

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE FARMACIA**

**MODIFICACION DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS
PRODUCTORAS DE NADPH+H⁺ EN RATONES INFECTADOS
CON *Plasmodium berghei* Y TRATADOS CON CLOROQUINA**

Trabajo presentado por la Fctca. María C. Raddatz G.
para su Ascenso a la categoría de Profesor Asistente, conforme al Reglamento de
Ubicación y Ascenso del Personal Docente y de Investigación de la
Universidad Central de Venezuela

Caracas, Mayo 2011

**MODIFICACION DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS PRODUCTORAS DE NADPH+H⁺
EN RATONES INFECTADOS CON *Plasmodium berghei*
Y TRATADOS CON CLOROQUINA**

RESUMEN

La actividad metabólica de los eritrocitos y hepatocitos infectados con *Plasmodium*, así como de las células fagocíticas del hospedador, como respuesta del sistema inmune a la presencia de los parásitos, son responsables del estrés oxidativo (EO) que acompaña a la infección malárica y que está involucrado en el desarrollo de complicaciones clínicas generadas en el hospedador vertebrado durante el curso de la enfermedad. Ante este desbalance redox, tanto los parásitos, como las células del hospedador, activan sus mecanismos de defensa en base a la modulación de las actividades de las enzimas de defensa oxidativa de primera línea catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidada (GPx) y glutatión reductasa (GR), los metabolitos glutatión (GSH) y tiorredoxina (TRx), y las enzimas productoras de NADPH, como cofactor indispensable para el control del EO. Dentro de este contexto, en este trabajo estudiamos la modificación de los sistemas enzimáticos productores de NADPH del tejido hepático, y los eritrocitos del hospedador, como consecuencia de la infección de ratones por *Plasmodium berghei* y del tratamiento con el fármaco antimalárico cloroquina (CQ). Específicamente, determinamos la actividades de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa eritrocítica y hepática (G6PDH_E y G6PDH_H), la 6 fosfogluconato deshidrogenasa hepática (6PGDH_H) y la glutamato deshidrogenasa e isocitrato deshidrogenasa hepáticas (GDH e IDH) dependientes de NADP, utilizando el modelo murino de infección de ratones INH con *Plasmodium berghei* cepa ANKA (*sensible a CQ*). Se incluyeron los siguientes grupos experimentales: Controles Sanos, Controles Sanos tratados con CQ (CQ 25 mg/Kg), Grupo Infectado con baja parasitemia (< 30%), Grupo Infectado con alta parasitemia (>70%), Grupo infectado con baja parasitemia y tratado con CQ, Grupo infectado con alta parasitemia y tratado con CQ. A los animales de cada grupo, se les extrajo sangre por cardiopunctura directa y se extrajo el hígado, para la determinación de la actividad de las enzimas sujetas a estudio, por espectrofotometría UV, usando el coeficiente de extinción molar del par NADP/NADPH, a 340nm. La infección por *P.berghei*, aumentó la actividad de las enzimas G6PDH_E, G6PDH_H y 6PGDH_H en animales con alta parasitemia, también disminuyó la actividad de la IDH_H, en los diferentes grados de infección y no presentó modificación de la

actividad de la GDH_H. El aumento de la G6PDH_E, es atribuible a la presencia de los parásitos hospedados en estas células, lo cual se confirma por la disminución de actividad G6PDH_E observada por el tratamiento con CQ en los animales con alta parasitemia. El aumento, en mayor proporción, observado para la actividad de las G6PDH_H y 6PGDH_H, indica que, durante la infección, el tejido hepático contribuye con una mayor producción de NADPH, como poder reductor frente al EO, principalmente, por la activación de las enzimas que participan en el segmento oxidativo del ciclo de las pentosas fosfato (CPF), sin la participación del sistema enzimático IDH/GDH. Por su parte, la inhibición de la actividad de las G6PDH_H y 6PGDH_H, observada durante el tratamiento con CQ, de los animales infectados con altas parasitemias, parece deberse más a la disminución del EO que generan las formas eritrocíticas del parásito, más que a un efecto directo del fármaco sobre la enzima. El efecto inhibitorio producido por la infección sobre la IDH_H, probablemente se relaciona con la inactivación de la enzima por mecanismos de nitrosilación de grupos SH promovidos por el radical peroxinitrito, elevado durante la infección como consecuencia de la disminución de la actividad de SOD y aumento de la producción de óxido nítrico (NO), tal y como ha sido reportado en otros tejidos modulados por EO. El efecto inhibitorio de la CQ sobre la IDH_H, se observó, tanto en presencia como en ausencia de la infección, lo que apunta hacia un efecto directo del fármaco sobre la isoforma hepática. Con respecto al comportamiento de la GDH_H, en los animales infectados con *P.berghei* y tratados con CQ, se demuestra un grado de sensibilidad de la enzima por el fármaco promovida por factores propios de la infección, en los diferentes grados de parasitemia, lo que representa una diferencia importante con la actividad reportada para la isoforma de GDH presente en los parásitos. Esto marca diferencias entre los sistemas enzimáticos de parásito y hospedador con miras al desarrollo racional de nuevos fármacos con actividad antimalárica. Los resultados discutidos, muestran una nueva dimensión de los efectos de la CQ, que mantienen la vigencia de su uso, a pesar de que el parásito haya desarrollado mecanismos de resistencia al fármaco. La posibilidad de su uso, en combinación con nuevos fármacos, permitiría la acción antimalárica del nuevo compuesto manteniendo la actividad inmunomoduladora y metabólica de la CQ.

I. INTRODUCCIÓN

1. LA MALARIA

La malaria o paludismo es un problema mundial grave que afecta de forma inaceptable la salud y el bienestar económico de las comunidades más pobres del mundo. A finales del año 2006, la malaria despunta como problema de salud pública en 109 países, habitados por una población de 3,300 mil millones de personas, lo que representa más de un 40% de la población mundial. Los informes emanados de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para ese año describen una incidencia global de 1,5 millones de muertes como consecuencia de un total de 500 a 580 millones de casos clínicos reportados de la enfermedad (WHO, 2008).

El paludismo es una enfermedad infecciosa aguda y crónica, con carácter endemo-epidemiológico, producida por protozoarios del género ***Plasmodium*** y transmitida por mosquitos infectados del género ***Anopheles***. Se caracteriza clínicamente por fiebre de diversos tipos (intermitentes, remitentes, tercianas, cuartanas), esplenomegalia y la presencia del parásito en la sangre, donde este invade los eritrocitos y los destruye causando anemia. También presenta complicaciones graves de diferente naturaleza que pueden ser mortales tales como hematológicas, pulmonares, hepáticas, renales y malaria cerebral (Rey, 1991; González y col., 2000). Del parásito protozoario responsable de la infección en el humano se conocen cuatro especies: ***Plasmodium falciparum***, ***Plasmodium vivax***, ***Plasmodium malarie*** y ***Plasmodium ovale***, siendo el *P.falciparum* la especie más agresiva responsable por la mayor parte de los casos mortales.

Las características de transmisión y enfermedad por paludismo son muy variables entre regiones, incluso en un mismo país, como resultado de la variación entre los parásitos maláricos y los mosquitos vectores, las condiciones ecológicas que afectan la transmisión del paludismo y factores socioeconómicos como la pobreza y el acceso a servicios eficaces de salud y prevención (WHO; 2008).

La mayor parte de la carga de la enfermedad, así como la mayoría de las muertes, ocurre en el África subsahariana, mientras que el resto de los casos se distribuye principalmente en el sureste asiático, Oceanía y las zonas tropicales y sub-tropicales de América. El paludismo reapareció o se intensificó en el sureste de Asia y en varios países de Asia central durante la última década, cuando se interrumpieron las campañas de erradicación. Esta es una enfermedad con una dimensión económica y social bastante alta, debido a que el mayor riesgo a la malaria lo sufren las poblaciones pobres o marginalizadas tales como minorías étnicas o gente desplazada como resultado de conflictos civiles. Se ha estimado que la carga económica sobre los sistemas de salud en las zonas endémicas también es extremadamente alta, causando una reducción del 1,3% en la tasa de crecimiento económico anual de los países endémicos que, en su mayoría, corresponden a países pobres del continente africano (WHO, 2008).

La carga malárica difiere de acuerdo a la edad. Casi todas las muertes ocurren en niños africanos menores de 5 años, los adultos mayores tienen un riesgo reducido debido al desarrollo de cierto grado de inmunidad a la enfermedad como resultado de la exposición continua. Fuera de África, la morbi-mortalidad a causa de la malaria, se extiende igualmente en niños y adultos (Sachs y Malaney, 2002).

Pese a los diferentes esfuerzos internacionales y regionales llevados a cabo para la erradicación de la malaria, esta persiste como problema de salud pública global debido a la falla en lograr una adecuada cobertura con tratamientos con drogas antimaláricas y uso de insecticidas adecuados para la eliminación de vectores, debido a: La falta de recursos para sostener programas de control de vectores, la resistencia desarrollada por los mosquitos a los insecticidas, la pobreza de las poblaciones expuestas en las áreas endémicas, la falta de disponibilidad de vacunas preventivas, la resistencia de los agentes causales al tratamiento con antimaláricos convencionales y el conocimiento incompleto de los mecanismos biológicos del parásito y de la respuesta del hospedador frente a la infección malarica (WHO, 2008). Además, la falla o carencia de recursos humanos y financieros para el adecuado monitoreo, predicción, detección y desarrollo de estrategias de respuesta epidémica rápida, hacen del control de la malaria un reto que demanda políticas regionales eficientes y estrategias internacionales coherentes y coordinadas (WHO, 2002).

En América, se da la transmisión de la enfermedad en 21 países del continente, poniendo en situación de riesgo a una población de 293 millones (35,2%) de personas del total de la población de la Región. En el continente, las áreas malarígenas se han dividido en tres regiones:

1. Altiplano Mejicano, donde la transmisión ocurre principalmente por el vector ***Anopheles quadrimaculatus*** y ***Anopheles pseudopunctipenis***.
2. América Central, las Antillas y costa norte de Colombia y Venezuela, en donde la transmisión está predominantemente a cargo del vector ***Anopheles albimanus***.
3. El resto del continente Sur Americano, en donde el vector principal es el ***Anopheles darlingi***.

Para el año 2000, el 86,8% de los casos reportados de malaria en Sudamérica se concentraron en nueve países: Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Guayana Francesa, Guyana, Perú, Surinam y Venezuela (OPS, 2001).

