos transducidos con RV-Bcl-2.

Efecto sobre la citoarquitectura del bazo. Desde el punto de vista histológico, la arquitectura esplénica de los ratones que recibieron células transducidas, mostraron: (1) una conservación de la arquitectura; y (2) una conservación de la relación de la pulpa roja:pulpa blanca, en comparación con los ratones del grupo control. Adicionalmente, el efecto de citoprotección *in vivo* fue más evidente en los bazos de aquellos animales que se trasplantaron con células transducidas con RV-Bcl-2 y que, interesantemente, correlaciona con el aumento de la celularidad y la aparición de una población celular en el bazo.

Conclusión. En este trabajo, se ha probado el uso de una estrategia de terapia génica basada en la reconstitución de ratones irradiados con células modificadas genéticamente en un modelo experimental murino de malaria, sobreexpresando la proteína antiapoptótica Bcl-2. Los hallazgos encontrados hasta el momento, permiten soportar la hipótesis de utilizar una estrategia de terapia génica en un modelo de malaria. Se observó: (1) una reducción transitoria de la parasitemia; (2) la preservación de la arquitectura esplénica; y (3) el aumento de la supervivencia celular *in vitro*, aún en condiciones de estrés oxidativo. Aunque el diseño experimental se enfocó en probar el efecto de la sobreexpresión de Bcl-2, el trasplante de células transducidas con el vector retroviral vacío también resultó en un efecto protector significativo, que adicionalmente está acompañado por el aumento de expresión de Bcl-2 endógeno.

II. ANTECEDENTES

El término malaria tiene sus orígenes en el italiano medieval (*mala aria*, que significa *mal aire*). También se le conoce como paludismo, que proviene del latín *palus* y significa pantano. Esta connotación etimológica ilustra la forma más común de adquirir la enfermedad en el pasado, lo que ocurría habitualmente en lugares con agua estancada propicia para la reproducción del mosquito-vector que transmite la enfermedad al hombre. La malaria es una enfermedad infecciosa cuyo agente etiológico es un parásito del género *Plasmodium*, que se transmite a los humanos por la picadura de una mosquito hembra infectada de la especie *Anopheles* (1).

Clínicamente, la enfermedad se caracteriza por fiebre progresiva, malestar general, debilidad muscular, ictericia, hepatomegalia, esplenomegalia y anemia severa; que en los casos más graves afecta al sistema nervioso central produciendo convulsiones, falla cerebral y hasta la muerte (2).

II.1. La epidemiología de la malaria.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), cada año se presentan más de 6 millones de nuevos casos y más de un millón de muertes debido a la malaria en todo el mundo. La enfermedad se encuentra distribuida de manera endémica en más de 102 países principalmente en África Central, Asia del Sur, Centro y Sudamérica, incluyendo a México (3). La mayoría de las enfermedades graves y muertes por malaria se da entre niños y representa el 10.7% de todas las muertes en menores de cinco años de edad. Lamentablemente, la incidencia de la malaria no ha disminuido en la mayoría de regiones endémicas en los últimos decenios e incluso, ha aumentado en algunas zonas (3).

En México se han estadificado como zonas endémicas los estados del Sur de ambas costas del país. Tan sólo en el estado de Chiapas, se reportan más de 140 mil casos por año desde 1998 (4, 5).

Durante décadas se ha intentado erradicar la enfermedad, a través de medidas de saneamiento básico y control del mosquito vector. Sin embargo, múltiples problemas de orden técnico, socioeconómico y político han impedido el éxito de los programas de erradicación. El control del mosquito vector tampoco ha sido eficiente, debido a que depende de variables climáticas y fenómenos meteorológicos (3, 4, 6).

Otros factores importantes relacionados con la persistencia de la malaria son la resistencia que desarrollan los mosquitos a los insecticidas, adicional a la del parásito frente a los fármacos antimaláricos comúnmente empleadas para su tratamiento (7, 8).

II.2. Distribución geográfica.

La malaria se transmite en gran parte en las zonas tropicales en el mundo, incluyendo la mayoría del África subsahariana, las zonas rurales del sureste de Asia, algunos países de Oriente Medio, partes de Oceanía, muchas áreas tropicales de América del Sur y Centroamérica, así como España. Su transmisión es más común en las zonas rurales sin embargo, también se presenta en las ciudades del África subsahariana y en el subcontinente Indio (3, 6).

En las áreas no endémicas de malaria, la enfermedad se produce de forma esporádica y se presenta principalmente en los inmigrantes que regresan de viaje procedente de las regiones endémicas. En los Estados Unidos de Norteamérica, se han registrado cerca de 1,500 episodios de malaria por año (9, 10).

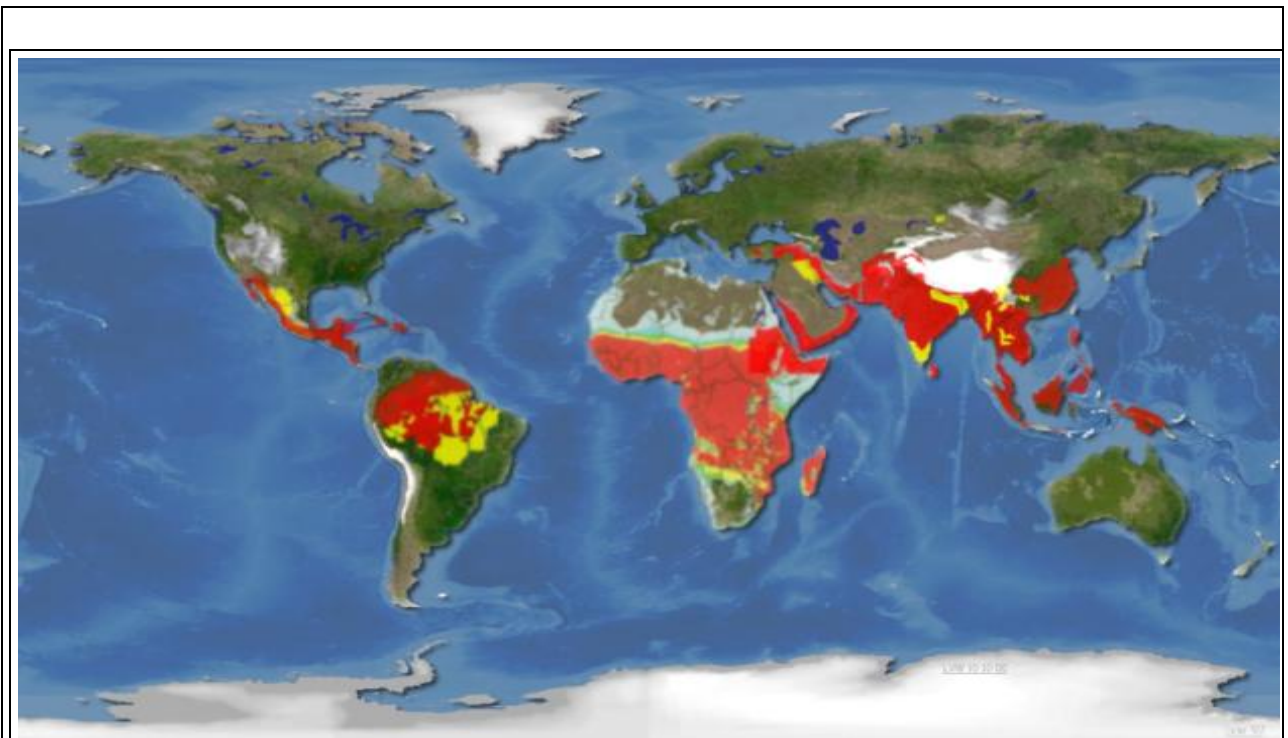


Figura 1. Mapa de distribución mundial de malaria.
Fuente: WHO-2009, Malaria Report.

La intensidad de la transmisión de la malaria se puede definir por la tasa de inoculación entomológica (EIR), que representa el número de picaduras de mosquitos infecciosos por persona y por año. El **EIR** varía enormemente en todo el mundo e incluso dentro de áreas endémicas pequeñas, con una mayor transmisión cerca de los criaderos de mosquitos. En las zonas endémicas de América y Asia, el **EIR** oscila en el rango de 1 a 10, pero en algunas zonas de África, el EIR puede alcanzar niveles superiores a 1000 (11). La transmisión de la malaria puede darse durante todo el año y a menudo, después de los picos de inicio de las lluvias en aquellas regiones con distintas estaciones de lluvia. En algunas áreas, la incidencia de la malaria por *P. falciparum* es estacional, mientras que la malaria por *P. vivax*, puede tener un período largo de incubación, y se produce durante todo el año (3, 12, 13).

II. 3. El vector de la malaria.

La malaria se transmite por la picadura de mosquitos *Anopheles* hembras infectadas con el parásito.



Figura 2. Fotografía de un mosquito del género *Anopheles*.

Tomado de Center of Diseases Control and Prevention. (Biology of Malaria)
<http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>

Muchas de las especies de *Anopheles* transmiten la malaria en diferentes partes del mundo y han variado la capacidad de transmitir la enfermedad. Entre los

más eficientes como vectores del *Plasmodium*, se encuentran *Anopheles gambiae* y *Anopheles funestus* en África y *Anopheles darlingi*, en la cuenca amazónica (1, 3, 14).

II.4. EL ciclo de vida del *Plasmodium*.

El parásito que causa la malaria tiene un ciclo de vida complejo, ya que incluye una fase de infección en los mosquitos y otra en los humanos. Durante su alimentación con sangre, los mosquitos infectados inyectan en el humano entre 10 y 100 esporozoitos a través de la saliva, los cuales llegan al hígado e infectan a los hepatocitos de manera asintomática. Después de aproximadamente una semana, los merozoitos son liberados del hígado hacia la circulación sanguínea para rápidamente infectar a los eritrocitos. Esta etapa de la infección es la responsable de las manifestaciones clínicas de la enfermedad en los humanos y se conoce como fase eritrocítica, con una duración de aproximadamente 48 horas para *P. falciparum*, *P. vivax* y *P. ovale*, y cerca de 72 horas para *P. malariae*.

Durante cada ciclo, los parásitos se desarrollan en pequeñas formas de anillo ó trofozoito. La siguiente fase denominada esquizonte, es metabólicamente más activa y multinucleada.

El esquizonte, con un contenido de hasta 36 núcleos, causa la ruptura de la membrana eritrocítica y liberá merozoitos infecciosos que invaden a otros eritrocitos. El desarrollo de múltiples rondas intraeritrocíticas conduce a un gran número de parásitos circulantes y a la progresión de la enfermedad clínica. Algunos parásitos eritrocitarios también entran a la fase sexual generando gametocitos (15).

Cuando los gametocitos maduros son ingeridos por un mosquito, se funden para formar un cigoto, y más tarde se transforman en un oocinete que atraviesa la pared del intestino del mosquito originando un gran número de ooquistes. Las múltiples rondas de división celular de los ooquistes conducen a la producción de miles de esporozoitos. Alrededor de más 12 días después de la ingestión por mosquitos, los ooquistes migran a las glándulas salivales, donde se vuelven infecciosos para los seres humanos. El desarrollo del parásito en el mosquito es más lento con temperaturas bajas, por lo que la transmisión de la malaria en los climas fríos es limitada (14, 15).

De relevancia clínica es el tiempo de la picadura de mosquito a los primeros síntomas de la malaria, es decir, en el lapso más breve, transcurren ocho días, aunque puede ser mucho más largo, en particular con especies distintas a *P. falciparum* en muchos casos, el único síntoma asociado es la fiebre persistente (1, 2, 15, 16).

En infecciones por *P. falciparum* y por *P. malariae*, sólo existe un ciclo en las células del hígado para producir la invasión y multiplicación, por lo que la infección desaparece del hígado en menos de cuatro semanas. Por lo tanto, el tratamiento que elimina los parásitos eritrocitarios cura estas infecciones. En las infecciones por *P. vivax* y por *P. ovale*, existe una etapa de infección latente, el hipnozoito no es erradicado por la mayoría de las drogas y puede dar lugar a infección eritrocítica posterior con enfermedad clínica después del tratamiento, por lo que es necesaria la erradicación de la fase hepática para anular esta infección.

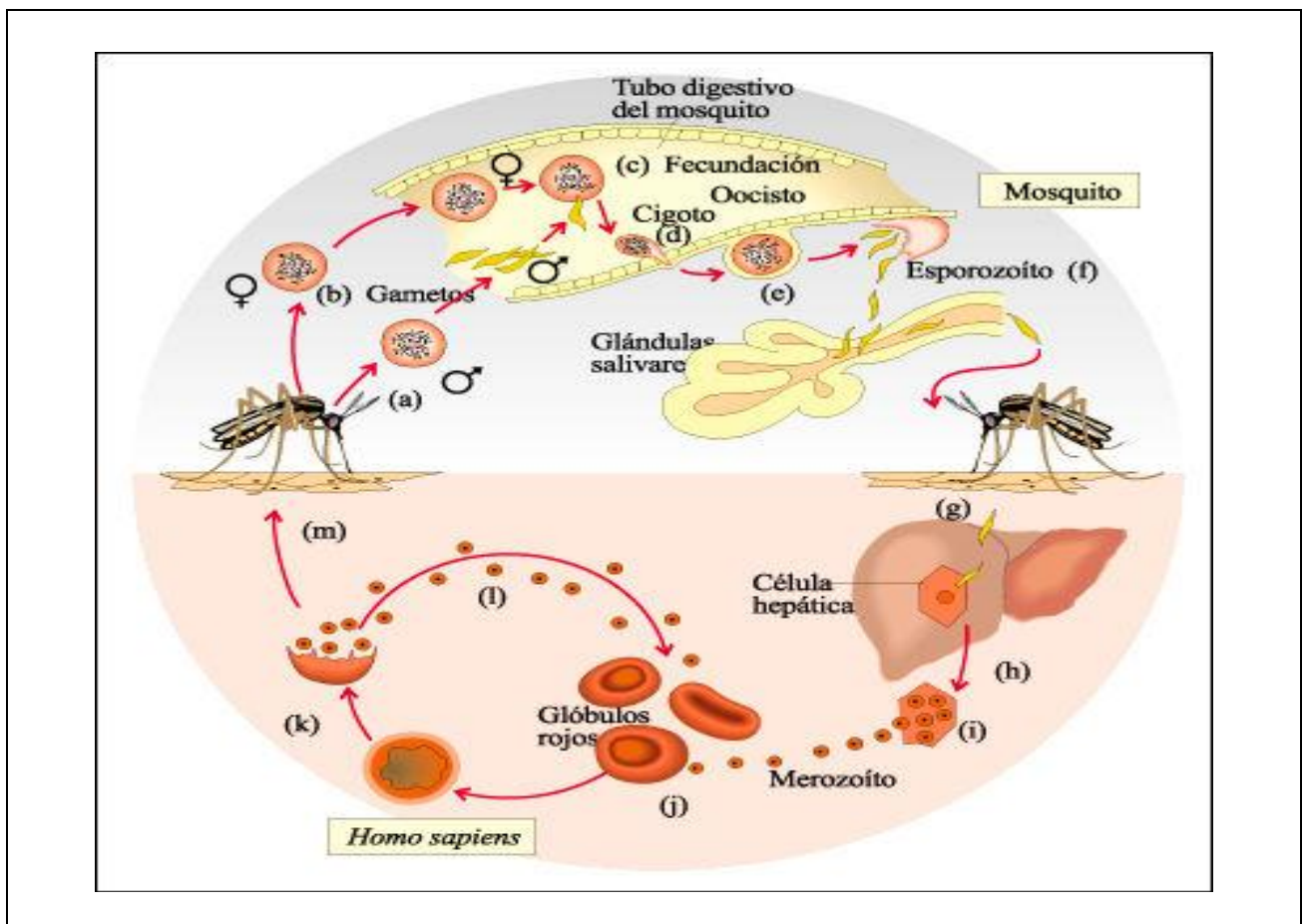


Figura 3. Ciclo de vida de los parásitos de la malaria.

a y b; representan los gametos que entran a la fase sexual al ser ingeridos por un mosquito. La fecundación en el tracto digestivo (C), origina un cigoto (D) que madura en un Oocisto (e) el cual a su vez genera esporozoitos (f) que maduran en las glándulas salivales. Los esporozoitos (g) son inyectados nuevamente en el humano. Los esporozoitos inyectados al torrente sanguíneo alcanzan el hígado (h). En el hepatocito, el esporozoito madura y libera merozoitos que infectan a los eritrocitos, (j). La fase intraeritrocitaria se lleva a cabo en múltiples rondas, algunos esquizontes entran a la fase sexual y se convierten en gametocitos. Los gametocitos pueden ser ingeridos por un mosquito e iniciar la fase sexual de replicación.

Tomado y Adaptado de http://www.searo.who.int/en/Section10/Section21/Section340_4269.html

II.5. Fisiopatogénesis de la malaria. En general se consideran dos cuadros comunes de la malaria, la fiebre palúdica y la malaria cerebral o paludismo grave.

II.5.1. Fiebre palúdica. En general, la fiebre coincide con la ruptura de los eritrocitos maduros por parásitos en fase de esquizontes. La ruptura de los eritrocitos está acompañada por niveles elevados del factor de necrosis tumoral- α , que junto con otras citocinas secretadas afectan la respuesta inmune. La liberación de sustancias del parásito (17, 18), así como la ruptura de los eritrocitos son responsables de la fiebre y otras manifestaciones generales de malaria aguda que se caracteriza por picos febriles cíclicos y mayores a 38°C, temblor, sudoración, cefalea, adinamia y debilidad muscular. En muchos casos, la fiebre persistente es la única manifestación clínica. Se calcula que alrededor del 40% de los cuadros febriles de causa no conocida, terminan con un diagnóstico de malaria (2, 17, 20, 21).

II.5.2. Paludismo grave. En las zonas altamente endémicas, la causa más frecuente de muerte por malaria es la anemia grave. En los niños con episodios repetidos de paludismo, las carencias nutricionales contribuyen a la anemia con alto riesgo de insuficiencia cardíaca y la muerte. La anemia es causada por la ruptura masiva de los eritrocitos infectados, la destrucción de eritrocitos no infectados y el deterioro marcado de la eritrogénesis (2, 19, 20, 21, 22).

La presentación aguda y grave de paludismo es común en las poblaciones endémicas no inmunes. Una característica única para *P. falciparum* es su capacidad para causar que los eritrocitos infectados se adhieran a los vasos sanguíneos. El secuestro de eritrocitos infectados dentro de los pequeños vasos sanguíneos, evita su paso por el bazo, el cual elimina los eritrocitos anormales de la circulación durante la infección (20, 21).

Este secuestro también ocurre en órganos altamente vascularizados como el cerebro, el corazón, los pulmones, el hígado, los riñones, e incluso en la placenta, originando disfunción orgánica y manifestaciones graves de malaria por *P. falciparum* (23). El secuestro de los eritrocitos infectados está mediado por la agregación de moléculas de superficie en la membrana eritrocitaria infectada, las cuales forman aglomeraciones llamadas rosetas (24, 25).

La proteína de membrana eritrocitaria-1 de *P. falciparum* (PfEMP-1) sobresale en forma de perilla para unirse a las moléculas superficiales del endotelio de los vasos sanguíneos humanos. Los diferentes parásitos expresan diferentes moléculas denominadas PfEMP-1 que se adhieren a diferentes moléculas de la superficie de las células humanas (25). De hecho, la capacidad de cambiar continuamente la expresión y síntesis de PfEMP-1 (alrededor de 60 codificados

en *P. falciparum*), provee una forma importante de evadir la respuesta inmune (26). Algunas moléculas que se unen a PfEMP-1 incluyen: CD36, molécula de adhesión intercelular-1, trombospondina, molécula de adhesión de células endoteliales, molécula de adhesión de plaquetas y el sulfato de condroitina A. Todos ellos se expresan en el endotelio de los vasos sanguíneos, y su expresión varía en diferentes tejidos (24, 25, 26).

II.6. Características clínicas de la malaria.

II.6.1. Paludismo no complicado. La gran mayoría de los episodios de malaria no complicada ocurre en poblaciones relativamente inmunes en las zonas endémicas. Un ataque agudo suele comenzar con dolor de cabeza y fatiga, seguido de fiebre y sudoración. Los pacientes pueden estar muy bien entre los ataques de fiebre. La fiebre es irregular, especialmente a principios de la enfermedad, pero sin tratamiento puede llegar a ser continua con ciclos de 48 (*P. vivax* y *P. ovale*) o 72 (*P. malariae*) horas, sobre todo con las enfermedades no-falciparum. El dolor de cabeza, malestar general, artralgias, mialgias, tos, dolor torácico, dolor abdominal, pérdida de apetito, náusea, vómito y diarrea son comunes. Los hallazgos físicos pueden estar ausentes o incluir palidez, ictericia, hepatomegalia y esplenomegalia (27). La erupción cutánea y el crecimiento de los ganglios linfáticos no son típicos de la malaria y por tanto, cuando están presentes pueden ser indicativos de otra causa de fiebre. El paludismo grave no responde bien en general, con una mortalidad de alrededor del 0.1% (22, 25, 27).

II.6.2. Paludismo grave. La malaria severa es principalmente un resultado de infección por *P. falciparum*, porque esta especie infecta a los eritrocitos de todas las edades, lo que causa el secuestro de un gran número de eritrocitos infectados en los pequeños vasos sanguíneos. La malaria grave por *P. falciparum* puede incluir la disfunción de cualquier órgano, incluyendo anomalías neurológicas como alteraciones de la conciencia, convulsiones reiteradas, coma (paludismo cerebral), anemia severa, hipertensión y estado de choque, disnea alteraciones respiratorias, insuficiencia renal, hipoglucemia; función hepática anormal con ictericia, anomalías hemorrágicas e infecciones bacterianas graves. Las causas más comunes de muerte en los niños son la malaria cerebral y la anemia severa (23, 24, 25). Sin embargo, la terapia temprana de la malaria severa es a menudo seguida de excelentes resultados terapéuticos. Las mujeres embarazadas son particularmente vulnerables a la malaria grave lo que trae pobres resultados principalmente durante su primer embarazo.

II.7. Alteraciones en pruebas de laboratorio con el paludismo.

El Paludismo no complicado se manifiesta con un bajo número de plaquetas, anemia, bajo o alto número de glóbulos blancos y la alteración de la función hepática como: elevación de la fosfatasa alcalina, incremento de la bilirrubina directa e indirecta; incremento de las aminotrasferasas oxalacética y pirúvica (TGO y TGP). La malaria severa se puede presentar con anomalías de laboratorio relacionada con la disfunción de órganos mencionados anteriormente (26, 27,28).

II.8. Diagnóstico de la malaria.

El diagnóstico de malaria se hace en base a sospecha clínica por interrogatorio y prueba confirmatoria.

II.8.1. Sospecha clínica. La malaria es la causa más común de fiebre en la mayor parte de los trópicos y en los individuos que desarrollan fiebre después de regresar de viaje al mundo en desarrollo. En las zonas endémicas, la fiebre es a menudo tratada como consecuencia de malaria, aunque el tratamiento ideal debe basarse en un diagnóstico específico de certeza.

En los países desarrollados, todas las personas con síntomas sugestivos, fiebre posterior de haber viajado a un área endémica, se deben evaluar para malaria. El riesgo de desarrollar malaria por *P. falciparum* es principalmente a los dos meses luego de regresar de viaje. Otras especies pueden causar la enfermedad muchos meses después, y en ocasiones a más de un año después de regresar de un área endémica (27, 28, 29).

II.8.2. Pruebas de confirmación: Incluyen exámenes basados en frotis de sangre y ensayos inmunoreactivos para diagnóstico rápido.

a). Frotis de sangre.

Un frotis de sangre teñido con Giemsa, es la base del diagnóstico. La gota gruesa proporciona una evaluación eficaz de grandes volúmenes de sangre, pero los frotis delgados son más simples para el personal sin experiencia y mejores para la discriminación de especies de parásitos. Los frotis suelen ser positivos en las personas infectadas, aunque la parasitemia (porcentaje de eritrocitos infectados con parásitos de la malaria) puede ser muy baja en una persona no inmune. Si se sospecha de la enfermedad y la primera tinción es negativa, la repetición de 8 frotis a intervalos de 24 horas es adecuada (Figura 4).

b). Pruebas de diagnóstico rápido.

Un segundo método diagnóstico consiste en la identificación de proteínas del *Plasmodium* circulante en formato de tira reactiva. Estas pruebas aún no están bien normalizadas, aunque son cada vez más comunes en todo el mundo; sin embargo, la prueba más sencilla y barata sigue siendo el frotis de gota gruesa.

Recientes avances en técnicas específicas para la búsqueda de proteínas de superficie usan anticuerpos fluorescentes y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) en modalidad de Tiempo Real y Multiplex (30,31).

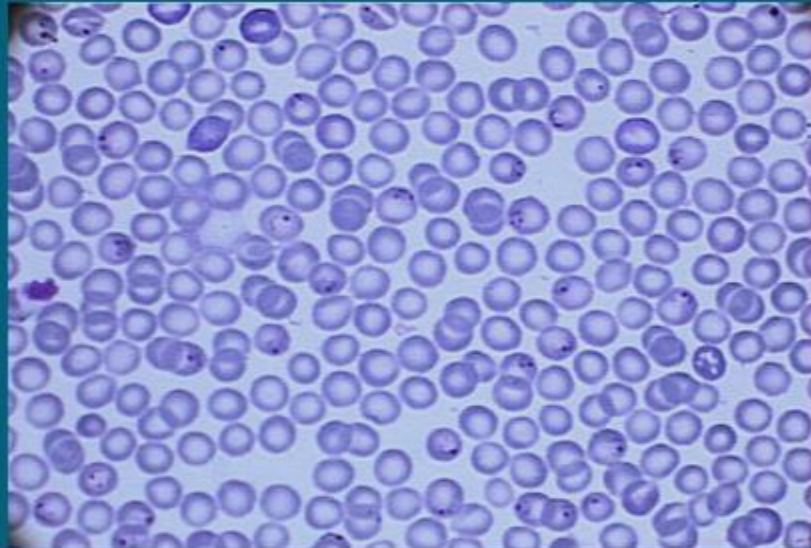


Figura 4. Frotis de gota gruesa teñido con Giemsa.

Nótese las inclusiones intra eritrocíticas de *plasmodium* de predominio anular. Cortesía del Departamento de Morfología Celular y Molecular, INR.

II.9. Terapia farmacológica para la malaria.

Los fármacos disponibles para tratar la malaria (Tabla 1), se clasifican principalmente en tres grupos químicos: 1) Alcaloides de la quinina y quinidina; 2) Los derivados de las sulfas y sulfonas (Antifolatos); y 3) Derivados de la pentamidinina como la pirimetamina.

II.9.1. Mecanismo de acción de los fármacos antimaláricos.

a). Quinina y Derivados. La mayoría son derivados alcaloides de la 4-aminoquinolona. Su principal mecanismo de acción es inhibir la actividad de la polimerasa *Hem* y evita la conversión de ferriprotoporfirina IX, un compuesto con propiedades membranolíticas. Adicionalmente, interfiere con la biosíntesis de ADN/ARN, la inhibición de proteasas de la síntesis de la hemoglobina y evita la acidificación intravacuolar. El fármaco más representativo de esta familia es la

cloroquina y se clasifica actualmente como el antimalárico más potente que la quinina. Se emplea principalmente en el ataque agudo de *P. vivax* y *P. ovale*; además de ser el fármaco de elección en la profilaxis y cura de infección por *P. malarie* (32, 33, 34).

b). Sulfonamidas y sulfonas: Son compuestos sintéticos desarrollados en la década de los 30's como los primeros antibióticos de la era moderna. Químicamente son derivados de la sulfanilamida (paraaminobenceno sulfamida) constituido por un núcleo benceno conjugado a un grupo amida y un grupo amino. Son antibióticos que también poseen actividad antiparasitaria, mediante la inhibición del último paso de la vía de síntesis de folatos, bloqueando a la dihidrofolato reductasa (32).

c). Pirimetamina: Es un fármaco antimalárico derivado de la pentamidina. Su mecanismo de acción principal es como inhibidor de la dihidrofolato reductasa de parásitos. Específicamente inhibe la conversión de dihidrofolato a tetrafolato en la vía de síntesis de folatos. Su espectro incluye principalmente a parásitos del género *plasmodium* y toxoplasma (32).

Sin embargo, muchos fármacos sufren de una o más de las tres limitaciones siguientes: 1) la disminución de la eficacia, debido a la propagación de parásitos resistentes a los fármacos, 2) la toxicidad, y 3) el alto costo, que limita su uso en los países en desarrollo. Es importante considerar el uso de los fármacos antipalúdicos sobre la base de estas indicaciones.

La quinina es la más antigua de las drogas antimicrobianas (32). Se utilizó para el tratamiento de la malaria a partir del 1600, inicialmente por la administración de corteza de árbol de la quina, y desde 1820, como un compuesto purificado. La quinina es tóxica en bajas dosis; sin embargo su derivado más importante es la cloroquina, que desde 1940, es una de las principales drogas empleadas para el tratamiento de la malaria, ya que ofrece rápida eliminación de parásitos, toxicidad mínima y bajo costo. Sin embargo, la resistencia de los parásitos del paludismo, en particular *P. falciparum* a la cloroquina se ha extendido a casi todo el mundo. Esta resistencia es también común con sulfadoxina-pirimetamina, un esquema farmacológico de remplazo frecuente a la cloroquina (32,33, 34).

Desde el punto de vista farmacológico, hay un fuerte impulso para tratar el paludismo por *P. falciparum*, empleando un régimen combinado para aumentar la eficacia y disminuir la presión para la selección de parásitos resistentes. En la actualidad, las combinaciones que incluyen derivados de la artemisinina, un compuesto extraído de la planta artemisia, ahora se incluye en el tratamiento, y la sustitución gradual de otros fármacos para el tratamiento de rutina de la malaria. La terapia estándar para la malaria grave, sigue siendo la quinina,

administrada por vía intravenosa o intramuscular. Teniendo en cuenta los desafíos de asegurar el tratamiento del paciente en los entornos con limitaciones de infraestructura de atención de salud, idealmente debería ser eficaz cuando se utiliza en casos más breves (generalmente hasta tres días) con una dosis diaria.

II.9.2. El tratamiento del paludismo no complicado.

En el tratamiento de la malaria por *P. falciparum*, *P. vivax* y *P. ovale*, se debe considerar incluir a la primaquina para erradicar el hipnozoito del hígado para evitar las recaídas posteriores. La combinación de sulfas-pirimetamina, es otra clase de fármacos que ofrece potente actividad, y los antifolatos, sulfadoxina-pirimetamina (Fansidar), que inhibe la vía de las enzimas dihidrofolato reductasa y dihidropteroato sintasa, se ha utilizado como un sustituto de bajo costo para la cloroquina. Sin embargo, la resistencia a la sulfadoxina-pirimetamina se ha desarrollado rápidamente después de un uso generalizado.

Fármaco	Clase	Indicación
Cloroquina	4- Aminoquinolina	Tratamiento y quimioprofilaxis de infección con parásitos susceptibles.
Amodiaquina	4-Aminoquinolina	Tratamiento de infección con algunas cepas de <i>Plasmodium falciparum</i> resistentes a cloroquina.
Piperaquina	Bisquinolina	Tratamiento de <i>P. falciparum</i> en combinación fija con dihidroartemisina.
Quinina	Metanol quinolina	Tratamiento oral de infecciones con <i>P. falciparum</i> resistentes a cloroquina. Terapia intravenosa de infección grave con <i>P. falciparum</i> .
Quinidina	Metanol quinolina	Terapia intravenosa de una infección grave con <i>P. falciparum</i> .
Mefloquina	Metanol quinolina	Quimioprofilaxis y tratamiento de infecciones con <i>P. falciparum</i> .
Primaquina	8-Aminoquinolina	Cura radical y profilaxis terminal de infección con <i>Plasmodium vivax</i> y <i>Plasmodium ovale</i> .
Pirimetamina-sulfadoxina (Fansidar)	Combinación de antagonista de folatos	Tratamiento de infección con algún <i>P. falciparum</i> resistente a cloroquina. Terapia preventiva intermitente
Proguanil-Atovacuona (Malarone)	Combinación antagonista de quinona-folatos	Tratamiento y quimioprofilaxis de infección <i>P. falciparum</i>
Dapsona-Cloroproguanil (Lapdap)	Combinación antagonista de folatos	Tratamiento de <i>P. falciparum</i> multifármaco-resistente en África.
Doxiciclina	Tetraciclina	Tratamiento (con quinina) de infecciones con <i>P. falciparum</i> . Quimioprofilaxis.
Halofantrina	Metanol fenantreno	Tratamiento de infección con algunos <i>P. falciparum</i> resistentes a cloroquina.
Lumefantrina	Alcohol amílico	Tratamiento de malaria por <i>P. falciparum</i> en combinación fija con artemetero (Coartem).

Tabla 1. Fármacos empleados para el tratamiento de la malaria.

Fuente: Tomado de las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, Goodman y Gilman. XI edición, Panamericana.

Otros antagonistas del ácido fólico son también muy eficaces, en particular cloro-proguanil-dapsona, que fue aprobado recientemente en algunos países africanos, está menos sujeto a problemas de resistencia en África, y se encuentra en estudio en combinación con artesunato (32,33).

En los Estados Unidos, donde artemisinina y una serie de otros antimaláricos activos por vía oral no están disponibles, la terapia estándar para la malaria por *P. falciparum* son quinina más doxiciclina (en niños o mujeres embarazadas, además de clindamicina), mefloquina o malarone. Las personas no inmunes con malaria por *P. falciparum* son generalmente hospitalizadas, ya que la enfermedad puede progresar rápidamente a enfermedad grave.

II.9.3. El tratamiento de la malaria severa.

El paludismo grave es casi siempre debido a la infección por *P. falciparum*. El tratamiento estándar para la malaria severa ha sido durante muchos años la administración intravenosa de quinina. En zonas con limitada infraestructura médica, también puede ser proporcionada por la vía intramuscular o rectal. La quinina, que es muy mal tolerada, puede reducirse mediante la adición de doxiciclina o clindamicina, estos antibióticos son de acción lenta, pero eficaz en combinación. En los Estados Unidos, donde las formulaciones de la quinina intravenosa no están disponibles, la administración intravenosa, de quinidina ha sido el tratamiento estándar para la malaria severa. Tanto la quinina y la quinidina administrada por vía intravenosa, puede causar toxicidad significativa, en particular, arritmias cardíacas y debe, idealmente, administrarse con monitorización cardíaca (33).

Algunos estudios recientes han demostrado que las artemisinina ofrecen al menos una eficacia equivalente a la quinina para el paludismo grave. Los resultados con artemetero intramuscular han dado lugar a una llamada de sustituir a la quinina con artemisinina, idealmente por vía intravenosa, como la terapia estándar para la malaria severa (32, 34). En 2007, el artesunato por vía intravenosa se puso a disposición de los Estados Unidos, pero sólo como droga de investigación.

II.10. La inmunidad contra la malaria.

La respuesta inmunológica humoral (anticuerpos) y mediada por células (células T), parecen desempeñar un papel, pero ha sido difícil determinar respuestas específicas que conducen a la protección. Los parásitos evaden la respuesta inmune por el cambio de expresión de proteínas antigénicas, en particular PfEMP-1, ya que la protección contra la malaria es altamente específica de la cepa (35). Por lo tanto, los niños en áreas endémicas requieren de múltiples

infecciones, para desarrollar poco a poco una amplia inmunidad protectora. Además la inmunidad es de corta duración, por lo que es común para las personas que regresan a las zonas endémicas después de estancias prolongadas en los países no endémicos experimentar paludismo más grave que las que habían experimentado previamente (30). Se ha sugerido que las células T de memoria sufren apoptosis y por lo tanto no se mantiene una inmunidad sólida (36,37).

II.10.1. Protección en los niños.

En las zonas endémicas de malaria, los recién nacidos están ligeramente protegidos contra la enfermedad por la adquisición de anticuerpos protectores de sus madres proporcionados por la leche materna (38) y a la persistencia de la hemoglobina fetal, que parece ser menos favorable a la infección que la hemoglobina adulta. El riesgo es más alto en los niños de seis meses de edad. Los niños de áreas endémicas experimentan frecuentes episodios de malaria. Los episodios iniciales son severos, y la gran mayoría de las muertes por paludismo se producen en los niños pequeños de las zonas endémicas (21). Conforme avanza la edad se incrementa el fortalecimiento de la protección contra la malaria, que va desde la infección frecuente, incluyendo una enfermedad grave en los niños pequeños, a la infección asintomática en niños mayores hasta a la infección poco frecuente en adultos. Las edades más afectadas por la malaria pueden variar dependiendo de la endemicidad. En la mayoría de las zonas endémicas, el pico de la enfermedad es en niños menores de cinco años de edad; en zonas menos endémicas la enfermedad puede ser común en la infancia tardía, pero poco frecuente en adultos. Los viajeros a zonas endémicas, que normalmente no han tenido antes la infección, se encuentran en alto riesgo de malaria grave a cualquier edad (24, 29).

II.10.2. La malaria y la genética humana.

El riesgo mortal de la malaria ha ejercido una fuerte presión evolutiva a través de la historia de la humanidad. Se han seleccionado múltiples variantes genéticas, con la persistencia de las enfermedades genéticas graves, ya que ofrecen protección contra el paludismo (39).