2. LA MALARIA EN VENEZUELA

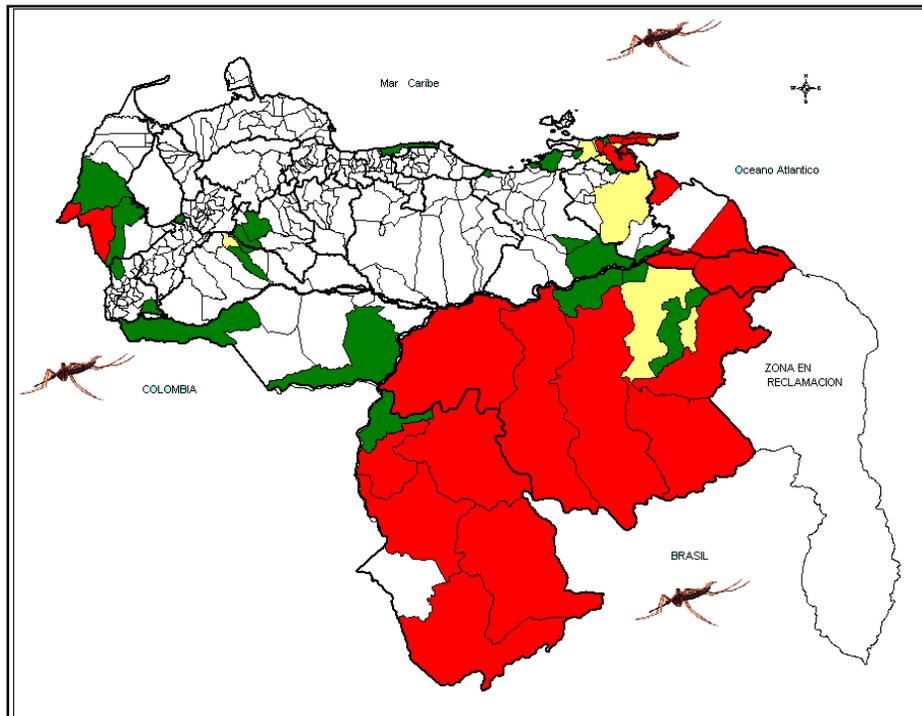


Fig. 1: **Áreas de Riesgo Malárico en Venezuela:** ○ Área de malaria erradicada; ● Área de riesgo Moderado; ● Área de riesgo moderado con posibilidad de aumentar; ● Área de alto riesgo (Div. de Epidemiología, Dir. de Vigilancia Epidemiológica Sanitario Ambiental, MPPS; 2005).

En Venezuela, los focos activos de malaria se ubican en tres áreas principales (Fig 1):

- ◆ Área Occidental (Oeste de Apure, Barinas, Táchira, parte de Mérida y Zulia), donde el vector local está representado por el *Anopheles nuñeztovari*, exofílico, de difícil control con insecticidas residuales.
- ◆ Área Meridional (Sur Este de Apure, Bolívar, Delta Amacuro y Amazonas), donde el vector más encontrado es el *Anopheles darlingi*, siendo su principal problema la

accesibilidad a los focos maláricos debido a la presencia de grupos indígenas nómadas, los asentamientos humanos con condiciones precarias de vivienda con pocas superficies rociables y continuos movimientos de población relacionados a la actividad minera. En esta área se registra el mayor número de casos originados por *P.falciparum* en el país.

- ◆ Área Oriental (Anzoátegui, Norte de Monagas y Sucre), donde el vector principal es el *Anopheles aquasalis*. Este foco, reactivado desde 1984, es importante debido al aumento de los casos causados por *P.vivax*.

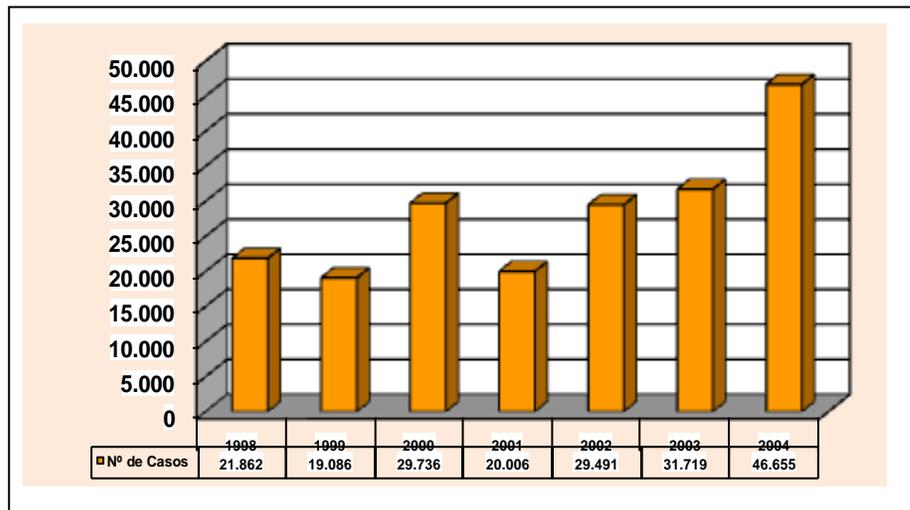


Fig.2: Morbilidad por Malaria en Venezuela desde 1998 al 2004 (OPS, Malaria in Venezuela. 2005).

La morbilidad por malaria en Venezuela (Fig. 2) representa el 2,11% de los casos reportados para la totalidad de la Región de las Américas. En el país, el agente causal más frecuente es el *P.vivax*, siendo el responsable de más del 70% de los casos de malaria (Fig.3) (MPPS, 2005). En Venezuela, después de varias décadas de aplicación de programas para la erradicación de la malaria, se ha logrado prácticamente eliminar los casos de mortalidad por la infección plasmodial, no hubo reportes de casos fatales desde 2000 (Fig 4).

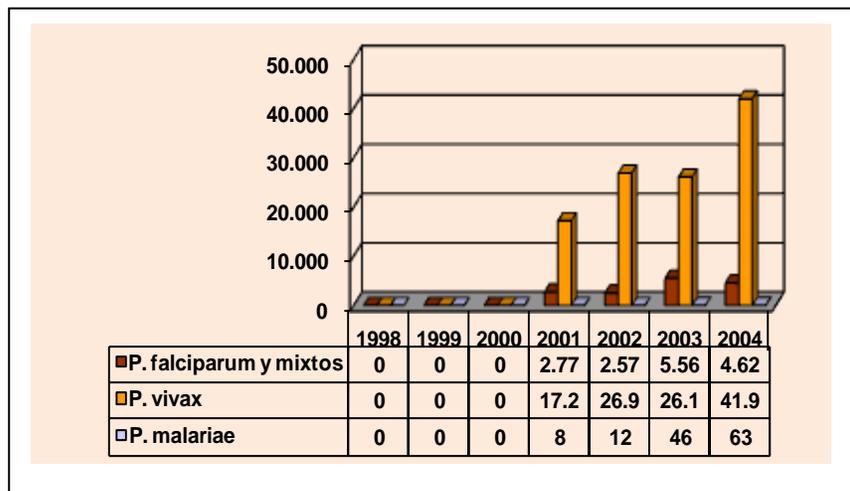


Fig. 3: **Distribución de la Morbilidad por Malaria en Venezuela de acuerdo a la especie del *Plasmodium*** (OPS, Malaria in Venezuela. 2005).

Sin embargo, la OMS reportó 37.062 casos en el año 2006 y la estadística nacional elevó a 32.250 casos para la semana epidemiológica 39 del año 2007. Siendo las zonas más afectadas la de los Estados, Bolívar, Sucre, Amazonas y Delta Amacuro, que concentran el 95,5% de la morbilidad, en conjunto (OMS, 2008; MPPS, 2007)

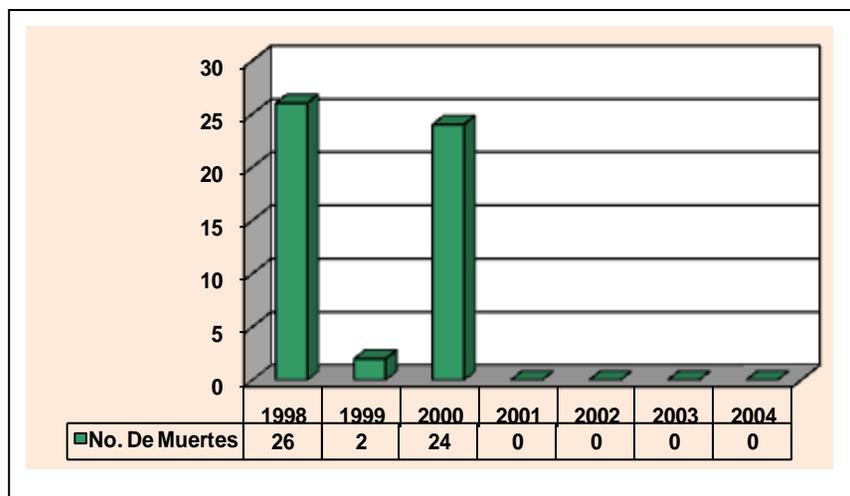


Fig.4: **Mortalidad por Malaria en Venezuela 1998 – 2004.** (OPS, Malaria in Venezuela. 2005).

La única herramienta disponible actualmente para el control y tratamiento de la malaria se basa en el uso de quimioterapia antimalárica, pero la misma descansa sobre un limitado

número de principios activos como son la cloroquina, amodiaquina, primaquina, antifolatos (clorproguanil, dapsona), artemisina y sus combinaciones. Sin embargo, la vertiginosa expansión del fenómeno de la resistencia a las drogas limita su uso, por lo que es cada vez más pertinente el desarrollo de nuevas estrategias para el diseño de los antimaláricos del futuro.

Sin duda, el conocimiento de la biología de los parásitos causantes de la malaria, de las vías metabólicas de los mismos y de las relaciones que este establece con sus hospedadores, es imprescindible para alcanzar este objetivo. Este trabajo se enmarca dentro de este contexto. De una manera directa, se enfoca hacia el estudio de las modificaciones de algunas actividades enzimáticas críticas en la regulación del balance redox que genera la infección del *Plasmodium* al hospedador vertebrado y la posible relación entre las modificaciones de estas vías metabólicas en el hospedador y el efecto antimalárico de la cloroquina.

3. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

Antes de exponer los objetivos generales y específicos de este trabajo es oportuno abordar brevemente algunos aspectos que conforman el marco teórico de esta investigación, como son:

1. Ciclo de Vida del Plasmodium
2. Malaria y Estrés Oxidativo
3. Mecanismos de Defensa Contra el Estrés Oxidativo
4. Estrés Oxidativo y Manifestaciones Clínicas de la Enfermedad
5. Tratamiento Antimalárico con Cloroquina y Estrés Oxidativo

3.1. Ciclo de Vida del *Plasmodium*

La infección malárica comienza con la picadura de un mosquito hembra del género *Anopheles*, el cual inocula esporozoitos (formas inactivas) del parásito que, siendo llevados en sangre, invaden los hepatocitos, dando lugar a la fase pre-eritrocítica o hepática de la enfermedad. Durante esta fase, después de uno a varios días, los parásitos se replican y maduran para formar trofozoitos, los cuales se dividen en muchos merozoitos (esquizogonia) que erupcionan desde los hepatocitos e infectan los eritrocitos, dando lugar al ciclo eritrocítico que se caracteriza por una multiplicación rápida asexual de estadios bien diferenciados (anillos, trofozoitos, esquizontes, merozoitos), responsables de las manifestaciones clínicas de la malaria (fiebre, anemia, hepato y esplenomegalia). En la infección con *P.vivax* o *P.ovale*, algunos esporozoitos exoeritrocíticos, conocidos como hipnozoitos, pueden mantenerse "silentes" en la fase hepática por meses o años y al romperse reinician el ciclo eritrocítico, siendo responsables de las recidivas de la enfermedad.