Esta situación de riesgo de una enfermedad genética compensado por la protección contra otro riesgo, se conoce como un "polimorfismo equilibrado". Por ejemplo, la enfermedad de células falciformes, se caracteriza por el cambio de un aminoácido en la secuencia de la hemoglobina. La forma homocigota de la enfermedad de células falciformes (en la que ambas copias de la beta-globina llevan la mutación) causa discapacidad grave, pero los heterocigotos (portadores de células falciformes, que tienen un gen mutante y uno normal de

beta-globina) son generalmente saludables (40). Los heterocigotos permanecen en riesgo de malaria, pero están relativamente protegidos contra la enfermedad grave, probablemente debido a que la hemoglobina defectuosa es menos permisiva que la hemoglobina normal para el desarrollo del parásito en el eritrocito. Así, a pesar de las graves desventajas de la enfermedad de células falciformes, la protección brindada a los heterocigotos permite a la hemoglobina falciforme ser común en muchas zonas palúdicas del mundo, particularmente en África, donde la prevalencia puede ser de hasta 25% (41). Otras dos hemoglobinas mutantes, la C y la E, también ofrecen protección contra la malaria. Las talasemias, que son debidas a la mutación de algunos de los genes de globina, también causan graves anomalías, pero los heterocigotos están relativamente protegidos contra la malaria. Otras enfermedades genéticas que ofrecen protección contra la malaria son la deficiencia en la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que aumenta el estrés oxidativo y la ovalocitosis que altera la forma de los eritrocitos.

Una característica interesante en la genética humana es la deficiencia del antígeno Duffy, una proteína eritrocítica de función desconocida. Los antígenos Duffy, están codificados por tres alelos, es decir hay tres grupos sanguíneos diferentes: FyA, FyB y Fy0 (también llamado Fy-). Fy- es un alelo que no expresa antígeno (42). *Plasmodium vivax* utiliza estos antígenos para introducirse en los glóbulos rojos, por tanto aquellos individuos con el grupo sanguíneo Duffy Fy-Fy- son totalmente inmunes puesto que no poseen antígenos en la superficie de sus eritrocitos que pueda usar *P. vivax*. Fy- es muy raro en poblaciones europeas, pero es el grupo más común en África, donde la malaria es endémica. Los individuos duffy negativos, incluidos la mayoría de los africanos, no tienen efectos negativos evidentes de la deficiencia, pero están protegidos contra la malaria vivax, debido a que *P. vivax*, requiere del antígeno Duffy para invadir los eritrocitos. Esto también explica por qué la malaria vivax es muy poco común en África (43, 44).

II.11. La prevención de la malaria.

Las medidas preventivas para la picadura de mosquito, incluyen el uso de repelentes de insectos (lo ideal es que contengan aproximadamente el 30% de DEET), insecticidas, ropa de manga larga y mosquiteros. La quimioprofilaxis con fármacos antipalúdicos se recomienda para todos los viajeros provenientes de regiones no endémicas a zonas endémicas, a pesar de que los riesgos varían mucho en diferentes lugares, y algunas áreas tropicales no entrañan ningún riesgo. Las recomendaciones específicas para viajar a diferentes localidades están disponibles en los centros de control de enfermedades (CDC), la Organización Mundial de la Salud y otras organizaciones de salud pública.

Las recomendaciones actuales de los CDC incluyen el uso de la cloroquina para la quimioprolifaxis; sólo pocas áreas con parásitos de la malaria son sensibles a la cloroquina (principalmente el Caribe y Centroamérica, al oeste del canal de Panamá), mefloquina o Malarone son para la mayoría de las otras zonas palúdicas y; la doxiciclina para las zonas con una alta prevalencia de *P. falciparum* resistente. Regímenes de auto-tratamiento puede incluir Malarone, quinina o artemisato. En las situaciones de mayor exposición a *P. vivax*, puede ser apropiado también administrar primaquina tras la finalización del riesgo de malaria por *P. vivax* y *P. ovale* a fin de evitar recaídas posteriores y erradicar etapas hepáticas latentes. Sin embargo, debido a que por *P. falciparum* no se sufre recaída y los riesgos de recaídas de malaria son relativamente modestos; la profilaxis con primaquina no se utiliza habitualmente (45, 46, 47).

II.11.1. Tratamiento preventivo intermitente.

Un componente clave de un eficaz programa de control de la malaria es el suministro de una terapia eficaz; la quimioprolifaxis no es una práctica estándar en poblaciones del mundo en desarrollo, debido a los gastos y la potencial toxicidad de la terapia a largo plazo. Sin embargo, hay un creciente interés en el tratamiento preventivo intermitente, según la cual toda la población de alto riesgo recibe terapia antipalúdica inactiva (sin evaluación de infección activa) en intervalos definidos. Esta estrategia puede reducir la incidencia de la malaria sintomática al tiempo que permite desarrollar inmunidad al *plasmodium*.

La terapia preventiva intermitente ha sido mejor estudiada con sulfadoxina-pirimetamina, una combinación de fármacos con acción prolongada que se administra en una dosis única. Las dos poblaciones de alto riesgo mejor estudiadas son las mujeres embarazadas y los lactantes. Durante el embarazo, la sulfadoxina-pirimetamina una vez al día durante el segundo y tercer trimestre ha mejorado los resultados de mujeres embarazadas. En los lactantes, la terapia intermitente con sulfadoxina-pirimetamina ha ofrecido beneficios, pero no se han normalizado los horarios de dosificación. Con el aumento de la resistencia a la sulfadoxina-pirimetamina, no está claro si la droga seguirá ofreciendo una prevención eficaz o si otros fármacos, con vidas medias más breves, serán efectivos para el tratamiento preventivo intermitente. Sin embargo, es probable que se utilice cada vez más como una estrategia clave para el control de la malaria (47, 48).

II.11.2. El control del mosquito vector.

El control sanitario de la malaria es muy difícil. La transmisión local de la enfermedad se ha eliminado de algunas zonas, incluidos los Estados Unidos, Canadá, Europa occidental y Australia, pero en otros ámbitos, como el

subcontinente indio, los primeros éxitos de hace algunas décadas se siguieron por el fracaso y la incidencia de paludismo es probablemente ahora tan alta como nunca, en la mayoría de los trópicos. Los programas incluyen el control de mosquitos con insecticidas ecológicos y medidas para destruir los sitios de reproducción. A pesar de la gran preocupación por las consecuencias ecológicas del DDT, existe ahora un consenso general de que las fumigaciones de DDT en interiores, que sigue siendo muy eficaz, son relativamente seguras. Otros insecticidas que tienen menos preocupaciones ecológicas, sino que son más caros, se utilizan cada vez más. Los mosquiteros, en particular las redes tratadas con insecticidas piretroides, son cada vez más baratos y promovidos como un medio de protección antipalúdica. Estudios recientes han demostrado una significativa disminución de la mortalidad en niños con mosquiteros tratados con insecticida. La distribución de mosquiteros impregnados con insecticidas se ha incrementado rápidamente. Sin embargo, el costo de esta intervención de ya bajo costo, ha impedido hasta ahora la disposición en la mayoría de los niños con mayor riesgo de malaria (49,50).

II.12. La vacuna contra la malaria.

Una vacuna para prevenir eficazmente la malaria, sería un medio ideal para el control de la enfermedad. No obstante la comprensión de la respuesta inmune a la malaria y la mejor manera de obtener una respuesta inmune contra ella sigue siendo limitada; la probabilidad de una vacuna en el futuro cercano es baja. Sin embargo, se ha avanzado en estrategias de vacunas que ofrecen protección a algunas poblaciones de alto riesgo. Este enfoque no sustituye la quimioprofilaxis para la protección de los viajeros o de otras poblaciones de alto riesgo. Las vacunas contra la malaria en estudio incluyen la proteína-adyuvante, vector y parásito completo (51,52).

Las vacunas con proteína-adyuvante incluyen una o más proteínas, o partes de proteínas (péptidos) de parásitos de la malaria vinculadas a un hapteno, que es una sustancia que amplifica la respuesta inmunitaria. Estudios de proteínas o péptidos como posibles componentes de vacunas están en evaluación (53). Muchos expertos creen que una vacuna óptima requiere componentes que se producen en diferentes fases del ciclo de vida del parásito. La vacuna contra el péptido componente que ha sido más estudiado es la proteína que recubre el esporozoito (CSP) y en la etapa que es inyectado por los mosquitos en las células hepáticas. Estudios recientes con esta vacuna, que contiene una parte especialmente formulada del CSP provoca una fuerte respuesta inmune con alrededor de 30-60% de eficacia en la prevención de la malaria e incluso una mayor eficacia en la prevención de la malaria severa. Las vacunas que contienen otros componentes, entre ellos las proteínas de los parásitos que infectan a las etapas de glóbulos rojos y las etapas que son infecciosas para los

mosquitos, se encuentran bajo estudio intensivo. La inclusión de componentes eritrocitarios de entrada puede ser necesaria para prevenir la malaria sintomática (53,54).

Un segundo enfoque en la vacuna contra el parásito es incorporar los componentes en un vector viral o ADN. Este es un enfoque prometedor para las vacunas para una serie de enfermedades, incluyendo la infección por el VIH y la tuberculosis. Varias vacunas contra la malaria vinculadas a vectores virales se encuentran actualmente en estudio (53,54).

Un tercer y nuevo enfoque para las vacunas contra la malaria es inmunizar con parásitos intactos que se han atenuado (incapacitados, pero no muertos) para prevenir la enfermedad, sin embargo, puede causar el desarrollo de una respuesta inmunitaria protectora. Este principio se ha utilizado con éxito para muchas vacunas virales, como los de la poliomielitis y el sarampión. La estrategia es desalentadora para la malaria, ya que requeriría la irradiación de mosquitos infectados para la atenuación seguida de la disección de un gran número de esporozoitos de los mosquitos y, a continuación, la inyección en seres humanos. A pesar de las evidentes dificultades de este enfoque, se investiga agresivamente. Los múltiples enfoques de la vacuna en estudio (54,55) y el aumento del financiamiento para las vacunas contra la malaria ofrecen la esperanza de que las vacunas parcialmente eficaces puedan estar disponibles en breve (tal vez de cinco a 10 años). Sin embargo, lo más probable es que la espera de una vacuna eficiente será mucho más tiempo (55).

II.13. Aspectos moleculares de la inmunopatología de la malaria.

La fase sanguínea de la primoinfección por *Plasmodium* en el humano, se caracteriza por una fragilidad incrementada del bazo con esplenomegalia este fenómeno es parte resultado resultado de la gran actividad fagocítica del sistema reticuloendotelial. Histológicamente, el bazo presenta una extravasación de eritrocitos, congestión sanguínea, edema intersticial, cambios en la relación de pulpa roja y blanca, así como depósitos protéicos y de hemosiderina (56).

En la circulación periférica, se observa inicialmente una linfocitosis reactiva, que luego se transforma en una linfopenia progresiva. Esta linfopenia se atribuye a un índice elevado de células en proceso de apoptosis, como un mecanismo de defensa del huésped contra el parásito (18,57).

En la malaria ocurre una activación importante del sistema inmune con un incremento en la expresión del receptor soluble de IL-2 (IL-2Rs). Esta activación está involucrada tanto en la eliminación del parásito como en la Patología. Se ha descrito una correlación entre niveles elevados de IL-2Rs y una disminución

de la proliferación de los linfocitos, lo que sugiere que las células se podrían estar eliminando de la circulación (18, 58, 59). También se han descrito cambios en diferentes parámetros de la función inmune inducidos por la infección con *Plasmodium falciparum*; estos cambios incluyen un número reducido de linfocitos T y una disminución de la respuesta proliferativa de linfocitos mononucleares de sangre periférica contra antígenos de malaria, así como cambios en niveles de citocinas circulantes. (59, 60).

En las zonas endémicas los individuos con malaria muestran un mayor porcentaje de linfocitos T que sufren apoptosis espontánea que los controles sanos de la misma edad y sexo. Además; las infecciones agudas y las crónicas asintomáticas con *P. falciparum* se asocian con un marcado incremento en la apoptosis de las células T CD4+, células T CD8+, y linfocitos B. Este proceso podría estar implicado en las alteraciones de las respuestas proliferativas de las células T en las regiones donde la malaria es endémica (57, 58, 59).

II.13.1. La apoptosis en la malaria.

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular involucrado en diversos procesos fisiológicos y patológicos. Desde el punto de vista inmunológico, la apoptosis es un proceso de muerte celular programada que juega un papel central en la regulación del número de linfocitos y en la eliminación de linfocitos autorreactivos tanto a nivel central como a nivel periférico. Se ha demostrado que, luego de una respuesta inmune, sólo un pequeño número de linfocitos sobreviven mientras que la gran mayoría muere por apoptosis, de esta manera se preserva un sistema inmune sano y equilibrado (18).

Durante distintos procesos infecciosos, la apoptosis de los linfocitos se puede inducir por mecanismos de control del huésped con el objetivo de eliminar a los linfocitos que albergan al patógeno y/o mantienen la homeostasis del sistema inmune (60). Es bien conocido que durante un proceso infeccioso se generan linfocitos efectores específicos para el patógeno; sin embargo, ciertos microorganismos tales como virus, algunas bacterias y parásitos pueden activar a los linfocitos produciendo una activación policlonal como: reactivos con el agente infeccioso, autorreactivos o para antígenos no relacionados. Luego de la activación, ya sea específica o policlonal, el sistema inmune pone en marcha distintos mecanismos de control tratando de:

- 1) limitar la respuesta inmune específica para el agente infeccioso, con el objetivo de controlar procesos inflamatorios y responder en contra de un nuevo desafío antigénico.

- 2) limitar la respuesta inmune específica para antígenos propios, para evitar la autoinmunidad y mantener un estado de tolerancia.
- 3) limitar la respuesta inmune con especificidad no relacionada con el fin de evitar la sobrevida de linfocitos que pueden diluir los linfocitos específicos para el agente infeccioso y retardar el surgimiento de una respuesta protectora (59).

II.13.2. Vías de activación de la apoptosis.

La muerte celular por apoptosis es un proceso regulado genéticamente, en el cual intervienen moléculas efectoras y moléculas reguladoras (61, 62). Muchas de las señales de muerte y supervivencia celular proceden del exterior a través de receptores de superficie (vía extrínseca). Otro mecanismo de inducción de apoptosis es la vía intrínseca, que se activa ante la falta de factores de crecimiento o puede ser inducido por una alteración intrínseca de los mecanismos reguladores de apoptosis. Más recientemente se ha descrito otra vía de estrés a través del retículo endoplásmico (63, 64).

Vía extrínseca. La muerte celular por apoptosis puede iniciarse mediante la unión de un ligando a un receptor especializado (receptores de muerte) en la membrana plasmática. Los receptores de muerte pertenecen a la familia de genes del receptor del Factor de Necrosis Tumoral (TNFR). De ellos, el mejor conocido es el de FasR, que se activa al unirse a su ligando (FasL). Estos receptores son proteínas que se expresan en muchas células del organismo y presentan a nivel intracelular, una secuencia citoplasmática denominada dominio de muerte. Cuando el receptor de membrana se activa al unirse a su ligando se produce una serie de alteraciones en el dominio de muerte que conlleva a un reclutamiento de las moléculas adaptadoras que permiten la activación de las caspasas iniciadoras. Estas moléculas adaptadoras son TRADD (dominio de muerte asociado al TNFR) y FADD (dominio de muerte asociado a Fas). Ambas, Fas y TNFR normalmente están inactivos en forma de monómeros. Cuando los ligandos se unen a esos receptores, los dominios de muerte se trimerizan y pueden activar a las caspasas iniciadoras para ejecutar el programa de muerte celular.

Las **caspasas** son una familia de cisteín proteasas que se sintetizan como precursores inactivos, están compuestos por diferentes dominios o regiones peptídicas: un dominio amino terminal de tamaño variable, una subunidad larga, una subunidad corta y una región de unión entre ambas subunidades. La activación de las caspasas supone la fase efectora de la apoptosis y se puede producir por numerosos estímulos. Uno de ellos es la activación de la caspasa 8 por la unión de factores solubles (FasL y TNF) a sus receptores de membrana (61).

Las caspasas se clasifican en iniciadoras (caspasas 1, 2, 4, 5, 8, 9 y 10) que tienen pro-dominios largos de 15 a 25 kd; y en efectoras (caspasas 3, 6 y 7) que tienen pro-dominios de menos de 5 kd (65).

Otras moléculas inductoras de las Caspasas son la familia de proteínas Bcl-2 con capacidad apoptótica.

La vía intrínseca. El otro mecanismo de inducción del programa de apoptosis es la vía intrínseca, a partir de señales intracelulares. Esta vía participa en muerte celular inducida por privación de factores de crecimiento, radiaciones, corticoides, etc. De la vía intrínseca depende la apoptosis de las células durante el desarrollo embrionario y la homeostasis celular en condiciones fisiológicas. Existe una familia de proteínas esencial en la regulación de la vía intrínseca de la apoptosis, conocida como familia de Bcl-2 (65).

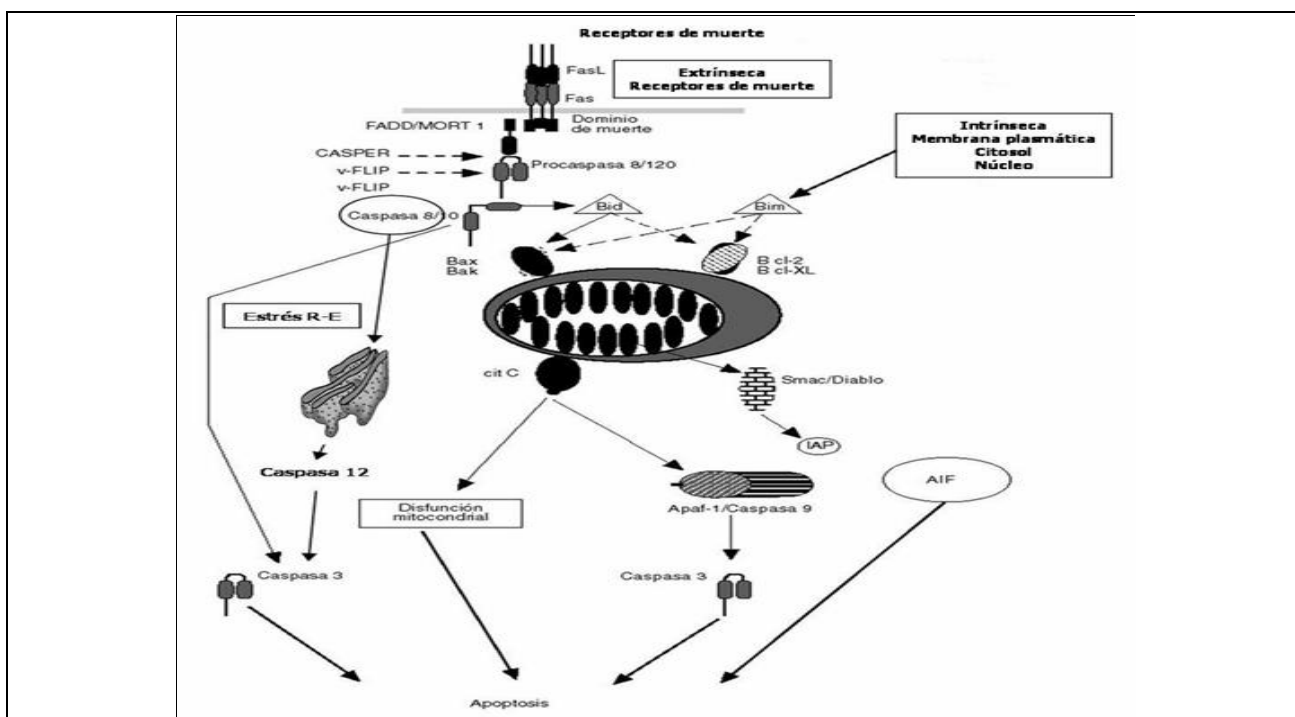


Figura 5. Vías de muerte celular programada.

Esquema que ejemplifica las vías de apoptosis. FasL: ligando de Fas; FADD: dominio de muerte asociado a Fas; RE: retículo endoplasmático; cit C: citocromo C; IAP: proteína inhibidora de apoptosis; AIF: factor inductor de apoptosis; Smac/Diablo: Segundo activador mitocondrial derivado de caspasas (del inglés Second mitochondria-derived activator of caspases/ Direct IAP-binding protein with low Pi).

II.13.3. La familia de proteínas BCL-2 como reguladores esenciales de la apoptosis celular.

La muerte celular es un proceso extraordinariamente regulado, que involucra interacciones entre moléculas extracelulares, vías de transducción de señales intracelulares y programas residentes de suicidio y rescate (Hale et al, 1996). Se han descrito una serie de mecanismos moleculares, que disparan su activación o que evitan el evento, con lo cual se han catalogado algunos mecanismos como pro-apoptóticos (a favor de la apoptosis) y otros anti-apoptóticos, entre los que destacan las proteínas de la familia BCL-2 (65, 66).

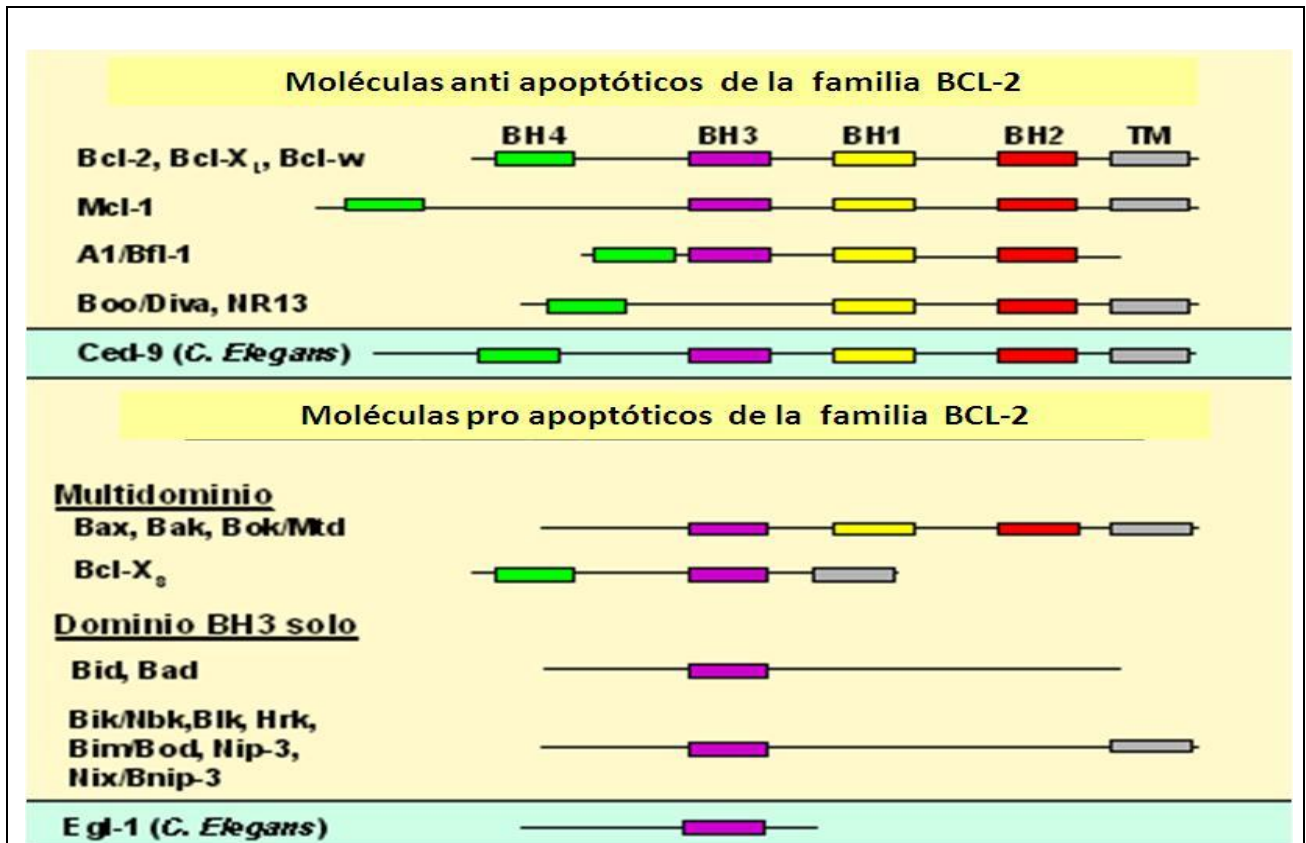


Figura 6. Familia de Bcl-2. Los miembros de la familia de Bcl-2 poseen hasta cuatro dominios de estructura en hélice de homología (denominados desde BH1 hasta BH4) que se representan por rectángulos. Parte de los miembros se anclan a las membranas a través de un dominio transmembranal (TM). Los miembros de esta familia se pueden subdividir en dos grandes grupos: anti-apoptóticos y pro-apoptóticos. Se observa como los primeros se caracterizan por conservar los cuatro dominios BH. Por el contrario, los pro-apoptóticos se dividen en los que conservan la mayoría de los dominios BH (multidominio) y los que sólo conservan el dominio BH3, junto con la región TM. Además, se muestran los homólogos en el nemátodo *C. elegans* de los miembros de la familia de Bcl-2.

La familia de proteínas Bcl-2 desempeña un papel fundamental en la regulación de la muerte celular programada y apoptosis (67), y está compuesta de al menos 16 miembros. Consta de una variedad de proteínas agrupadas en función de sus características estructurales y funcionales. Los diferentes miembros de la familia

de BCL-2 se encuentran principalmente en la mitocondria o en el citosol de la célula y forman dímeros entre sí. Los niveles relativos de miembros inductores e inhibidores de la apoptosis funcionan como reguladores del umbral apoptótico de la célula (68).

Algunos miembros de esta familia, tales como Bcl-2 y Bcl-XL suprimen la muerte celular, mientras que otros como Bax y Bak inducen la apoptosis. Al menos tres características bioquímicas se han atribuido a la familia de proteínas Bcl-2 incluyendo: (a) la dimerización con ellos mismos y unos a otros, (b) la interacción con otras proteínas, que van desde las proteína cinasas y fosfatasas y proteínas que activan proteasas de la familia de las caspasas, y (c) la formación de poros o la activación de canales iónicos de membrana. La importancia relativa de estas funciones no está bien aclarada, pero puede depender de la expresión de las proteínas Bcl-2 en los diferentes tipos celulares así como el tipo de estímulos implicados en la muerte celular (68, 69).

II.13.4. La proteína Bcl-2.

La proteína Bcl-2 se descubrió y se caracterizó inicialmente en pacientes con linfoma de células B por Reed y Zato. Se encuentra codificada en el brazo largo del cromosoma 18, ubicada en el loci 21, sub-banda 3. Está constituida por 6,492 pb para la variante alfa y 4580 pb para la variante beta. El transcrito primario es de 720 pb lo que da origen a una proteína de 239 aa. Ambas variantes difieren en su extremo carboxilo terminal (Anexo 1). La proteína tiene un peso molecular de 4,800 kilodaltones y esta clasificada desde su caracterización como una proteína de localización mitocondrial (en la membrana externa), pero también se ha descrito su presencia en la membrana nuclear y en la celular.

La función habitual de Bcl-2 es el bloqueo de la muerte celular, principalmente en linfocitos. En algunos modelos experimentales, los ratones deficientes de Bcl-2 sufren apoptosis fulminante de sus linfocitos y una fracción importante de muerte celular y pérdida de melanocitos; por el contrario, los ratones transgénicos que sobre expresan el gen Bcl-2 muestran una sobrevida de sus linfocitos (68, 69, 70).

II.14. Aspectos generales de la apoptosis de linfocitos.

La apoptosis es un proceso ordenado y regulado por diferentes proteínas y que se caracteriza morfológicamente por la fragmentación de ADN, la condensación de la cromatina, la compactación de organelos celulares y la formación de ampollas en la membrana celular (66). Los reguladores mejor definidos de la apoptosis de linfocitos son:

- a) Proteínas de membrana como los miembros de la superfamilia del receptor de TNF (TNFR) (Fas, p55, TNFR,) y los ligandos miembros de la familia de TNF (FasL, TNF, TRAIL,).

b) Proteínas citoplasmáticas como los miembros de la familia Bcl-1.

Muchos de los miembros de la superfamilia de TNFR comparten un dominio de muerte en la porción citoplasmática, el cual induce la formación de un complejo de señales que llevan a la activación de una familia de proteasas también conocidas como caspasas, y culmina en la activación de nucleasas que degradan el ADN (70, 71). Fas (APO-1 o CD95), es uno de los miembros más estudiados de esta superfamilia, es una proteína pro-apoptótica que se expresa en una amplia variedad de tejidos mientras que su ligando (FasL) tiene una expresión más restringida (71).

Las proteínas BCL-2 forman parte de una familia cuyos miembros comparten un número de regiones con secuencias homólogas y todos, aunque en diferente forma, influyen la muerte celular. Así, algunas de estas proteínas como Bcl-2 y Bcl-xL actúan bloqueando la activación de las caspasas y por lo tanto tienen actividad antiapoptótica. Por el contrario, Bcl-xS o BAD potencian la muerte al unirse a Bcl-2 y/o Bcl-xL para bloquear sus efectos antiapoptóticos.

II.14.1. Apoptosis de linfocitos inducida por agentes infecciosos.

Diversos tipos de agentes infecciosos (desde los virus hasta los parásitos), pueden inducir o retardar la apoptosis en diferentes células del huésped. La apoptosis seguida de la activación policlonal y la estimulación de los linfocitos T periféricos, es un resultado de la interacción de sistemas específicos de ligando-receptor, y son de especial interés para definir la inmunocompetencia del huésped y los mecanismos de inmunopatología (72).

Se han descrito dos situaciones en las que los mecanismos de control del sistema inmune del huésped inducen la apoptosis de linfocitos con el objetivo de controlar la respuesta inmune.

Una de ellas es la muerte celular pasiva, a través de la cual se eliminan linfocitos que se encuentran en exceso. Este tipo de muerte ocurre bajo condiciones donde la concentración de IL-2 y el nivel de antígeno es bajo, tal como ocurre al final de una respuesta inmune. Algunas características de la apoptosis pasiva son: (i) requiere de la síntesis de nuevas proteínas; (ii) es inhibida por la expresión de Bcl-2 o moléculas relacionadas y; (iii) puede ser impedida por varias citocinas que favorecen el crecimiento de células como IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15. Otras señales coestimuladoras, tales como la interacción de B7/CD28, también inhiben este tipo de apoptosis al incrementar la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-xL.

El otro tipo de muerte que pueden sufrir los linfocitos como consecuencia de los mecanismos de control del sistema inmune, es la muerte celular inducida por activación (AICD). Mediante este mecanismo, las células activadas en repetidas situaciones inician una muerte activa en la cual se matan a sí mismas (suicidio o propicidio) o entre sí (fraticidio) (71, 72, 73).

Se ha descrito para el compartimento de células T que el propicidio o apoptosis por retroalimentación es guiado por IL-2 y los niveles de antígeno en el microambiente inmune local (71, 74). La muerte activa de las células T limita la respuesta inmune bajo condiciones de altos niveles de IL-2 y antígeno. Paradójicamente, IL-2 que inicia la progresión en el ciclo celular de las células T, también es capaz de conducir a estas células a la apoptosis. En una respuesta temprana de células T, cuando la concentración de IL-2 es baja tiene un efecto proliferativo dominante; pero cuando la citocina se acumula y otros estímulos cambian, su efecto es antiproliferativo.

Estudios recientes han demostrado que las células B activadas por la infección con *plasmodium* aumentan la expresión de FasL y de esta manera ejercen un papel supresor sobre los linfocitos T (72, 73, 74). Es importante destacar que en ciertas infecciones, la muerte por AICD es mediada por Fas y FasL en sus formas solubles. En este sentido, se ha propuesto que durante la infección con HIV la muerte de los linfocitos T es mediada tanto por células que expresan en su membrana FasL, como por anticuerpos autorreactivos anti-Fas y por Fas sérico soluble que alcanzan niveles altos en pacientes infectados. Este mecanismo contribuiría a la desregulación de la vía Fas/FasL observada en las células T activadas, lo que conduce a una apoptosis anormal y por lo tanto a la disminución progresiva de linfocitos T observada en los individuos infectados. La apoptosis masiva de linfocitos, se ha asociado y atribuido a las formas más severas de malaria cerebral (75, 76, 77).

II.15. La terapia génica como una estrategia terapéutica de enfermedades humanas.

La introducción de material genético (ADN o ARN) exógeno para restaurar, conferir o potenciar una función, constituyen la piedra angular de la terapia con genes en el tratamiento de las enfermedades humanas. Clásicamente la terapia con genes se diseñó como una estrategia para la reparación de genes relacionados con enfermedades monogénicas como la distrofia muscular de Duchenne, la fibrosis quística, la hemofilia y las inmunodeficiencias congénitas. Sin embargo, después de 20 años de estrategias experimentales, su impacto mayor se ha centrado en áreas como la oncología, la inmunología y el tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas (78).

Existen dos estrategias de manipulación genética, en la práctica clínica experimental, la modificación *in vivo* y la modificación *ex vivo*. La modificación *in vivo* requiere de la introducción de material genético en el contexto *in situ*. Las estrategias de terapia *ex vivo*, incluyen la extracción de las células para la modificación *in vitro* con la posterior reintroducción de células modificadas al huésped.

No obstante, existen limitaciones para lograr una exitosa transferencia del material genético al sitio blanco en los modelos *in vivo*. Entre estas limitaciones se encuentran: la destrucción del ADN o la del vehículo seleccionado antes de llegar al sitio de interés por el sistema inmunológico o la degradación por enzimas séricas de ambos. El éxito de una buena transferencia de genes, depende en gran medida del método elegido (78, 79).

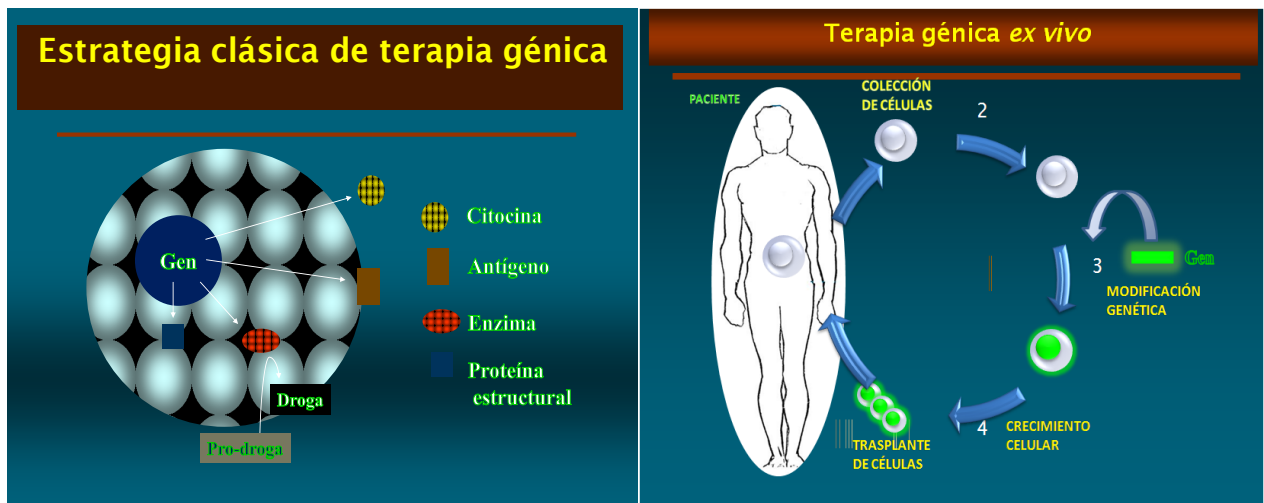


Figura 7. Estratégias de terapia génica.

La introducción de material genético puede conferir una función como la producción de una citocina para amplificar una respuesta pro inflamatoria, la generación de un antígeno para estimular la respuesta inmunológica o la generación de una enzima para conferir o acelerar un proceso metabólico. La modalidad más común en el humano, implica la modificación *ex vivo* de las células blanco y su reincorporación posterior.

Fuente: Bases moleculares de la terapia génica. Farmacología Médica. 1ra edición. Mc Graw Hill. México 2009.

II.15.1. Métodos para la transferencia de genes.

Los métodos para la transferencia de genes se clasifican en dos grupos:

1. Métodos no virales.
2. Métodos virales.

Los métodos no virales comprenden principalmente:

- a) Inyección directa o por biobalística *in situ* del plásmido que contiene el gen de interés.
- b) Métodos químicos como la precipitación con fosfato de calcio
- c) Encapsulación del ADN por micelas de lípidos catiónicos.
- d) Conjugación con polímeros inertes de alto peso molecular como DAE dextrán, polietilenglicol o el uso de polímeros para el plegamiento del ADN y encapsulado por micelas de lípidos catiónicos.

Sin embargo, estos sistemas son poco eficientes en modelos *in vivo*.

II.15.2. Los métodos virales.

Entre los sistemas para transferir genes, los vectores virales son la herramienta más eficiente para la terapia génica en los modelos experimentales *in vivo*. Los virus (del latín *venenum*) son entidades microbianas de replicación intracelular obligada, los cuales por su capacidad de transferir su propio material genético a la célula huésped, han influido en el curso de la evolución y son capaces de infectar células con una gran especificidad (tropismo) (79,80).