Algunos merozoitos evolucionan a formas sexuales o gametos que son ingeridos por el mosquito, mediante la toma de sangre de un hospedador infectado. Dentro del mosquito los gametos se fusionan formando un cigoto que se alarga y se transforma en un ooquinetto. El ooquinetto penetra las paredes del estómago del mosquito y se transforma en un oocito, el cual da lugar a la formación de miles de esporozoitos. Cuando se rompe el oocito, los esporozoitos migran hacia las glándulas salivales del *Anopheles*, pudiendo así ser inyectados, durante la picadura, al hospedador vertebrado. De esta manera se completa el ciclo vital del *Plasmodium* (Fig. 5) (Parra, 1995; Collins y Jeffrey, 1996).

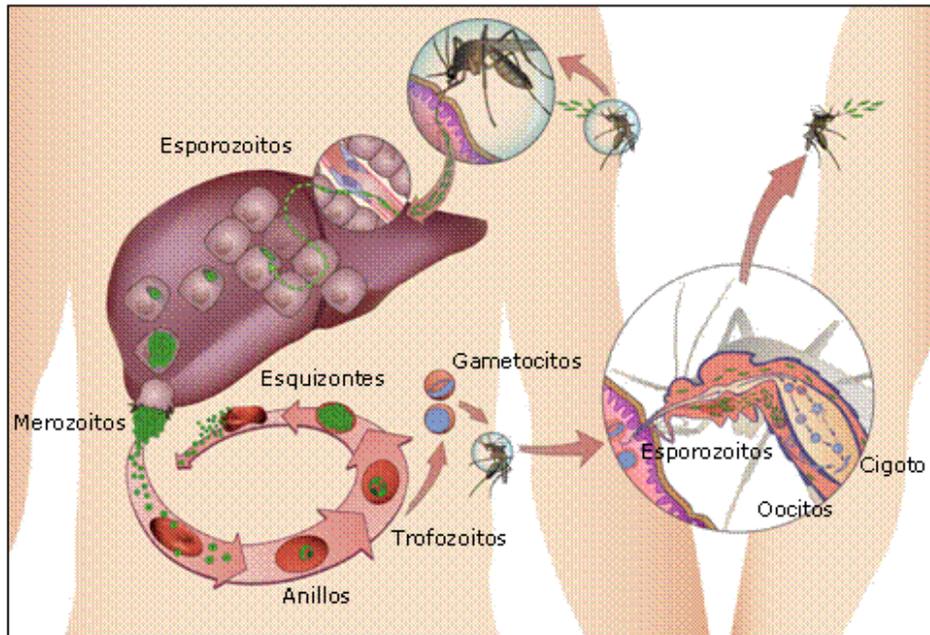


Fig.5: **Ciclo de Vida del *Plasmodium***. (Tomado de: <http://sciencetrio.wordpress.com/2009/07/31/malaria-in-the-modern-world>)

3.2. Malaria y Estrés Oxidativo

Los estadios intracelulares del *Plasmodium*, se desarrollan en un ambiente rico en especies reactivas de oxígeno (ERO) los cuales son responsables de la generación del estrés oxidativo (EO) que acompaña a la infección malárica. En primer lugar, como consecuencia de la alta actividad metabólica desarrollada por el parásito debido a su rápido crecimiento y multiplicación dentro del hospedador, se generan grandes cantidades de productos tóxicos, principalmente debido a la degradación de hemoglobina dentro del eritrocito, que de no ser depurados pueden atentar contra la viabilidad del propio parásito. Por otra parte, la actividad metabólica de los propios eritrocitos y hepatocitos infectados, así como la actividad de las células fagocíticas del hospedador (como respuesta del sistema inmune a la presencia de los parásitos), generan un medio extracelular agresivo extremadamente oxidativo en torno a las células hospedadoras parasitadas, que se traducen en una alteración del estado de oxido-reducción (Ohno y col., 1982_a; Ohno y col.,

1982_b; Siddiqi y col., 1999; Becker y col., 2004). Sin embargo, pese a que la presencia de las alteraciones en el metabolismo redox durante la infección representa un importante mecanismo de defensa contra el parásito, estas alteraciones actúan sobre las propias células del hospedador (especialmente sobre las células endoteliales y hepatocitos) pudiendo así, contribuir al desarrollo de la mayoría de las manifestaciones clínicas de la enfermedad. En este sentido, se ha demostrado que el EO aumentado sobre los eritrocitos puede contribuir a la hemólisis y al desarrollo de la anemia y se han presentado evidencias que señalan al EO como un factor importante en la clínica y en la fisiopatología, así como en muchos de los desenlaces fatales de la enfermedad y, al mismo tiempo, representa uno de los blancos más prometedores para el diseño racional de nuevas quimioterapias antimaláricas (Becker y col., 2004).

3.2.1. Mecanismos que Aumentan el EO Durante la Infección Malárica

3.2.1.1. Metabolismo de la Hemoglobina

El metabolismo de la hemoglobina del eritrocito hospedador por los parásitos del género *Plasmodium* es una vía metabólica central tanto para su propio desarrollo, así como para la generación de EO. El desarrollo intracelular del parásito malárico depende de la degradación de la hemoglobina, esta representa la fuente principal de aminoácidos para el desarrollo parasitario, crea el suficiente espacio para el crecimiento del *Plasmodium* y ayuda a mantener la integridad osmótica de la célula infectada (Lew y col., 2003). Los eventos de esta degradación se llevan a cabo en el ambiente ácido de la vacuola digestiva de los trofozoitos parasitarios, y supone un complejo proceso de separación de las cadenas α y β del tetrámero de la hemoproteína, la separación de los grupos hemo y la acción hemoglobinolítica de proteasas específicas (Eggleson y col., 1999) como son: dos proteinasas aspárticas denominadas plasmepsinas I y II, una proteinasa cisteínica, la

falcipaina-2 y una metaloproteasa denominada falcilisina (Tilley y col., 2001). Este proceso es utilizado por el *Plasmodium* como principal fuente de aminoácidos, pero también ocasiona la producción de grupo hemo libre (ferriprotoporfirina IX; **FP**) tóxico y ERO que generan un ambiente agresivo al parásito (Golenser y col.,1991; Tilley y col., 2001) (Fig.6).

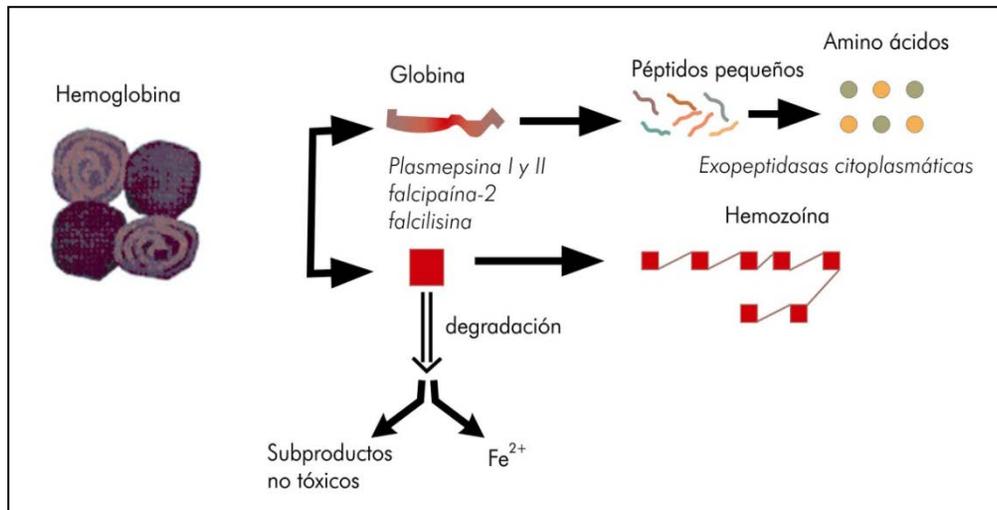


Fig. 6: **Productos de la degradación de la hemoglobina.**

La producción de grandes cantidades de hemo libre (FP), por sus propiedades tóxicas, compromete la viabilidad del binomio parásito-eritrocito mediante daño a las membranas y proteínas del hospedador con la consecuente lisis del eritrocito, y la inhibición de las proteasas parasitarias (Chou y Fitch, 1980; Chou y Fitch, 1981; Fitch y col., 1982; Orjih y Fitch, 1993; Meshnik y col.,1996; Tilley y col., 2001). Para garantizar la viabilidad del parásito, él mismo pone en marcha procesos que controlan la toxicidad de los productos de metabolismo de la hemoglobina. Mucha de la FP ingresa como sustrato en un proceso de biomineralización único en el *Plasmodium* que le permite la cristalización del hemo a **Hemozoina** o pigmento malárico (Slater y col., 1991; Bohle y col., 1997; Tripathi y Tekwani, 1999) (Fig.7).

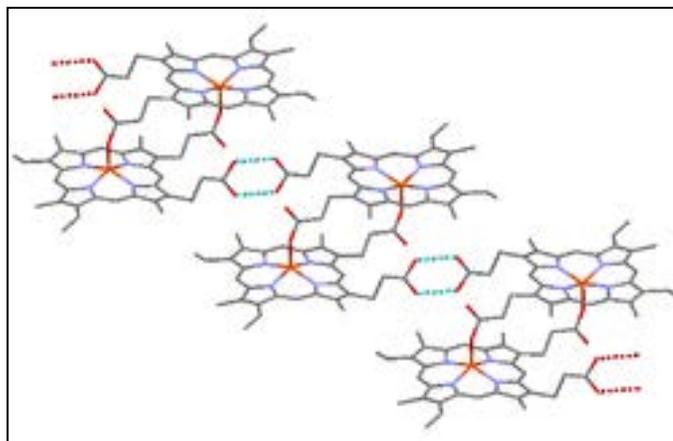


Fig.7: **Estructura de la β -hematina (Hemozoína)** (Bohle y col., 1997).

Aunque alrededor del 75% de la hemoglobina del eritrocito hospedador es degradada por los trofozoitos de *Plasmodium*, sólo una tercera parte de las moléculas de FP liberadas en este proceso son cristalizadas para formar hemozoína (Loria y col., 1999; Krugliak y col., 2002). En reticulocitos de rata infectados con *Plasmodium berghei*, entre el 20 a 30% de la FP liberada forma hemozoína, por lo que la gran cantidad de FP restante debe ser manejada por una vía diferente (Wood y Eaton, 1993). Entre las rutas alternativas para la detoxificación dentro del parásito se incluyen la unión a proteínas ligadoras de FP (Becker y col., 2004), la degradación de los grupos FP liberados y la reacción con glutatión (GSH), mediante la participación de enzimas de defensa contra el estrés oxidativo (Ginsburg y col., 1998; Loria y col., 1999). En esta última ruta de detoxificación de FP libre, la oxihemoglobina que contiene ferriprotoporfirina⁺² (FP II) sufre una auto-oxidación espontánea, debido a la alta acidez del medio dentro de la vacuola digestiva del parásito (pH 5), con la consecuente producción de ferriprotoporfirina⁺³(FP III) contenida en la metahemoglobina, y un anión superóxido el cual dismuta espontáneamente a H₂O₂; ambas moléculas formadas son tóxicas para el parásito y deben ser destruidas o neutralizadas. De esta manera, la FP III formada reacciona con el H₂O₂ para formar un intermediario *ferril* y destruir peroxidativamente el anillo de porfirina (Loria y col., 1999). Por otra parte, la FP

III formada en esta reacción de detoxificación, puede ser degradada por reacción con el GSH en el citoplasma del parásito cuando el grupo tiol del GSH se une al hierro de la FP y se lleva a cabo la formación de glutatión oxidado (GSSG) con la consecuente liberación del Fe y radicales oxidativos (Ginsburg y col., 1998).

3.2.1.2. Fagocitosis

Estudios *in vitro*, usando *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium berghei*, sugieren que las células fagocíticas formadas en el bazo, en la cavidad peritoneal y en sangre periférica ingieren eritrocitos parasitados o merozoitos libres como parte de su función en la inmunidad mediada por células. La fagocitosis llevada a cabo por macrófagos y leucocitos polimorfonucleares está acompañada de una elevación de la producción de ERO que pueden estar involucradas en el proceso de hemólisis (Stocker y col, 1985). El parásito malarico induce EO sobre las células infectadas las cuales, a pesar de la activación de los sistemas de defensa tanto parasitarios como de la propia célula parasitada, sufren un daño oxidativo apreciable (Atamna y col., 1994; Siddiqi y col., 1999). En diferentes estudios usando cultivos de *Plasmodium falciparum*, se ha observado que la presencia del parásito induce el aumento de la expresión de moléculas proteicas en la membrana del eritrocito que permiten la deposición de IgG y proteínas del sistema de complemento como la C3c lográndose así el reconocimiento de los eritrocitos por los macrófagos y su posterior fagocitosis (Giribaldi y col., 2001; Turrini y col., 1992). Estos cambios en la membrana del eritrocito y el aumento consecuente de la fagocitosis son directamente proporcionales al EO inducido por el parásito, son similares a los observados en eritrocitos sanos expuestos a lesión oxidativa y es posible revertirlos cuando se usan agentes reductores como el β -mercaptoetanol, lo que evidencia el carácter oxidativo de las modificaciones inducidas por el parásito (Giribaldi y col., 2001; Becker y col., 2004). De esta manera, el secuestro de

eritrocitos infectados con estadios maduros del *P.falciparum* ocurrido en la vasculatura del hospedador, parece esencial para que el parásito cumpla su ciclo de vida. Además, esto sugiere que los cambios oxidativos producidos por el metabolismo del parásito son necesarios y, al mismo tiempo, suficientes para que ocurra la fagocitosis y, en este sentido, el propio proceso de fagocitosis estaría acompañado de una elevación de la producción de ERO que aumentarían el desbalance del estado redox ocasionado por la infección malárica (Becker y col., 2004).

3.3. Mecanismos de Defensa Contra el EO

Frente a condiciones de EO endógenas generadas por la infección malárica tanto el parásito como las propias células del hospedador ponen en marcha un eficiente sistema de defensa constituido por una serie de reacciones bioquímicas catalizadas por diferentes sistemas enzimáticos que les permiten detoxificar las ERO generadas principalmente por la degradación de hemoglobina y por los procesos de fagocitosis. Como se mencionó con anterioridad, la FP II liberada en el proceso de degradación de la hemoglobina eritrocitaria por parte de los parásitos maláricos involucra la formación de grandes cantidades de ERO como superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido, radicales oxidrilo, oxígeno singlete, así como la acumulación de FP, lo que pone en peligro la viabilidad del binomio parásito-eritrocito. Sin embargo, el parásito es capaz de sobrevivir en un ambiente oxidativo adverso mediante la activación de mecanismos eficientes para la detoxificación de FP (Fig.8), la utilización de sistemas enzimáticos de defensa y de vías metabólicas que, además de aportar la energía necesaria para mantener su desarrollo, proveen intermediarios metabólicos claves para restaurar el estado redox y adaptarse al estrés oxidativo al que está sometido. Como se expone a continuación, los mecanismos implicados en la defensa antioxidante durante la infección malárica, no sólo suponen la actividad de los sistemas parasitarios, sino que se

emplean también mecanismos pertenecientes a la célula hospedadora, lo que permite que tanto el parásito como el tejido infectado logren mantener su actividad vital, estableciéndose una estrecha relación metabólica entre ambos.

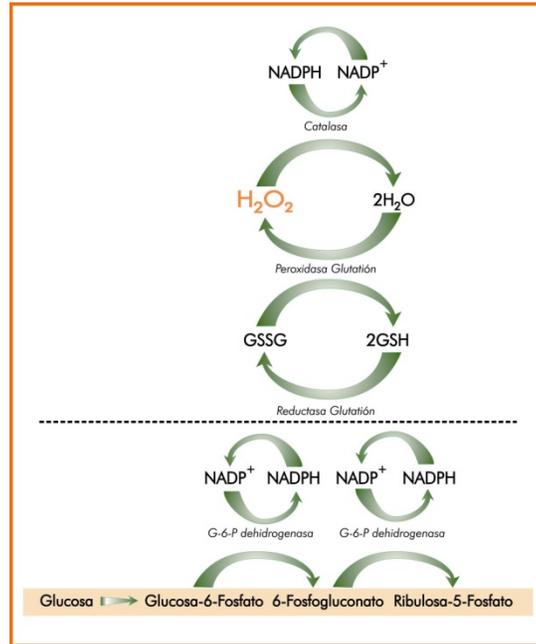


Fig.8: **Mecanismos de detoxificación del H_2O_2 en el eritrocito.**

3.3.1. Superóxido Dismutasa y Catalasa

El radical superóxido (O_2^*), un ERO muy importante, se produce normalmente durante la degradación de la hemoglobina en el ambiente ácido de la vacuola digestiva del parásito. Una vez generado, puede sufrir dismutación espontánea debido a la alta concentración local de H^+ lo que ocasiona un aumento en la velocidad de reacción, permitiendo que el O_2^* se transforme en H_2O_2 y O_2 (Atamna y col., 1994). Una parte del superóxido producido puede abandonar la vacuola digestiva y difundir al citoplasma del parásito donde puede ser procesado por la maquinaria antioxidante. Otras fuentes de O_2^* son la cadena de transporte mitocondrial y el sistema retículo-endotelial. Efectivamente, ante la infección

malárica, se ponen en marcha los mecanismos de citotoxicidad dependientes de oxígeno y los fagocitos producen grandes cantidades de superóxido a través de la actividad de la NADPH oxidasa.

El superóxido endógeno es procesado por la superóxido dismutasa (SOD) dependiente de Cu/Zn (Cu/Zn-SOD) del eritrocito para producir H_2O_2 . Se ha determinado que la actividad de la Cu/Zn-SOD está disminuida en eritrocitos infectados por *Plasmodium falciparum* y que esa actividad puede ser asumida por el parásito (Stocker y col., 1985). Por su parte el parásito puede dismutar al superóxido, independientemente de su origen, con la enzima plasmodial superóxido dismutasa dependiente de hierro (Fe-SOD) y posiblemente con una Mn-SOD asociada al mitocondrion del parásito. Se han identificado dos genes que codifican por la SOD en *P.falciparum*, cuya transcripción ocurre a las 30 h post invasión, en correspondencia con el desarrollo del trofozoito, estos genes codificarían por las isoformas de SOD descritas para el parásito (Ranz y col, 1989; Gratepanche y col., 2002).

Tanto el H_2O_2 producido por la actividad de la Cu/Zn-SOD como el proveniente de la dismutación espontánea, son reducidos por la actividad de la catalasa a H_2O y O_2 . Desde el punto de vista bioquímico cabe la interpretación de que el trofozoito se prepara para defenderse del O_2^* que en este momento alcanza un máximo como consecuencia de la elevada actividad hemoglobinolítica de este estadio y por corresponder al período de máximo reconocimiento de las células infectadas por parte de los macrófagos. El producto final de la reacción de dismutación, el H_2O_2 , puede ser removido por la actividad de la catalasa, una hemoproteína oligomérica que presenta dos estados conformacionales I (activo) y II (inactivo). La forma activa se une a cuatro moléculas de NADPH y desfavorece la acumulación de la forma inactiva que se genera en la reacción de degradación del H_2O_2 (Chance y col, 1979). Esta enzima puede remover altas concentraciones de H_2O_2

generando, en la reacción, O_2 y H_2O . La actividad de la catalasa de las células rojas infectadas se encuentra disminuida en infecciones con *P.berghei* (Areekul y col., 1986; Seth y col., 1985) y *P.vinchei* (Picard-Maureau y col., 1975).

3.3.2. Sistema de la Tiorredoxina

Las tiorredoxinas (Trxs) son un grupo de pequeñas proteínas que actúan en el metabolismo redox de las células de los mamíferos y que también han sido caracterizadas en el genoma del *P.falciparum* (Oblong y col., 1993). Estas proteínas poseen un sitio activo con una secuencia típica Cis-Gli-Pro-Cis y son reducidas por la acción de la Tiorredoxina reductasa (TrxR), estando involucradas en procesos de defensa antioxidante, reducción de ribonucleótidos, de peroxidasas y de factores de transcripción (Holmgren y col., 2002). Aparte de su papel en la regulación del estado redox, el sistema de la Trx sirve como un donador de electrones para la ribonucleótido reductasa, por lo que contribuye en la síntesis de DNA. El *P. falciparum* posee al menos una Trx típica (PfTrx1) que provee los equivalentes de reducción para las peroxidasas y ribonucleótido reductasa, siendo un mejor sustrato para la TrxR humana que para la propia TrxR plasmodial. Entonces, la Trx de *P.falciparum* es reducida con alta especificidad por la TrxR y dos peroxidasas dependientes de Trx; ambas peroxidasas son reducidas por la Trx con la consecuente transferencia de equivalentes de reducción al H_2O_2 (Kanzok y col., 2000).

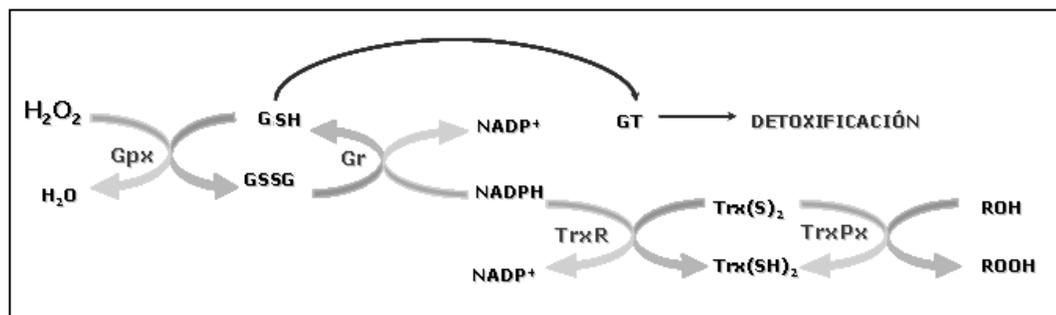


Fig. 9: Actividad Antioxidante del sistema de la Tiorredoxina

Como ya se mencionó, el sistema de defensa antioxidante está constituido no solo por el sustrato Trx, sino también por la enzima TrxR y, además por peroxidasas dependientes de Trx (TrxPx). La TrxR es un flavoproteína distribuida ampliamente, que cataliza la reducción de la proteína Trx, en una forma dependiente de NADPH. Varios estudios han demostrado que la condición de carencia de FAD o del co-sustrato NADPH que es observada en la deficiencia de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), produce una protección contra la malaria severa (Ginsburg y col., 1999). Se ha comprobado que existen dos formas de TrxR, una en procariotas, hongos y plantas (54 kDa) y otra en mamíferos y *P.falciparum* de 55-59 kDa (Oblong y col., 1993). Ambas reductasas, la humana y la plasmoidal, se diferencian en su mecanismo de catálisis, lo cual las postula como un excelente blanco para las terapias antimaláricas (Becker y col, 2004).