El reemplazo de los genes necesarios para el inicio de la replicación (genes no esenciales) por otros genes de interés terapéutico, se emplea para la generación de vectores virales recombinantes, que pueden transducir el tipo celular para los que son normalmente infecciosos. Las modificaciones del genoma de varios tipos de virus han mejorado la eficiencia de la infección y la expresión de genes de interés para utilizarse como vectores (80).

En general, para la producción *in vitro* de vectores virales recombinantes, las proteínas derivadas de los genes no esenciales son provistas por transcomplementación vía dos estrategias:

- Por una línea celular transformada de manera estable, la cual se denomina célula empaquetadora.
- Por la cotransfección temporal del plásmido que provee los genes requeridos.

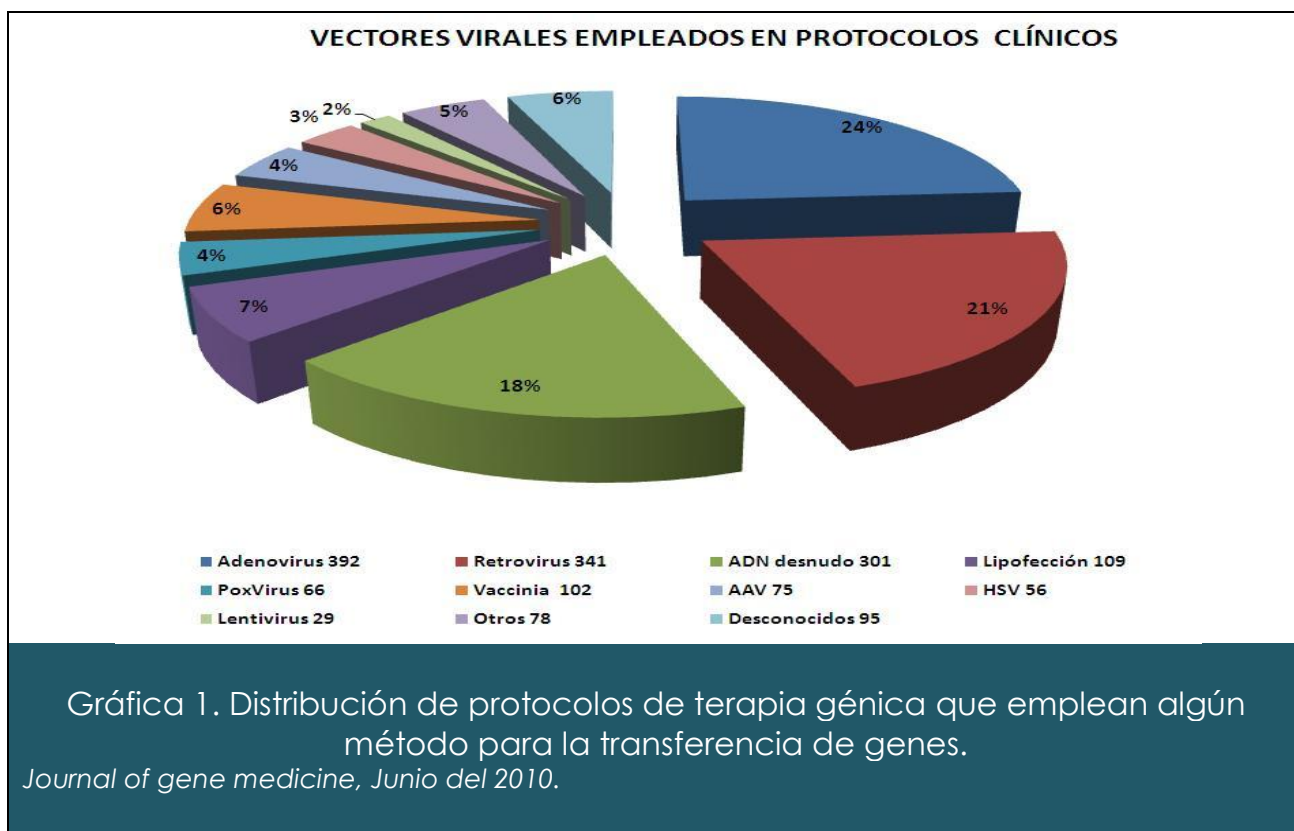
Además, los vectores virales recombinantes pueden mantener o suprimir su capacidad de replicación (replicativos y no replicativos) o inducir esta característica bajo circunstancias específicas (replicación condicionada) (79, 81, 82).

Entre estos virus se encuentran los ADNvirus, como el adenovirus serotipo Ad-3, 5, 6, y 7; los virus adeno-asociados (AAV serotipos 4, 5 y 6); el virus de la influenza, el

rotavirus; los RNAvirus; como el virus de la leucemia murina; los lentivirus y el herpes virus, entre los más empleados (**Gráfica 1**).

II.16. Los retrovirus como el vector ideal para infectar células hematopoyéticas.

Los retrovirus se han utilizado como vehículos para la transferencia de genes en muchos protocolos clínicos. Los más empleados están basados en el virus de la leucemia murina, y los lentivirus como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). El sistema más común es el descrito por Naveaux *et al* (**83, 84**).



El tropismo de estos es mayor en células hematopoyéticas, ya que su mecanismo de entrada está mediado por proteínas de superficie o receptores, que están anclados o ligados a algún sistemas de transducción que activa vías de internalización celular; mediados por actina, tubulina y algunas integrinas de la familia V.

Una vez dentro de la vacuola de clatrina, el pH ácido, favorece el desensamblaje de la cubierta viral. Posteriormente el complejo nucleoproteico se desplaza a las fenestras nucleares usando las proyecciones de los microtubulos. El genoma retroviral, posee una reversotranscriptasa y una recombinasa, que permiten la obtención de una hebra de cadena sencilla de

ADN, la cual una vez obtenida, se integra al genoma de la célula huésped. Esto permite que el material se pueda transferir a la célula hija en la siguiente fase de replicación celular, lo que permite una expresión permanente del transgen en el caso de la terapia con genes.

Esta integración no ocurre al azar como tradicionalmente se pensaba, Recientemente Schroeder *et al* (85) ha descrito que los lentivirus se integran preferentemente cerca de los genes con mayor actividad transcripcional en el genoma de la célula blanco. Adicionalmente, se ha documentado, que la integración proviral al genoma ocurre en su mayoría en el sitio de inicio de la transcripción. Entre los cuales se ha descrito el promotor del gen LM02. Sin embargo, se siguen empleando como los vectores ideales para la exploración de estrategias de terapia génica con expresión permanente (81, 82, 86).

II.17. Terapia génica para enfermedades parasitarias.

Las estrategias de terapia génica para enfermedades parasitarias se han focalizado para la producción de vacunas empleando plataformas virales. En el caso de la malaria, el éxito ha sido limitado, ya que la variación antigénica de los parásitos, el recambio rápido de algunas proteínas de superficie y algunos datos sugieren asociación antigénica, para poder obtener una respuesta humoral efectiva (87, 88).

Sin embargo, poco se ha explorado en relación a la potenciación inmunológica celular o la intervención de la respuesta celular. Por ello, este proyecto, representa una de las primeras estrategias para interferir con la respuesta celular y la evolución de la enfermedad, con el fin de orientar estudios ulteriores.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La inmunidad a malaria se desarrolla de forma muy lenta en los individuos que viven en las regiones endémicas. La inmunidad para los estadios sanguíneos de malaria depende de los anticuerpos y de las células T. El papel de los linfocitos T CD4⁺ se ha demostrado eliminando selectivamente a esta población *in vivo* y por transferencia de células T en ratones inmunodeficientes. Las células CD4⁺ de ambos fenotipos Th1 y Th2 son efectivas; sin embargo, no todos los plasmodios son susceptibles a la inmunidad mediada por células y las razones de esto se desconocen (89).

De tal forma, es de esperar que los factores que afectan la activación, la función y el tiempo de vida de las células T específicas para el parásito, puedan tener un impacto en la sobrevivencia del *plasmodio*. Se ha sugerido que tales factores podrían ser: (i) la pobre inmunogenicidad de los antígenos; (ii) la variación antigénica; (iii) la inmunosupresión como resultado de la infección con plasmodio y; (iv) la necesidad de una exposición continua al plasmodio para mantener la memoria inmunológica.

La eliminación de respuestas inmunológicas es una de las principales estrategias para controlar respuestas potencialmente peligrosas y los organismos infecciosos pueden utilizar esto para sobrevivir, como en el caso del virus que produce la coriomeningitis linfocítica donde ocurre una eliminación exhaustiva de células T CD8⁺ específicas para el virus. Aunque la capacidad de los plasmodios para persistir como resultado de la eliminación de células T CD4⁺ específicas no se ha investigado, la infección se asocia con inmunosupresión donde no se manifiestan respuestas específicas en las células mononucleares de sangre periférica (90).

Esta inmunosupresión puede ser consecuencia de un aumento en la apoptosis de células específicas por el *plasmodio*; por lo tanto el diseño de una estrategia de terapia génica, que pudiera rescatar de la apoptosis a las células del bazo que están directamente involucradas en la eliminación del parásito y que además podría determinar el efecto de la terapia génica en la proliferación y eliminación del plasmodio.

Además se ha demostrado que en varias infecciones se produce una desregulación de algunos miembros de la familia Bcl-2 lo cual afecta la viabilidad de linfocitos del hospedador (91). Así, los linfocitos de sangre periférica de los pacientes infectados con el virus HIV presentan una incrementada apoptosis espontánea *in vitro* y el agregado de IL-2 o de IL-15 revierte esta

muerte al aumentar los niveles de Bcl-2. Adicionalmente, el virus de la Inmunodeficiencia de Simios (SIV) inhibe la expresión de Bcl-2 en los timocitos CD4+CD8+ induciendo una marcada apoptosis y alteración de la función tímica. Por otra parte, *Baixeras* y *cols* demostraron que el virus vaccinia dispara la apoptosis de linfocitos B inmaduros por inducir una disminución de Bcl-2 (92).

Los recientes reportes de que los linfocitos B de animales infectados *in vitro* con *Trypanosoma cruzi* sufren de un proceso de apoptosis espontánea. En particular se ha descrito que la muerte de estos linfocitos B podría originarse por una expresión alterada de las proteínas de la familia Bcl-2. Finalmente, se ha observado que las células B de los animales infectados con este protozooario, presentan una alta expresión de las proteínas Bcl-2 y Bcl-xL (93).

Por lo anterior, este proyecto exploró una estrategia de terapia génica para sobre expresar el gen Bcl-2 exógeno, usando un vector retroviral, para de esta manera transformar a los linfocitos de ratones singénicos de la cepa CBA/Ca y usarlos para trasplante con el objeto de rescatar de la apoptosis a las células que están directamente involucradas en la eliminación del parásito, y analizar el efecto de la sobreexpresión de Bcl-2 en esta población celular y de ser posible determinar si el rescate de los linfocitos que mueren comúnmente debido a la infección con *Plasmodium* influye en la cinética de la parasitemia. Además También se analiza el efecto de la sobreexpresión de bcl-2 en las células del bazo y los posibles cambios histológicos en el mismo, ya que constituye un órgano blanco importante para la eliminación del *plasmodium*.

La razón de usar un vector retroviral en la prueba de concepto, está fundamentada en: (i) la alta eficiencia de estos virus para infectar células hematopoyéticas; (ii) la expresión estable del gen de interés y; (iii) la capacidad de integración de los transgenes al genoma huésped y de transferir esta información a las células hijas.

Esto permite seguir a la población celular modificada genéticamente *ex vivo* y trasplantada, así como los posibles efectos ulteriores a la proliferación celular, sin limitaciones en el tiempo de expresión en los modelos *in vivo*, como en el caso de la expresión génica temporal que confiere un vector adenoviral recombinante que estos vectores, solo confieren expresión temporal por la pérdida de los transgenes episomales durante la duplicación celular.

IV. HIPÓTESIS

En investigaciones previas se ha demostrado que el sitio de eliminación del plasmodio es el bazo y que los linfocitos de este tejido juegan un papel importante en la activación de los mecanismos inmunes (inmunidad humoral y celular) los cuales son necesarios para la eliminación del parásito. Además, también se ha documentado que como consecuencia de la infección con plasmodio, se genera una importante disminución de los linfocitos circulantes como resultado de un incremento de la apoptosis de estas células. Por lo anterior, si se sobreexpresa la proteína antiapoptótica Bcl-2 en los esplenocitos transformados con un vector retroviral, se podría aumentar la sobrevivencia de los linfocitos de bazo, lo que modificará la eliminación del parásito y por lo tanto la cinética de la parasitemia

V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos de la sobreexpresión de Bcl-2 sobre la cinética de la parasitemia en un modelo experimental de malaria murina usando ratones singénicos irradiados de manera subletal y trasplantados con células totales de bazo transformados con un vector retroviral que confiere la sobreexpresión de Bcl-2 y un vector reportero con la Proteína Verde Fluorescente.

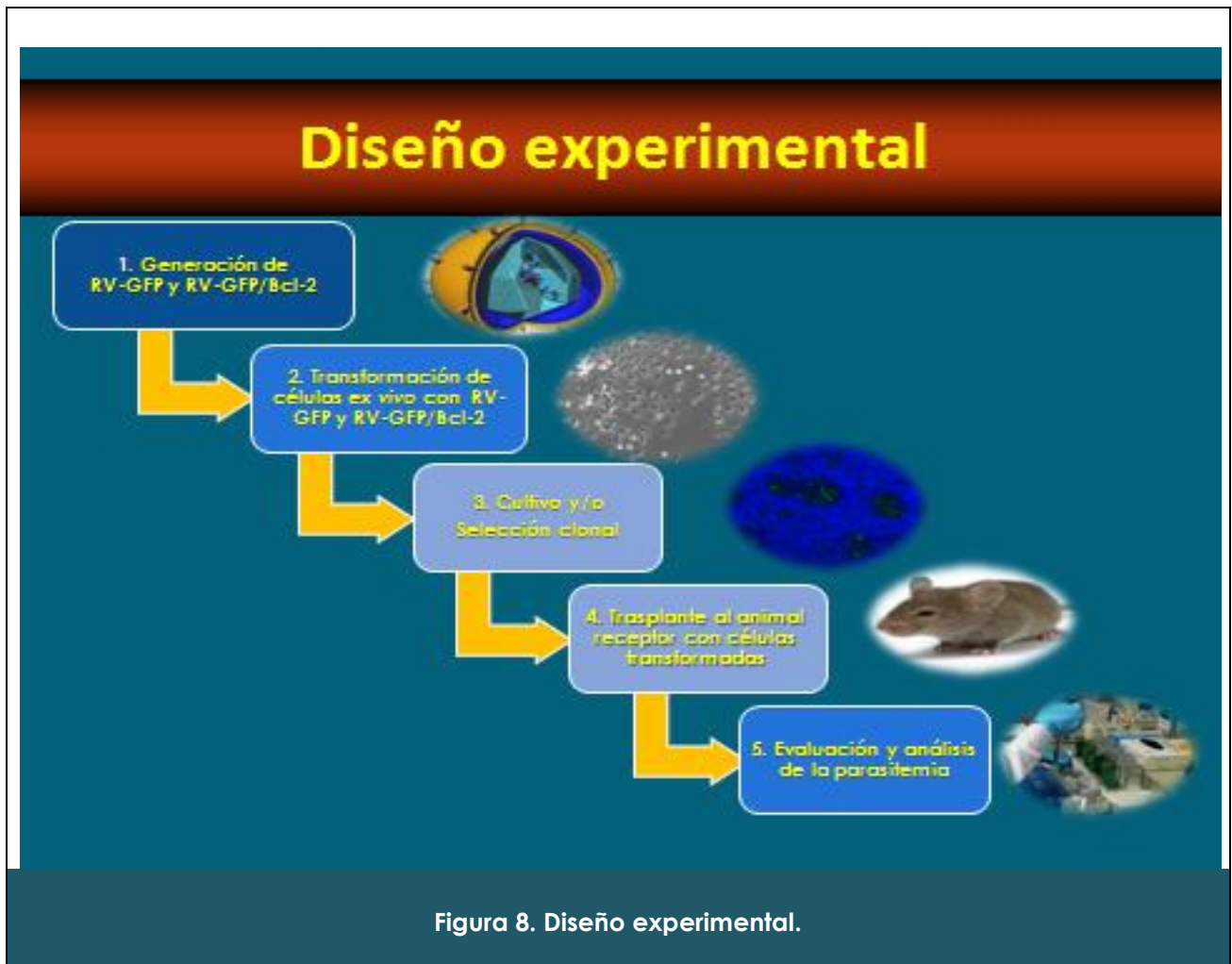
VI. OBJETIVOS PARTICULARES

Para lograr el objetivo general, se diseñaron de manera secuencial los siguientes objetivos particulares.

1. Generar partículas retrovirales (RV) que contuvieran los genes Bcl-2 y GFP como gen reportero (RV-GFP-BCL-2, y RV-GFP).
2. Establecer las condiciones para infectar de manera *ex vivo* a los esplenocitos totales provenientes de ratones singénicos (CBA/Ca57 donadores) con las partículas RV preparadas en el objetivo 1.
3. Determinar la eficiencia de infección por RV/GFP-BCL-2 en las células de bazo mediante citometría de flujo y/o microscopía de fluorescencia, identificando el gene reportero GFP.
4. Trasplantar a los ratones irradiados subletalmente con los esplenocitos transformados que sobre expresan el gen Bcl-2 y GFP.
5. Identificar la población de linfocitos que sobreexpresen Bcl-2 en ratones irradiados subletalmente.
6. Evaluar el efecto de la reconstitución de ratones irradiados subletalmente con linfocitos que sobreexpresan Bcl-2 sobre la cinética de la parasitemia.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

Para alcanzar los objetivos anteriores se realizaron los siguientes pasos secuenciales en dos fases y con el siguiente diseño experimental (Figura 8).



A. Fase *in vitro*.

1. Generación de partículas retrovirales RV-GFP-Bcl-2 y RV- GFP.
2. Infección óptima de esplenocitos *in vitro* y selección clonal.
3. Determinación de la eficiencia de infección y expresión por RV-GFP y RV-GFP/Bcl-2.

B. Fase *in vivo* (Modelo murino de malaria y trasplante).

4. Irradiación subletal de ratones singénicos.

5. Trasplante de esplenocitos totales transformados *in vitro* a los ratones irradiados (Receptores).
6. Infección de los receptores con eritrocitos parasitados por *Plasmodium chabaudi*.
7. Evaluación de cinética de la parasitemia.
- 8- Sacrificio de los ratones para análisis molecular e histológico.

VII.1. Generación de retrovirus recombinantes con la construcción bicistrónica de GFP-Bcl-2. (RV-GFP/Bcl-2).

Todas las partículas retrovirales se generaron usando el sistema Retromax Retroviral system (Imgenex corporation) de acuerdo a protocolo descrito por Naviaux *et al* (68).

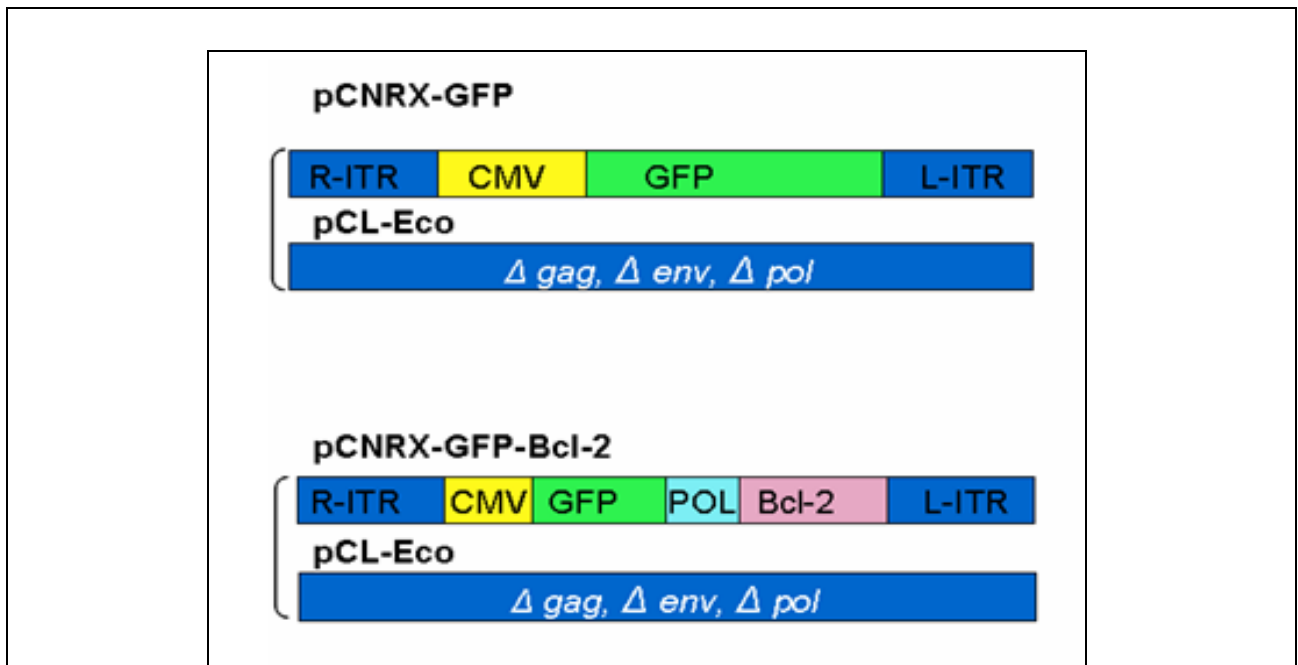


Figura 9. Esquema de la construcción de los plásmidos para la generación de los vectores retrovirales.

Esquema de la construcción de los plásmidos para la generación de los vectores RV; Arriba, el plásmido PCNRX que contiene el cassette de CMV-GFP. Abajo; el plásmido bicistrónico pCNRX que contiene el cassette de CMV-GFP y del promotor de la polimerasa II dirigiendo el control transcripcional de Bcl-2.

VII.1.1. El Sistema Retromax (RetroMax™ retrovirus vector system; Imgenex corp).

Es un sistema comercial para la generación de vectores retrovirales basado en el vector pCL, desarrollado por Naviaux *et al* (84). Los vectores generados en este sistema, están diseñados para maximizar los títulos de retrovirus recombinantes

de una forma simple, sistemática, eficiente y flexible. Todos los miembros de la familia de vectores de expresión RetroMax (**pCLXSN**, **pCLNCX**, **pCLNRX**, y **pCLNDX**) tienen una señal de encapsidación (ψ +) y su seguridad deriva de una mutación puntual en el marco de lectura que detiene la replicación y la supresión de la unidad E1A.

El sistema permite la generación de vectores retrovirales con títulos transitorios en el rango de $2-5 \times 10^6$ UFC/ml cuando se utilizan células empaquetadoras HEK-293.

Para la generación de partículas retrovirales, inicialmente se emplearon protocolos de producción de los plásmidos requeridos en gran escala y con alto grado de pureza (libres de endotoxinas) para realizar ensayos de transfección altamente reproducibles en células empaquetadoras HEK-293.

VII.1.2. Generación de los plásmidos pCL-Eco-I y pCNRX a gran escala (Gigaprep).

Los plásmidos del sistema Retromax se utilizaron para transformar una cepa de *E. coli* recombinasa A(-) con el objeto de minimizar las posibilidades de mutación. Para ello, 100 μ l de bacterias competentes por el método químico de cloruro de calcio de la cepa *E. coli*-JM109 (*invitrogen Corp*), se sometieron a protocolo de transformación usando el método de choque térmico con 500 ng de cada uno de los plásmidos de interés.

Las bacterias fueron recuperadas en medio LB sin antibiótico, con 1 mM de glucosa y 2 mM de MgCl durante 1 hora. Inmediatamente se sembraron en placas solidas de LB-Agar con ampicilina-HCl (100 μ g/mL) y se incubaron por 16 hrs a 37°C. Una vez incubadas, se seleccionaron 5 colonias de cada plásmido y se cultivaron en 12 mL de medio LB líquido con ampicilina en condiciones de agitación (250 rpm) a 37°C durante 16 hrs.

Para aislar el ADN plasmídico en escala midi, se usaron 10 mL de cultivo bacteriano líquido y se procesaron por el método de lisis alcalina de acuerdo al protocolo de *Maniatis y Sambrock*.

El ADN plasmídico obtenido de todas las clonas seleccionadas fue analizado por ensayo de restricción por endonucleasas específicas para verificar los fragmentos de cada plásmido, empleando las enzimas: Hind III, Xho I y Xba I.

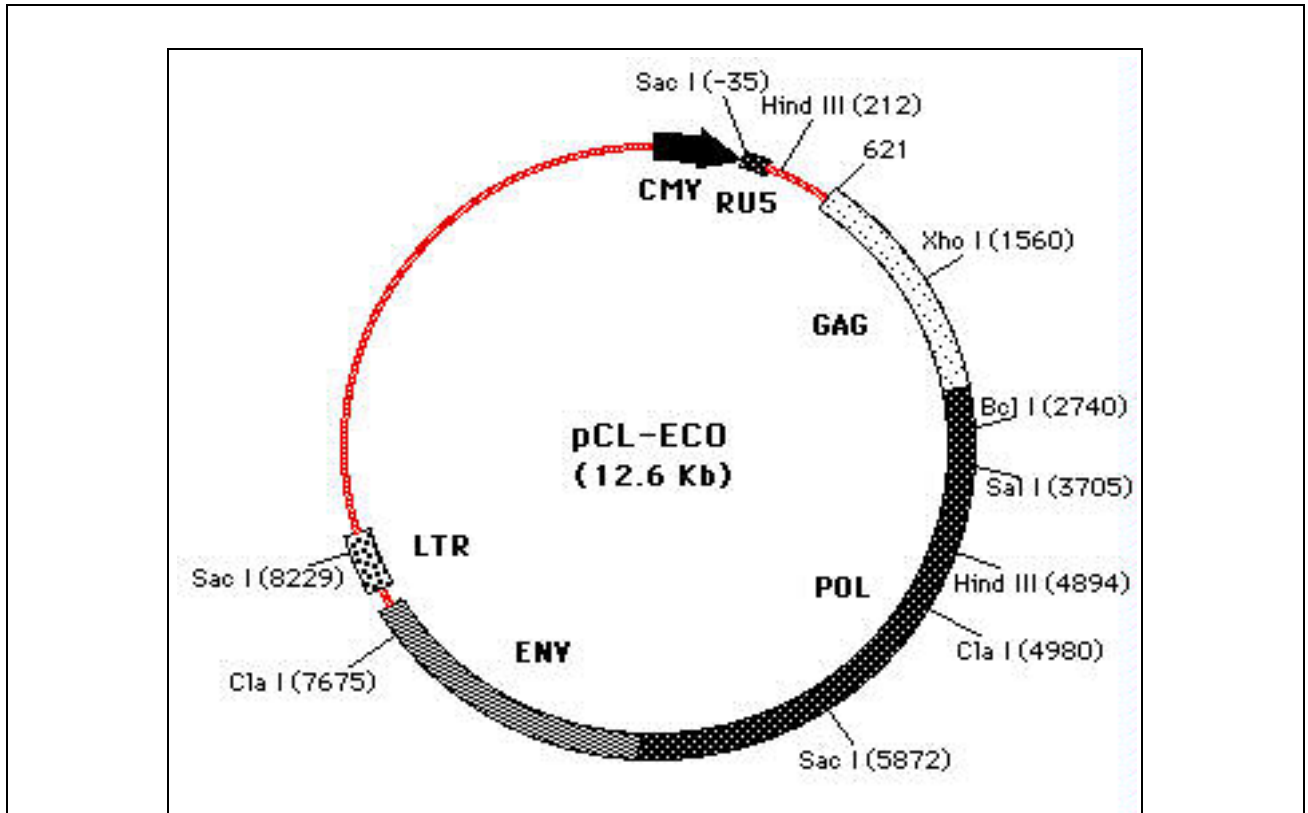


Figura 10. Mapa de pCL-Eco de 12.6 Kbs .
 Imagen tomada de Imgenex Retromax vector System.

El patrón de restricción resaltante fue visualizado por electroforesis para ADN y fotodocumentado para análisis de posición y restricción.

Una vez verificados los patrones de restricción, el resto del cultivo fue inoculado en 1.5 L de medio LB para la obtención de ADN plasmídico en escala giga. Para ello, se empleó un sistema de asilamiento de ADN plasmídico que garantizara la obtención de ADN puro y libre de endotoxinas (Gigaprep DNA isolation kit, Qiagen Corp).

Este paso es fundamental para la transfección masiva de células HEK-293, ya que debido a su naturaleza embrionaria, estas células epiteliales son muy sensibles a la presencia de endotoxinas (Lipopolisacáridos) procedentes de la pared bacteriana.

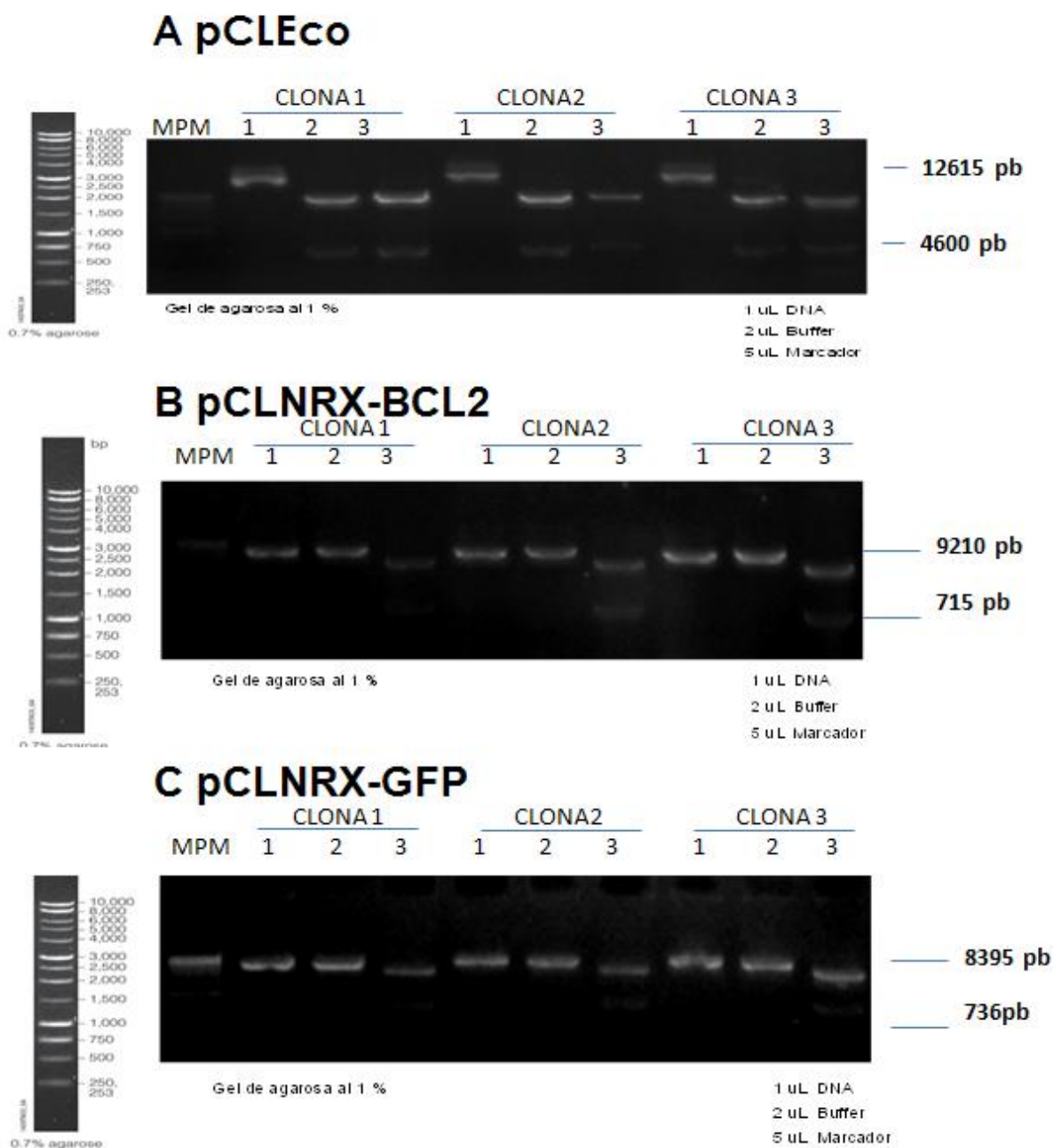


Figura 11. Electroferogramas resultantes del análisis de restricción de plásmidos del sistema Retromax.

pCL-Eco (A) Linearizado con EcoR1 (1); Hind III (2) EcoR1/Sal I (3); (B) pCNRX-Bcl-2-GFP Linearizado con EcoR1 (1), XbaI (2); y EcoR1 y Xba I (3) para liberar el cDNA de Bcl-2 de ~715 pb. Panel C muestra la pCNRX-GFP (C). Se muestra a PCNRX-GFP linearizado con EcoR1 (1), XbaI (2); y EcoR1 y Xba I (3) para liberar el cDNA de Bcl-2 de ~736 pb. Se seleccionaron las clonas 3 de cada plásmido para producción a gran escala.

VII.1.3. Cultivo de células HEK-293 (ATCC).

Las células HEK-293 son derivadas del mesonefros renal humano. Estas células epiteliales están transformadas con la subunidad E1A del adenovirus tipo 5 descrito por *Graham et al* en 1977 (94). También son conocidas como células empaquetadoras (ya que expresan de manera ubicua la subunidad E1A) un factor de transcripción que permite el inicio de la transcripción de otros genes tempranos que controlan la replicación viral. Actualmente, se emplean de manera rutinaria para la generación de vectores adenovirales y retrovirales recombinantes en la variedad defectuosos de replicación. Todos los experimentos realizados en este proyecto se cultivaron de un lote del mismo pasaje (Pase 15).

VII.1.4. Condiciones de cultivo de células HEK-293.

Las células HEK-293 se cultivaron a una confluencia menor al 80% en medio D-MEM-F12/505:50 (Gibco-Invitrogen corp.) suplementado con 1 mM de L-glutamina (Glutamax, Gibco-Invitrogen corp) y 1% de mezcla de antibiótico-antimicótico (100 mil unidades de penicilina G, 100 µg de estreptomicina, 25 µg de anfotericina B).

Se generó un lote inicial de 50×10^6 células/10 mL, los cuales se congelaron y criopreservaron en nitrógeno líquido (medio MEM con 20% de SFB inactivado por calor, y 10% de DMSO grado cultivo celular). Para Cada experimento se descongeló un criovial con 5×10^6 células en medio Optimem suplementado con 10% SFB (probado para micoplasma y esterilizado por filtración) e incubado a 37°C, 20% de oxígeno, 100% de humedad y 5% de CO₂. Cada lote fue tratado con ciprofloxacino (25 mg/mL) durante 5 días como profiláctico contra una posible infección por micoplasma.

VII.1.5. Generación de partículas retrovirales.

La generación de partículas retrovirales se estandarizó de la siguiente manera: Para determinar la cantidad óptima de ADN plasmídico a usar en los ensayos posteriores, se realizó un ensayo con 1, 2.5 y 5 µg de cada plásmido para 350 mil células HEK-293, y los sobrenadantes se usaron para infectar células totales de bazo. 3×10^5 células HEK-293 se sembraron en medio DMEM suplementado con 10% de SFB y 1% de antibiótico. Cuando las células alcanzaron el 50% de confluencia, se transfectaron con 2.5 µg de cada uno de los vectores pCLEco/pCNRX-GFP. Usando el protocolo de transfección basado en fosfato de calcio. (Calcium phosphate transfection kit, Invitrogen corp).