3.3.3. Sistema del Glutati6n

La producci6n de ERO (O_2^* , H_2O_2) que ocurre en el eritrocito como consecuencia de la oxidaci6n de la hemoglobina a metahemoglobina, es controlada por la acci6n de enzimas de defensa oxidativa como la super6xido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutati6n peroxidasa (GPx), siendo esta 6ltima la responsable de la reacci6n de oxidaci6n del glutati6n (GSH). El GSH es un trip6ptido (3-glutamyl-L-cisteinilglicina) encontrado en la mayoría de las c6lulas eucariotas (Sies, 1986), incluyendo a los parásitos del g6nero *Plasmodium*, y juega un papel fundamental en su defensa antioxidante mediante el mantenimiento del estado redox de las porciones –SH proteicas, la reducci6n de per6xidos de hidr6geno y per6xidos lipídicos, y la eliminaci6n de compuestos t6xicos que incluyen fármacos y otros xenobi6ticos, debido a que reduce el ambiente intracelular y protege a los componentes celulares del daño oxidativo. El GSH es sintetizado por la acci6n consecutiva

de las enzimas γ -glutamyl-cisteina sintetasa (γ -GCS) y glutathion sintetasa. La transcripción del gen de la γ -GCS, ocurre entre las 24 y 30 horas, durante el cultivo de *P.falciparum*, sugiriendo que la síntesis de GSH coincide con el evento hemoglobinolítico y el máximo de formación de ERO. El GSH sirve como donador de electrones para la reducción de peróxidos en reacciones catalizadas por la glutathion peroxidasa (GPx) por lo que es oxidado a disulfuro de glutathion (GSSG; Glutathion oxidado). En última instancia, es de nuevo reducido a GSH por acción de la enzima glutathion reductasa (GR) la cual utiliza NADPH^+ como donador de electrones. El NADP producido en esta reacción ingresa al ciclo de las pentosas fosfato (CPF; PPP por sus siglas en inglés) donde es reducido nuevamente a NADPH^+ por acción de las enzimas Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y 6-fosfogluconico deshidrogenasa (6PGDH), y glutamato deshidrogenasa (GDH) (Van der Jagt y col., 1989; Atamna y col., 1994 Luzzatto., 1995; Atamna y col., 1997). La enzima glutathion S-transferasa (GT) conjuga GSH a electrófilos tóxicos, generando así las condiciones para que estas moléculas puedan ser eliminadas fuera de la célula por un mecanismo de transporte dependiente de ATP presente en la membrana celular. Los eritrocitos pueden usar un transporte unidireccional dependiente de energía que mueve GSSG intracelular hacia el espacio extracelular en contra de su gradiente de concentración. La función de este sistema es significativa y su tasa de transporte se hace aún más importante cuando las células rojas están expuestas al estrés oxidativo. La acumulación de GSSG en el plasma puede considerarse un índice de estrés oxidativo en la célula roja (Srivastava y col., 1999). En el caso de los parásitos plasmodiales, se ha caracterizado un transportador activo primario o bomba de membrana conocido como “Bomba Multi-Resistencia” responsable de la extrusión del GSSG desde el citoplasma del parásito hacia el citoplasma de la célula hospedadora y al cual se le atribuye participación en el mecanismo de resistencia frente a diferentes agentes quimioterápicos usados en el tratamiento de la malaria (Borst y col., 1999; Becker y col, 2004). Como se mencionó

anteriormente, el GSH sirve de sustrato en varios procesos reductores como los catalizados por GPx y Glutation-S-transferasa (GT), con la consecuente formación de GSSG. Este último es reducido, de nuevo, a GSH por la Glutation reductasa (GR), usando $\text{NADPH} + \text{H}^+$. En muchas células eucariotas, la GPx reduce el H_2O_2 , y los peróxidos lipídicos usando GSH. Sin embargo, la caracterización bioquímica de la enzima recombinante, indica que la GPx del *P.falciparum*, tiene más afinidad por la Trx que por GSH (Stzajer y col., 2001). La gran capacidad reductora del GSH se evidencia también por el hecho de que sólo aquellas células que han perdido el 90% de la actividad de la GR muestran un desbalance en la regeneración del GSH y una sensibilidad aumentada hacia los oxidantes (Fisher y col., 1987). De esta manera el hecho de que en los eritrocitos exista una vasta reserva de poder reductor disponible para el ciclo redox del GSH, indica claramente su importancia en la protección de las células contra el daño oxidativo (Fig.10).

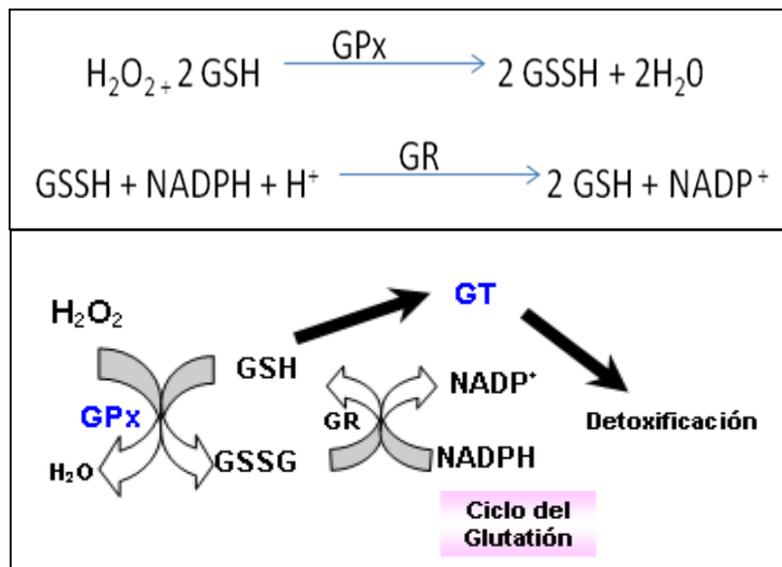


Fig. 10: Reacciones de detoxificación de ERO en el Ciclo del Glutación.

Diferentes estudios han revelado evidencia que permite establecer una estrecha relación entre los mecanismos de defensa redox que se encuentran tanto en el parásito como en la célula hospedadora. Está claro que la célula hospedadora, principalmente el eritrocito, pierde su capacidad para la síntesis de novo de GSH debido a la salida de la célula del precursor γ -glutamil-cisteína (Atamna y col. 1997). Sin embargo, el mecanismo antioxidante del binomio parásito-hospedador es mantenido apropiadamente debido a la activación, dentro del citoplasma parasitario, de la síntesis de novo de GSH, la acción concertada de la GR y del CPF y la alta relación GSH/GSSG, así como la elevada extrusión de GSSH hacia el citoplasma de la célula hospedadora, donde es reducido a GSH por la GR residente y el CPF del hospedador que se encuentra altamente activado (Atamna y col. 1997; Ayi y col. 1998). En este sentido, se ha demostrado que el *P. falciparum* se desarrolla normalmente en eritrocitos carentes de GSH, donde el parásito regenera el contenido de GSH de sus eritrocitos hospedadores 10 a 20 veces más rápido que los eritrocitos no parasitados por efecto del eflujo de glutatión oxidado (GSSG) (Ruwende y col., 1995).

3.3.4. Participación de Vías Metabólicas en la Defensa Contra el EO

3.3.4.1. Ciclo de las Pentosas Fosfato (CPF)

El CPF es una vía metabólica de utilización de glucosa y es la fuente principal de NADPH en la mayoría de las células. En condiciones normales, el eritrocito cataboliza entre el 5 y 10% de la glucosa a través del CPF el cual permite una alta relación de NADPH/NADP⁺ citoplasmática, que capacita a la célula para enfrentar demandas tanto oxidativas como

energéticas, al tiempo que permite la regulación alostérica de la vía a nivel de la enzima G6PDH mediante el efecto inhibitor del propio NADPH.

En el caso de células infectadas con *Plasmodium*, como ya se ha mencionado anteriormente, la degradación de la hemoglobina y la oxidación espontánea del hemo libre liberado durante este proceso, así como las ERO generadas por la actividad inmune, constituyen los eventos determinantes en la generación de este estrés oxidativo endógeno al que se encuentran sometidos los parásitos maláricos y las células hospedadoras infectadas (Atamna y Ginsburg, 1993). La presencia de ERO en condiciones fisiológicas y, más aún, durante la infección, hace a las células hospedadoras especialmente vulnerables al daño oxidativo por ataque a lípidos poliinsaturados y a las proteínas (Stocks y col., 1971). Algunas estimaciones indican que las células rojas infectadas con *Plasmodium* producen dos veces más H_2O_2 y radicales superóxido que las células rojas normales (Hunt y Stocker, 1990; Mishra y col., 1994). A pesar de esto, el binomio célula-parásito es resistente a procesos oxidativos debido a la gran eficiencia tanto de los mecanismos de defensa que ya han sido comentados, como del suplemento energético que es generado tanto en el parásito como en la célula hospedadora.

En este sentido, es necesario establecer que la actividad metabólica, sobre todo el catabolismo de glucosa, tanto parasitaria como de la célula hospedadora, a través del CPF, se convierte en supridor de cofactores y equivalentes de reducción fundamentales para los mecanismos desarrollados por ambos contra el EO. En primera instancia, se ha determinado que la actividad glicolítica del eritrocito infectado con *Plasmodium* es 100 veces más alta que la del eritrocito normal (Pfaller y col., 1982) y parte del ATP producido en la glucólisis proviene de la actividad de la célula hospedadora (Kanaanni y Ginsburg, 1989) cuya glicólisis se encuentra disminuida debido a la acidificación del citoplasma

ocasionada por la actividad del parásito (Ginsburg, 1990). En consecuencia, el *Plasmodium* no sólo se encuentra bajo una fuerte carga oxidativa, sino también en una situación de alta demanda energética. En eritrocitos infectados con parásitos maláricos se ha observado un aumento de la actividad de la hexoquinasa, como reguladora de la glicólisis, y un aumento en la actividad del CPF (Roth y col., 1978). La membrana de los eritrocitos parasitados es mucho más permeable a la glucosa, su principal fuente de energía, que las células rojas normales o la de los eritrocitos no parasitados en animales infectados (Neame y col., 1975). El parásito puede utilizar el NADPH generado por el metabolismo eritrocitario o bien obtenerlo de su propio CPF en una tasa más limitada (Eckman y col, 1979).