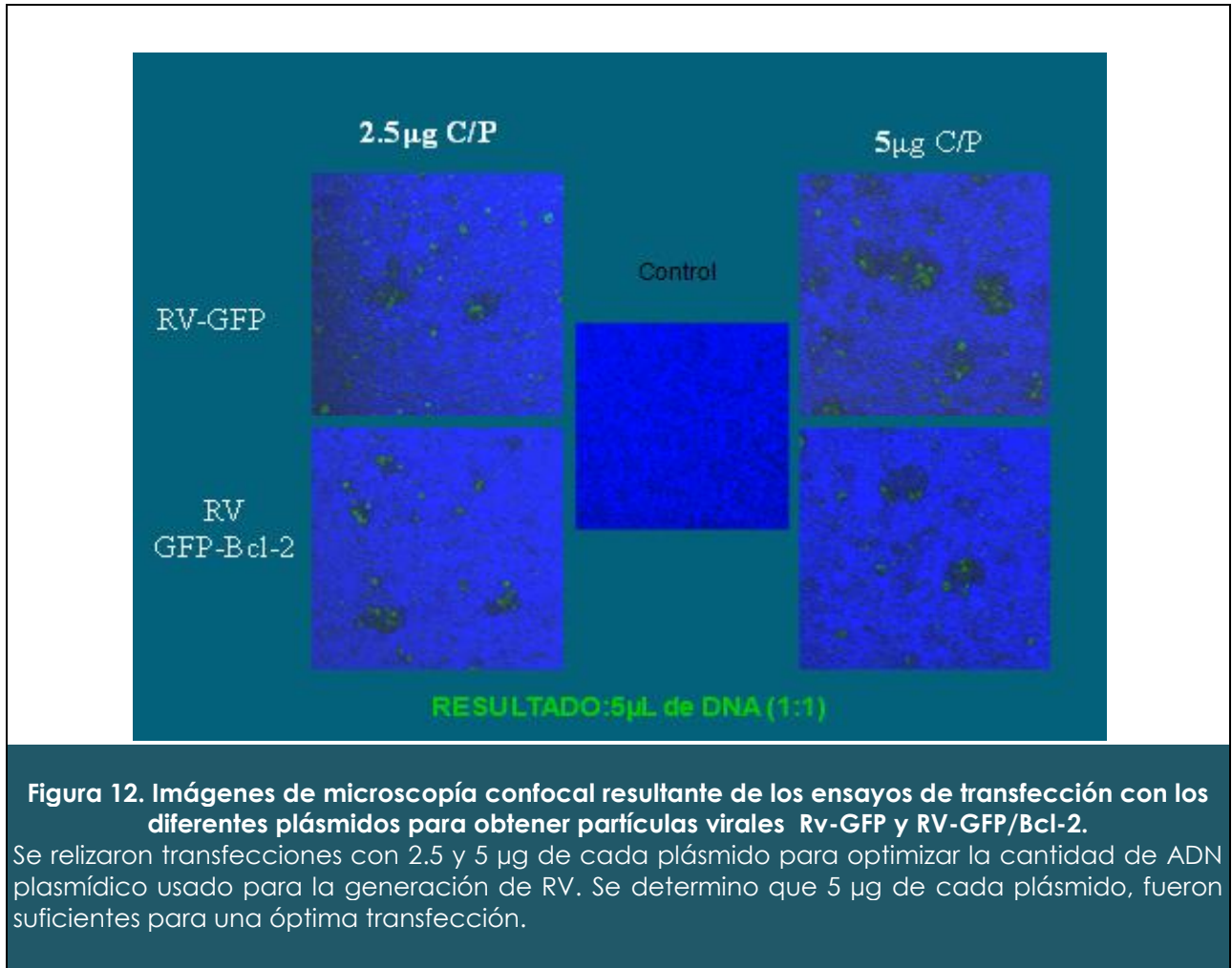


Figura 12. Imágenes de microscopía confocal resultante de los ensayos de transfección con los diferentes plásmidos para obtener partículas virales Rv-GFP y RV-GFP/Bcl-2.

Se realizaron transfecciones con 2.5 y 5 µg de cada plásmido para optimizar la cantidad de ADN plasmídico usado para la generación de RV. Se determinó que 5 µg de cada plásmido, fueron suficientes para una óptima transfección.

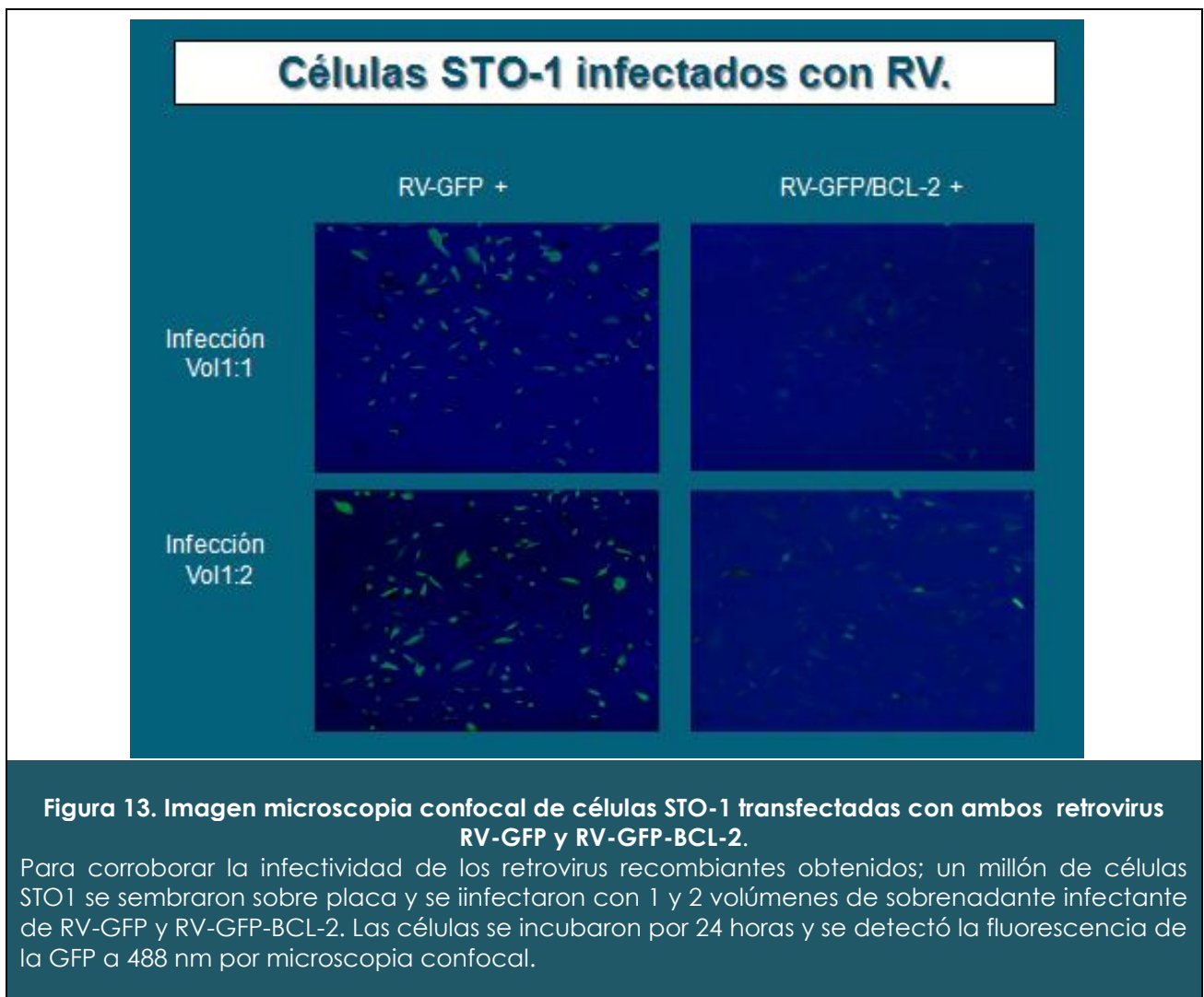
El medio de transfección se dejó por espacio de 12 horas, después del cual se reemplazó por medio fresco y se incubó nuevamente en las mismas condiciones.

48 horas post-transfección el sobrenadante se recuperó en un tubo de 15 mL y se centrifugó a 2000 RPM en un rotor de ángulo fijo (Sorval FX-12000) y posteriormente se filtró con una membrana de PVDF con poro de 0.45 micrones, bajo campana de flujo laminar con nivel de seguridad clase 2AB.

Para mantener la eficiencia de infección y de acuerdo a McMillan *et al* en 2004 (95, 96, 97), cada sobrenadante se conjugó con 8 ng/mL de PB (Bromuro de hexadimetrina, Sigma) y 10 ng/mL de sulfato de condroitina durante 30 minutos a temperatura ambiente. Inmediatamente después de la conjugación, se procedió a la infección de células totales sanas de bazo.

Para corroborar la capacidad infectiva de cada lote de retrovirus se utilizaron Células STO-1 como control positivo de la infección, a una densidad de 100 mil células (estas células poseen un elevado número de receptores para el

retrovirus) que se sembraron en placas de cultivo de 6 pozos utilizando diferentes diluciones. (Figura 12).



VII.2. Infección ex vivo de los esplenocitos totales.

Se homogenizó un lote de esplenocitos obtenidos del bazo de 3 ratones CBA/CA machos en quirófano y con técnica de asepsia y antisepsia. Previo sacrificio por luxación cervical, se realizó una laparotomía total y se extrajo el bazo, previo corte de los ligamentos gastro-esplénico y reno-esplénico. El órgano completo fue mantenido en medio RPMI-1640 (Gibco-invitrogen) y se obtuvo la pulpa esplénica por compresión mecánica en solución salina con HEPES (HBS) pH 7.4, bajo campana de flujo laminar.

Las células obtenidas se lavaron con D-PBS pH 7.4 y mantenidas en medio RPMI-1640 suplementado con 10% SFB y antibiótico (penicilina/estreptomicina) e

Inmediatamente se infectaron con el conjugado de partículas RV-GFP y RV-GFP-Bcl2, preparados de acuerdo al punto 1.3.

Las células totales infectadas se estimularon con 10 ng/mL de α IL-2 de ratón y se incubaron por 24 hrs antes de transplantarse en un ratón subletalmente irradiado (450 Rads con una fuente de cobalto).

VII.3. Determinación de la eficiencia de infección y sobreexpresión del gen Bcl-2 y GFP.

Después de 24h de incubación, las células infectadas se lavaron y se procedió a los siguientes pasos para su análisis:

1. Una fracción de la población celular se destinó a la obtención de proteínas totales para ensayo de WB para identificar la proteína Bcl-2.
2. Otra fracción se utilizó para determinar el porcentaje de la población infectada por medio de citometría de flujo para identificar la proteína verde fluorescente (GFP) transducida por ambos retrovirus recombinantes.
3. Para evaluar la función biológica de la sobreexpresión Bcl-2 y determinar el efecto protector a daño oxidativo de Bcl-2, los esplenocitos transformados se incubaron en presencia de diferentes concentraciones peróxido de hidrógeno (1, 2, y 4 mM). El análisis de viabilidad celular se realizó por tinción del colorante supravital azul tripano.

VII.4. Modelo animal de trasplante.

Para evaluar el efecto *in vivo* de la sobreexpresión de Bcl-2 transferida por el RV, se trasplantaron esplenocitos totales infectados con el RVGFP-Bcl-2 en un ratón previamente irradiado a una dosis subletal con el objeto de depletar la población celular endógena de linfocitos del ratón receptor y de esta manera favorecer el implante exitoso de las células trasplantadas.

VII.4.1. Irradiación subletal y cuidado de los ratones singénicos.

12 Ratones singénicos CBA57, fueron irradiados a partir de una fuente de cobalto 68 a una dosis de 450 Rads en el Instituto de Física de la UNAM. Ésta dosis ha estandarizado como la necesaria en estos ratones para depletar más del 50% de la población celular del bazo de acuerdo a *Legorreta et al, 1993 (98)*.

Los ratones irradiados y trasplantados con las diferentes poblaciones celulares se mantuvieron en jaulas ventiladas (Techniplast, Corp) y en condiciones libres de

patógenos propias para animales inmunocomprometidos dentro del bioterio del Instituto Nacional de Rehabilitación.

El alimento y el agua se esterilizaron antes de alimentar a los ratones con recambio cada 2 días. En el caso del agua esta fue previamente acidificada con HCl (1mM/L) para facilitar la eliminación de proteínas por el riñón. Además, la dieta fue suplementada con una fuente rica en hierro y ácido fólico para favorecer la regeneración de la serie mieloide (Harlan, Mexico).

VII.4.2. Infección por *Plasmodium chabaudi*.

Los parásitos *Plasmodium chabaudi* se prepararon a partir de eritrocitos estabilizados y criopreservados a partir de líneas clonadas de estos parásitos de la forma descrita por Jarra & Brown (1985). Posteriormente, 5×10^4 eritrocitos parasitados, se inocularon en los ratones vía intraperitoneal y, cuando el experimento lo requirió, por vía intravenosa a través del plexo retro ocular.

VII.4.3. Trasplante *in vivo* con esplenocitos infectados *ex vivo* a los ratones irradiados (Receptor).

La reconstitución de los ratones irradiados se realizó con el trasplante de células transformadas con los RV-GFP y RV-GFP-Bcl2 del punto 1.4, y como control se usaron células cultivadas en el mismo lote.

En campana de flujo laminar, y bajo condiciones de asepsia y antisepsia 2×10^7 esplenocitos se suspendieron en 100 μ L de HBS pH 7.4 fueron trasplantados vía plexo retro-ocular a cada ratón receptor. Los ratones se mantuvieron en condiciones libres de patógenos específicos, con cambio de alimento y agua cada 48 horas hasta los 10 días. Al cabo de este periodo los animales fueron sacrificados para su análisis.

VII.5. Identificación de linfocitos utilizando marcadores de superficie y citometría de flujo.

Se utilizaron anticuerpos monoclonales específicos marcados con ficoeritrina para identificar a las células: CD3+, CD4+, CD8+ y B220+. Los anticuerpos se diluyeron en (amortiguador de FACS) (PBS pH 7.2 con 1% de BSA, 0.1% azida de sodio y 0.05 mM de EDTA). Las células de bazo se incubaron en presencia de anticuerpos marcados durante 30 minutos, a 4°C, seguida de dos lavados en solución amortiguadora para citometría (FACS flow, Beckton&dickenson). El análisis de fluorocromos se realizó en un citómetro de flujo (Beckton&Dickinson).

VII.6. Valoración de la parasitemia por *Plasmodium*.

La evaluación del efecto de la sobreexpresión de Bcl-2 sobre la parasitemia se realizó mediante la identificación y cuantificación de parásitos intraeritrocíticos, usando la técnica de Giemsa. Durante cada día post-trasplante, se tomó una gota de sangre periférica y se realizó un frote sanguíneo. Cada laminilla se fijó con metanol absoluto por 30 segundos y se tiñó con el colorante Giemsa durante 30 min. Posteriormente se lavó con agua corriente y se secó a temperatura ambiente. Todas las laminillas fueron leídas al microscopio de luz el mismo día por duplicado, para determinar la curva de la parasitemia.

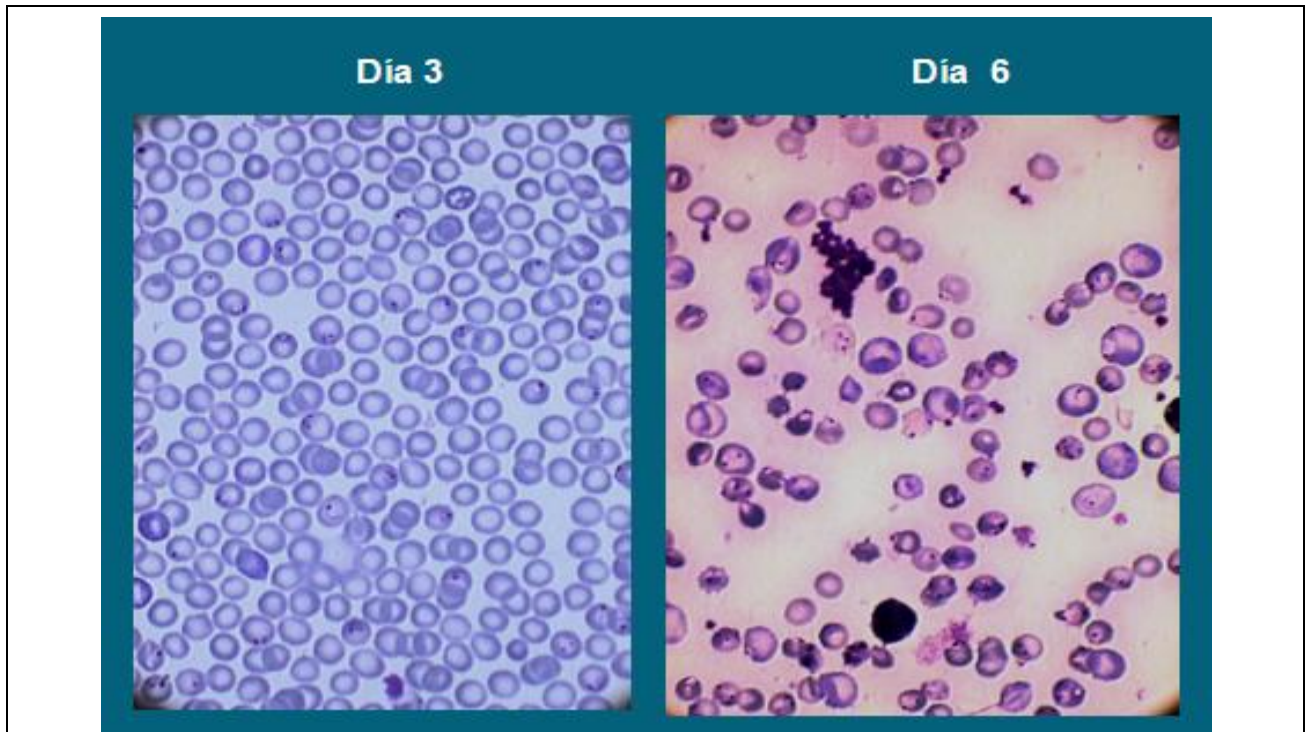


Figura 14. Parasitemia de los ratones infectados.

Diariamente se tomó muestra de sangre periférica para realizar frotis sanguíneos que se fijaron con metanol y se tiñeron con Giemsa. Los eritrocitos parasitados se contaron en relación a la cuenta de eritrocitos totales. En la fotografía de la izquierda se presenta la parasitemia en el día 3 postinfección y en la fotografía de la derecha se muestra la parasitemia del día 6 postinfección. En el día 3, las inclusiones intraeritrocíticas de plasmodium son de predominio anular. Al día 6, los eritrocitos tienen formas aberrantes (Drepanocitosis) y tienden a agruparse. Cortesía del Departamento de Morfología Celular y Molecular, INR.

VII.7. Análisis de ARN mensajero y proteínas.

VII.7.1. Extracción de ARN mensajero.

Los fragmentos de tejido esplénico fueron mantenidos en congelación con solución de preservación para ARN (RNAlater TM; Ambion Corp.) hasta su

procesamiento. Una vez descongelados, se mantuvieron en trizol (Invitrogen Co.) y se dejó a temperatura ambiente para su lisis total con agitación orbital por 10 m. Posteriormente fue procesado de acuerdo con el protocolo del fabricante, hasta obtener el ARN total y rehidratado en agua libre de nucleasas tratado con DEPC (1:1000). **(Anexo 7. Protocolo de extracción de ARN).**

El ARN fue cuantificado y se tomaron 500 ng para RT *in vitro*, usando el sistema de reverso transcripción con MLV-1 (Roche corp.); para la generación de la primera cadena de ADN. **(Anexo 8. Protocolo de extracción de transcripción reversa).**

10 µL del cADN obtenido se empleó para las reacciones de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y su posterior cuantificación por densitometría **(Anexo 9. Protocolo de PCR).**

VII.7.2. Obtención de proteínas totales.

Los fragmentos destinados a la obtención de proteínas totales, se mantuvieron en buffer de lisis para proteínas inhibidor de proteasas (RIPA+ inhibidor de proteasas (Roche, Biolabs). Una vez lisadas por agitación, se cuantificaron y se emplearon para ensayo de WB. **(Ver apéndice XIII.10 y XIII.12).**

VII.8. Análisis histopatológico.

El fragmento del bazo de cada ratón destinado al análisis histológico, fue embebido en TissueTek por 10 minutos y se congeló sobre plataforma de aluminio para realizar cortes en fresco usando un criostato a -20°C (Leica Instruments).

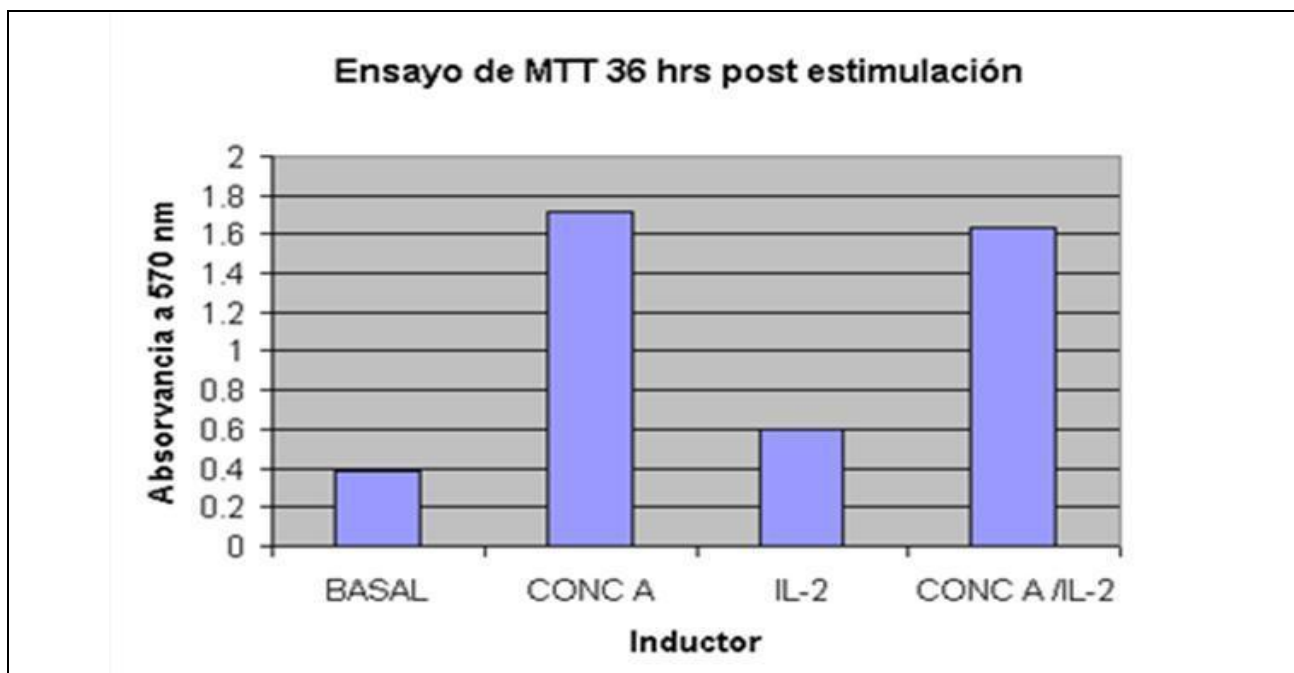
10 cortes en frescos de 10 micras de grosor se montaron en portaobjetos gelatinizados y se llevaron a análisis histológico para microscopia confocal (LSM Meta, Carl Zeiss). Otras laminillas fueron enviadas al departamento de patología del INR para tinción por H&E, así como para descripción y el reporte del análisis histopatológico.

VIII. RESULTADOS

VIII.1. Determinación de las dosis óptima de IL-2 para la inducción de la replicación de linfocitos.

Durante el procedimiento de trasplante, la viabilidad celular es un parámetro vital. Para lograr una mejor eficiencia de transformación, las células infectadas con un retrovirus requieren entrar a fase de replicación celular con el objeto de incorporar el material genético exógeno.

En nuestro caso, este hecho se resolvió con la estimulación de linfocitos con Interleucina 2 recombinante (rIL-2, Sigma Corp.). Por ello, para determinar que concentración de rIL-2 que inducía la mayor proliferación celular. Para lo cual, se emplearon diferentes dosis de 5, 10 y 20 ng de rIL-2/mL de medio, tomando como control a la concanavalina A, que es una excelente inductora de mitosis en linfocitos.



Grafica 2. Estimulación de esplenocitos de ratón con IL-2 a una concentración de 10 ng/ml.

Se determinó que 10 ng/mL de rIL-2 fueron suficientes para estimular la replicación celular adecuada en linfocitos murinos normales de bazo. Este

hallazgo se determino por medio del ensayo de proliferación celular basado en reducción de sales de formazan ó MTT, **(Gráfica 2)**.

VIII.2. Infección de esplenocitos y vectores retrovirales.

En estudios previos, las células linfoides y del sistema hematopoyético han sido transducidas con vectores retrovirales con una eficiencia de infección de aproximadamente el 20% de esplenocitos totales (McMillan et al, 2005).

Con el fin de introducir un gen exógeno de Bcl-2 en esplenocitos totales a los ratones infectados con *P. chabaudi*, se desarrollaron los siguientes plásmidos retrovirales: pCLNRX-GFP y GFP-pCLNRX-Bcl-2, (Figura 9). En ambas construcciones, el cADN del gen reportero GFP, se subclono bajo el control transcripcional del promotor de CMV. En el caso de pCLNRX-GFP-Bcl-2, el cADN de Bcl-2 de rata, fue insertado corriente abajo del promotor de la ADN polimerasa II.

Por lo tanto, Bcl-2 sólo podría expresarse en células en fase de proliferación, mientras que la GFP puede ser expresada constitutivamente incluso en las células quiescentes.

En todos los experimentos se utilizaron partículas retrovirales frescas, para infectar esplenocitos murinos totales, tal y como se describe en el apartado de materiales y métodos.

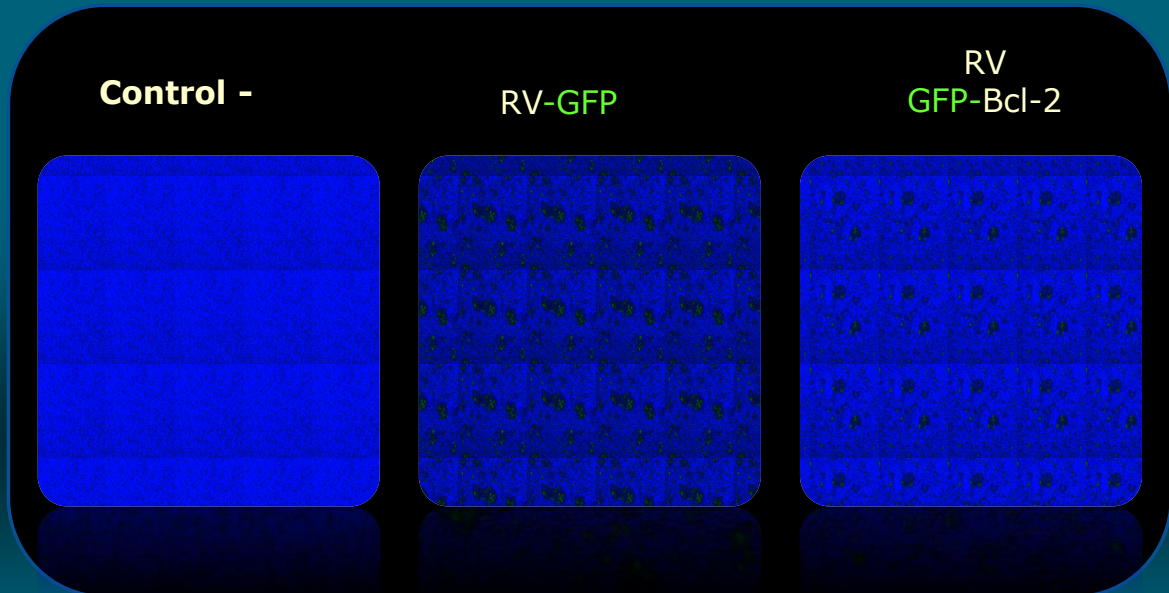
Para detectar la expresión de la GFP, se utilizó microscopía de fluorescencia y se verificó que el protocolo de infección no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad de los esplenocitos **(Figura 15)**.

VIII.2.1. Determinación del MOI óptimo para la infección de linfocitos por RV.

El múltiplo de infección óptimo (MOI) se determinó por dilución seriada de acuerdo al protocolo de rutina establecido en el laboratorio de bioquímica del INCMyNSZ. Aproximadamente 1×10^6 partículas virales/mL se utilizaron en todos los experimentos y se mezclaron con 1×10^6 esplenocitos totales en un volumen de 1 ml manteniendo una relación 1:1 e incubadas en condiciones habituales de cultivo celular y en presencia de μ L-2. Posteriormente, los esplenocitos transducidos y cultivados por 18 hrs fueron trasplantados a los ratones irradiados subletalmente.

Con el fin de evaluar la eficacia de la transducción, se analizaron los controles de la expresión de la GFP a los 24, 48 y 72 horas. **(Figura 16)**.

Eficiencia de RV para la transferencia de genes en linfocitos



MCL-Laser 488, 1.5 AU. 10% Ganancia.
Departamento de Morfología Celular y Molecular.

Figura 15. Eficiencia de infección por retrovirus para linfocitos totales de bazo *in vitro*.

Imagen representativa de esplenocitos de ratón transducidos con ambos vectores virales. La GFP emite una señal luminosa (λ 520 nm) en las células transducidas con la construcción que codifica sólo con GFP a las 24 hrs.

Es importante señalar que la señal de GFP en las células transducidas con la construcción de RV-GFP-Bcl-2 (+/+) siempre fue de menor intensidad en comparación con la construcción que expresaba sólo GFP (RV-GFP), este fenómeno se observó de manera reproducible en todos los experimentos.

A pesar de que los esplenocitos totales provinieron de diferentes donantes la transducción fue reproducible. La eficiencia en la transducción se cuantificó por citometría de flujo para la búsqueda de la proteína reportero GFP a 488 nm. Se observó un rango entre 25-35% de la población total, positiva para GFP (**Figura 17**, histogramas central y derecho).

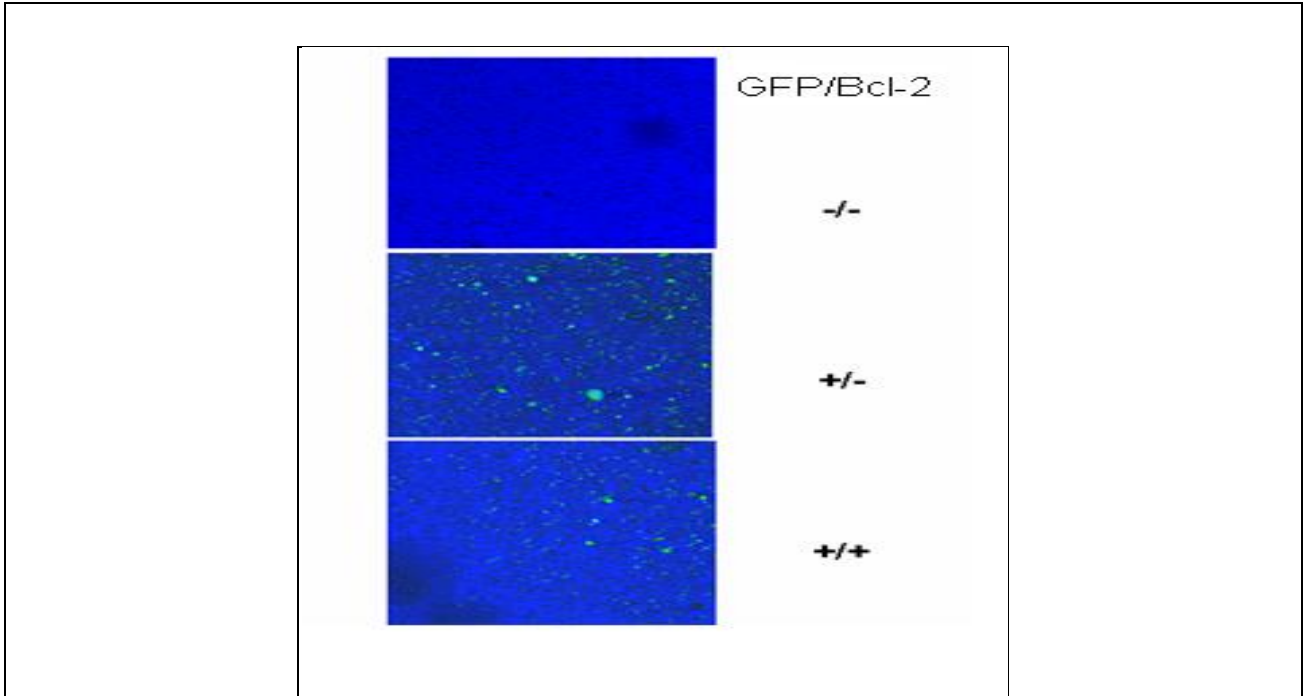


Figura 16.- Intensidad de fluorescencia de los linfocitos infectados con RV-BCL-2 y RV-GFP. Expresión de la GFP en linfocitos infectados después de 72 horas de incubación.

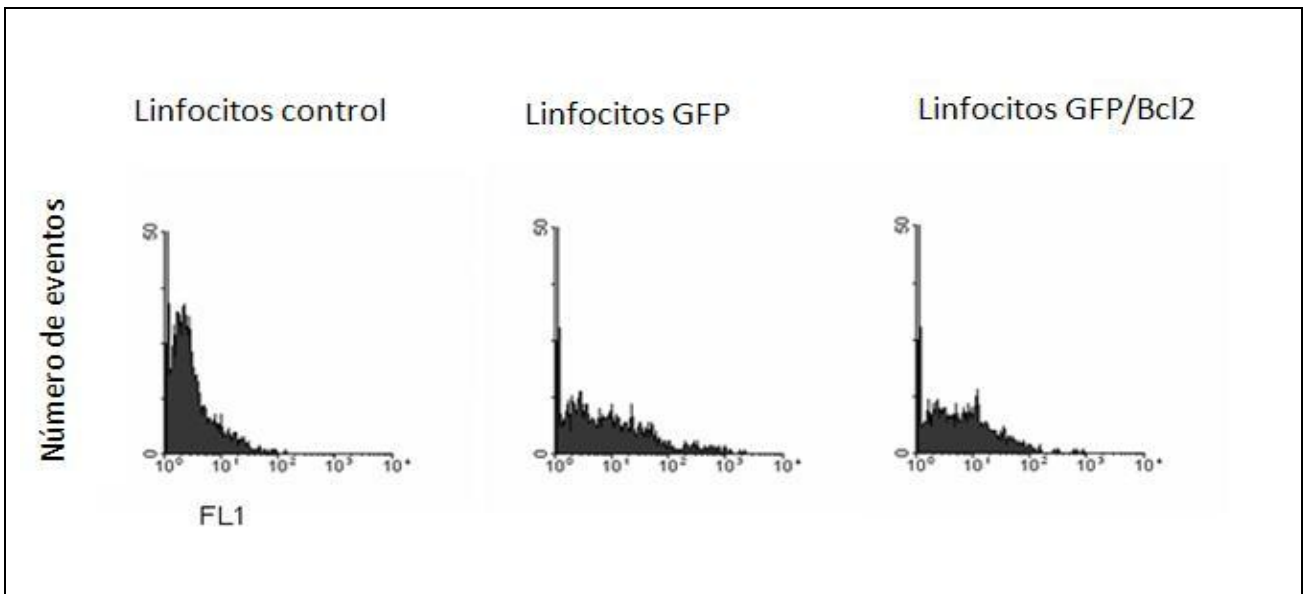


Figura 17. Histogramas de células infectadas con RV-BCL-2 y RV-GFP/Bcl-2. Análisis por citometría de flujo para determinar la eficiencia de transducción de las células transformadas con Rv-GFP y RV-Bcl2, antes de ser trasplantadas a los ratones receptores.

VIII.3. La localización *in situ* de la GFP reveló la colonización del bazo de los ratones receptores por las células trasplantadas.

Para comprobar el sitio de ubicación de las células trasplantadas en el bazo de los ratones receptores, se usó la expresión GFP como un marcador. Siete días después del trasplante y la infección con *P. chabaudi*, los ratones se sacrificaron, se obtuvo el bazo y se hicieron cortes longitudinales del bazo para la búsqueda de la GFP por microscopía de fluorescencia.

Se detectaron grupos de células fluorescentes en el bazo de los ratones trasplantados con células transducidas con Bcl-2; en comparación con los ratones controles no transducidos (-/-) o ratones trasplantados con células transducidas con GFP (+/-). Interesantemente, las células fluorescentes se encontraron a lo largo de la periferia del bazo de los ratones trasplantados con células transducidas con RV-GFP-Bcl-2 (+/+). Estas observaciones demuestran que la colonización de los esplenocitos transducidos con las diferentes construcciones retrovirales se llevó a cabo en los ratones receptores trasplantados con similares eficiencias y la intensidad de la GFP, mantuvo el mismo patrón que en los ensayos *in vitro*.

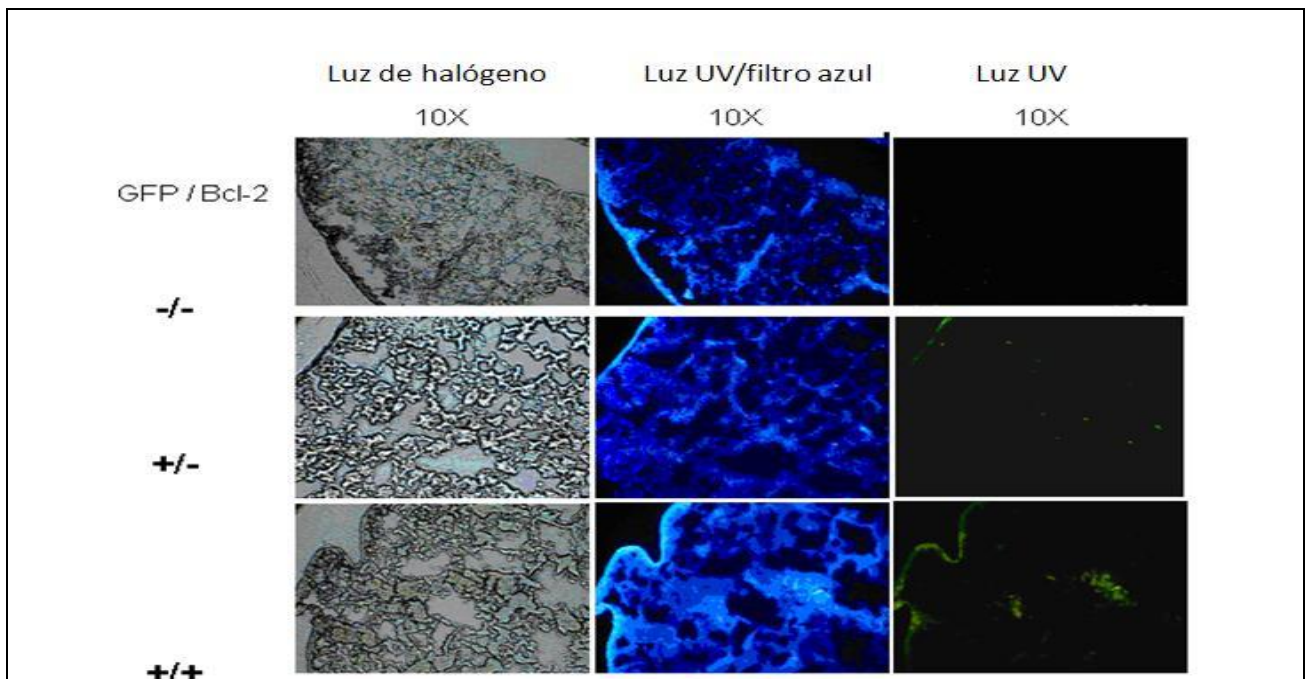


Figura 18. Colocalización de las células trasplantadas en el bazo.

Imágenes que muestran los cortes en fresco de los bazos de animales trasplantados con células transformadas con RV-GFP y RV-GFP/Bcl-2. El Bazo GFP+/Bcl-2+ muestra la fluorescencia de la GFP en agrupaciones y en la periferia. La fluorescencia es mayor en este grupo comparado con los cortes de bazos transducidos solo con Rv-GFP.

VIII.4. La expresión del ARN mensajero Bcl-2 y la proteína en el bazo de los ratones trasplantados.

Para identificar y verificar la expresión del transgen de Bcl-2, en el bazo de los animales trasplantados con células modificadas genéticamente y con los RV, se realizaron los ensayos de RT-PCR y WB a partir de extractos del bazo de los ratones trasplantados.

Fue interesante encontrar que el bazo de los ratones trasplantados con células transducidas con GFP mostraron una mayor cantidad de mRNA de Bcl-2 y la expresión de la proteína (**Figuras 19a**, GFP). La figura **19B** (Bcl-2) muestra la amplificación de Bcl-2 en el bazo de los ratones que se transplantaron con células transducidas con Bcl-2.

El análisis de WB reveló mayor expresión de la proteína Bcl-2 en el bazo de los ratones trasplantados con esplenocitos transducidos con ambas construcciones (**Figura 19, GFP y Bcl-2**). También se observó en los ratones que recibieron los esplenocitos transducidos con GFP, un aumento de 15 veces en la expresión de Bcl-2, en comparación con los ratones que recibieron células sin transducir. Sin embargo, la expresión de Bcl-2 fue mayor (50 veces más) en el bazo de los ratones trasplantados con células transducidas con RV-Bcl-2. (**Figuras 19A y B, Bcl-2**).

Estos resultados confirman la sobreexpresión de Bcl-2 cuando las células son transformadas con retrovirus que codifica para Bcl-2 exógeno en el modelo *in vivo*; Sin embargo, la sola infección retroviral parece ser suficiente para promover la expresión de Bcl-2 endógeno (**Figura 19**).

Esta expresión puede ocurrir en células trasplantadas, pero también es posible que la presencia de la población trasplantada promueva la expresión endógena de Bcl-2 en células de su entorno.

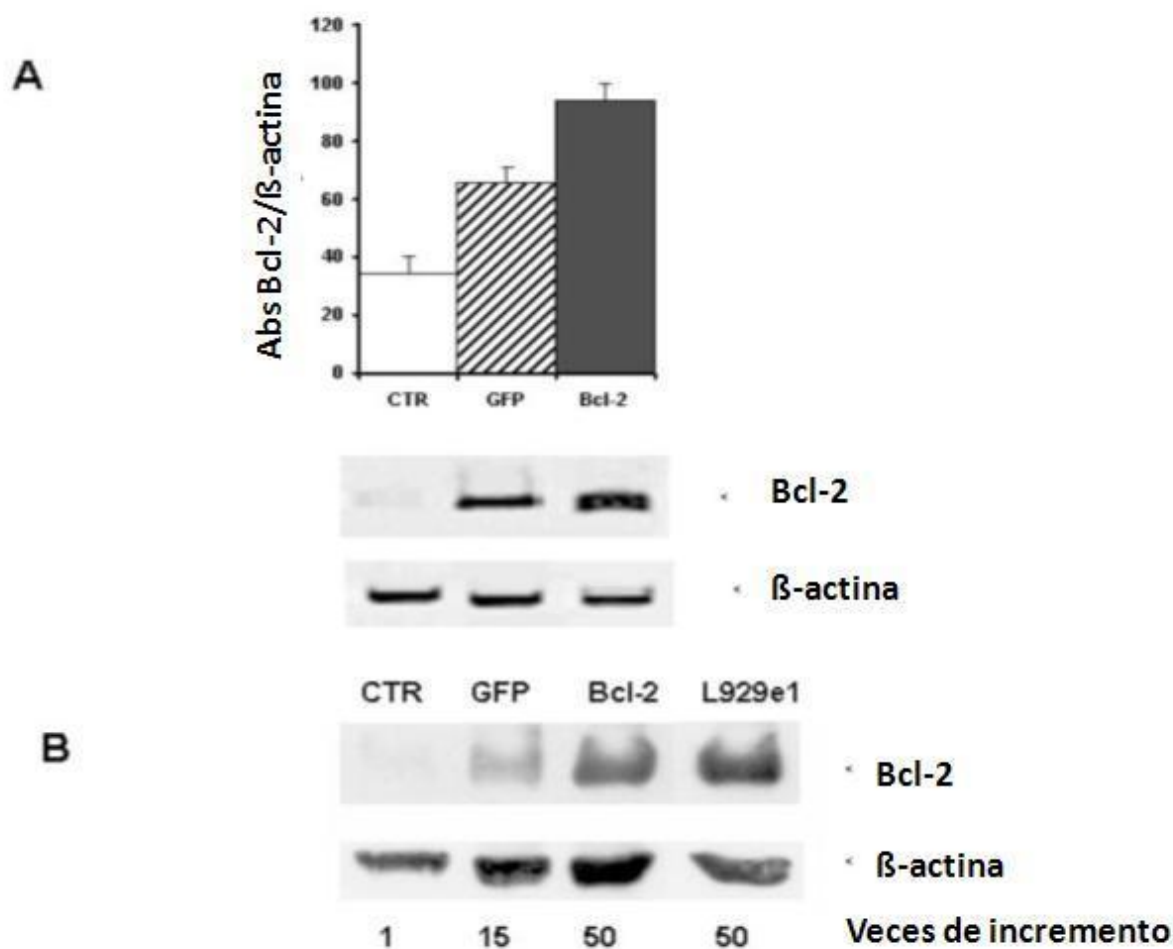


Figura 19. Expresión de mensajero en células transducidas con RV.

La expresión de Bcl-2 a partir de RNA total en células transducidas con RV-GFP, RV-GFP/Bcl-2 fue documentada por RT-PCR y comparada con la expresión constitutiva de β -actina (A). La presencia de la proteína, fue confirmada en el ensayo de WB a partir de proteínas totales (B). La autoradiografía muestra la interacción con el anticuerpo específico para bcl2 y la expresión constitutiva de β -actina. La expresión de bcl-2 fue mayor en las células transformadas con RV-GFP/Bcl-2.

VIII.5. Disminución de la susceptibilidad al estrés oxidativo en las células que expresan Bcl-2, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Como la sobreexpresión de Bcl-2 confiere protección contra una variedad de condiciones estresantes, incluyendo altas concentraciones de H_2O_2 , así como inductores de la apoptosis; analizamos si la sobreexpresión del gen Bcl-2 modificaba la viabilidad de las células de los ratones transplantados cuando éstas se sometieron a estrés por peróxido de hidrógeno.

La prueba de oro para evaluar el efecto de la sobreexpresión de Bcl-2, es la resistencia al estrés oxidativo inducida por peróxido de hidrógeno, por lo que para evaluar la actividad biológica de la sobreexpresión de Bcl-2, las células de bazo transducidas con las partículas retrovirales que contenían las construcciones GFP ó GFP-Bcl-2 se incubaron por 2 hrs en presencia de diferentes concentraciones de H₂O₂ (**Figura 20**).

Los resultados muestran que la infección con las partículas retrovirales incremento la viabilidad en comparación con las células control no transducidas (**Figura 20A**). Sin embargo, esta diferencia fue estadísticamente significativa a una concentración de 4mM de H₂O₂ para GFP, mientras que para Bcl-2 se detectó una diferencia significativa en concentraciones de 2 y 4mM de H₂O₂ con respecto al grupo control (**Figura 20-A**).

Para determinar si este mismo efecto se podía detectar en las células de los ratones receptores subletalmente irradiados en el día 7 postransplante, los ratones reconstituidos con las células transducidas con RV-GFP o bien con RV-GFP-Bcl-2, se sacrificaron, se extrajeron las células de bazo y se incubaron durante 2 horas en presencia de diferentes concentraciones de H₂O₂, los resultados se muestran en la figura 20-B.

Las células de los ratones trasplantados con células transducidas (RV-GFP+ o RV-GFP-Bcl-2+) mostraron mayor viabilidad al estrés con peróxido de hidrógeno. Esta diferencia fue estadísticamente significativa, al comparar la viabilidad de las células control y las que provenían de ratones trasplantados con las células transducidas con los retrovirus GFP-Bcl-2 en todas las concentraciones de H₂O₂ analizadas (1, 2 y 4 mM).

La mayor protección al estrés se detectó a una concentración de 1mM de H₂O₂ y para el caso de las células de ratones que se reconstituyeron con las células transducidas con GFP, solo se detectó diferencia significativa con respecto al control en la concentración de 4mM de H₂O₂ (**Figura 20-B**).

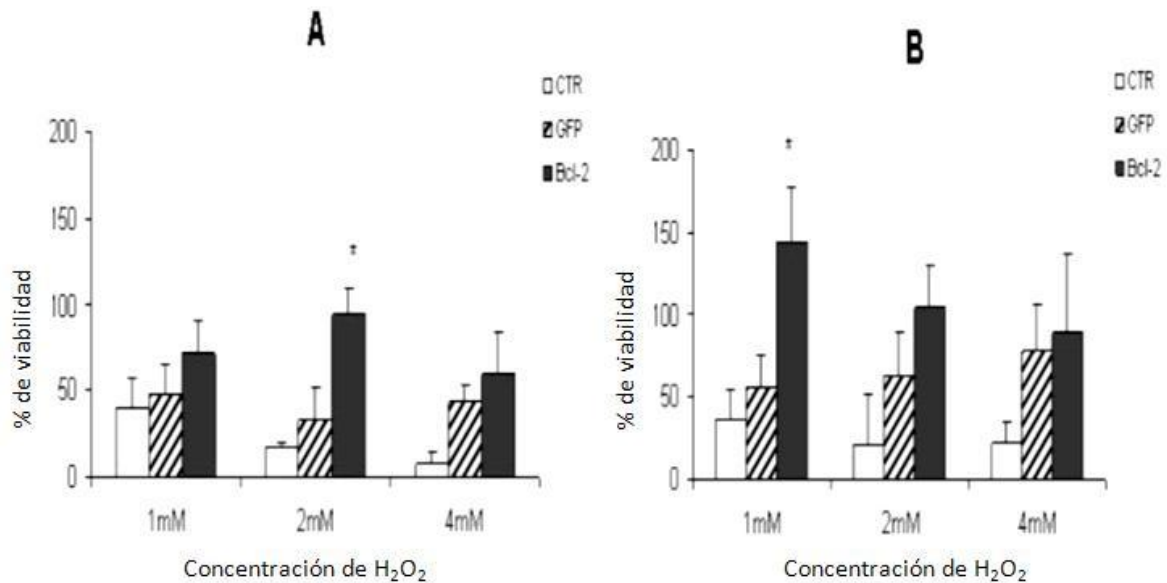


Figura 20. Resistencia a peróxido de hidrógeno de las células transformadas con los retrovirus RV-GFP/Bcl-2 y RV-GFP.

La gráfica A muestra la resistencia a H₂O₂ después de 48 horas de cultivo y 2 horas de incubación. La gráfica B muestra la resistencia a H₂O₂ después de 72 horas. En todos los grupos, la resistencia fue mejor a 1 mM, pero siempre mayor en el grupo de Bcl-2.

Este incremento en la expresión de bcl-2 endógeno no es sorprendente, ya que en condiciones habituales, la infección celular por un virus, causa secuestro de la maquinaria celular para enfocarla a la replicación viral, este mecanismo está mediado por un bloqueo de p53 y un ligero incremento de Bcl-2.

VIII.6. Evaluación histopatológica de los bazos de los ratones trasplantados con células transformadas.

Desde el punto de vista macroscópico, los bazos de los ratones trasplantados con células control sin transformar, mostraron una mayor friabilidad (**Figura 21**). También presentaron mayor cantidad de zonas hemorrágicas en comparación con los bazos de animales trasplantados con células no transformadas.

VIII.6.1. Análisis histológico y morfométrico del bazo.

Todos los bazos de los ratones receptores se analizaron macroscópicamente y microscópicamente. Desde el punto de vista macroscópico, todos presentaron

un incremento en la friabilidad, una disminución de tamaño y múltiples zonas hemorrágicas, pero fue más evidente en los grupos control y GFP.

En el estudio microscópico, la histología del bazo de los ratones trasplantados con esplenocitos normales (**Figura 22-A, Normal**) fue diferente en comparación con el bazo de los ratones no trasplantados (**Figura 22-A, CTRL**). El bazo de los ratones trasplantados con células no transducidas e infectados con *P. chabaudi* reveló una marcada reducción de la celularidad (**Figura 22-C, CTRL**), cerca de 40% con respecto a los bazos los animales no trasplantados.

De acuerdo al reporte de patología, más del 90% de estas células fueron inmunoblastos (**Gráfica 3, barras rojas**) que se localizaron en el compartimento linfoide, además de mostrar una proporción de pulpa roja:blanca fue de 1:3 en el bazo de los ratones trasplantados con células no transducidas comparados contra una relación 1:5 en condiciones normales de bazos no trasplantados (**Figura 22A, Normal y Control**).

También se observaron en los bazos de los ratones trasplantados con esplenocitos no transformados, depósitos de hemosiderina y detritus. En el grupo de los bazos trasplantados con RV-GFP+, el total de la población de células linfoides en el compartimento fue de un 53%, comparado con el normal (**Gráfica 3**).

Las células más abundantes fueron los inmunoblastos (90% de las células cuantificadas por morfometría), y una pequeña población de macrófagos. También, se encontraron cuerpos apoptóticos y figuras mitóticas distribuidos al azar. Además, la pulpa roja se incrementó con un gran número de células parasitadas; así como de macrófagos con hemosiderina (datos no mostrados). La proporción de pulpa roja:blanca fue de 2:1.

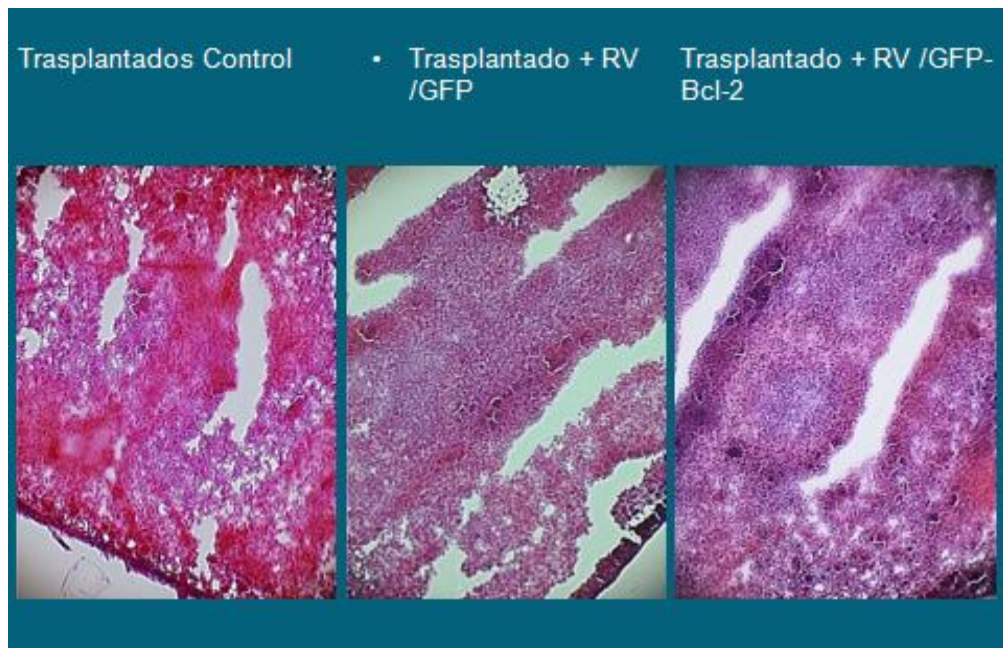


Figura 21. Microfotografías del aspecto macroscópico de los bazo teñidos con H&E.

Notese la friabilidad de los mismos y el aspecto hemorrágico del bazo control comparado con el de los ratones trasplantados con esplenocitos modificados genéticamente. Se aprecia una menor friabilidad y un aspecto morfológico más organizado en el bazo de ratones trasplantados con RV-GFP/BCL2.

En el caso de los ratones trasplantados con células transducidas con RV-Bcl-2 e infectados con *P. chabaudi* (**Figura 22-A, Bcl-2**) se encontró un incremento de la celularidad; 77% en comparación con el bazo normal (**Gráfica 3, Bcl-2**).

Es importante indicar que los bazo de este grupo, mostraron la presencia de una nueva población de células caracterizadas por un tamaño pequeño, con núcleo central definido y redondo (**Figura 22 y gráfica 3**).

El análisis morfométrico, mostró que esta nueva población, representa el 30% de los esplenocitos totales, mientras que los inmunoblastos y macrófagos comprenden el 66% y el 4%, respectivamente. Sin embargo, como se observa en la **gráfica 3**, el número de macrófagos e inmunoblastos, fue muy similar en los tres grupos infectados con *P. chabaudi* (CTR, GFP y Bcl-2). Combinada con otros tipos de células en el compartimento linfoide, representó menos del 1% de la población total. La proporción de pulpa blanca: roja fue similar a la observada en el grupo de GFP+ (2:1).

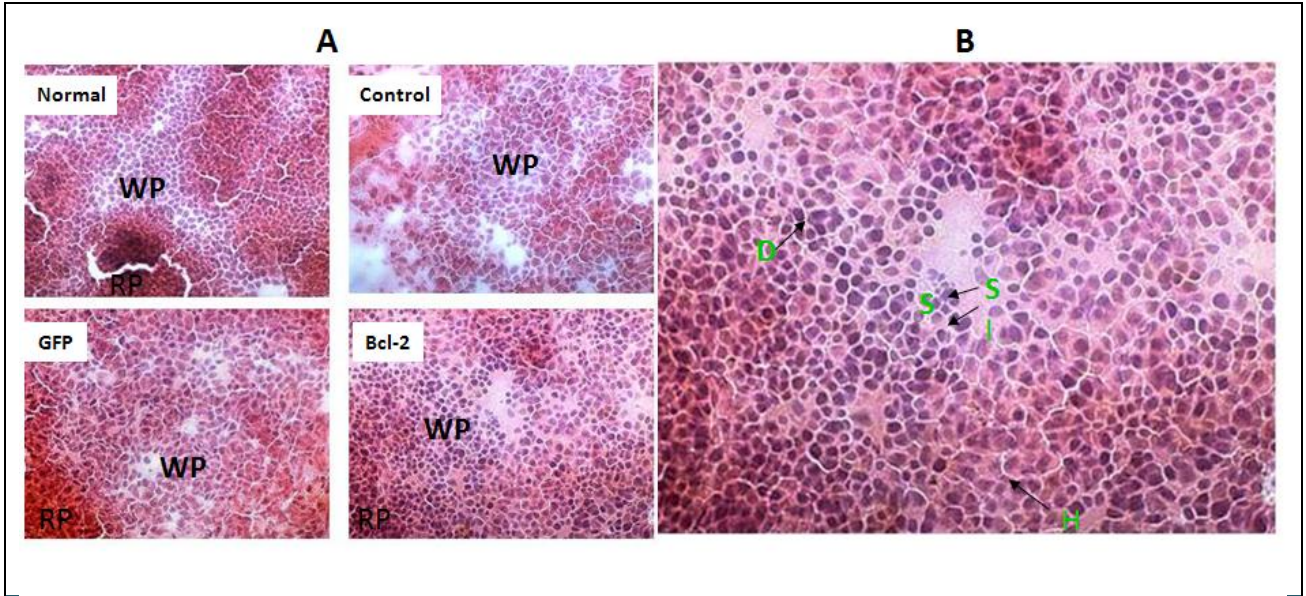


Figura 22. Histología del bazo de ratones infectados con *P. chabaudi* y trasplantados con células modificadas genéticamente.

Microfotografías del análisis histopatológico de los bazos de ratones teñidos con H&E. Se observó una mejor organización histológica en los bazos de ratones trasplantados con esplenocitos RV-Bcl-2+ (A). Destaca la presencia de una población de células pequeñas y la aparición de vasos sanguíneos en el grupo de bazos RV-Bcl-2+ (B).



Gráfica 3. Análisis morfométrico de la población celular de los bazos de ratones infectados con *p. chabaudi* y trasplantados con células modificadas genéticamente. Resalta la aparición de una población de células pequeñas (columna roja) que no se encuentra en los otros grupos. Esta población se caracterizó por núcleos redondos y de aspecto metabólico activo.

VIII.7. El trasplante de células transducidas a los animales infectados con *P. chabaudi*, reduce la parasitemia.

Durante la infección por *P. chabaudi*, se han descrito mecanismos inmunológicos implicados en la destrucción de los eritrocitos infectados, que incluyen a los macrófagos activados del bazo, la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos, la activación del sistema de complemento, etc (99,100).

Además, se han descrito alteraciones en los mecanismos de regulación de la respuesta inmune que conducen a la inmunosupresión misma que podría explicarse con la activación de la apoptosis de los linfocitos. Este fenómeno ya se ha descrito en la malaria por otros autores (101), así como en otras parasitosis como las producidas por *Leishmania sp* y por *Schistosoma sp* (102, 103).

La parasitemia fue evaluada diariamente a partir del día 4 y hasta el día 7 después de la infección con *Plasmodium chabaudi*. Los niveles de la parasitemia aumentaron de manera gradual en los tres grupos

Sin embargo, en el día 5 post-infección, los ratones trasplantados con los esplenocitos transducidos con ambos RV's, mostraron una disminución transitoria en la parasitemia de hasta 10 veces (cuadrados y triángulos sólidos, $p < 0,01$) en relación al grupo control (Figura 23).

Además, los ratones trasplantados con células transducidas con Bcl-2 (triángulos sólidos, $p < 0,05$), mostraron un nivel de la parasitemia significativamente menor en comparación con los ratones trasplantados con células transducidas con GFP (cuadrados sólidos). Sin embargo, en el día 6, el efecto protector de la sobre expresión del gen Bcl-2 se ha perdido.

Llegamos a la conclusión de que la transducción retroviral confiere una protección transitoria, que se fortaleció con la expresión adicional de Bcl-2.

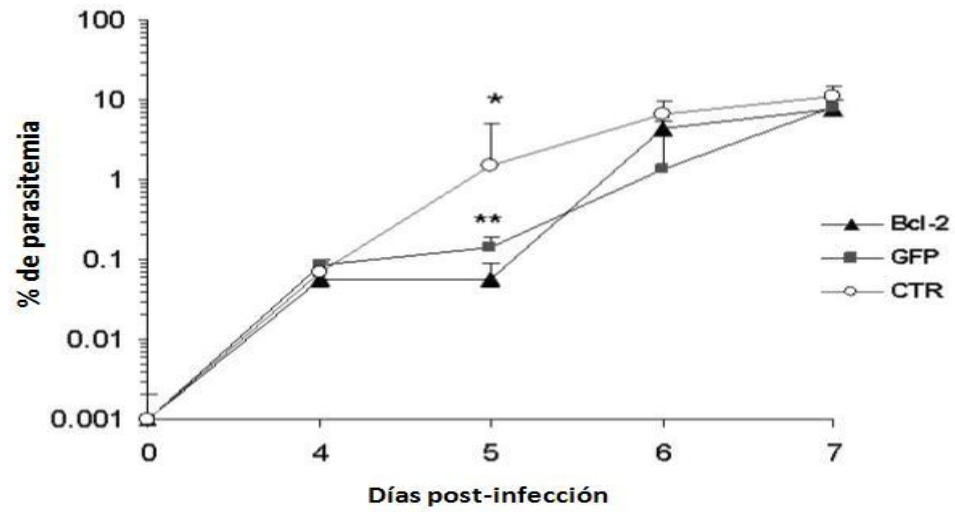


Figura 23. Evolución de la parasitemia en los tres grupos de ratones.

La figura esquematiza la evolución de la parasitemia y su retraso en el día 5 en los grupos tratados con RV-GFP y RV GFP/Bcl-2. Sin embargo, la parasitemia retoma su curso después del día 6.

IX. DISCUSIÓN

El uso de vectores virales para la terapia génica se ha centrado en un intento por la corrección de alteraciones genéticas asociadas al cáncer, a las enfermedades metabólicas o a las monogénicas hereditarias (Bartsch et al, 2007; Bilbao et al., 1999; Gómez-Navarro y Curiel, 2000; Grompe et al, 1995; y Muul Candotti, 2007).

De acuerdo con el último reporte de la Sociedad Europea de Terapia Génica y Celular (ESGCT 2010), el foro más antiguo y reconocido en el mundo en su género, destaca por su aparición, desde hace 5 años, el uso de las estrategias de terapia génica mediadas por virus para el posible tratamiento de las enfermedades infecciosas tales como Síndrome de inmunodeficiencia por HIV, tuberculosis, leishmaniasis y esquistosomiasis (104, 105, 106, 107).

En este trabajo, se diseñó un sistema de terapia génica para un modelo experimental de malaria murina que utilizó los métodos convencionales para introducir de manera exógena el cDNA de Bcl-2 en esplenocitos murinos, con el objeto de interferir en la apoptosis de los mismos, en ratones singénicos CBA/Ca infectados con *P. chabaudi* AS, con el fin de estudiar una posible aplicación e intervención terapéutica.

Se ha demostrado que los vectores RV's son las herramientas más eficientes para lograr una expresión constante y permanente del transgen en las células hematopoyéticas (107, 108). En el modelo utilizado, a pesar del porcentaje relativamente pequeño de células transducidas con los vectores RV que repoblaron el bazo de los ratones irradiados (receptores), su presencia parece ser suficiente para inducir efectos biológicos contra *Plasmodium*.

Al igual que otros estudios descritos anteriormente (Del Vecchio et al, 2001; Kinyanjui et al, 2006; McMillin et al, 2005), en donde se han utilizado vectores virales para la transferencia de genes, se encontró el problema de lograr una infección lo suficientemente eficiente como para obtener una respuesta biológica robusta (Figura 16 y 17) y de expresión permanente. Por lo anterior, se intentó aumentar la eficiencia de la infección utilizando diferentes estrategias:

- i) la identificación del momento óptimo de cosecha de las partículas virales.
- ii) el empleo de métodos de concentración y conjugación de partículas RV con diferentes reactivos, como el bromuro de

hexadimetrina (Polibreno) o 6-sulfato de condroitina (Cepko, 2001; Del Vecchio et al, 2001; McMillin et al., 2005).

- iii) el uso de una variedad de protocolos de re-infección y, finalmente,
- iv) la estimulación de la replicación celular de la población transducida con factores de crecimiento como la rIL-2.

La combinación óptima de todas estas variables en el diseño experimental permitió lograr una eficiencia de transducción de aproximadamente 30%, (Figura 17).

El protocolo para la reconstitución más frecuente en modelos experimentales de trasplante de esplenocitos utiliza el total de la población, debido a que se cree que se requiere de las interacciones entre las distintas poblaciones celulares para la generación de una respuesta inmune adecuada (Legorreta-Herrera et al., 1993). Por lo anterior, se trasplantaron esplenocitos totales después de la infección *in vitro*.

Los intentos preliminares de caracterizar las células transducidas sugieren que se incluyen células B220+, una minoría de células CD3 + y otras células negativas de estas señales. Si bien es posible que la repoblación esplénica con células no transducidas, puede contribuir a los efectos protectores observados.

A pesar del bajo número de células transducidas utilizadas en el trasplante, fue posible identificar a las células GFP+ en el bazo de los ratones trasplantados a las 48 horas y hasta 7 días después del trasplante (Figura 18). Es importante indicar que la infección con los retrovirus que solo tenían al gen reportero (pRV-GFP), incrementó la expresión de Bcl-2 endógeno *in vivo* 7 días post-trasplante (Figuras 19A y 19B).

Teniendo en cuenta que sólo un pequeño número de células positivas a GFP estuvieron presentes en el día 7 post-trasplante, es posible que la presencia tanto del ARNm como de la proteína Bcl-2 se debe a las células residentes no transducidas pero que modificaron su expresión en presencia de células transformadas

Es posible que la transducción con el RV-Bcl-2 confiera un aumento de la supervivencia en las células blanco, y más aún, que podría influir en la mejoría del resto de los esplenocitos.

Los datos obtenidos también confieren elementos que sugieren que las células transducidas influyen en el microambiente esplénico posiblemente a través de la

secreción de factores parácrinos, tal como se ha observado en la migración y adhesión de las células troncales que sobreexpresan bcl-2 implantadas en epitelios o mesenquima como odontoblastos o cardiomioblastos (109, 110). Alternativamente, la presencia de las células transducidas puede activar una respuesta biológica en el resto de la población de esplenocitos y protegerlos del estrés celular, tal como se ha demostrado en células troncales sometidos a hipoxia, donde se ha observado una diferenciación sinérgica inducida con la eritropoyetina y el factor estimulador de granulocitos y macrófagos endógenos (GM-CSF) (111).

En cualquier caso, es un hecho que la expresión transgénica de Bcl-2 contribuye a la protección *in vitro* contra el H₂O₂, así como la disminución de la parasitemia observada *in vivo* (Figura 19) en los animales trasplantados con esplenocitos RV-BCL-2+.

En cambio, la morfología y citoarquitectura del bazo, se conservaron mejor únicamente en los ratones infectados con *Plasmodium chabaudi* AS y trasplantados con células transducidas con RV-Bcl-2. Este efecto se apreció macroscópicamente como: 1) una menor friabilidad del órgano; 2) menor cantidad de zonas hemorrágicas y, 3) la preservación de la proporción de pulpa blanca en comparación con el bazo normal.

En el modelo estudiado, el daño esplénico durante la infección por *Plasmodium* muestra una marcada reducción de la celularidad en el grupo control en comparación con los otros tres grupos; probablemente, a pesar de la esplenomegalia y el menor número de células, que puede ser debido a mayor edema intersticial y al incremento de detritus intraesplénica, así como a una reducción de células vivas.

El aumento de la friabilidad esplénica se observa comúnmente durante la progresión de la malaria, pudiendo en algún momento complicarse con una ruptura esplénica. Este evento ocurre como consecuencia de la eliminación de los eritrocitos parasitados por el bazo (112). Sin embargo, el procedimiento de la radiación utilizado para promover el implante celular en este modelo animal podría tener un efecto negativo sobre la integridad esplénica. Estos factores podrían explicar el aumento de friabilidad del bazo en los diferentes grupos de ratones estudiados.

Adicionalmente, la marcada reducción de la friabilidad esplénica observada sólo en los ratones trasplantados con células transducidas con Bcl-2, se correlaciona con los incrementos en la sobreexpresión de la proteína Bcl-2 exógena (Figura 20).

Resulta interesante la emergencia de una nueva población de células representadas principalmente por las células con morfología similar a los linfocitos maduros. Un análisis más detallado con marcadores antigénicos de superficie podría definir mejor esta población (Figura 22, Bcl-2, magnificada en la Figura 22B), para así identificar los componentes celulares que modifican la población celular. Recientemente este fenómeno de reclutamiento celular ha sido descrito también por Giusti IP y cols (2011), encontrando células dentríticas en un modelo de malaria (119).

Recientemente, Hanson *et al* (2009) reportaron que el aumento de los niveles intracelulares de Bcl-2 confiere un efecto biológico apoptótico o antiapoptótico, que depende del tipo de promotor utilizado para expresar Bcl-2. En este estudio, la expresión exógena de Bcl-2 está dirigida por el promotor de Pol-II, por lo que la expresión de Bcl-2, se limita sólo a células en fase de duplicación.

Cabe señalar que la expresión de Bcl-2, endógeno se incrementa en los ratones RV-GFP+. Por consiguiente, en el grupo de ratones RV-Bcl-2+, un efecto aditivo de Bcl-2 endógeno y exógeno podría ser postulado.

Estas observaciones y hallazgos en conjunto, sugieren que un pequeño número de esplenocitos modificados genéticamente tienen efectos biológicos importantes, probablemente debido a que promueven el reclutamiento de las células normales o de otros órganos linfoides como las placas de Peyer, ganglios linfáticos o incluso de la médula ósea, por la secreción sostenida de estímulos pro-inflamatorios o quimiotácticos (IL4, IL10, FasL, TNF, Leukotrienos) (112,119), o la activación de señales de transducción de factores de crecimiento hematopoyéticos (GM-CSF, eritropoetina), o incluso péptidos con actividad específica u hormonas (Tiroxina, hormona de crecimiento, o testosterona)(113). En este sentido, la malaria ofrece un modelo interesante en la que el bazo juega un papel central en la destrucción de los eritrocitos parasitados (112).

En resumen, el efecto biológico de un pequeño número de células que expresan Bcl-2 recombinante y que preservan la morfología y la citoarquitectura esplénica, podría interpretarse a favor de la supervivencia y la maduración de las células contiguas. Un efecto similar se ha informado anteriormente en un modelo de células endoteliales, en el cual las células madre de cordón umbilical adquieren características epiteliales y migran cuando se encuentra una sobreexpresión de Bcl-2 (Enis *et al*, 2008).

El efecto biológico más dramático de esta sobreexpresión, se observa con la disminución de la parasitemia en el día 5, el cual fue 10 veces menor, lo que

traduce una respuesta de protección contra el parásito, a pesar del pequeño número de células trasplantadas y transducidas con los vectores retrovirales.

Sin embargo, no queda clara la causa del porqué la protección es transitoria. Si bien la terapia génica se basa en la premisa de la introducción de un cADN para compensar deficiencias endógenas, se encontró que en el caso de la malaria experimental murina, la presencia de esplenocitos transducidos con el vector retroviral vacío tiene un efecto protector significativo tanto *in vitro* como *in vivo*.

En conjunto, los hallazgos encontrados sugieren que el procedimiento de la transducción con el vector RV es suficiente para inducir una disminución transitoria de la parasitemia, una arquitectura más conservada del bazo, menor friabilidad y rearrreglos de la población celular del bazo.

X. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Si bien el presente modelo no representa una estrategia terapéutica con impacto clínico, permite inferir que, a pesar del efecto biológico menor que se observa en los animales trasplantados con células modificadas genéticamente, la expresión del gen exógeno (Bcl-2) pudiera tener efecto sobre algunas vías de crecimiento y proliferación celular, como los que se han descrito en células epiteliales troncales mesenquimales; y mas aún esta puede estar implicada en varios eventos asociados a una infección por plasmodium como por ejemplo:

1. La hipoxia tisular, inducida por la anemia severa característica de la malaria.
2. El incremento de factores de crecimiento y citocinas que intenten restaurar esta asociación y que reclutan o movilizan otras células circulantes tales como monocitos o células dendríticas (113,119),
3. La activación de vías de proliferación celular hematopoiéticas, incluyendo la estimulación de células troncales hematopoyéticas (112, 113); y por último,
4. La posible activación de vías angiogénicas, como respuesta secundaria a la hipoxia celular observada en otros modelos (114).

Adicionalmente, los cambios en la citoarquitectura del bazo, tales como la mejor preservación, la posible aparición de nuevos vasos sanguíneos, y la reducción marcada del edema; pueden ser consecuencia de la activación de angiogénesis por Bcl-2 (114) como se ha descrito en otros modelos de diferenciación y de metástasis celular. Este fenómeno también se ha reportado en células troncales de cordón, en donde también pudiera existir una posible interacción con las vías de diferenciación celular y mecanismo angiogénicos (115). En todo caso, la aceleración de la reconstitución de linfocitos con la sobreexpresión de bcl-2, ha sido descrita por Uchida y cols, 2011 (117).

Recientemente, Mandoki y cols, 2011 (119) ha postulado que el efecto y la respuesta de algunas hormonas manifiestan efectos pleiotrópicos, que solo pueden ser explicados como resultado de la interacción de factores presentes en el contexto fisiológico o fisopatológico, lo cual ha sido observado en fenómenos oncológicos que modifican la apoptosis y la utofagia (120).