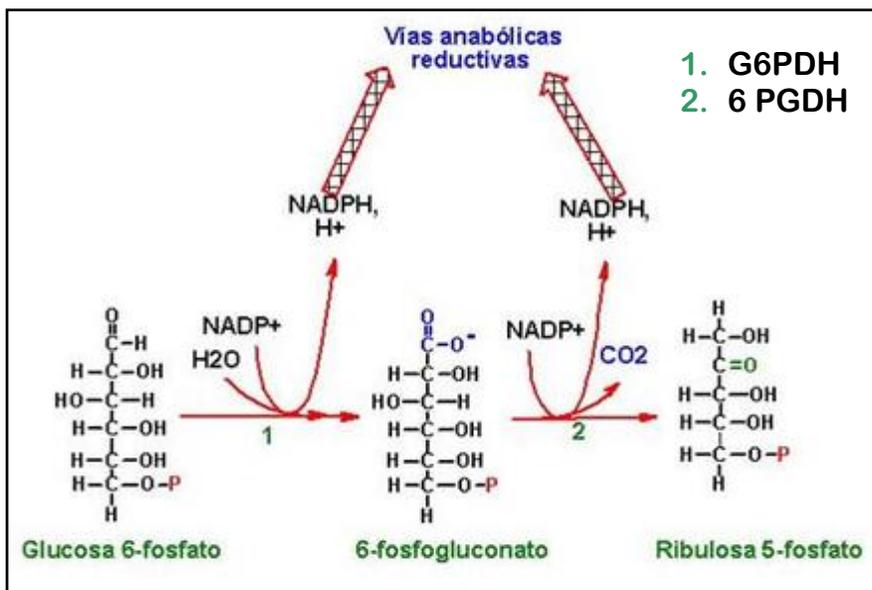


Fig. 11: Reacciones del segmento oxidativo del Ciclo de las Pentosas Fosfato (CPF)

El NADPH citoplasmático proviene fundamentalmente de la fase oxidativa del ciclo de las pentosas (Fig. 11) en donde participan dos deshidrogenasas: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH). La primera cataliza el paso inicial y velocidad-limitante y es regulada en forma alostérica por el

NADPH. Cuando los eritrocitos son sometidos a EO, el CPF degrada una mayor proporción de glucosa, con el objetivo de generar una mayor cantidad de equivalentes de reducción y garantizar la actividad de la catalasa y del ciclo del GSH (Albrecht y col., 1971). Bajo estas condiciones de alta demanda de NADPH, la hexoquinasa, más que la G6PDH, regula la actividad de la CPF en el eritrocito (Mangani y col., 1988).

El CPF en su brazo oxidativo, utiliza la G6P como sustrato al comienzo de la ruta y son las reacciones que generan NADPH. Entonces, el primer carbono de la G6P es oxidado a lactona (ácido 6-fosfo-D-glucónico; ácido 6PG) catalizado por la G6PDH, liberando concomitantemente dos electrones que reducen una molécula de NADP^+ a NADPH. El siguiente paso metabólico implica la descarboxilación del ácido 6PG catalizado por 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) liberándose dos electrones adicionales, los cuales reducen una segunda molécula de NADP^+ .

El par $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ es usado por varias reacciones bioquímicas en el parásito, pero el papel principal del NADPH se encuentra en su defensa antioxidante. Se ha demostrado que la resistencia natural a la malaria, desarrollada en algunas poblaciones humanas por la deficiencia de G6PDH, con la consecuente disminución en la producción de NADPH, se basa principalmente en la ineficiencia de los mecanismos de defensa antioxidante, como el sistema del GSH, para reducir el EO generado por la presencia del parásito (Becker y col., 2004; Muller, 2004).

En la reacción de la 6PGDH, se produce un azúcar de 5 carbonos, la D-ribulosa-5-fosfato, la cual, por isomerización, forma la D-ribosa-5-fosfato (R5P) (Fig. 11). Luego, la R5P es transformada en ácido 5-fosfo-D-ribosa-1-pirofosfórico (PRPP) por la ribosa-fosfato difosfoquinasa, para ser usada en la síntesis de ácidos nucleicos. El parásito contiene

niveles sustanciales de los nucleótidos de piridina NAD^+ y NADP^+ y sus formas reducidas, al mismo tiempo que se ha determinado la presencia de genes que codifican por las enzimas necesarias para su síntesis en el genoma de *P.falciparum*, indicando la capacidad del parásito para producir estos cofactores (Bozdech y Ginsburg, 2005). En el caso *P.falciparum*, ha sido caracterizada la actividad de la ribosa fosfato difosfoquinasa y han sido medidos los niveles de PRPP en eritrocitos infectados por *P.falciparum*, los cuales fueron encontrados aumentados 56 veces en células infectadas por trofozoitos, cuando se compararon con los niveles de PRPP en eritrocitos no infectados (Atamna y col, 1994).

Como otras células, en el sentido de llevar a cabo su anabolismo y la detoxificación de las ERO producidas por el propio parásito y por el hospedador, el parásito no sólo necesita energía (ATP), también necesita poder reductor bajo la forma de NADPH. Las enzimas que funcionan principalmente en dirección reductora utilizan como cofactores el par $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, en forma opuesta a las enzimas oxidativas que utilizan como cofactor el par NAD^+/NADH . La conversión de ribonucleótidos a desoxiribonucleótidos (por medio de la acción de la ribonucleótido reductasa) requiere NADPH como fuente de electrones. Entonces, como todas las células que proliferan rápidamente, el *Plasmodium* requiere grandes cantidades de NADPH que es producido durante la oxidación de glucosa-6-fosfato (G6P) en el CPF. Esta vía metabólica también produce el azúcar que compone los ácidos nucleicos, ribosa-5-fosfato (R5P).

Las reacciones no oxidativas del CPF están diseñadas principalmente para generar R5P (Fig 12). Reacciones del CPF igualmente importantes se llevan a cabo para convertir azúcares de 5 carbonos ingeridas en la dieta o D-ribosa-1-fosfato generada en la recuperación de purinas (que pueden ser convertidas lentamente a R5P por la fosfoglucomutasa) hacia dos azúcares, una de 6 carbonos (fructosa-6-fosfato; F6P) y una

de 3 carbonos (gliceraldehído-3-fosfato; G3P) las cuales pueden, entonces, ser utilizadas en la ruta de la glicólisis. En la primera reacción, R5P aceptará dos átomos de carbono de la xilulosa-5-fosfato (obtenida por epimerización de la ribulosa-5-fosfato), produciendo pseudoheptulosa-7-fosfato y G3P en una reacción catalizada por la transcetolasa. La pseudoheptulosa-7-fosfato transfiere tres átomos de carbono al G3P catalizado por la transaldolasa, conduciendo a la formación de F6P y eritrosa-4-fosfato. Entonces, la eritrosa-4-fosfato acepta dos átomos de carbono de una segunda molécula de F6P y una molécula de G3P. Entonces, tanto la F6P como el G3P, pueden entrar en la glicólisis y producir ATP. La parte no-oxidativa del CPF también puede trabajar en dirección inversa utilizando F6P y G3P, generados en la glicólisis, para producir R5P.

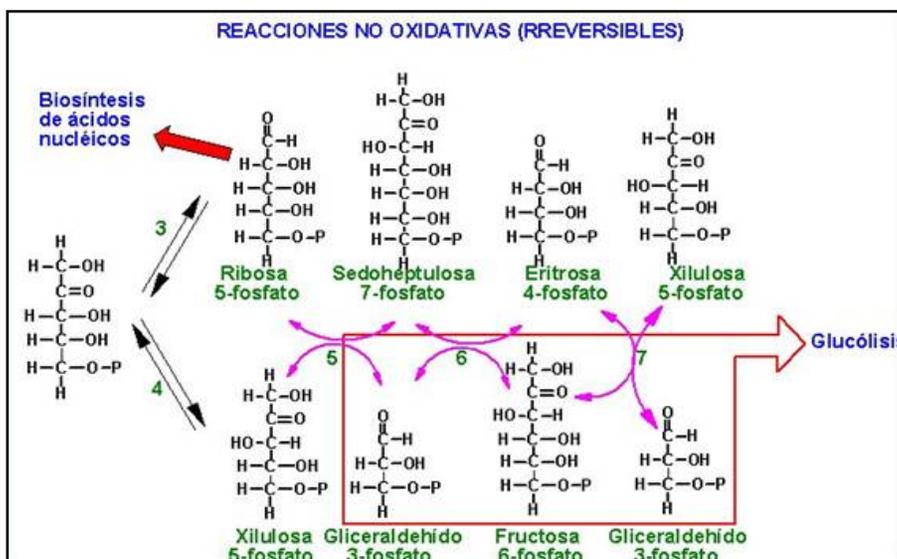


Fig. 12: Reacciones del segmento no oxidativo del Ciclo de las Pentosas Fosfato (CPF).

En esencia, el CPF puede operar en formas diferentes:

- a. Cuando se necesitan tanto R5P y NADPH, operará sólo la parte oxidativa y toda la ribulosa-5-fosfato será isomerizada a R5P completándose la ruta.

- b. Cuando se necesita más R5P que NADPH, esta será sintetizada por una reversión del brazo no oxidativo, usando como sustratos la F6P y el G3P generados por la glicólisis.
- c. Cuando las células necesitan más NADPH y ATP, pero no R5P, la ribulosa-5-fosfato es convertida a F6P y G3P por la glicólisis para producirlos.

La actividad del CPF, ha sido medida en eritrocitos infectados con *P.falciparum*, y se ha demostrado la actividad inversa del brazo no oxidativo del CPF determinando la incorporación de radiactividad de [1-¹⁴C]glucosa en nucleótidos (Rorh y col., 1982). Atamna y col., reportaron que las células infectadas tienen un gran incremento en la actividad del CPF, donde el 82% es contribución del parásito, mientras que la actividad del CPF de la célula hospedadora es activada 24 veces como resultado del EO (Atamna y col., 1994). Existen evidencias que indican que la R5P incorporada dentro del DNA parasitario se origina exclusivamente de la actividad no-oxidativa del CPF, es decir, a partir de los intermediarios glicolíticos F6P y G3P (Scheibel y col., 1988). Sin embargo, hasta ahora las únicas enzimas del CPF con existencia comprobada en los parásitos del género son la G6PDH y la 6PGDH las cuales, a diferencia de las enzimas humanas, se expresan como una proteína única con la actividad bifuncional, ya que presenta las actividades de G6PDH y 6PGDH, tanto dentro del *P.falciparum* como del *P. berghei* (Clarke y col., 2001).

3.3.4.2. Glutamato Deshidrogenasa e Isocitrato Deshidrogenasa

Al igual que la mayoría de las células eucariotas, el *Plasmodium* puede obtener NADPH de vías alternas representadas por enzimas como glutamato deshidrogenasa (GDH) y la isocitrato deshidrogenasa (IDH). Los sistemas de defensa contra el EO, requieren NADPH

provisto por la actividad de la G6PDH, dentro del CPF. Sin embargo, se ha observado que su actividad es baja y, probablemente no sea la única fuente de NADPH en los parásitos (Van der Jagt y col., 1989), por lo que se ha postulado a la GDH e IDH como potenciales proveedores del cofactor (Fig. 13) (Wrenger y col., 2003). Estas enzimas productoras de NADPH no se encuentran en el eritrocito normal, pero si están presentes en células hospedadoras afectadas directamente por los parásitos maláricos como son los hepatocitos. En el caso de la IDH, se ha demostrado su presencia en *P.falciparum* (Van der Jagt y col., 1989), pero no en los estadios intraeritrocíticos de *P.berghei* (Howells y col., 1973) y se ha caracterizado el gen que la codifica dentro del genoma del *Plasmodium falciparum* (Wrenger y col., 2003).

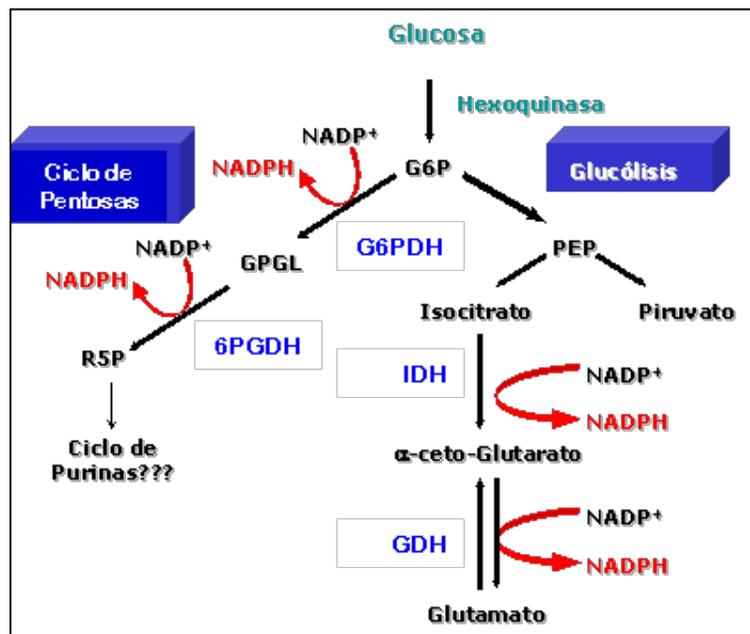


Fig.13: Participación de diferentes vías metabólicas en la defensa antioxidante: G6PDH, 6PGDH, IDH y GDH como productoras de NADPH + H⁺.

La IDH es la enzima responsable de la descarboxilación oxidativa del isocitrato, reacción que genera NAD(P)H y α-oxoglutarato (Sahni y col., 1992) el cual es conducido a la ruta del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) o metabolizado a glutamato, dependiendo de la

localización de la respectiva isoforma de IDH. La IDH dependiente de NAD^+ se encuentra en las mitocondrias y conforma una parte esencial del ciclo de los TCA, mientras que la IDH dependiente de NADP^+ , ha sido encontrada en las mitocondrias, citoplasma y peroxisomas. Su función más importante es proveer el NADPH esencial para las reacciones reductoras como la síntesis de lípidos y la reducción de hidroperóxidos (Bozdech y Ginsburg, 2005).

La actividad de la GDH no depende de iones metálicos, a diferencia de la IDH que es activada por Mn^{+2} y Mg^{+2} (Van der Jagt y col., 1989). El *P. falciparum*, al igual que los eritrocitos no poseen ciclo de Krebs como en los mamíferos, sin embargo a partir de fosfoenol piruvato se sintetiza oxalacetato y luego citrato, lo que conduce a la síntesis de isocitrato (Fig. 13). Las enzimas proveedoras de NADPH constituyen puntos clave de enlace entre el metabolismo energético y la regulación del estado redox de los parásitos del género *Plasmodium* y por ende, pueden considerarse posibles blancos de terapia antimalárica que necesitan ser mejor estudiados.

3.4. Estrés Oxidativo y Manifestaciones Clínicas de la Enfermedad

Las alteraciones en el metabolismo redox observadas en pacientes con infección por parásitos del género *Plasmodium*, al mismo tiempo que conforman un aspecto importante de las respuestas de defensa del hospedador frente a la enfermedad, contribuyen en gran medida con las manifestaciones clínicas de la enfermedad. En pacientes con infección malárica, la alteración del metabolismo redox es evidenciada por un aumento en la peroxidación lipídica. Sin embargo, los niveles de GSH y la actividad de la catalasa eritrocitarios, quienes forman parte de los mecanismos antioxidantes del hospedador, son

significativamente menores cuando se comparan con sujetos sanos (Das y Nanda, 1999). Lo mismo ocurre en modelos murinos, donde se ha observado que la infección malárica también aumenta la tasa de peroxidación lipídica, disminuyendo la actividad de la xantina oxidasa, los niveles de GSH y la actividad de la GR en el hígado, lo que conduce a un aumento en la generación de EO (Srivastava y col., 1991; Nikhat y col., 1999). Por otra parte, en humanos, la intervención terapéutica con fármacos que disminuyen la producción de ERO como el p-acetaminofenol, retarda la depuración de la parasitemia, demostrándose que la presencia de las ERO es importante para aumentar la depuración de la parasitemia tanto en modelos humanos como murinos (Greve y cols., 1999). En el mismo sentido, los ratones carentes de NADPH oxidasa, no pueden producir superóxido y sufren incrementos mucho más rápidos en la densidad de parásitos maláricos que los ratones de tipo nativo. Estas observaciones sugieren que una producción disminuida de ERO por monocitos puede exacerbar la infección (Sanni y col., 1999).

Los síntomas del cuadro de infección malárica se caracterizan principalmente por fiebre y escalofríos que pueden estar acompañados por cefalea, mialgias, artralgias y trastornos digestivos. Sin embargo, anualmente de 5 a 10 millones de personas infectadas desarrollan complicaciones durante la infección presentando desordenes neurológicos que pueden llegar al coma (malaria cerebral), acidosis metabólica, hipoglicemia, anemia severa (con o sin trombocitopenia), fallas renales y edema pulmonar. Los signos y síntomas de la malaria severa indican un síndrome complejo establecido por factores del parásito y del hospedador (Kirchgatter y col., 2005). Es importante destacar que la malaria es una enfermedad sistémica dónde los diferentes sistemas son afectados principalmente debido a la infección de los eritrocitos (González y col., 2000; Kirchgatter y col., 2005). En este sentido, ya que la fisiopatología de la enfermedad se refiere principalmente a las

reacciones del hospedador humano frente a la agresión parasitaria, es importante revisar el papel del desbalance en el metabolismo redox en el desarrollo de las complicaciones que acompañan a la infección.

3.4.1. Estrés Oxidativo y Secuestro de Eritrocitos

Como se mencionó anteriormente, dentro de las complicaciones de la enfermedad se encuentran los trastornos hematológicos como el secuestro de glóbulos rojos, sobre todo en la microcirculación, y la anemia severa (González y col., 2000; Becker y col., 2004; Kirchgatter y col., 2005). El estrés oxidativo aumentado sobre los eritrocitos puede contribuir a la hemólisis y al desarrollo de la anemia. Los eritrocitos infectados con *Plasmodium falciparum* pueden ser secuestrados en la circulación profunda por adhesión a las células endoteliales debido a las modificaciones que se presentan en su superficie como consecuencia de la presencia de las formas eritrocíticas del parásito. Este mecanismo de adhesión permite a las formas maduras del *Plasmodium* escapar a la depuración por parte del bazo (Kirchgatter y col., 2005). De esta manera, los eritrocitos infectados se adhieren a receptores de células endoteliales que incluyen receptores CD36, molécula 1 de adhesión intracelular (ICAM-1 o CD54), moléculas de adhesión celular endotelial-plaquetaria (PECAM-1 o CD31), P-selectina en la microvasculatura, Glicosaminoglicano condroitin sulfato A (CSA), y ácido hialurónico en la placenta (Fig.14) (Beeson y col., 2000). La principal adhesina derivada del parásito es la proteína de membrana del eritrocito infectado con *P.falciparum* 1 (**PFEMP1**), una familia de proteínas variables cuyos miembros han sido señalados como mediadores de la adhesión a CD36, ICAM-1, CSA y P-selectina (Senczuk y col., 2001). El efecto del desbalance redox sobre la

expresión o la conformación de PfEMP1 no está bien descrito aún, pero se ha indicado que la expresión de estas moléculas receptoras de adhesión endotelial para el eritrocito infectado por *P.falciparum* está aumentada por el EO.

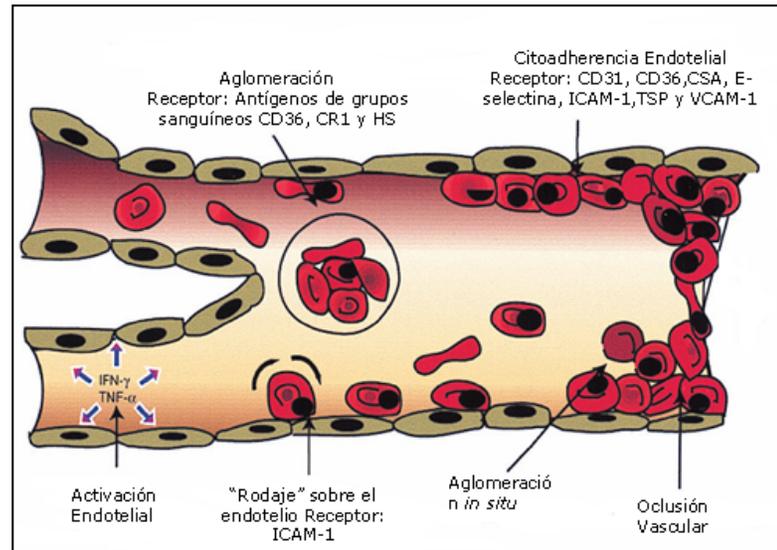


Fig.14: **Secuestro Eritrocitario en la Microvasculatura** (Becker y col., 2004).

Los niveles de factor de necrosis tumoral (TNF) en malaria por *P.falciparum*, se han correlacionado con la severidad de la enfermedad, ya que este sinergiza a los oxidantes intracelulares para incrementar la expresión de ICAM-1, mientras que los agentes reductores disminuyen significativamente la citoadhesión de los eritrocitos infectados a las células que expresan CD36 (Gruarín y col., 2000). El estrés oxidativo puede incrementar la expresión de fosfatidilserina en la superficie de los eritrocitos infectados, la cual parece mediar la adhesión de estas células a CD36, aumentando así su adhesión al endotelio vascular (Becker y col., 2004).

3.4.2 Estrés Oxidativo y Anemia Severa

La anemia es otra complicación producida por la destrucción de glóbulos rojos, que puede ser lo bastante grave como para poner en riesgo la vida del paciente. El incremento de la peroxidación lipídica reportado en la malaria humana puede afectar la membrana de los eritrocitos infectados y de los no infectados (Omodeo-Sale y col., 2003). En la infección malárica se ha visto una disminución en la deformabilidad de las células rojas la cual está asociada con el incremento de la mortalidad por malaria en niños y adultos (Dondorp y col., 2002). Las consecuencias directas de la rigidez celular pueden incluir la obstrucción circulatoria, lo que exacerba la hipoperfusión tisular, y las células rojas rígidas pueden ser removidas más fácilmente por el bazo aumentando la gravedad de la anemia (Kirchgatter y col., 2005). También es común, en la malaria, la trombocitopenia. Los casos de hemorragia son raros, pero están asociados con una prognosis pobre (Clemens y col., 1994). Ocurre coagulación intravascular en la malaria placentaria, donde es común la deposición de fibrina y trombos de fibrina, y deposición de plaquetas son comunes en los vasos cerebrales de niños con malaria cerebral fatal (Grau y col., 2003). La actividad del factor tisular iniciador de la coagulación, está incrementado en condiciones inflamatorias que incluyen la sepsis y el daño pulmonar agudo, y es estimulado por la presencia de ERO (Cadroy y col., 2000). Aunque no ha sido estudiado en otros tejidos durante la infección malárica, el incremento en la actividad del factor tisular puede explicar el descubrimiento común de la deposición de trombos de fibrina en microvasos cerebrales encontrados en tejido de autopsia (Becker y col., 2004).