En conclusión, los hallazgos en este proyecto, se pueden interpretar como el resultado de la interacción de un conjunto de factores que modulan el efecto pleiotrópico de Bcl-2 (exógeno y endógeno), que dependen de la regulación genética, la activación de factores mitogénicos de la estirpe linfoide o hematopoyético, así como la presencia de factores de crecimiento, además del contexto fisiológico y la evolución propia de la enfermedad.

Por último, el ligero retraso de la parasitemia observado en el grupo experimental es significativo en el día 5. Este evento, traducido a la medicina clínica humana, pudiera representar un periodo de tiempo más largo de evolución, lo que permitiría una ganancia de tiempo, para una mejor atención oportuna del paciente.

En perspectiva, se puede realizar un estudio similar, explorando el uso de un vector que permita la expresión temporal con un Ad o VAA. Este esquema tendría la ventaja de abatir la posible integración al genoma, ya que estos vectores son de localización episomal. Como consecuencia, también permitiría descartar la presencia de un factor oncogénico por inserción en algún sitio frágil del genoma de las células huésped (117).

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Hommel M. Morphology, biology and life-cycle of *Plasmodium* parasites. *Bull Acad Natl Med.* 2007; 191 (7): 1235-45.
2. Harrison's Principles of internal medicine. Tinsley Harrison. 17th edit. MCGraw Hill. 2005.
3. World Malaria Report 2009. World Health Organization. WHO Library.
4. Henry-Rodriguez M, Ulloa-García A, Ramsey-willoquet JM. Manual para la vigilancia y el control del paludismo en Mesoamerica. Primera edición. Instituto nacional de salud pública, México; 2008.
5. Danis LR, Rodríguez MH, Betanzos RA, Hernández AJ, González CL, Méndez GJ, Velázquez MO, Tapia CR. Individual risk factors for *Plasmodium vivax* infection in the residual malaria transmission focus of Oaxaca, Mexico. *Salud Pública de Mexico* 2007; 49: 199-209.
6. Guerra CA, Howes RE, Patil AP, Gething PW, Van Boeckel TP, Temperley WH, Kabaria CW, Tatem AJ, Manh BH, Elyazar IR, Bair JK, Snow RW, Hay SI. The International Limits and Population at Risk of *Plasmodium vivax* Transmission in 2009. *Plos Negl Trop Dis* 2010; 4(8): e774.
7. Hay SI, Okiro EA, Gething PW, Patil AP, Tatem AJ, Guerra CA, Snow RW. Estimating the Global Clinical Burden of *Plasmodium falciparum* Malaria in 2007. *Plos Med* 2010; 7(6):e1000290.
8. Gemma S, Travagli V, Savini L, Novellino E, Campiani G, Butini S. Malaria Chemotherapy: Recent Advances in drug development. *Recent pat Antiinfect Drug Discov* 2010.
9. Vogel G. New Map Illustrates Risk From the 'Other' Malaria. 2010. *Science* 2010; 329(5992).
10. Provost S, Gagnon S, Lonergan G, Bui YG, Labbé AC. Hepatitis A, Typhoid and Malaria Among Travelers—Surveillance Data From Québec (Canada). *Journal of Travel Medicine* 2010; 13(4): 219–226.
11. Shaukat AM, Breman JG, McKenzie FE. Using the entomological inoculation rate to assess the impact of vector control on malaria parasite transmission and elimination. *Malar J.* 2010, 12(9):122.
12. Connor SJ, Ceccato P, Dinku T, Omumbo J, Grover-Kopec EK, Thomson MC. Using climate information for improved health in Africa: relevance, constraints and opportunities. *Geospat Health.* 2006 Nov;1(1):17-31.
13. Saugeon C, Baldet T, Akogbeto M, Henry MC. Will climate and demography have a major impact on malaria in sub-Saharan Africa in the next 20 years?. *Med Trop (Mars).* 2009 Apr;69(2):203-7.
14. Rodríguez MH, Gonzalez CL, Hernández JE, Nettel JA, Villarreal C, Kain KC and Wirtz RA. Different prevalences of *Plasmodium vivax* phenotypes VK210 and VK247 associated with the distribution of *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis* in Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg;* 2000 62(1): 122–127.
15. Contreras-Ochoa C, Ramsey JM. *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* gametocyte stages are neglected in vaccine development. *Sal Pub Mex.* 2004, 46 (1):64-70.
16. Arnot DE, Ronander E, Bengtsson DC. The progression of the intra-erythrocytic cell cycle of *Plasmodium falciparum* and the role of the centriolar plaques in asynchronous mitotic division during schizogony. *Int J Parasitol.* 2011, 41 (1): 71-80.
17. Wu X, Gowda NM, Gowda DC. *Plasmodium falciparum*: Differential merozoite dose requirements for maximal production of various inflammatory cytokines. *Exp. Parasitol.* 2011; 127: 202–207.
18. Hansen DS, Schofield L. Natural regulatory T cells in malaria: host or parasite allies?. *Plos*

- Pathogens* 2010; 6(4),1-9.
19. Haldar K, Mohandas N. Malaria, erythrocytic infection, and anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009: 87-93.
 20. Han C, Lin Y, Shan G, Zhang Z, Sun X, Wang Z, Wei C, Deng Y, Zhang L, Bu L, Shao D, Wang H. Plasma concentration of malaria parasite derived MIF in uncomplicated malaria patient correlates with parasitemia and disease severity. *Clin Vaccine Immunol* 2010; 10.1128/CVI.00149-10v1.
 21. Crawley J, Chu C, Mtove G, Nosten F. Malaria in children. *Lancet* 2010;375 (9724):1468-81.
 22. Sulistyaningsih E, Fitri LE, Löscher T, and Berens-Riha N. 2010. Diagnostic Difficulties with *Plasmodium knowlesi* Infection in Humans. *Emerging Infectious Diseases* 2010; 16(16):1033-4.
 23. Franke-Fayard B, Fonager J, Braks A, Khan SM, Janse CJ. Sequestration and tissue accumulation of human malaria parasites: can we learn anything from rodent models of malaria. *PLoS Pathog*. 2010, 6(9). pii: e1001032.
 24. Doumbo OK, Thera MA, Koné AK, Raza A, Tempest LJ, Lyke KE, Plowe CV, Rowe JA. High levels of *Plasmodium falciparum* rosetting in all clinical forms of severe malaria in African children. *J Trop Med Hyg*. 2009 81 (6):987-93.
 25. Rowe JA, Claessens A, Corrigan RA, Arman M. Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Expert Rev Mol Med*. 2009;11:16.
 26. Sequence variation of PfEMP1-DBLalpha in association with rosette formation in *Plasmodium falciparum* isolates causing severe and uncomplicated malaria. *Malar J*. 2009 Aug 4;8:184.
 27. Kirchgatter K, Del Portillo HA. Clinical and molecular aspects of severe malaria. *An Acad Bras Cienc*. 2005;77(3):455-75.
 28. Shingadia D, Ladhani S. UK treatment of malaria. *Arch Dis Child Educ Pract Ed*. 2010 Oct 13.
 29. Ladhani S, Aibara RJ, Riordan FA, Shingadia D. Imported malaria in children: a review of clinical studies. *Lancet Infect Dis*. 2007; 7(5):349-57.
 30. Perandin F, Mancan, Calderaro A, Galati L, Ricci R, Medici MC. Development of a Real-Time PCR Assay for Detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for Routine Clinical Diagnosis *J Clin microbiol* 2004, 42 (3), 1214-1219.
 31. Zakeri S, Kakar Q, Ghasemi F, Raeisi A, Butt W, Safi N, Afsharpad M, Memon MS, Gholizadeh S, Salehi M, Atta H, Zamani G, Djadid ND. Detection of mixed *Plasmodium falciparum* & *P. vivax* infections by nested-PCR in Pakistan, Iran & Afghanistan. *Indian J Med Res*. 2010 132:31-5.
 32. Goodman A, Gilman A. Las bases moleculares de la tereputica. 10 edición. Edit Mc. Graw hill. México. Wellems TE, Plowe CV. Chloroquine-resistant malaria. *J Infect Dis*. 2001,184(6):770-6.
 33. Barnes KI, White NJ. Population biology and antimalarial resistance: The transmission of antimalarial drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Acta Trop*. 2005 Jun;94(3):230-40.
 34. Krudsood S, Imwong M, Wilairatana P, Pukrittayakamee S, Nonprasert A, Snounou G, White NJ, Looareesuwan S. Artesunate-dapsone-proguanil treatment of *falciparum* malaria: genotypic determinants of therapeutic response. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2005 Feb;99(2):142-9.
 35. Vigan-Womas I, Lokossou A, Guillotte M, Juillerat A, Bentley G, Garcia A, Mercereau-Puijalon O, Migot-Nabias F. The humoral response to *Plasmodium falciparum* VarO rosetting variant and its association with protection against malaria in Beninese children. *Malar J*. 2010; 9(1):267.
 36. Mukherjee P, Devi YS, Chauhan VS. Blood stage malaria antigens induce different activation-induced cell death programs in splenic CD4+T cells. *Parasite Immunol*. 2008, 30(10):497-514.

37. Kemp K, Akanmori BD, Adabayeri V, Goka BQ, Kurtzhals JA, Behr C, Hviid L. Cytokine production and apoptosis among T cells from patients under treatment for *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Exp Immunol*. 2002;127(1):151-7.
38. Holmlund U, Amoudruz P, Johansson MA, Haileselassie Y, Ongoiba A, Kayentao K, Traoré B, Doumbo S, Schollin J, Doumbo O, Montgomery SM, Sverremark-Ekström E. Maternal country of origin, breast milk characteristics and potential influences on immunity in offspring. *Clin Exp Immunol*. 2010 doi: 10.1111/j.1365-2249.
39. López C, Savaria C, Gomez A, Hoebeke J, Patarroyo MA. Mechanisms of genetically-based resistance to malaria. *Gene* 2010.
40. Roberts DJ, Williams TN. Haemoglobinopathies and resistance to malaria. *Redox Rep*. 2003;8(5):304-10.
41. Hebbel RP. Sick cell hemoglobin instability: a mechanism for malarial protection. *Redox Rep*. 2003;8(5):238-40.
42. Langhi DM Jr, Bordin JO. Duffy blood group and malaria. *Hematology*. 2006 Oct;11(5):389-98.
43. Rowe JA, Opi DH, Williams TN. Blood groups and malaria: fresh insights into pathogenesis and identification of targets for intervention. *Curr Opin Hematol*. 2009 Nov;16(6):480-7.
44. Guiguemde WA, Shelat AA, Bouck D, Duffy S, Crowther GJ, Davis PH, Smithson DC, Connelly M, Clark J, Zhu F, Jiménez-Díaz MB, Martínez MS, Wilson EB, Tripathi AK, Gut J, Sharlow ER, Bathurst I, El Mazouni F, Fowble JW, Forquer I, McGinley PL, Castro S, Angulo BI, Ferrer S, Rosenthal PJ, Derisi JL, Sullivan DJ, Lazo JS, Ross DS, Riscoe MK, Phillips MA, Rathod PK, Van Voorhis WC, Avery VM, Guy RK. Chemical genetics of *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2010; 465(7296):311-5.
45. Griffin JT, Hollingsworth TD, Okell LC, Churcher TS, White M, Hinsley W, Bousema T, Drakeley CJ, Ferguson NM, Basañez MG and Ghani AC. Reducing *Plasmodium falciparum* Malaria Transmission in Africa: a model-based evaluation of intervention strategies. *PLoS Med* 2010; 7(8): e1000324.
46. Hodel EM, Genton B, Zanolari B, Mercier T, Duong S, Beck HP, Olliaro P, Decosterd LA and Ariey F. Residual Antimalarial Concentrations before Treatment in Patients with Malaria from Cambodia: Indication of Drug Pressure. *The Journal of Infectious Diseases* 2010;2020.
47. Widmer LL, Blank PR, Van Herck K, Hatz C, Schlagenhauf P. Cost-effectiveness analysis of malaria chemoprophylaxis for travellers to West-Africa. *BMC Infect Dis*. 2010;10:279.
48. Parikh S, Rosenthal PJ. Intermittent preventive therapy for malaria in pregnancy: is sulfadoxine-pyrimethamine the right drug?. *Clin Pharmacol Ther*. 2010;87(2):160-2.
49. Sinka ME, Rubio-Palis Y, Manguin S, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, Van Boeckel T, Kabaria CW, Harbach RE, Hay SI. The dominant Anopheles vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and biologic precis. *Parasit Vectors*. 2010;3(1):72.
50. Eisen L, Eisen RJ. Using Geographic Information Systems and Decision Support Systems for the Prediction, Prevention, and Control of Vector-Borne Diseases. *Annu Rev Entomol*. 2010 56:41-61.
51. Cruz-Chan JV, Rosado-Vallado M, Dumonteil E. Malaria vaccine efficacy; overcoming the helminth hurdle. *Expert Rev Vaccines* 2010; 9(7):707-11.
52. Rodríguez-López MH. Avances en el desarrollo de vacunas contra la malaria. *Rev Biomed* 2008; 19:61-79.
53. Goodman AL, Epp C, Moss D, Holder AA, Wilson JM, Gao GP, Long CA, Remarque EJ, Thomas AW, Amendola V, Colloca S, Dicks MD, Biswas S, Seibel D, Van Duivenvoorde LM, Gilbert SC, Hill AV, Draper SJ. New candidate vaccines against blood-stage *P. falciparum* malaria: Prime-boost immunization regimes incorporating human and simian adenoviral vectors and poxviral vectors expressing an optimized antigen based on MSP-1. *Infect Immun* 2010; 78(11):4601-12.
54. Shuaibu MN, Kikuchi M, Cherif MS, Helegbe GK, Yanagi T, Hirayama K. Selection and

- identification of malaria vaccine target molecule using bioinformatics and DNA vaccination. *Vaccine* 2010; 28(42):6868-75.
55. Tetteh KK, Polley SD. Progress and challenges towards the development of malaria vaccines. *BioDrugs* 2007; 21(6):357-73.
 56. Buffet PA, Safeukui I, Deplaine G, Brousse V, Prendki V, Thellier M, Turner GD, Mercereau-Pujalon O. The pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria in humans: insights from splenic physiology. *Blood*. 2011;117 (2):381-92.
 57. Hviid L, Kemp K. What is the cause of lymphopenia in malaria?. *Infect Immun*. 2000;68 (10):6087-9.
 58. Mitchell AJ, Hansen AM, Hee L, Ball HJ, Potter SM, Walker JC, Hunt NH. Early cytokine production is associated with protection from murine cerebral malaria. *Infect Immun*. 2005;73 (9):5645-53.
 59. Fernandes AA, Carvalho LJ, Zanini GM, Ventura AM, Souza JM, Cotias PM, Silva-Filho IL, Daniel-Ribeiro CT. Similar cytokine responses and degrees of anemia in patients with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections in the Brazilian Amazon region. *Clin Vaccine Immunol*. 2008;15(4):650-8.
 60. Akanmori BD, Kurtzhals JA, Goka BQ, Adabayeri V, Ofori MF, Nkrumah FK, Behr C, Hviid L. Distinct patterns of cytokine regulation in discrete clinical forms of *Plasmodium falciparum* malaria. *Eur Cytokine Netw*. 2000;11(1):113-8.
 61. Iveth J. González. Las metacaspasas y su rol en la vida y muerte de los parásitos protozoarios humanos. *Biomédica* 2009;29:485-93
 62. Levine B, Sinha S, and Kroemer G. Bcl-2 family members: Dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy* 2008; 4(5):600-6.
 63. Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol*. 2011; 13(3):184-90.
 64. Li J, Lee B, Lee AS. Endoplasmic reticulum stress induced apoptosis: multiple pathways and activation of puma and noxa by p53. *Journal of Biol Chem*. 2006, 281, 7260-7270.
 65. Huai J, Jöckel L, Schrader K, Borner C. Role of caspases and non-caspase proteases in cell death. *Biol Rep*. 2010]; 2:48.
 66. Soriano ME, Scorrano L. The interplay between BCL-2 family proteins and mitochondrial morphology in the regulation of apoptosis. *Adv Exp Med Biol*. 2010; 687:97-11.
 67. Thomadaki H, Scorilas A. BCL2 family of apoptosis-related genes: functions and clinical implications in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2006; 43(1):1-67.
 68. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. 2002, (9):647-56.
 69. Sasi N, Hwang M, Jaboin J, Csiki I, Lu B. Regulated cell death pathways: new twists in modulation of BCL2 family function. *Mol Cancer Ther*. 2009; 8(6):1421-9.
 70. Da Fonseca RR, Kosiol C, Vinar T, Siepel A, Nielsen R. Positive selection on apoptosis related genes. *FEBS Lett*. 2010; 584(3):469-76.
 71. Na IK, Lu SX, Yim NL, Goldberg GL, Tsai J, Rao U, Smith OM, King CG, Suh D, Hirschhorn-Cymerman D, Palomba L, Penack O, Holland AM, Jenq RR, Ghosh A, Tran H, Merghoub T, Liu C, Sempowski GD, Ventevogel M, Beauchemin N, van den Brink MR. The cytolytic molecules Fas ligand and TRAIL are required for murine thymic graft-versus-host disease. *J Clin Invest*. 2010;120 (1):343-56.
 72. Cianci R, Pagliari D, Pietroni V, Landolfi R, Pandolfi F. Tissue infiltrating lymphocytes: the role of cytokines in their growth and differentiation. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2010; 24 (3):239-49.
 73. Scott DW, Grdina T, Shi Y. T cells commit suicide, but B cells are murdered. *J Immunol*. 1996,156 (7):2352-6.
 74. Konforte D, Simard N, Paige CJ. IL-21: an executor of B cell fate. *J Immunol*. 2009; 182(4):1781-7.
 75. Hurd H, Carter V. The role of program cell death in *Plasmodium*-mosquito interactions. *Int J*

- Parasitol* 2004; 34:1459-72.
76. Hurd H, Grant KM, Arambage SC. Apoptosis-like death as a feature of malaria infection in mosquitoes. *Parasitology* 2006;132:33-47.
 77. Helmers AJ, Lovegrove FE, Harlan JM, Kain KC, Liles WC. Failure of two distinct anti-apoptotic approaches to reduce mortality in experimental cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 79(6):823-5.
 78. Martínez F, Jiménez A, Villegas-C, Zentella-DA. Bases moleculares de la terapia génica. *Farmacología médica*. 1ra edición. México 2008. Mc Graw Hill.
 79. Nouredini SC, Curiel DT. Genetic targeting strategies for adenovirus. *Mol Pharm*. 2005;2(5):341-7.
 80. Mateu MG. Virus engineering: functionalization and stabilization. *Protein Eng Des Sel*. 2011; 24:53-63.
 81. Kealy B, Liew A, McMahon JM, Ritter T, O'Doherty A, Hoare M, Greiser U, Vaughan EE, Maenz M, O'Shea C, Barry F, O'Brien T. Comparison of viral and nonviral vectors for gene transfer to human endothelial progenitor cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 2009;15(2):223-31.
 82. Mancheño-Corvo P, Martín-Duque P. Viral gene therapy. *Clin Transl Oncol*. 2006;8(12):858-67.
 83. Van Beusechem VW, Valerio D. Gene transfer into hematopoietic stem cells of nonhuman primates. *Hum Gene Ther*. 1996;7(14):1649-68.
 84. Naviaux RK, Costanzi E, M, Verma IM, The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. *J. Virol.*, 1996; 70(8).5701-5705.
 85. Lorenz C, Piganeau N, Schroeder R. Stabilities of HIV-1 DIS type RNA loop-loop interactions in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(1):334-42.
 86. Yoder KE, Roddick W, Hoellerbauer P, Fishel R.X. PB mediated retroviral cDNA degradation coincides with entry to the nucleus. *Virology*. 2011;410(2):291-8.
 87. Draper SJ, Biswas S, Spencer AJ, Remarque EJ, Capone S, Naddeo M, Dicks MD, Faber BW, de Cassan SC, Folgori A, Nicosia A, Gilbert SC, Hill AV. Enhancing blood-stage malaria subunit vaccine immunogenicity in rhesus macaques by combining adenovirus, poxvirus, and protein-in-adjuvant vaccines. *J Immunol*. 2010;185(12):7583-95.
 88. Goodman AL, Epp C, Moss D, Holder AA, Wilson JM, Gao GP, Long CA, Remarque EJ, Thomas AW, Ammendola V, Colloca S, Dicks MD, Biswas S, Seibel D, van Duivenvoorde LM, Gilbert SC, Hill AV, Draper SJ. New candidate vaccines against blood-stage *Plasmodium falciparum* malaria: prime-boost immunization regimens incorporating human and simian adenoviral vectors and poxviral vectors expressing an optimized antigen based on merozoite surface protein 1. *Infect Immun*. 2010;78(11):4601-12.
 89. Vigan-Womas I, Lokossou A, Guillotte M, Juillerat A, Bentley G, Garcia A, Mercereau-Pujalon O, Migot-Nabias F. The humoral response to *Plasmodium falciparum* VarO rosetting variant and its association with protection against malaria in Beninese children. *Malar J*. 2010 5;9:267.
 90. Rizzo C, Ronca R, Fiorentino G, Verra F, Mangano V, Poinsignon A, Sirima SB, Nèbiè I, Lombardo F, Remoue F, Coluzzi M, Petrarca V, Modiano D, Arcà B. Humoral Response to the *Anopheles gambiae* Salivary Protein gSG6: A Serological Indicator of Exposure to Afrotropical Malaria Vectors. *PLoS One*. 2011;6(3):e17980.
 91. Mukherjee P, Devi YS, Chauhan VS. Blood stage malaria antigens induce different activation-induced cell death programs in splenic CD4+T cells. *Parasite Immunol*. 2008; 30(10):497-514.
 92. Baixeras E, Cebrían A, Albar JP, Salas J, Martínez-A C, Viñuela E, Revilla Y. Vaccinia virus-induced apoptosis in immature B lymphocytes: role of cellular Bcl-2. *Virus Res*. 1998;58(1-2):107-13.
 93. Pays E, Vanhollebeke B. Human innate immunity against African trypanosomes *Curr Opin Immunol*. 2009; 21(5):493-8.

94. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*. 1977; 36(1):59-74.
95. Landázuri N, Gupta M, Le Doux JM. Rapid concentration and purification of retrovirus by flocculation with Polybrene; *J Biotechnol*, 2006;125 (4):529-39.
96. McMillin DW, Landázuri N, Gangadharan B, Hewes B, Archer DR, Spencer HT, Le Doux JM. Highly efficient transduction of repopulating bone marrow cells using rapidly concentrated polymer-complexed retrovirus. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 330(3):768-75.
97. Landázuri N, Le Doux JM. Complexation of retroviruses with charged polymers enhances gene transfer by increasing the rate that viruses are delivered to cells. *J Gene Med*. 2004;6(12):1304-19.
98. Legorreta-Herrera M, Fiallos-Leon C, Cedillo-Barron L, Martinez-Gomez F, Foster-Cuevas M, Favila-Castillo L. Anti-Thy-1 treated and irradiated spleen cells from (BALB/c x C57Bl/6) F1 mice infected with *Plasmodium chabaudi chabaudi* can transfer protection into irradiated hosts. *Parasite Immunol*. 1993;15(3):143-51.
99. Artavanis-Tsakonas K, Tangram JE, Riley EM. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clin Exp Immunol*. 2003; 133 (2):145-52.
100. Giusti P, Urban BC, Frascaroli G, Albrecht L, Tinti A, Troye-Blomberg M, Varani S. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and β -hematin induce partial maturation of human dendritic cells and increase their migratory ability in response to lymphoid chemokines. *Infect Immun*. 2011 Apr 4. [Epub ahead of print]
101. Mukherjee P, Devi YS, Chauhan VS. Blood stage malaria antigens induce different activation-induced cell death programs in splenic CD4+T cells. *Parasite Immunol*. 2008;30(10):497-514.
102. Kaczanowski S, Sajid M, Reece SE. Evolution of apoptosis-like programmed cell death in unicellular protozoan parasites. *Parasit Vectors*. 2011;4(1):44.
103. Bruchhaus I, Roeder T, Rennenberg A, Heussler VT. Protozoan parasites: programmed cell death as a mechanism of parasitism. *Trends Parasitol*. 2007 23(8):376-83.
104. Lorenzi JC, Trombone AP, Rocha CD, Almeida LP, Lousada RL, Malardo T, Fontoura IC, Rossetti RA, Gembre AF, Silva AM, Silva CL, Coelho-Castelo AA. Intranasal vaccination with messenger RNA as a new approach in gene therapy: use against tuberculosis. *BMC Biotechnol*. 2010; 20;10:77.
105. Burke B, Sumner S, Maitland N, Lewis CE. Macrophages in gene therapy: cellular delivery vehicles and in vivo targets. *J Leukoc Biol*.;72(3):417-28.
106. Angaji SA, Hedayati SS, Poor RH, Madani S, Poor SS, Panahi S. Application of RNA interference in treating human diseases. *J Genet*. 2010; 89(4):527-37.
107. Kitchen SG, Shimizu S, An DS. Stem cell-based anti-HIV gene therapy. *Virology*. 2011;411(2):260-72.
108. Trobridge GD, Kiem HP. Large animal models of hematopoietic stem cell gene therapy. *Gene Ther*. 2010;17(8):939-48.
109. Zhang W, Pantschenko AG, McCarthy MB, Gronowicz G. Bone-targeted overexpression of Bcl-2 increases osteoblast adhesion and differentiation and inhibits mineralization in vitro. *Calcif Tissue Int*. 2007;80(2):111-22.
110. Ke H, Parron VI, Reece J, Zhang JY, Akiyama SK, French JE. BCL2 inhibits cell adhesion, spreading, and motility by enhancing actin polymerization. *Cell Res*. 2010;20(4):458-69.
111. Liu SP, Lee SD, Lee HT, Liu DD, Wang HJ, Liu RS, Lin SZ, Shyu WC. Granulocyte colony-stimulating factor activating HIF-1 α acts synergistically with erythropoietin to promote tissue plasticity. *PLoS One*. 2010, 9;5(4).
112. Buffet PA, Safeukui I, Milon G, Mercereau-Pujalon O, David PH. Retention of erythrocytes in the spleen: a double-edged process in human malaria. *Curr Opin Hematol*. 2009;16(3):157-64.
113. Sponaas AM, Freitas do Rosario AP, Voisine C, Mastelic B, Thompson J, Koernig S, Jarra

- W, Renia L, Mauduit M, Potocnik AJ, Langhorne J. Migrating monocytes recruited to the spleen play an important role in control of blood stage malaria. *Blood*. 2009;114(27):5522-31.
114. Hans-Peter Gerber and Napoleone Ferrara. The role of VEGF in normal and neoplastic hematopoiesis *Journal of Molecular Medicine* 2010; 81,(1): 20-31.
115. Sheibani N, Scheef EA, Dimaio TA, Wang Y, Kondo S, Sorenson CM. Bcl-2 expression modulates cell adhesion and migration promoting branching of ureteric bud cells. *J Cell Physiol*. 2007;210(3):616-25.
116. Ardehali R, Inlay MA, Ali SR, Tang C, Drukker M, Weissman IL. Overexpression of BCL2 enhances survival of human embryonic stem cells during stress and obviates the requirement for serum factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(8):3282-7.
117. Biasco L, Ambrosi A, Pellin D, Bartholomae C, Brigida I, Roncarolo MG, Di Serio C, von Kalle C, Schmidt M, Aiuti A. Integration profile of retroviral vector in gene therapy treated patients is cell-specific according to gene expression and chromatin conformation of target cell. *EMBO Mol Med*. 2011;3(2):89-101.
118. Uchida N, Bonifacino A, Krouse AE, Metzger ME, Csako G, Lee-Stroka A, Fasano RM, Leitman SF, Mattapallil JJ, Hsieh MM, Tisdale JF, Donahue RE. Accelerated lymphocyte reconstitution and long-term recovery after transplantation of lentiviral-transduced rhesus CD34(+) cells mobilized by G-CSF and plerixafor. *Exp Hematol*. 2011 Apr 15.
119. Giusti P, Urban BC, Frascaroli G, Albrecht L, Tinti A, Troye-Blomberg M, Varani S. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes and beta-hematin induce partial maturation of human dendritic cells and increase their migratory ability in response to lymphoid chemokines. *Infect Immun*. 2011 Apr 4.
120. Mandoki JJ, García-Mondragón MJ, Casa-Tirao B, Jiménez-Orozco FA. Reflections on the mode of functioning of endocrine systems. *Arch Med Res*. 2010; 41(8):653-7.
121. Clarke R, Shajahan AN, Riggins RB, Cho Y, Crawford A, Xuan J, Wang Y, Zwart A, Nehra R, Liu MC. Gene network signaling in hormone responsiveness modifies apoptosis and autophagy in breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2009;114(1-2):8-20.

XII. ANEXOS.

Este proyecto de investigación generó las siguientes publicaciones y fue presentado en los siguientes foros científicos.

a). Artículo original de investigación.

a.1. *Francisco Martínez-F*, José Luis Ventura-Gallegos, Eréndira G. Estrada-Villaseñor, Hilda Villegas-Castrejón, Epifanio Cruz-Zaragoza, Luis Covarrubias-Robles, Alejandro Zentella-Dehesa, Martha Legorreta-Herrera. "Enhanced splenic protection and reduction of parasitaemia following transplantation of splenocytes overexpressing Bcl-2 in a murine malaria model". *Gene Ther Mol Biol*, 2008, Vol 12, 301-311.

b). Artículo de revisión.

b.1. *Martínez-Flores F*, Jiménez-Orozco FA, Villegas-Castrejón H. Molecular biology of adenoviral vectors Original title: *Molecular Biology of Adenoviral vectors*" *Cir Ciruj* 2006; 74 (6): 483-493.

c). Capítulos de libro.

c.1. *Implicaciones Gineco-obstétricas de la Terapia Génica. Francisco Martínez-F*. Obstetricia y Medicina Perinatal, Tomo I. Colegio Mexicano de gineco-obstetricia. 2006. ISBN en Tramite.

c.2. "Bases moleculares de terapia génica;" *Francisco Martínez-F*. Alejandro Jiménez-O; Alejandro Zentella-Dehesa, Hilda Villegas-C. Farmacología Médica, Editorial Panamericana/UNAM. 2008 ISBN: 978-968-7988443.

d). Presentaciones en congreso nacionales.

d.1. XXV Congreso de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. "Efecto de Bcl-2 en la apoptosis inducida por plasmodium." *Francisco Martínez-F*, Ventura Gallegos JL., García F., Cruz E., Covarrubias L., Zentella Dehesa A. Legorreta-Herrera M. 2004.

d.2. XXVI Congreso de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. "Cambios histológicos del bazo inducidos por bcl-2 en un modelo de plasmodium". *Francisco Martínez-F*, Ventura-Gallegos JL., Covarrubias L., Estrada Villaseñor, Epifanio Cruz, Legorreta-Herrera M., Zentella-Dehesa A. 2006.

e). Presentaciones en congresos internacionales.

e.1. Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, ASGT-2005. "Effect of Bcl-2 overexpression on Plasmodium infection". *Francisco Martínez-F*, Jose Luis Ventura, Luis F. Covarrubias, Alejandro Zentella-D, Martha Legorreta-H. ASGT. St. Louis MO. USA, 2005.

e.2. XV Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy, ESGCT-2007. "Over expression of Bcl-2 improves cytoarchitecture preservation of spleen during early plasmodium murine

infection". *Francisco Martínez-F*, JL Ventura-Gallegos; Luis Covarrubias; Hilda Villegas-C; Eréndira Estrada-V; Martha Legorreta-Herrera, Alejandro Zentella-D. Rotterdam, The Netherlands, Octubre, 2007. Travel granted presentation.

e.3. XIV Annual Congress of the American Society of Gene and Cell Therapy, ESGCT- 2011
Over Expression of Bcl-2 Enhance Preservation of Spleen Cytoarchitecture and Promotes Lymphocyte Proliferation. *Francisco Martínez-F*, JL Ventura-Gallegos², L Covarrubias, Eréndira Estrada-V, Epifanio Cruz, M Legorreta– Herrera, A Zentella-Dehesa. Seattle , USA. Mayo 21 del 2011.

Enhanced splenic protection and reduction of parasitaemia following transplantation of splenocytes overexpressing Bcl-2 in a murine malaria model

Research Article

Francisco Martínez-Flores^{1,§}, José Luis Ventura-Gallegos^{2,§}, Eréndira G. Estrada-Villaseñor¹, Hilda Villegas-Castrejón¹, Epifanio Cruz-Zaragoza³, Luis Covarrubias-Robles⁴, Alejandro Zentella-Dehesa^{2,5,*}, Martha Legorreta-Herrera^{6,*}

¹Departamento de Morfología Celular y Molecular, Instituto Nacional de Rehabilitación.

²Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México, D.F.

³Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM

⁴Instituto de Biotecnología, UNAM

⁵Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

⁶Laboratorio de Inmunología Molecular, FES Zaragoza, UNAM

*Correspondence: Martha Legorreta-Herrera PhD, Laboratorio de Inmunología Molecular, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, Batalla 5 de mayo s/n Iztapalapa, CP 09230, México, DF México; Tel/Fax: 52(55)56230736; e-mail: marthal@servidor.unam.mx

Alejandro Zentella-Dehesa PhD, Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15, Sector XVI, Tlalpan, CP 14000, DF México; Tel 52(55)54870900 ext 2126; Fax: 52(55)56550011; e-mail: azentel@biomedicas.unam.mx

Key words: Apoptosis, retroviral vectors, promoter PolIII, oxidative stress

Abbreviations: green fluorescent protein, (GFP); intravenously, (iv); Moloney Leukaemia Virus, (MLV)

Received: 17 November 2008; Revised: 9 December 2008

Accepted: 9 December 2008; electronically published: December 2008

Summary

Malaria is one of the most important infectious diseases worldwide. During acute infection, the activation of the immune response and parasite clearance by the spleen are key host defence mechanisms. Apoptosis of lymphocytes is believed to compromise the immune response in malaria cases. As limited progress has been made using gene therapy against parasitic infections, we explored the potential beneficial effect of reconstituting *Plasmodium chabaudi* infected mice with transduced splenocytes overexpressing Bcl-2. An ecotropic retrovirus encoding GFP and Bcl-2 was packaged in 293T cells. A second retrovirus expressing only GFP was used as control. Initially, CBA/Ca mice were transplanted with 2×10^7 total splenocytes from syngenic donor mice transduced with retroviral particles. Two hours later recipient mice were infected with 5×10^4 *P. chabaudi* parasitised erythrocytes. Parasitaemia was evaluated every 24 h. Seven days post-infection, we evaluated splenic histology and Bcl-2 expression via RT-PCR and western blot. The protection against H₂O₂-induced apoptosis was tested on isolated total splenocytes. The efficiency of retroviral infection, expression of Bcl-2 and reporter gene was confirmed by Fluorescence microscopy, RT-PCR and western blotting of splenocytes from transplanted with cells transduced with GFP- or Bcl-2-expressing retroviruses. Parasitaemia in mice transplanted with GFP-transduced splenocytes transiently decreased 10-fold at day five after *Plasmodium* infection and was further decreased when mice were transplanted with Bcl-2-transduced splenocytes. The splenic architecture of mice that received transduced cells was preserved compared to control mice. Cytoprotection in vitro was enhanced with the Bcl-2 construct. The protective effect correlated with increased the cellularity in the spleen and overexpression Bcl-2. We tested the use of standard gene therapy strategies based on the reconstitution of irradiated mice with genetically modified heterologous cells in

Martínez-Flores et al: Enhanced splenic protection and reduction in a murine malaria model

an experimental murine model of malaria. We observed transient reduction of parasitaemia, preservation of splenic architecture and increased cell survival in vitro against oxidative stress. Although the experimental design aimed to test the effect of Bcl-2 overexpression, transplantation of cells transduced with the empty retroviral vector resulted in a significant protective effect accompanied by the increased expression of endogenous Bcl-2.

I. Introduction

Malaria is the leading infectious cause of death worldwide, and estimated of two billion people (more than 40% of the world population) live in areas with a high risk of infection. The global annual incidence ranges between three to five hundred million clinical cases, with a total mortality between 2 to 3 millions a year (Wykes and Good, 2007).

Attempts to curtail the devastating effects of malaria have encountered many obstacles including the rapid development and spread of vector resistance to residual insecticides, a decreasing parasite response to clinically used drugs and the lack of effective and affordable alternative anti-malarial therapies. Despite all these difficulties the use of the gene therapy against infectious diseases, particularly malaria, has been poorly explored.

The cellular immune response to *Plasmodium* infection has been widely studied (Good and Currier, 1992; Taylor-Robinson and Phillips, 1993; Von Der Weid et al, 1994). In general, acute infection with *Plasmodium* is associated with the activation of peripheral T cells, alterations in the level of cytokine production (Cross and Langhorne, 1998) and lymphopaenia (Wipasa et al, 2001). These changes can compromise the immune response and have been explained by apoptosis of lymphocytes, relocation of peripheral lymphocytes or both. In fact, it has been shown that schistosome, toxoplasma, and trypanosome infections induce apoptosis in host mononuclear cells (Lopes et al, 1995; Khan et al, 1996; Estaquier et al, 1997). Moreover, apoptosis of lymphocytes may contribute to parasite survival, through down regulation of anti-parasite inflammatory responses and immunosuppression.

Bcl-2 was the first characterised member of a family of genes that regulate apoptosis by preventing or inducing cell death (Korsmeyer et al, 1995; Kluck et al, 1997; Yang et al, 1997). The biochemical basis of their actions has not been completely elucidated and remains unclear. However, over-expression of Bcl-2 can block many forms of apoptosis in transfected cell lines, transgenic mice or transduced organs in several in vivo models (Bilbao et al, 1999; Molto et al, 2003; Mitsiades et al, 2007).

Apoptosis is a major mechanism by which the development, maturation and activation of lymphocytes is regulated. During *Plasmodium* infection, apoptosis has been implicated as a mechanism whereby parasites escape from the immune system. Helmby et al have described the increased frequency of apoptosis in macrophages, B and T cells in the spleen of *P. chabaudi*-infected mice (Helmby et al, 2000). These alterations correlate with increased expression of Fas and Fas-ligand, suggesting that apoptosis is, in part, Fas-mediated.

Gene therapy aims to correct defects in gene expression through the expression of exogenous proteins

introduced by genetic vectors (plasmids and viral vectors) encoding the corresponding cDNAs. Although this principle can be applied to a variety of diseases its applications to the treatment of infectious diseases remains to be developed. Reconstitution of infected individuals with genetically modified immune cells provides a simple application of the principles of the genetic therapy in these kinds of diseases.

If apoptosis is important for the progression of malaria, overexpression of anti-apoptotic proteins such as Bcl-2 should have a protective effect. Consequently, we explored the evolution and course of parasitaemia in *P. chabaudi*-infected mice previously transplanted with splenocytes over-expressing Bcl-2, as well as the resistance against hydrogen peroxide-induced apoptosis in splenocytes. We also documented the cytoarchitecture and histology of the spleen during *P. chabaudi* infection.

II. Materials and Methods

A. Animal model design

CBA/Ca mice (kindly donated by Dr. W. Jarra, National Institute for Medical Research, London, UK) were used in all experiments; animals were maintained and cared for according to the Mexican Animal Regulations in a specific pathogen free environment. Splenocytes were isolated from healthy male mice, cultured in RPMI-1640 media supplemented with 10% foetal bovine serum, penicillin-streptomycin and amphotericin B (100 U/ml, 100 µg/ml and 0.25 µg/ml respectively) and stimulated with recombinant IL-2 (100 U/ml Sigma, USA). Cells were transduced with retroviral vectors encoding either GFP alone or GFP and Bcl-2. After twenty-four hours post transduction the cells were transplanted intravenously (iv) into sub-lethally irradiated mice in three groups: 1) Control: non-transduced cells; 2) GFP: cells expressing only GFP; 3) Bcl-2: cells expressing both GFP and Bcl-2. The sub-lethal irradiation allowed the transplanted cells to repopulate the spleen of the recipient mice. After four hours post transplant, all mice were infected with *P. chabaudi* parasitised erythrocytes. Mice were bred and maintained at the FES-Zaragoza-UNAM animal care facility in microisolator cages and were provided with a parasite promoting diet (TD 993 Harlan USA) and acidified water *ad libitum*; animals were sacrificed at the indicated days post-infection for the different studies.

B. Plasmid constructs

All retroviral plasmids were based on the ecotropic system using the Moloney Leukaemia Virus (MLV) Long Terminal Repeats (IMGENEX Corp.). The pCNRX-GFP plasmid expresses of the green fluorescent protein (GFP) under the transcriptional control of the minimal CMV promoter, flanked by the LTRs of MLV. The Bcl-2 cDNA was cloned downstream of the DNA Polymerase II promoter into an EcoRI site of the pCNRX-GFP plasmid. The resulting construct was named pCNRX-GFP-Bcl-2. Endotoxin-free, high scale plasmid preparations (Qiagen Inc, USA) were used for plasmid sequencing, transfection assays, functional expression and viral packaging in HEK-293T cells.

C. Packaging of retroviral particles

The night before transfection, 3×10^6 HEK-293T cells/well were seeded in 6-well plates with DMEM media (Gibco/Invitrogen, USA) supplemented with 10% heat inactivated foetal bovine serum, (Gibco/Invitrogen) and incubated at 37°C with 5% CO₂.

The media was replaced 3 h before co-transfecting the cells with 5 µg of both pCLNRX-GFP and pCL-Eco or pCLNRX-GFP-Bcl-2 and pCL-Eco using a calcium phosphate precipitation protocol (Gibco/Invitrogen). In all transfection experiments, endotoxin-free plasmids were used to transfect the cells. The media was replaced 24 h post-transfection and the supernatants were collected 48 h after transfection. polybrene (Sigma, USA) was added to a final concentration of 8 µg/mL before infecting the target splenocytes.

D. Retroviral infection

Splenocytes were isolated from healthy male mice and 3×10^6 cells were maintained in supplemented RPMI-1640 and 100 U/ml of recombinant IL-2 (Sigma-Aldrich, USA). The infection procedure was performed by adding the retrovirus-containing supernatants at 1:1 ratio to the splenocytes. After 24 h of incubation under standard conditions, transduced cells were used for transplants.

E. Irradiation and spleen cell-transplant

Recipient mice were exposed to γ -irradiation equivalent to a total dose of 4.5 Gy at a rate of 450 cGy/min using the Siemens Biomed Inc. irradiator with a Cobalt-60 source (Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM). Two hours post-irradiation, the mice were transplanted with 2×10^7 transduced splenocytes resuspended in 100 µl of PBS (Gibco/Invitrogen) by iv injection.

F. Infection and parasitaemias

Groups of 6-8 week-old male CBA/Ca mice were inoculated iv with 5×10^4 *P. chabaudi*-parasitised erythrocytes as previously described (Legorreta-Herrera et al, 1993). Parasites were kindly donated by Dr. K N Brown (National Institute for Medical Research, London, UK). Parasitaemia was evaluated with Giemsa-stained blood smears starting at day 4 through day 7 post-infection. The course of infection in each group is shown as the percentage of parasitaemia.

G. Bcl-2 mRNA expression

On day 7 post-infection, mice were sacrificed and splenic mRNA was extracted using Trizol (Invitrogen). DNA was digested with DNase I (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions and total RNA was quantified spectrophotometrically. Total RNA (1.5 µg) was reverse transcribed using 0.5 mM dNTP's (Pharmacia, Uppsala, Sweden), 40 U of RNase inhibitor (Invitrogen) and 200 U of MMLV-RT (Invitrogen) and incubated at 37°C for 30 min. A 1 µl sample of the resulting cDNA was used to amplify Bcl-2 and β -actin in duplicate. Both the number of cycles and the cDNA concentrations were optimised such that the reactions were in the logarithmic phase of amplification.

The following primers were used for Bcl-2 amplification: forward TCATGAAGACAGGGCCTTTT, reverse TGGAGCTGCAGAGGATGATTG; and for β -actin: forward GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA, reverse CTCTTTGATGTCACGCACGATTTC. PCR reactions were performed in a total volume of 20 µl. Amplification was carried out in 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0.1 mg/mL Gelatin (Sigma-Aldrich), dNTP's 200 mM each (Pharmacia, Uppsala, Sweden), 2 mM MgCl₂, 100 n moles each primers, 0.5 U Ampli Taq polymerase (Applied Biosystems, Branchburg, NY, USA) and 1

µL of the cDNA (RT reaction mixture). β -actin and Bcl-2 were simultaneously amplified in the same tube. After 28 cycles, the PCR products were separated on 5% acrylamide gels and stained with ethidium bromide. Band intensity was measured via densitometry (GelDoc, BioRad, Hercules, USA). Results are shown as the ratio between the density (arbitrary units) of Bcl-2 and the density of β -actin.

H. Microscopy analysis

GFP expression in infected cells was detected using an epifluorescent microscope (Bio-Rad Inc). Histological analysis was performed on frozen spleen slice sections embedded in Tissuetek (Dako). Several slices were fixed for routine haematoxylin and eosin staining protocol. Morphometric analysis and histopathological description was performed in the Department of Pathology of the Instituto Nacional de Rehabilitación (Mexico City).

I. Cell phenotype characterization

Suspensions of 1×10^6 splenocytes were washed in PBS and stained with pre-calibrated dilutions of PE-conjugated anti mouse CD3, CD4, CD8 or B220 monoclonal antibodies (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). Cells were incubated for 30 min at 4 °C, washed twice with FACS-buffer (0.1% bovine serum albumin, 0.1% sodium azide in PBS) and suspended in 500 µl of the same buffer. Fluorescence was analysed using a FACSCalibur flow cytometer and Cell Quest software (BD, San Jose, CA, USA). For each sample, 40,000 events were acquired and analysed. Dead cells were excluded by gating on PI negative cells.

J. Statistical analysis

Student's t-test was used to determine statistical significance.

III. Results

A. Expression vectors and splenocyte infection

Hematopoietic and lymphoid cells that have been transduced with retroviral vectors have been reported to reconstitute approximately 20% of the total population of splenocytes (McMillin et al, 2005; Ide et al, 2008). In order to introduce a recombinant form of Bcl-2 into total splenocytes of mice which will be infected with *P. chabaudi*, to retroviral expression vectors, pCLNRX-GFP and pCLNRX-GFP-Bcl-2, were developed (Figure 1A). In both constructs, the GFP cDNA was placed under the transcriptional control of the CMV enhancer promoter. In the case of pCLNRX-GFP-Bcl-2, the cDNA of rat Bcl-2 was placed under the control of the DNA polymerase II promoter. Therefore, Bcl-2 will only be expressed in proliferating cells, while GFP should be constitutively expressed even in quiescent cells.

Freshly prepared retroviral particles were used to transduce total murine splenocytes as described in Materials and Methods. Using fluorescence microscopy to detect the expression of GFP, we verified that the transduction protocol had no effect on the viability of the splenocytes (Figure 1B). The optimal multiplicity of infection was determined by serial dilution. Approximately 1×10^6 viral particles/ml were used in all experiments and mixed with 1×10^6 total splenocytes in a final volume of 1 ml. Normally, splenocytes were

Martínez-Flores et al: Enhanced splenic protection and reduction in a murine malaria model

transplanted into irradiated mice 18 h after in vitro viral infection. In order to evaluate the efficiency of transduction, control cultures were monitored for GFP expression for 24, 48 and 72 h (data not shown). **Figure 1B** shows representative images of transduced splenocytes. The GFP signal was always bright in cells transduced with the construct encoding only GFP (**Figure 1B**, +/-). The GFP signal in cells transduced with the construct encoding Bcl-2 (+/+) was always of a lower intensity compared to the construct expressing only GFP. Despite the fact that the splenocyte came from different donors the transduction was consistent and reproducible. The transduction efficiency was quantified by flow cytometry on the transduced cells 25-35 % of the total population of transduced splenocytes was GFP positive (**Figure 1C** central and right histograms).

B. *In situ* localization revealed homing of transplanted cells to the spleens of recipient mice

To verify the homing of the transplanted cells to the spleens of recipient mice, we used GFP expression as a marker. Seven days post-transplantation and infection with *P. chabaudi*, longitudinal spleen slices were analysed for GFP expression. Large clusters of fluorescent cells were detected in the spleens of mice transplanted with Bcl-2 transduced cells (**Figure 2**, Bcl-2) compared to untransduced controls (-/-) or to GFP-transduced cells (+/-). Additionally, more fluorescent cells were found along the periphery of the spleens of mice transplanted with cells transduced with the Bcl-2-expressing construct (+/+). Interestingly, the spleens of mice transplanted with control cells were more fragile than the spleens from animals transplanted with transduced cells. These observations

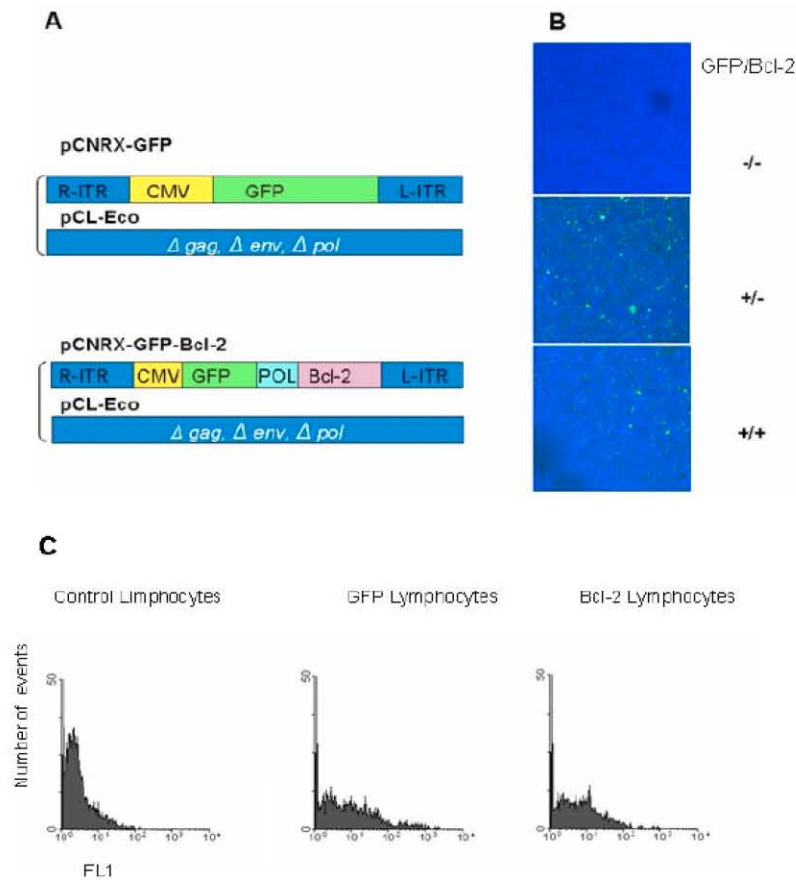


Figure 1. Plasmid constructs used for retroviral gene delivery and expression in murine splenocytes. (A) Schematic representation of plasmid constructs for packaging of retroviral particles in 293-T cells (as described in Materials and Methods). (B) Fluorescence microscopy of uninfected murine splenocytes (-/-), infected with GFP vector (+/-) and infected with GFP-Bcl-2 (+/+). (C) Flow cytometry histograms examining the efficiency of transduction in total splenocytes before transplant. Control (CTR), cells transduced with GFP (GFP) or with GFP-Bcl-2 (Bcl-2).

Gene Therapy and Molecular Biology Vol 12, page 305

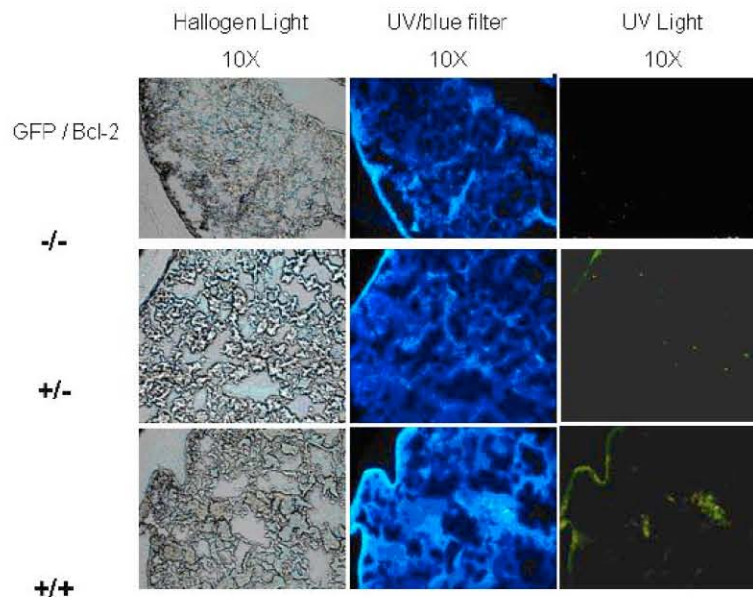


Figure 2. GFP signal in the spleens of recipient mice after transduction and seven days post-transplant. After irradiation mice received a transplant with the different transduced splenocytes were iv infected with *P. chabaudi*, spleens were removed and the fluorescent signal was evaluated in fresh tissue slices. Each field is presented in light transmission (Halogen light), UV/blue illumination (UV/blue) and green fluorescence (excitation 488 nm emission 530 nm). The first line corresponds to control animals transplanted with not-transduced splenocytes (-/-). The second (+/-) and third (++) lines correspond to the spleens of animals transplanted with GFP- or Bcl-2-transduced cells respectively.

demonstrate that the homing of splenocytes transduced with the different retroviral constructs took place in recipient mice transplanted with similar efficiencies.

C. Bcl-2 mRNA and protein expression in the spleens of transplanted mice

In order to identify and verify Bcl-2 transgene expression, RT-PCR and western blot analysis were performed on the spleens of transplanted mice. Interestingly, the spleens of mice transplanted with GFP-transduced cells exhibited significantly enhanced Bcl-2 mRNA and protein expression (Figures 3A and B, GFP). Figure 3A (Bcl-2) shows the amplified Bcl-2 fragment from the spleens of mice receiving Bcl-2-transduced cells. Western blot analysis revealed Bcl-2 protein in the spleens of mice receiving splenocytes transduced with either construct (Figure 3B, GFP and Bcl-2). A 15-fold increase in the expression of Bcl-2, when compared to mice receiving untransduced cells, was seen in mice receiving GFP-transduced splenocytes (GFP). However, Bcl-2 expression was greater (50-fold increase) in the spleens of mice transplanted with Bcl-2 transduced cells (Figures 3A and B, Bcl-2). These results confirm the overexpression of Bcl-2 when cells are transduced with retroviruses encoding Bcl-2. Nevertheless, transduction alone appears to be enough to promote the expression of endogenous Bcl-2. This expression could occur in the transduced

transplanted cells, but it is also possible that the presence of the transplanted population leads to the expression of endogenous Bcl-2 in their surrounding cells.

D. Decreased susceptibility to oxidative stress in cells expressing Bcl-2 both *in vitro* and *in vivo*

As Bcl-2 overexpression confers protection against a variety of stressful conditions, including high concentrations of H_2O_2 and inducers of apoptosis (Korsmeyer et al, 1995; Yang et al, 1997; Mitsiades et al, 2007), we tested the potential protective effects of Bcl-2 overexpression on the viability of total splenocytes exposed to increasing concentration of H_2O_2 (Figure 4). Initially, the efficiency of the protective effect of Bcl-2 overexpression was evaluated 48 hrs after *in vitro* culture following transduction (Figure 4A). Cell viability was assessed 2 h after the addition of increasing concentrations of H_2O_2 and is expressed relative to normal splenocytes not exposed to H_2O_2 (100%). In untransduced cells, the viability decreased with increasing H_2O_2 concentrations, while GFP-transduced cells were refractory to H_2O_2 -induced cell death, and viability remained relatively unchanged at approximately 50%. Statistical significance was only observed when the viability of normal cells and Bcl-2-transduced cells treated with 2 mM of H_2O_2 was compared ($p < 0.05$). Having shown that the transduction

Martínez-Flores et al: Enhanced splenic protection and reduction in a murine malaria model

with the retrovirus expressing Bcl-2 confers protection against H_2O_2 in vitro we evaluated if the protective phenotype was retained in vivo when mice were transplanted with transduced cells and infected with *P. chabaudi*. Given the difficulties in evaluating the potential protective effect of the expression of Bcl-2 in vivo, we evaluated cell viability in vitro in the total splenocyte population 72 h after transplantation (Figure 4B).

Interestingly, the general trend was similar to that observed in total splenocytes prior to transplantation (Figure 4A). Statistically significant differences ($p < 0.05$) in the viability of splenocytes from mice receiving untransduced control cells or Bcl-2-transduced cells were only observed when cells were treated with the lowest dose of H_2O_2 (1 mM; Figure 4B).

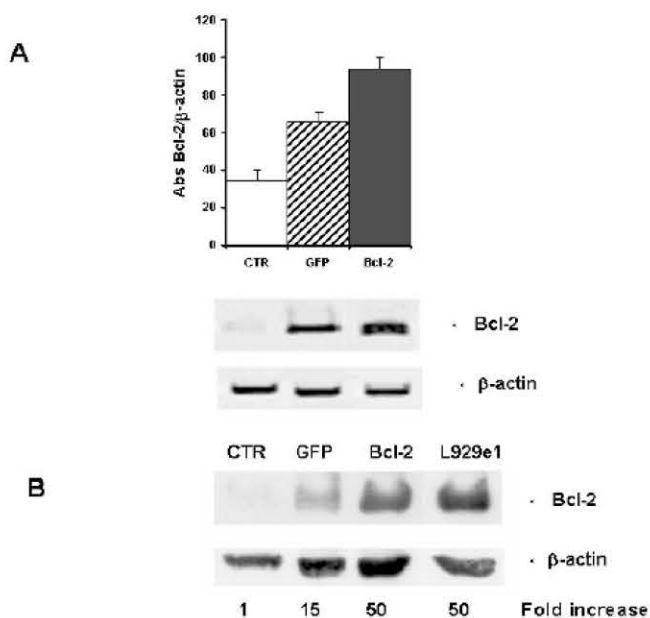


Figure 3. Bcl-2 expression in the spleens of transplanted mice infected with *P. chabaudi*. Mice were transplanted with 2×10^7 splenocytes from donor mice, these cells were previously transduced with the Bcl-2-expressing retrovirus (Bcl-2), the GFP-expressing retrovirus (GFP) or subjected to mock transduction (CTR). All mice were infected iv with 5×10^4 parasitised erythrocytes the same day. Seven days after parasite infection, animals were sacrificed and Bcl-2 expression in the spleen was analysed. (A) RT-PCR of Bcl-2 (lower panel) and densitometric analysis (histogram) compared to β -actin expression. (B) Western blot of Bcl-2 on total spleen cell protein extracts. L929e1: Total protein extracts from the L929 murine fibroblast cell line constitutively overexpressing Bcl-2 used as a positive control. β -actin was used as a loading control. Numbers below the western indicate the fold increase in the β -actin-normalised Bcl-2 signal compared to the control.

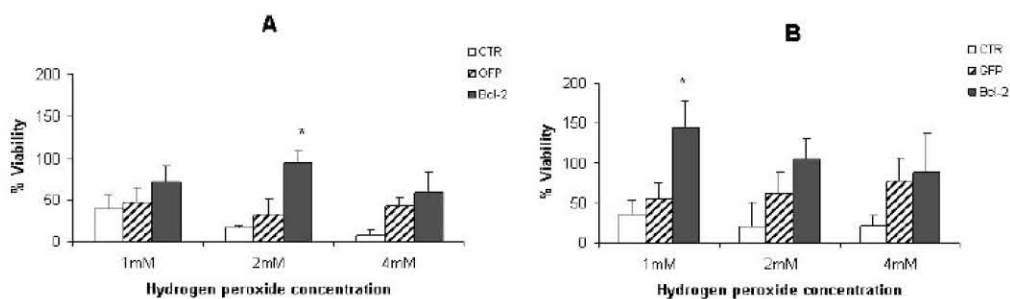


Figure 4. Hydrogen peroxide resistance of splenocytes before and after transplant into irradiated receptor mice infected with *P. chabaudi*. The viability of splenocytes after 2 h of challenge with different concentrations of H_2O_2 was determined. (A) Viability was measured after culture for 48 h *in vitro*. (B) Viability was evaluated 72 h after mice were irradiated and reconstituted with 3×10^7 splenocytes. As in previous experiments donor cells were either GFP- or BCL-2-transduced. Control cells were subjected to mock transduction (CTR). * $p < 0.05$ compared to control (CTR).

Taken together, these results demonstrate an increased cell viability in transduced cells, regardless of the presence or absence of the Bcl-2 cDNA, and this protective effect remained 72 h post-transplantation into irradiated mice. While splenocytes transduced with the retrovirus expressing GFP alone demonstrated an increased viability compared to untransduced cells, the viability was always higher in cells expressing Bcl-2.

E. Histologic and morphometric analysis of the spleen

Both a macroscopic and microscopic analysis of the spleens of recipient mice was carried out. All the spleens had increased friability but it was more evident in the control and GFP groups (data not shown). The histology of the spleens from mice transplanted with normal splenocytes (Figure 5A, NORMAL) was different when compared to the spleens of normal, non-transplanted mice (Figure 5A, CTR). Spleens from mice transplanted with non-transduced cells and infected with *P. chabaudi*

revealed a marked reduction in cellularity (Figure 5C, CTR), close to 40% with respect to the spleens from normal, non-transplanted animals. More than 90% of these cells were immunoblasts in the lymphoid compartment. Additionally, the white:red pulp ratio was 1:3 in the spleens of mice transplanted with non-transduced cells compared to 1:5 in normal untransplanted spleens (Figure 5A, NORMAL and CTR). Haemosiderin deposits and detritus were also observed in the spleens of mice transplanted with untransduced splenocytes.

In the GFP group, the total cell population in the lymphoid compartment was 53% of the normal, untransplanted spleen (Figure 5C). Immunoblasts were the most abundant cell type (90% of the cells) with a small amount of macrophages. Apoptotic bodies and mitotic figures were distributed randomly. Additionally, the red pulp was enlarged and contained a high number of parasitised cells as well as macrophages with haemosiderin (data not shown). The white:red pulp ratio was 2:1.

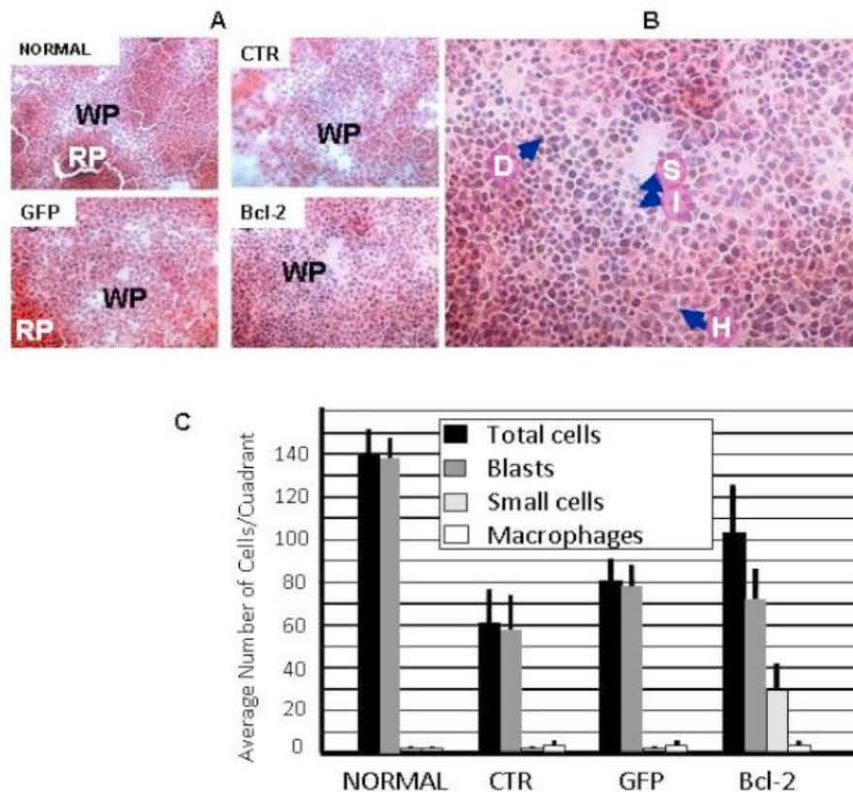


Figure 5. Histologic and morphometric analysis of the fresh spleen slices stained with haematoxylin and eosin. (A) Comparative analysis of tissues from mice spleens of different experimental groups. Histology of an animal that was not transplanted and nor infected with *P. chabaudi* (NORMAL). Histologies of animals infected with *P. chabaudi* and transplanted with: normal cells (CTR), GFP transduced cells (GFP) or Bcl-2-transduced cells (Bcl-2). Red Pulp (RP); White Pulp (WP). (B) Magnification of the micrograph labelled Bcl-2. Immunoblasts (I); small cell (S); detritus (D); haemosiderin (H). (C) Histogram of the morphometric analysis from the four groups.

Martínez-Flores et al: Enhanced splenic protection and reduction in a murine malaria model

The spleens of mice transplanted with Bcl-2-transduced cells and infected with *P. chabaudi* (Figure 5A, Bcl-2) had 77% of the cellularity seen in normal, untransplanted spleen (Figure 5C, Bcl-2). In this group a new cell population was observed that was characterised by a small size with a clear, defined central round nucleus. This new population comprised 30% of the total splenocytes, while immunoblasts and macrophages comprised 66% and 4%, respectively. As seen in Figure 5C, the number of immunoblasts and macrophages was very similar in the three groups infected with *P. chabaudi* (CTR, GFP and Bcl-2). Combined other cell types in the lymphoid compartment represented less than 1% of the total population. The white to red pulp ratio was similar to that observed in the GFP group (2:1).

We conclude that the spleens from mice transplanted with cells transformed with the Bcl-2-transduced cells infected with *P. chabaudi* retained the cytoarchitecture with diminished cellularity when compared to the spleens from normal, non-transplanted mice. In addition, a higher white:red pulp ratio was observed in the spleens of mice transplanted with transduced cells, regardless of the presence or absence of Bcl-2.

F. Transfer of transduced cells into animals infected with *P. chabaudi* reduces parasitaemia

During *P. chabaudi* infection, a variety of immunological mechanisms have been implicated in the destruction of infected erythrocytes, including the effector function of splenic macrophages. Immunosuppression linked to the activation of lymphocyte apoptosis has been described in malaria, leishmania and schistosoma parasitosis (Estaquier et al, 1997; Das et al, 1999; Mukherjee et al, 2006). Consequently, we tested the effect of Bcl-2 overexpression sub-lethally irradiated mice transplanted with transduced splenocytes and infected with *P. chabaudi* (Figure 6) on parasitaemia. Parasitaemia was

evaluated daily after day 4 and until day 7 post-parasite infection. Parasitaemia increased gradually and no difference was observed at day 4. Interestingly, on day 5 post-infection mice transplanted with splenocytes transduced with either retrovirus showed a transient 10-fold decrease in parasitaemia (solid squares and triangles, $p < 0.01$). Additionally, mice transplanted with the Bcl-2-transduced cells (solid triangles, $p < 0.05$) showed a significantly lower level of parasitaemia compared to mice transplanted with GFP-transduced cells (solid squares). However, by day 6, the protective effect of Bcl-2 was lost. We conclude that the retroviral transduction alone conferred a transient protection that was strengthened with the additional expression of Bcl-2.

IV. Discussion

The use of viral vectors for gene therapy has focused on genetic disorders, such as metabolic diseases or cancer (Grompe et al, 1995; Bilbao et al, 1999; Gomez-Navarro and Curiel, 2000; Bartsch et al, 2007; Muul and Candotti, 2007), while little work has been done utilizing the vector to treat infectious diseases. Using conventional methods, we have introduced an exogenous form of Bcl-2 cDNA into murine splenocytes with the aim of interfering with the apoptosis present in an experimental model of malaria. In spite of the relatively small percentage of cells transduced with the retroviral vector that repopulated the spleens of irradiated mice, their presence appeared to be enough to induce biological effects against *Plasmodium*, even in the absence of the Bcl-2 cDNA. Taken together, these findings suggest that the transduction procedure with the retroviral vector is sufficient to induce beneficial responses against *Plasmodium*, possibly by recruiting normal splenocytes. Similar to other studies (Del Vecchio et al, 2001; Mcmillin et al, 2005; Kinyanjui et al, 2006) that have used viral vectors, we encountered the problem of generating a high enough viral titre to elicit a robust biological response (Figure 1B, C).

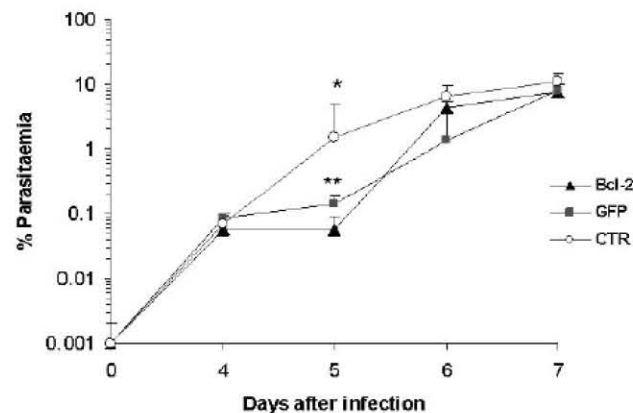


Figure 6. Course of parasitaemia with *Plasmodium chabaudi* in mice transplanted with genetically modified cells. Parasitaemia was measured as described in Materials and Methods in mice sublethally irradiated and transplanted with: normal splenocytes (CTR); GFP-transduced splenocytes (GFP) or Bcl-2-transduced splenocytes (Bcl-2). Bars represent standard deviation of the mean. Comparison CTR against GFP or Bcl-2 is represented by *, with a $p < 0.01$. Comparison between GFP and Bcl-2 is represented by **, with a $p < 0.05$.

We attempted to increase the efficiency of transduction in different ways: i) identification of the optimal time to harvest the viral particles; ii) concentration of the retroviral particles with different reagents such as hexadimethrine bromide (polybrene) or chondroitin 6-sulphate (Cepko, 2001; Del Vecchio et al, 2001; Mcmillin et al, 2005); iii) the use of a variety of re-infection protocols; iv) expansion of the transduced cell population with growth factors such as IL-2. However, the optimal combination of all these variables did not lead to transduction efficiencies above 30 % (Figure 1C).

The reconstitution protocol most frequently used in experimental models of transplantation uses the total splenocyte population, as it is believed that the interactions between the various populations of cells are required for the generation of an adequate immune response (Legorreta-Herrera et al, 1993). As such, we transplanted total splenocytes following in vitro transduction. Preliminary attempts to characterize the transduced cells suggest that they include B220⁺ cells, a minority CD3⁺ cells and other cells negative for these markers (data not shown). While it is possible that splenic repopulation with untransduced cells may contribute to the protective effects observed, we discounted this possibility based on the fact that the control group corresponds to irradiated animals transplanted with mock-transduced cells.

In spite of the low number of transduced cells used in the transplant, we were able to observe GFP positive cells in the spleen of transplanted mice 48 h (Figure 2) and even 7 days after transplantation (data not shown).

Interestingly, despite the fact that our study was designed to observe the effects of over-expression of Bcl-2, the transduction of splenocytes with the empty construct (pCLNRX-GFP) led to the increased expression of endogenous Bcl-2 in vivo 7 days post-transplant (Figures 3A, B). Taking into account that only a small number of GFP positive cells were present at day 7 after transplantation, both Bcl-2 mRNA and protein are likely generated in non-transduced cells. We postulate that transduced cells influence the splenic microenvironment such that endogenous Bcl-2 expression is stimulated. It is possible that the transduction with retroviruses expressing Bcl-2 confers an increased survival of these cells further improving their influence on the rest of the splenocytes. We also postulate that the transduced cells influence the splenic microenvironment through the secretion of paracrine factors. Alternatively, the presence of transduced cells could activate a defence response in the remaining population of splenocytes. At this point we cannot distinguish between these two possibilities. In any event, the fact that expression of transgenic Bcl-2 has only a minor contribution to the in vitro protection against H₂O₂ as well as the decreased parasitaemia observed in vivo could be due to the low transduction efficiency (Figures 4, B).

In contrast, the gross morphology and cytoarchitecture of the spleen were well-preserved only in mice transplanted with Bcl-2-transduced cells and infected with *P. chabaudi*. This effect could be appreciated macroscopically with less organ fragility and the preservation of the proportion of red pulp compared to

normal spleens. One measure of the organ damage during *Plasmodium* infection is the marked reduction in cellularity observed in the control group reconstituted with untransduced splenocytes compared to the other three groups. Additionally, a new cell population represented mainly by cells with morphology similar to mature lymphocytes was observed. Further analysis with surface markers could better define this population (Figure 5A, Bcl-2, magnified in Figure 5B).

Increasing splenic fragility is commonly observed during the progression of malaria. This event is the consequence of clearance of the parasitised erythrocytes by the spleen. However, the radiation procedure used to promote cellular homing in this animal model could have a synergistic effect on the splenic integrity. These factors could explain the increased spleen friability in all animals. However, the marked reduction of fragility observed only in the Bcl-2-transduced mice correlates with the overexpression of exogenous protein. Recently, Hanson et al, reported that increased intracellular levels of Bcl-2 confer an anti-apoptotic effect that depends on the kind of promoter employed to express Bcl-2 (Hanson et al, 2008). In this study, exogenous Bcl-2 expression is directed by the Pol-II promoter suggesting that Bcl-2 expression is limited only to replicating cells. It is noteworthy that in the GFP-transduced group endogenous Bcl-2 is already increased. Consequently, in the Bcl-2-transduced group, an additive effect of endogenous and exogenous Bcl-2 can be postulated. In summary, the biological effect of a small number of cells expressing recombinant Bcl-2 on splenic morphology and cytoarchitecture could be interpreted to favour survival and maturation of the surrounding cells. A similar effect has been reported previously in a model of endothelial cells (Enis et al, 2008).

As opposed to the white:red pulp ratio in the control group, the white:red pulp ratio in the spleens of mice transplanted with either population of transduced cells was similar to ratio seen in normal spleens. This could be interpreted as an active cellular phase of the immune response.

Interestingly, the positive effects in the splenic cytoarchitecture and in the white:red pulp ratio correlate with the homing of a small number of the transplanted transduced splenocytes expressing Bcl-2 and the appearance of a distinct cell population characterized by its small size and clear, defined central nucleus. The morphology of this latter cell population is suggestive of mature splenocytes (Figure 5).

The most dramatic biological effect observed was the 10-fold decrease in parasitaemia that implies an efficient host response against the parasite despite the small number of transplanted cells transduced with the retroviral vector. The fact that this protective effect was elicited with a small number of cells expressing only GFP suggests that the positive modulation of immune cells from the recipient mouse lead to more efficient parasite elimination. This effect correlates with the 15-fold increased expression of endogenous Bcl-2 (Figures 3A,B). Exogenous expression of Bcl-2 provided an additional 2-3-fold increase in protection (Figure 6) that correlated with a similar increased expression of Bcl-2 due to the expression

Martínez-Flores et al: Enhanced splenic protection and reduction in a murine malaria model

construct. In addition, all correlate with the histological findings that suggest an improved splenic microenvironment that could effectively induce a cellular immune response against the parasite. However, it remains unclear why protection is transient.

While gene therapy is based on the premise of introducing a specific cDNA to compensate for endogenous deficiencies, we found that in the case of experimental murine malaria, the presence of splenocytes transduced with the empty retroviral vector have a significant protective effect both *in vitro* and *in vivo*. Our observations indicate that a small number of genetically manipulated splenocytes had a significant biological effect likely due to the recruitment of normal cells. In this regard, malaria offers an interesting model in which the spleen plays a central role in the destruction of parasitised erythrocytes. This observation suggests that in parasitic infections that require efficient splenic function, empty viral vectors used in gene therapy may be able to activate host defence responses by themselves.

Author's contributions

FMF, JVG and MLH. Performed all experiments and wrote the manuscript. AZD wrote the manuscript and contributed to the analyses of the data. EGE and HVC and FMF performed and interpreted the histopathology. LCR provide the constructs and viral vectors. ECZ was responsible for the animal irradiation.

Acknowledgements

We thank to units of electronic microscopy and molecular biology (Instituto de Fisiología Celular, UNAM) for assistance. This work was supported by the following grants: PAPIIT, UNAM: IN22929607, IN214007; CONACyT: 45519-M and 52782.

References

- Bartsch H, Dally H, Popanda O, Risch A, Schmezer P (2007) Genetic risk profiles for cancer susceptibility and therapy response. *Recent Results Cancer Res* 174, 19-36.
- Bilbao G, Contreras JL, Gomez-Navarro J, Eckhoff DE, Mikheeva G, Krasnykh V, Hynes T, Thomas FT, Thomas JM, Curiel DT (1999) Genetic modification of liver grafts with an adenoviral vector encoding the bcl-2 gene improves organ preservation. *Transplantation* 67, 775-783.
- Cepko C (2001) Large-scale preparation and concentration of retrovirus stocks. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 9, Unit9 12.
- Cross CE, Langhorne J (1998) *Plasmodium chabaudi chabaudi* (as): Inflammatory cytokines and pathology in an erythrocytic-stage infection in mice. *Exp Parasitol* 90, 220-229.
- Das G, Vohra H, Rao K, Saha B, Mishra GC (1999) *Leishmania donovani* infection of a susceptible host results in cd4+ t-cell apoptosis and decreased th1 cytokine production. *Scand J Immunol* 49, 307-310.
- Del Vecchio MA, Georgescu HI, McCormack JE, Robbins PD, Evans CH (2001) Approaches to enhancing the retroviral transduction of human synoviocytes. *Arthritis Res* 3, 259-263.
- Enis DR, Dunmore B, Johnson N, Pober JS, Print CG (2008) Antiapoptotic activities of bcl-2 correlate with vascular maturation and transcriptional modulation of human endothelial cells. *Endothelium* 15, 59-71.
- Estaquier J, Marguerite M, Sahuc F, Bessis N, Aurault C, Ameisen JC (1997) Interleukin-10-mediated t cell apoptosis during the t helper type 2 cytokine response in murine schistosoma mansoni parasite infection. *Eur Cytokine Netw* 8, 153-160.
- Gomez-Navarro J, Curiel DT (2000) Conditionally replicative adenoviral vectors for cancer gene therapy. *Lancet Oncol* 1, 148-158.
- Good MF, Currier J (1992) The importance of t cell homing and the spleen in reaching a balance between malaria immunity and immunopathology: The moulding of immunity by early exposure to cross-reactive organisms. *Immunol Cell Biol* 70 (Pt 6), 405-410.
- Grompe M, Lindstedt S, al-Dhalimy M, Kennaway NG, Papaconstantinou J, Torres-Ramos CA, Ou CN, Finegold M (1995) Pharmacological correction of neonatal lethal hepatic dysfunction in a murine model of hereditary tyrosinaemia type i. *Nat Genet* 10, 453-460.
- Hanson CJ, Bootman MD, Distelhorst CW, Maraldi T, Roderick HL (2008) The cellular concentration of bcl-2 determines its pro- or anti-apoptotic effect. *Cell Calcium* 44, 243-258.
- Helmbly H, Jonsson G, Troye-Blomberg M (2000) Cellular changes and apoptosis in the spleens and peripheral blood of mice infected with blood-stage *Plasmodium chabaudi chabaudi* as. *Infect Immun* 68, 1485-1490.
- Ide LM, Javazon E, Spencer HT (2008) Transduction of murine hematopoietic stem cells and *in vivo* selection of gene-modified cells. *Methods Mol Biol* 433, 213-228.
- Khan IA, Matsuura T, Kasper LH (1996) Activation-mediated CD4+ T cell unresponsiveness during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Int Immunol* 8, 887-896.
- Kinyanjui MW, Ramos-Barbon D, Villeneuve A, Fixman ED (2006) Enhanced transduction of antigen-stimulated t lymphocytes with recombinant retroviruses concentrated by centrifugal filtration. *J Immunol Methods* 314, 80-89.
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD (1997) The release of cytochrome c from mitochondria: A primary site for bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275, 1132-1136.
- Korsmeyer SJ, Yin XM, Oltvai ZN, Veis-Novack DJ, Linette GP (1995) Reactive oxygen species and the regulation of cell death by the bcl-2 gene family. *Biochim Biophys Acta* 1271, 63-66.
- Legorreta-Herrera M, Fiallos-Leon C, Cedillo-Barron L, Martinez-Gomez F, Foster-Cuevas M, Favila-Castillo L (1993) Anti-thy-1 treated and irradiated spleen cells from (balb/c x c57bl/6) f1 mice infected with *Plasmodium chabaudi chabaudi* can transfer protection into irradiated hosts. *Parasite Immunol* 15, 143-151.
- Lopes MF, da Veiga VF, Santos AR, Fonseca ME, DosReis GA (1995) Activation-induced cd4+ t cell death by apoptosis in experimental chagas' disease. *J Immunol* 154, 744-752.
- McMillin DW, Landazuri N, Gangadharan B, Hewes B, Archer DR, Spencer HT, Le Doux JM (2005) Highly efficient transduction of repopulating bone marrow cells using rapidly concentrated polymer-complexed retrovirus. *Biochem Biophys Res Commun* 330, 768-775.
- Mitsiades CS, Hayden P, Kotoula V, McMillin DW, McMullan C, Negri J, Delmore JE, Poulaki V, Mitsiades N (2007) Bcl-2 overexpression in thyroid carcinoma cells increases sensitivity to bcl-2 homology 3 domain inhibition. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 4845-4852.
- Molto L, Rayman P, Paszkiewicz-Kozik E, Thornton M, Reese L, Thomas JC, Das T, Kudo D, Bukowski R, Finke J, Tannenbaum C (2003) The bcl-2 transgene protects t cells

Gene Therapy and Molecular Biology Vol 12, page 311

- from renal cell carcinoma-mediated apoptosis. *Clin Cancer Res* 9, 4060-4068.
- Mukherjee P, Sen PC, Ghose AC (2006) Lymph node cells from balb/c mice with chronic visceral leishmaniasis exhibiting cellular anergy and apoptosis: Involvement of ser/thr phosphatase. *Apoptosis* 11, 2013-2029.
- Muul LM, Candotti F (2007) Immune responses to gene-modified t cells. *Curr Gene Ther* 7, 361-368.
- Taylor-Robinson AW, Phillips RS (1993) Protective cd4+ t-cell lines raised against *Plasmodium chabaudi* show characteristics of either th1 or th2 cells. *Parasite Immunol* 15, 301-310.
- von der Weid T, Kopf M, Kohler G, Langhorne J (1994) The immune response to *Plasmodium chabaudi* malaria in interleukin-4-deficient mice. *Eur J Immunol* 24, 2285-2293.
- Wipasa J, Xu H, Stowers A, Good MF (2001) Apoptotic deletion of th cells specific for the 19-kda carboxyl-terminal fragment of merozoite surface protein 1 during malaria infection. *J Immunol* 167, 3903-3909.
- Wykes M, Good MF (2007) A case for whole-parasite malaria vaccines. *Int J Parasitol* 37, 705-712.
- Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X (1997) Prevention of apoptosis by bcl-2: Release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275, 1129-1132.

XIII. APENDICES

XIII.1. Cultivo de células HEK-294 (Human Embryonic kidney 293)

Las células HEK-293 (ATCC) son derivadas de epitelio del mesonefros renal humano, cuya característica principal es expresar la subunidad E1 del adenovirus tipo 5.

RECOMENDACIONES GENERALES.

Medio de crecimiento	DMEM-F12
Suplementos :	10% SFB
	1 % penicilina/estreptomicina
	1 % de L-glutamina

Confluencia recomendada para mantener el crecimiento: 70%

Confluencia para infección: 90%

Confluencia recomendada para la transfección: 50-60%

El cambio de medio para estas células, se debe de hacer cada 4 días (dos veces por semana, dependiendo de la confluencia y el color del indicador del medio).

PROCEDIMIENTO PARA TRIPSINIZACIÓN EN CAMPANA DE FLUJO LAMINAR.

- 1.- Aspirar el medio con una pipeta Pasteur de punta larga estéril.
- 2.- Agregar 5 mL de D-PBS sin calcio y agitar suavemente.
- 3.- Aspirar el D-PBS con cuidado de no tocar la capa de células.
- 4.- Agregar 1 mL de tripsina/verseno (0.5X) e incubar durante 3 minutos a 37°C.
- 5.- Golpear gentilmente un lado de la caja para despegar las células.
- 6.- Agregar 5 mL de medio y terminar de despegar con movimiento suave.
- 7.- Depositar el medio con las células en suspensión en un tubo de polipropileno cónico estéril de 15 o 50 mL.
- 8.- Centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos.
- 9.- Aspirar el sobrenadante y suspender en la cantidad deseada de medio para contar e incubar a 37°C, 100% de humedad y 5% de CO₂.

XIII.2. Protocolo de Transfección con Fosfato de Calcio en Células HEK-293 (Invitrogen Calcium Phosphate System)

MATERIAL:

- a) Puntas con filtro estériles p200µL y p1000µL.
- b) Puntas estériles p200µL sin filtro.
- c) Pipetas Pasteur de punta larga estériles.
- d) Medio DMEM/F12 suplementado con 10% de SFB y 1% de AA.
- e) Cajas de cultivo con 6 pozos.
- f) Microtubos de 1.7 ml estériles.

REACTIVOS:

1. HBSS 2X.
2. Cloruro de Calcio 2 M.
3. Agua estéril grado cultivo celular.
4. DNA libre de endotoxinas y estéril.
- 5.

Nota: La relación de ADN para una reacción de transfección es de 5 µg totales en 3×10^5 células en un volumen de 2 ml.

PROCEDIMIENTO:

- 1.- La noche anterior a la transfección, sembrar **3×10^5 células** HEK-293 en cajas de 6 pozos con medio completo.
- 2.- Al día siguiente, cambiar el medio de las células por medio fresco sin AA, 3-4 hrs antes de agregar la mezcla de transfección.
- 3.- Preparar la reacción de transfección. (Calcular la cantidad de ADN para un máximo 10 transfecciones, en un microtubo de 1.7 ml).
- 4.- Rotular un tubo A y tubo B.
- 5.- Mezclar los siguientes reactivos en los tubos correspondientes.

TUBO "A"	10 µl	X (cantidad de ADN plasmídico)
	42.6 µl	H₂O grado cultivo celular
	7.4 µl	CaCl₂ 2M.
Volumen final.	60 µl	

Nota: Mezclar cuidadosamente y de manera lenta. (Esta operación debe tomar aproximadamente entre 1 y 2 minutos).

TUBO "B": **60 µL** de HBSS 2X.

- 6.- Agregar lentamente la mezcla del tubo "A" al tubo "B", mientras este último está burbujeando. (Esto debe realizarse en más de 2 minutos para formar un precipitado fino casi imperceptible).
- 7.- Al final la mezcla del tubo B se torna turbia.
- 8.- Dejar reposar por 30 minutos.
- 9.- Después de los 30 minutos, rotular los pozos de transfección con el nombre de los plásmidos de interés.
- 10.- Agregar la mezcla de transfección de manera centrípeta.
- 11.- Incubar en medio con 3% de CO₂, por 12 horas.
- 12.- Al día siguiente cambie el medio por medio completo y fresco.

XIII.3. Ensayo de Viabilidad y Proliferación Celular por MMT (WST Cell proliferation Reagent, Roche)

MATERIAL:

- a) Multilector para absorbancia con formato de micro placa, rango de filtro de 420-480. (440nm).
- b) Pipeta multicanal.
- c) Puntas p200µl.
- d) Caja de cultivo en formato de 96 pozos, para células adherentes o en suspensión, de fondo plano y traslucido.

Concentración recomendada: 10 µl/100 µl de medio.
Absorbancia: 420-480 nm.

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Sembrar 5×10^3 células por pozo en 100 µl de medio completo.
- 2.- Incubar con una relación 1:10 de medio:WST a 37°C, con 5% de CO₂

10,000	-2 hrs.
- 20,000	-30 minutos.
- 3.- Leer y sustraer el blanco con medio + WST.
4. - Graficar.

XIII.4. Protocolo para la detección de GFP por citometría de flujo**PROCEDIMIENTO:**

- 1.- Después de 24 horas de infección, lavar el plato muy suavemente con PBS sin Ca⁺ y Mg⁺ dos veces.
- 2.- Añadir 3 ml de Tripsina/ Verseno (0,1%) e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- 3.- Añadir 3 ml de DMEM/F12 suplementado con 10% de los SFB inactivado por calor.
- 4.- Colectar el medio con células y centrifugar 4°C durante 5 minutos a 1000 RPM.
- 5.- Aspirar cuidadosamente el sobrenadante y resuspenda en 3 ml de HBS. Coloque 1 ml de la solución de suspensión en cada tubo de FACS.
- 6.- Centrifugar el tubo durante 3 minutos, y descarte el sobrenadante.
7. - Resuspenda en 1 ml de solución de fijación. Y mantener en hielo hasta el análisis.
- 8.- Leer con el láser de 488.

XIII.6. Protocolo para Células Competentes por el Método Químico con Cloruro de Calcio.**PROCEDIMIENTO:**

- 1.- En un tubo estéril con 10 ml de medio líquido LB, colocar 100 µL de bacterias, e Incubar en agitación constante a 37°C, toda la noche a 250 RPM
 - 2.- Diluir el cultivo del paso 1 con una relación 1: 100, en un tubo nuevo e incubar nuevamente.
 - 3.- Cuando el crecimiento haya alcanzado una OD a 600 nm entre 0.3 y 0.6 (visible). Mantenga en hielo.
 - 4.- Centrifugue por 10 minutos a 3500 rpm a 4°C.
 - 5.- Aspirar el medio y resuspender en 100 ml de cloruro de calcio estéril (0,1 M)
 - 6.- Dejar en hielo durante 40 minutos.
 - 7.- Centrifugar nuevamente durante 10 minutos a 3500 RPM 4°C y repetir el paso 5
- Opcional: Resuspender en el hielo frío 0,1 M CaCl (1/10 del volumen original y agregar el 10% de glicerol).
8. Resuspenda cuidadosamente y hacer alícuotas de 200µl. usar dentro las siguientes 2 horas o almacenar a -70°C

XIII.7. Protocolo para clonación de Fragmentos de DNA en plásmidos.**PROCEDIMIENTO:**

- 1.- En un tubo eppendorf estéril en hielo, agregar:
- | | |
|---------------------------|----------------|
| Buffer de ligación 5x | 4 μ l |
| DNA vector defosforilado | 1 vol. (10 ng) |
| DNA inserto | 5 vol. (50 ng) |
| T4 DNA Ligasa | 1 U. |
| H2O BM | cbp |
| Volumen final de reacción | 20 μ l |
- 2.- Agitar gentilmente y centrifugar para concentrar la mezcla en el fondo del tubo.
 3.- Incubar a T.A. por 1 hora ó 16-24 horas. a 14°C.
 4.- Transformar con 100 μ l de bacterias con la reacción de ligación. Para mejores resultados, diluir la reacción de ligación 5 veces antes de transformar por choque térmico a 37°C. 1 minuto.
 5.- Recupere las bacterias por 30 minutos en medio SOC sin antibiótico.
 5.- Cultivar en placa de LB-agar con el antibiótico de selección.

XIII.8. Preparación Mini de Plásmido basado en Lisis Alcalina

SOLUCIONES:

Solución MI :	25mM	TRIS-HCL
	10mM	EDTA
	50mM	Glucosa
Adicionar RNA 1 μ l /ml de 100 μ g / μ l. Después de esterilizar y guardar a 4°C		
Solución MII :	0.2N	NaOH.
	1%	SDS.

* mantener a T.A.

Solución MIII :	120 ml de acetato de potasio 5M pH 8.
	23 ml de Ácido acético.
	37 ml de H2O.

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Agregar 200 μ l de solución MI (Solución de resuspensión) y resuspenda en pellet.
 - 2.- Agregar 200 μ l de solución MII (Solución de lisis) e invertir 4 o 5 veces. Incube por 5 minutos a T.A.
 - 3.- Agregar 200 μ l de solución MIII (Solución de neutralización). Invertir 4 o 5 veces y colocar en hielo 5 minutos.
 - 4.- Centrifugar a 10,000 rpm/10 minutos a 4°C.
 - 5.- Recuperar con extremo cuidado el sobrenadante y depositar en un tubo eppendorf estéril.
- OPCIONAL:** Extracción 1 Vol. con Fenol:Cloroformo:Isoamílico (25:24:1).
- 6.- Agregar 2.5 vol de etanol 100% y 0.1 Volumen de acetato de sodio 3M pH 7 o pH5.
 - 7.- Precipitar a -70°C por 2 hrs. (o toda la noche a -20°C).
 - 8.- Centrifugar a 14,000 RPM por 30 minutos.
 - 9.- Decantar y agregar 1.5 ml de etanol frío al 80% y repetir el paso anterior con etanol al 70%.
 - 10.- Decantara y secar a T.A. ó a 55°C por 5 minutos.
 - 11.- Resuspender en 50 μ l de agua BM o buffer TE.
 - 12.- Cuantifique o someta a electroforesis en gel de agarosa al 1% a 80 Volts por 45 minutos.

XIII.9. Método para la concentración de retrovirus basado en conjugación con Polímeros. Protocolo de H. Spencer.

MATERIAL:

- a) Polibreno (Bromuro de Hexadimetrina, Sigma) (8 µg /ml).
- b) Sulfato sódico de condroitina CSC. (Sigma) (8µg/ml).
- c) Filtro 0,45 µm.
- d) Tubos de 50 ml.
- e) Microtubos estériles de 1.7 ml.

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Las células HEK-293 se cotransfectan de acuerdo con el protocolo estándar de fosfato de calcio.
- 2.- Recoger el sobrenadante con los viriones y filtrar por una membrana esteril de 0,45 µm y mantener a TA para su inmediato.
- 4.- Al sobrenadante que contiene los RV's, agregar 8 µg/ml y 8 µg/ml de CSC. Mezclar lentamente por agitación.
- 5.- Incubar a 37 ° C durante 20 minutos.
- 6.- Centrifugar a 9000XG durante 5 minutos y retire el sobrenadante.
- 7.- Resuspender en 0,10 vol de volumen inicial.
- 8.- Iniciar el procedimiento de infección e Incubar durante 3 horas. Opcional repetir el procedimiento.

XIII.10. Extracción de proteínas por el protocolo de RIPA

MATERIAL:

- a) Microtubos estériles de 1.5ml.
- b) Puntas estériles.

SOLUCIONES:

PBS sin calcio y magnesio.

- RIPA	NP40	0.1%
	Desoxicolato de Na	0.5%
	SDS	0.5% en PBS)

Para preparar 50ml.

PBS	49ml
NP4O	500µl
Desoxicolato de Na	2.5grs
SDS 10%	500µl

Adicionar inhibidor de proteasa (Roche mini complete) 1 tableta por cada 5 ml de solución.

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Aspirar el medio a las células y agregar 5 ml de PBS para una caja T75 y esperar 5 minutos y aspirar.

- 2.- Agregar 2 ml de PBS, recoger las células con un gendarme y trasferir a un tubo cónico de 50 ml. Lavar con 5 ml de PBS la caja y recuperar el sobrenadante.
- 3.- Centrifugar a 4°C 1,500rpm/5 min, aspirar y resuspender en 10 ml PBS.
- 4.- Decantar y resuspender nuevamente en 10 ml de PBS, centrifugar y decantar con extremo cuidado y quitar el exceso de PBS. Mantener en hielo.
- 5.- Resuspender con 500 µl de RIPA y aspirar con una jeringa de insulina hasta hacer espuma, aproximadamente. 20 o 30 veces o agitación orbital por 1 minuto.
- 6.- Centrifugar a 10,000 rpm /5 minutos.
- 7.- Colocar el sobrenadante en un tubo nuevo y guardar a -70°C.

XIII.11. Cuantificación de proteínas por microplaca por el método de Bradford modificado. (DC protein assay, Biorad)

MATERIAL:

- a) Puntas de 20 µl
- b) Puntas de 200µl
- c) Placa de 96 pozos de fondo plano
- d) Lector de placas con filtro de 655nm.
- e) Estándar con albúmina.

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Preparar la solución "A" provista por el fabricante..
1ml de solución "A" es suficiente para 40 pruebas. (25 µl/pozo o muestra)
Por cada ml de solución "A" agregar 20µl de reactivo "S"

Nota importante: Esta solución es estable para una semana.

- 2.- Preparar las diluciones del control.
Estándar igual a 1.5mg/ml.

- a) -250ng/ml
- b) -500ng/ml
- c) -750ng/ml
- d) -1000ng/ml
- e) -1250ng/ml

Leer a 520 nm en multilector y graficar.

XIII.12. Protocolo para Western-Blot

MATERIALES Y SOLUCIONES:

1. Buffer de carga para proteínas.
2. PBS.
3. Azul de coomassie.
4. Solución de destinción.
5. Tris 1.5M pH 6.8
6. Tris 1.5M pH 8.8
7. Tris 1M pH 7.6

8. Solución de acrilamida/Bisacrilamida (30%/0.85)
9. Persulfato de amonio (PSA) al10%.

Solución de acrilamida/Bisacrilamida (30%/0.8%) 200 ml

60gr de acrilamida
1.6gr de Bis-Acrlamida

Esterizar por filtración y almacenar a 4°C

Buffer de carga 6X

TRIS pH 6.8 0.5 M	7 ml
SDS al 10%	1gr
Glicerol	3ml
B-Mercapto-Etanol	600µl
Azul de bromefenol	1.2 mg

Electroforesis de proteínas

- 1.- Limpiar los cristales, peines y separadores con metanol. Armar la cámara de electroforesis verificando que no presente fugas.
- 2.- Preparar el gel separador de 30 ml.

Gel separador

	15%	10%	7.5%
AGUA	11.95ml	14.45ml	16.95ml
TRIS pH 8.8	3.75ml	3.75ml	3.75ml
SDS 10%	300µl	300µl	300µl
Acrlamida/Bis 30%	15ml	10ml	7.5ml
1.5 5 DE PA	1.5ml	1.5ml	1.5ml
TEMED	15µl	15µl	15µl

Vaciar en la cámara de electroforesis, utilizando una jeringa de 20ml y preparar el gel concentrador:

Gel concentrador

Tris6.8 ph	5ml	10ml
SDS 10%	1.25ml	2.5ml
DDW	50µl	100µl
ACRILAMIDA	3ml	6ml
PSA	670µl	1.34ml
TEMED	25µl	50µl
	2.5µl	5µl

- 3.- Cargar el gel concentrador con un grosor aproximado de 1.5 a 2 cm., colocar el peine y esperar la polimerización.
- 4.- Una vez polimerizado, agregar el buffer de corrida y limpiar los pozos con una jeringa.
- 5.- Agregar el buffer de carga (Loemli) a la proteína necesaria y desnaturalizar por calor por 5 min a temperatura de ebullición y mantener en hielo.
- 6.- Cargar y someter a electroforesis 10mA por 2 a 3 hrs.

Solución de Electroforesis

TRIS	1X	10X
Glicina	6.05 grs.	60.5 GRS
SDS	28.8 Grs	288 GRS
	2 Grs	20 GRS

AGUA-E	2 LITROS	2L
--------	----------	----

7.- Proceder a la tinción o a la transferencia.

Tinción de Gel

8.-Colocar el gel en una solución de Coomassie por 20 min ó toda la noche.

Solución de Coomassie:

Azul de coomassie R-250	0.125 g
Metanol	200ml
Ácido acético	35ml
Agua desionizada para	500ml

9.-Desteñir con solución desteñidora caliente.

Solución de Distinción:

Ácido Acético	10ml	100ml
Metanol	10ml	100ml
Agua desionizada	80ml	800ml

Transferencia de proteínas a partir de gel de Acrilamida.

MATERIAL:

- a) Membrana PVDF.
- b) Buffer de transferencia.
- c) Hojas de papel filtro estériles.
- d) Recipientes de plástico estériles.
- e) Tubos cónicos de 50 ml.
- f) Bolsa Ziploc.

Buffer de transferencia:

Tris HCl	3.8 grs
Glicina	18grs
Aforar a	1000ml
Agregar 250ml de metanol	

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Preparar la membrana PVDF.
 - 2.- Hidratar en metanol al 100% y mantener el buffer de transferencia (BT).
 - 3.- Hidratar el papel filtro en BT prepara el Sándwich en el siguiente orden; de abajo hacia arriba en la cámara de transferencia semi-seca.
 - 4.- Papel filtro.
 - 5.- Membrana.
 - 6.- Gel.
 - 7.- Papel filtro.
- Mantener húmedas y embebida en BT y eliminar las burbujas.
Cerrar la cámara y someter a electroforesis por 30 minutos 10 Volts. Secar la membrana a T.A. o 3 minutos a 45°C y guardar en medio el papel filtro a 4°C.

Inmunoblot

MATERIAL:

- a) Bolsa de plástico
- b) Leche baja en grasa
- c) AB primario
- d) AB secundario
- e) Tween 20.
- f) TBS.

XIII.13. Protocolo de Extracción de Esplenocitos de Ratón.

MATERIAL.

- a) 2 pinzas Kelly.
- b) 2 pinzas de disección de punta roma.
- c) 3 jeringas.
- d) Una caja Petri de vidrio.
- e) 3 tubos de 50 o 15ml.
- f) Puntas estériles con filtro.
- g) Pipetas Pasteur.

SOLUCIONES.

- 1. PBS pH 7.4.
- 2. MEDIO completo (RPMI-1240 suplementado con 10% SFB, AA 1%)

PROCEDIMIENTO

Nota: En quirófano o en Campana de flujo laminar

- 1.- Sacrificar al ratón por dislocación cervical.
 - 2.- Asepsia y antisepsia de la región abdominal y costal izq.
 - 3.- Con una pinza Kelly, levantar la piel del abdomen y cortar con unas tijeras de iris.
 - 4.- Levantar la capa muscular con mucho cuidado y cortar nuevamente para llegar a la cavidad abdominal.
 - 5.- Diseccionar un extremo cuidando el epiplón y aislar el bazo del tejido graso. Aislar con una gasa estéril y mojada con solución salina.
 - 5.- Cortar el pedúnculo gastro-esplénico y colocar el bazo en solución salina.
- Preparar en campana de flujo laminar lo siguiente
- 6.- En un caja Petri estéril, con dos agujas de jeringa, perforar en ambos extremos distales el bazo y exprimir la pulpa con una aguja hasta la cápsula.
 - 7.- Recuperar las células en suspensión en tubo cónico de 15ml y centrifugar a 2,500 rpm/5 minutos a 4°C.
 - 8.- Centrifugar a 2,500 rpm/2 minutos y resuspenda en 1ml de RPMI-1640 con 10% de SFB y 1% de AA.
 - 9.- Proceder a incubar a 37° mientras se prepara la infección inmediata.

XIII.14. Infección de esplenocitos por RV.

Nota: El manejo de estas herramientas requieren la aplicación de reglas para el manejo de biológicos tipo IIB.

NORMATIVIDAD BASICA PARA MANEJO DE RETROVIRUS.

- I. Protegerse con guantes, cubre-bocas, bata y lentes protectores.
- II. Minimizar el riesgo de contaminación de objetos.
- III. Manejo en campana de flujo laminar.
- IV. Esterilización en campana de flujo laminar por 30 minutos después de haber trabajado, así como de los implementos.
- V. Disposición de la basura para su posterior incineración o esterilización.
- VI. Inactivar el medio y líquidos con cloro al 5%.

MATERIAL.

- a) Cajas de cultivo con 4 pozos de 6 mm de diámetro.
- b) Medio de cultivo completo.
- c) Puntas con filtro estériles p20, p200 y p1000.
- d) Tubos cónicos estériles de 15ml.
- e) Microtubos de 1.5 ml, estériles.
- f) Polibreno en PBS.

PROCEDIMIENTO.

- 1.- Mezclar el volumen requerido de medio de las partículas virales (1vol:1vol).
- 2.- Agregar 8 µg/ml de PB y 10 ng de sulfato de condroitina. Mezclar gentilmente y mantenga en incubación a temperatura ambiente por 30 minutos.
- 3.- Centrifugue las células por 5 minutos a 1500 RPM y aspire el sobrenadante.
- 3.- Resuspenda las células con el sobrenadante y mezcla de Polimeros.
- 4.- Agregue un volumen de medio fresco con 10 ng/mL de α L-2. Mantenga en condiciones normales de cultivo por 24 horas,

XIII.15. Protocolo de aislamiento de RNA a partir de células en tejido por el método de Trizol

NOTA: Cuando la extracción tiene fines diagnósticos, este procedimiento se debe llevar a cabo en campana de flujo laminar. Durante todo el procedimiento los viales deben conservarse en hielo y sacarlo de él el menor tiempo posible. Hay que usar siempre guantes y bata, evitando tocar la piel, el cabello o superficies contaminadas.

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Adicionar 500 µl Trizol a cada 5 millones de células. Raspar con un gendarme si se trata de células adherente o centrifugar previamente si son células en suspensión.
- 2.- Añadir 100 µl de cloroformo (.5 vol de trizol) y agitar vigorosamente por 2 minutos. Dejar 2-3 min. Reposar en hielo.

- 3.- Centrifugar a 12,000 rpm/15 minutos a 4°C, (rango permitido: 2-8°C).
- 4.- Pasar la fase acuosa superior a un tubo limpio (tres fases: roja-proteína; intermedia-ADN; superior acuosa-ARN). Es preferible dejar un poco de sobrenadante a intentar obtenerlo todo, pues con ello hay riesgo de contaminación con proteínas o ADN.
- 5.- Añadir un volumen de isopropanol por cada volumen de sobrenadante obtenido para precipitar el ARN en la fase acuosa precipitar a -70.
- 6.- Centrifugar a 12,000 rpm/10 minutos a 4°C.
- 7.- Inmediatamente después de centrifugar, descartar directamente el sobrenadante volteando el tubo. Lave el pellet con 1 ml de ETOH de 75% por ml de TRI reagent inicial empleado. Agite con la mano.
- 8.- Centrifugar a 9,500 rpm/5 minutos a 4°C. Decantar el sobrenadante de la misma manera con todo cuidado (seguir observando la pastilla).
- 9.- Secar el pellet 5-10 minutos o en vacío **sin centrifugación**.
- 10.- Disolver en 20-40 µl de H₂O tratado DEPC 0.05%.
- 11.- Almacenar a -70°C. Posteriormente alicuotar según convenga.

XIII:16. Gel desnaturalizante al 1% para ARN.

Advertencia: La formamida y el formaldehído son fuertes irritantes de mucosas y piel. Es importante usar guantes, cubrebocas y no exponerse directamente a sus vapores.

REACTIVOS.

1. Agarosa.
2. Agua BM+DEPC.
3. Formamida.
4. Formaldehído.
5. Mops 10X.
6. ADN-LB 5X

PROCEDIMIENTO.

- 1.- Aplicar solución anti-RNAsas con una gasa estéril sobre todo el material que estará en contacto con el gel (cama, peines, barreras, etc.)
- 2.- Disolver 0.3 gr de agarosa en 26 ml de H₂O BM. Fundir por 30 segundos en microondas.
- 3.- Enfriar la agarosa fundida hasta 60°C y agregar 3 ml de MOPS 10X.
- 4.- Agregar 1.5 ml de formamida
- 5.- Adicionar 3 ml de formaldehído y agitar gentilmente.
- 6.- Vaciar en un molde previamente nivelado e incorporar el peine. Esperar a que se solidifique por 20 minutos.
- 7.- Preparar el buffer de carga con:

Formamida		5 µl
Formaldehído	2 µl	
MOPS		1 µl
Buffer de carga 5X		1 µl
Bromuro de Etidio		0.15 µl

NOTA: Puede hacerse una mezcla de estas mismas cantidades a manera de stock, multiplicando cada cantidad por el número de reacciones que se quiera tener preparadas.

- 8.- Adicionar MOPS 1X a la cámara de electroforesis y cargar 2 µl de RNA y 8 µl de carga para RNA.

9.- Someter a electroforesis a 60-70 volts por 90 minutos.

Buffer de carga para ADN 5X.

50 % glicerol	5 ml
1 ml EDTA	20 μ l 0.5 M
0.4% azul de bromofenol	0.04 gr
0.4% xileno cianol	0.04 gr

XIII.17. Reacción en cadena de la polimerasa a partir de reversotranscripción (RT-PCR)

NOTAS: Al sacar el RNA de su temperatura de almacenamiento (-70 °C), debe ser siempre manejado en hielo para evitar su degradación. Todo el material debe ser estéril y el agua, de usarse, tratada con DEPC. Conviene emplear puntas de 10-20 μ l con filtro especial para PCR.

PROCEDIMIENTO:

1.- Programar el termociclador con los siguientes segmentos:

Seg. 1	37°C	30-45 min.
Seg. 2	95°C	5 min.

1 ciclo, que puede seguirse de un segmento de refrigeración a 4°C

2.- En el termoblock, calentar a 65 °C por 5 minutos:

10 μ l RNAm
<u>1 μl</u> Hexameros al azar.
11 μ l

3.- Mientras tanto, mezclar en otro vial:

4 μ l	1 st Strand Buffer 5X
0.5 μ l	dATP
0.5 μ l	dCTP
0.5 μ l	dGTP
0.5 μ l	dTTP
2 μ l	Ditiotreitol (DTT)
<u>1 μl</u>	RVT SuperScript 200 U/ μ l (Gibco BRL)
9 μ l	

4.- Pasados los 5 minutos, unir el contenido de los dos viales resuspendiendo con cuidado (volumen total: 20 μ l) y manteniéndolos en hielo.

5.- Con la reacción en un solo tubo, introducir en el termociclador e iniciar el programa ya descrito.

6.- El producto puede ser almacenado a -20°C o empleado inmediatamente para una reacción de PCR.

XIII. 18. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

NOTAS: Aunque el DNA es menos lábil que el RNA, debe ser siempre manejado en hielo para evitar su degradación. Todo el material debe ser estéril y el agua, grado Biología Molecular. Conviene emplear puntas de 10-20 μ l con filtros especiales para PCR.

PROCEDIMIENTO:

1.- Programar el termociclador con los siguientes programas unidos en orden:

Prog. 1: 1 ciclo

Segmento 1 94°C 2 min.

Prog. 2: 30 ciclos

Seg. 1 94°C 15 seg. Desnaturalización

Seg. 2 60°C 30 Seg. Alineamiento

Seg. 3 72°C 1 min Polimerización

Prog. 3: 1 ciclo

Seg. 1 72°C 7 min. Polimerización final

Puede unirse a un programa de refrigeración a 4°C.

2.-Preparar una reacción conteniendo:

5 µl PCR Buffer 10X Gibco BRL (con 1.5 mM MgCl₂)

1 µl MgCl₂ 25 mM (Conc. final de Mg: 2 mM)

1 µl dATP

1 µl dGT

1 µl dCTP

1 µl dTTP

1.5 µl oligonucleotido up

1.5 µl oligonucleotido Down

5 µl 5 -10 ng de Template de DNAg o DNAc

0.5 µl 2 Unidades de enzima TAQ DNA polimerasa

31.5 µl H₂O BM

3.- Introducir el vial en el termociclador e iniciar los programas descritos al principio.