3.4.3. Estrés Oxidativo y Patología Cerebral

La malaria cerebral es la forma más temida de la enfermedad, producida únicamente por *P. falciparum*. Los glóbulos rojos infectados por este parásito, se tornan adhesivos y se adhieren al endotelio de los vasos cerebrales, entre otros. En el 10% de los niños que sobreviven a la malaria cerebral ocurre un extenso daño neurológico y son comunes alteraciones a largo plazo en la conducta y la actividad cognitiva (Holding, 1999). El secuestro que ocurre en la microvasculatura, se presenta en altas densidades en el cerebro y la obstrucción de vénulas y capilares con eritrocitos que contienen trofozoitos y esquizontes causa convulsiones y coma, con una tasa de mortalidad de 40 al 50% de los casos (Kirchgatter y col., 2005). Es probable que, como consecuencia del secuestro parasitario, ocurra hipoxia local, con una subsecuente reoxigenación debido a la liberación del contenido del glóbulo rojo por la ruptura eritrocitaria ocasionada por los esquizontes. La hipoxia-reoxigenación es una causa principal del daño neurológico en el cerebro en desarrollo y esta lesión puede afectar la función e integridad neuronal.

Los radicales libres, citoquinas y aminoácidos excitatorios, pueden contribuir al daño neuronal. En ratones, la sobreproducción de ERO no parece estar implicado en el desarrollo de la malaria cerebral (Sanni y col, 1999), pero la patología de la malaria cerebral humana y la murina pueden diferir. La evaluación de tejido post-mortem de malaria cerebral fatal en busca de evidencia de daño oxidativo sería de considerable interés.

3.4.4. Estrés Oxidativo y Falla Respiratoria

El edema pulmonar agudo es también una complicación fatal en los casos de malaria severa. La afección respiratoria en niños jóvenes es una respuesta a la acidosis metabólica profunda debida, predominantemente, al incremento en los niveles de ácido láctico (English y col., 1996). La obstrucción microvascular, posiblemente aumentada por la rigidez eritrocitaria, en presencia de anemia puede exacerbar la acidosis láctica por el incremento de flujo sobre la glicólisis anaeróbica. La lesión al flujo sanguíneo mediado por el secuestro puede ser visualizada por microfotografías vasculares rectales o sublinguales, con un daño marcado del flujo sanguíneo visto en pacientes con malaria severa en la fase aguda de la enfermedad, recuperándose proporcionalmente con la resolución de la misma (Dondorp y col., 1999). En los mismos pacientes, la N-acetilcisteína (como agente reductor) aumenta la tasa de normalización del lactato plasmático por un mecanismo independiente de la presencia factor de necrosis tumoral (TNF), posiblemente por el mejoramiento de la deformabilidad de las células rojas, o por reposición del glutatión (Watt y col., 2002). La N-acetilcisteína puede jugar un papel terapéutico en el tratamiento de las complicaciones maláricas y podría reducir la obstrucción intravascular del flujo sanguíneo.

El daño agudo de pulmón (DAP) es una manifestación de la malaria severa en adultos y puede ser especialmente común en mujeres embarazadas (Taylor y White, 2002). Estudios patológicos indican un incremento en el número de monocitos secuestrados en los vasos pulmonares y, como consecuencia, un aumento en la producción de ERO y citoquinas en los capilares alveolares lo que probablemente pueda ser responsable por el desarrollo de DAP asociado a malaria (Carr y col., 1999). Síntomas más suaves y evidencia de daño en el intercambio de gases, son comunes en la infección por malaria

sugiriendo que tales cambios representan el punto final de un espectro de cambios fisiopatológicos (Anstey y col., 2002).

3.4.5. Estrés Oxidativo y Malaria Placentaria

En la malaria placentaria es vista comúnmente la infiltración de espacios intervillosos con monocitos y se correlaciona con bajo peso del niño al momento del nacimiento (Menendez y col., 2000). Las concentraciones de citoquinas, incluyendo el TNF- α , están aumentados en la circulación placentaria (Fried y col, 1998), y también se correlacionan con prognosis pobres al momento del nacimiento. A la fecha, el EO no ha sido estudiado directamente en malaria placentaria, pero se ha documentado la presencia de un EO en la pre-eclampsia, otro desorden inflamatorio enfocado en la circulación materno placentaria, y los efectos sistémicos en la madre (Hubel, 1999). Se puede inferir que la atracción de los monocitos a la placenta y sus efectos adversos en infantes en crecimiento pueden estar mediados por la hipoxia - reoxigenación y la generación de ERO resultantes (Becker y col., 2004).

3.4.6. Estrés Oxidativo y Disfunción Hepática

La infección malárica cursa con una disfunción hepática que, en algunos casos, puede generar cuadros de encefalopatía hepática en pacientes infectados por *P.falciparum*. Clínicamente, la disfunción hepática en pacientes cursa con hiperbilirrubinemia (aumento de la bilirrubina conjugada) y elevación de las transaminasas ALT y AST (Kochar y col., 2003), también observadas en ratones infectados con *P.berghei* (Acosta, M., 2010). Los cambios histopatológicos que se observan en pacientes con malaria incluyen necrosis y

apoptosis de hepatocitos, colestasis, estasia biliar, lesiones granulomatosas, la presencia de nódulos maláricos con una densa infiltración de linfocitos (Srivastava y col, 1996; Rodríguez-Acosta y col., 1998; Adachi y col., 2001). La evidencia provista por estudios ultraestructurales en hígado de ratones infectados con *P.berghei* indica cambios importantes como: anormalidades en la estructura del hepatocito, cambios de tamaño y forma de la mitocondria, alteraciones del aparato de Golgi, pérdida de la forma y compartimentalización de los retículos endoplásmicos liso y rugoso, así como desaparición del glucógeno. Adicionalmente, hay disminución de las microvellosidades en el espacio de Disse y canalículo biliar debida a la necrosis de hepatocitos, presencia de vacuolas autofágicas y abundantes gotas lipídicas (Rodríguez-Acosta y col., 1998; Acosta, M., 2010).

Estudios realizados en modelos murinos, han implicado a las ERO asociadas al EO en el desarrollo de las complicaciones hepáticas de la enfermedad (Adachi y col., 2001; Guha y col, 2006). De esta manera, se ha determinado que la infección malárica disminuye los niveles de enzimas antioxidantes hepáticas como la CAT, y SOD, así como incrementa la actividad de la enzima que genera anión superóxido (O_2^*), la actividad de la xantina oxidasa y el contenido de lípidos peroxidados en el hígado (Srivastava y col, 1996; Siddiqi y col, 1999). La presencia del radical hidroxilo ($\bullet OH$), como una de las ERO generadas por la infección malárica en el hígado, se ha indicado como responsable por la inducción de apoptosis dependiente de caspasas por vía mitocondrial (intrínseca), donde se observa la desactivación de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, BclxL) y la activación de proteínas pro-apoptóticas (Bax, Bad, Bid), resultando en la apertura de poros transitorios de permeabilidad mitocondrial y la liberación de proteínas que inducen apoptosis (citocromo c, factor inductor de apoptosis, etc.) desde la mitocondria (Guha y col, 2006).

Por otro lado, las lesiones hepáticas pueden resultar de procesos no específicos causados por toxinas liberadas en la infección malárica, en la esquizogonia, durante la ruptura de eritrocitos y por la liberación de varias citoquinas: Inteferón gamma (IFN- γ), interleucina 2 (IL-2), interleucina 12 (IL-12), interleucina 18 (IL-18), que a su vez activan macrófagos, células de Kupffer, y oros linfocitos hepáticos no restringidos por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) para la producción de TNF- α y óxido nítrico (NO), induciendo lesiones en el tejido hepático (Igarashi y Waki, 1983; Adachi y col., 2001).

3.5. Tratamiento Antimalárico con Cloroquina y Estrés Oxidativo

El tratamiento quimioterapéutico de la malaria, durante muchos años, se ha basado en un reducido arsenal terapéutico que presenta limitaciones tanto farmacológicas como toxicológicas, y a los cuales el *Plasmodium* ha desarrollado resistencia. Entre los fármacos más usados en el tratamiento antimalárico se incluyen: los inhibidores de la síntesis de folato (sulfonamidas y sulfotas, pirimetamina y proguanil), algunos antibióticos (quinolonas, macrólidos), endoperóxidos relacionados con la artemisinina, la hidroxinaftoquinona atovaquona, las 4 amino quinolinas (quinina, cloroquina (CQ) y mefloquina) y las 8 aminoquinolinas (primaquina, tafenoquina).

3.5.1 Cloroquina y Estrés Oxidativo

Dentro de los antimaláricos 4-amino quinolinicos, la cloroquina (CQ) (Fig.15), ha sido uno de los más usados y estudiados, pese a la resistencia que ha desarrollado el *Plasmodium* frente a este fármaco, sigue considerándose uno de los principales exponentes dentro del arsenal terapéutico antimalárico.

El mecanismo de acción de la CQ, se basa principalmente en la interferencia en el metabolismo del grupo hemo. El fármaco se concentra en las vacuolas alimenticias parasitarias y se une al grupo hemo liberado durante la degradación de la hemoglobina por parte del parásito, interfiriendo en la formación del cristal de hemozoína. La formación del complejo entre la CQ y el hemo, postulado por diversos autores, ha sido descrito frecuentemente como la asociación entre los μ -oxo dímeros del hemo en una relación de 1 CQ : 2 dímeros; lo cual se ha propuesto como el complejo responsable de la toxicidad de la CQ. De esta manera, previene el mecanismo de detoxificación del grupo hemo, el cual se ha postulado por producir daño a las membranas y enzimas parasitarias tanto por su acción detergente, como por su capacidad de participar en reacciones relacionadas con el desbalance redox (Sullivan, 2002; Becker y col., 2004).

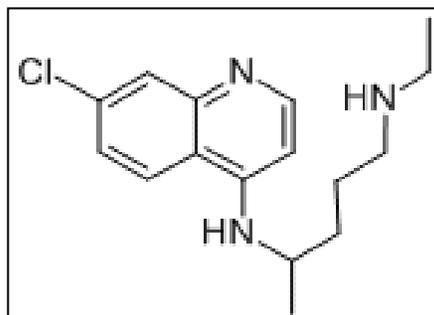


Fig.15: **Molécula de Cloroquina.** (Tomado de: http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB4359078.htm)

Por otro lado, se ha indicado que la CQ es capaz de inhibir la síntesis de proteínas dependientes del hemo, incrementar el pH dentro de vacuola alimenticia, inhibir la fosfolipasa vacuolar, las proteasas de la hemoglobina, la degradación del grupo hemo por el peróxido de hidrógeno y por glutatión e inhibir la formación del pigmento malárico; todos estos mecanismos producen un aumento en la permeabilidad de la membrana eritrocítica junto con la peroxidación lipídica de la misma. (Sullivan, 2002). Adicionalmente, se ha

indicado que tanto el grupo hemo libre, como el complejo hemo-CQ, pueden producir la muerte de las formas parasitarias por aumento de la toxicidad de las ERO producidas durante la degradación de la hemoglobina (Loria y col., 1999). El papel del EO en la cascada de eventos que explican la acción de la CQ está soportado por estudios de modulación de la acción de la CQ sobre los niveles de GSH, y el papel del GSH en el mecanismo de resistencia de los parásitos a la CQ (Ginsburg y col., 1998). Varios estudios de infecciones por *P.falciparum* y *P.berghei*, han reportado que el grupo hemo libre puede ser degradado por las reacciones del ciclo del GSH y que la CQ inhibe competitivamente esta degradación (Becker y col., 2004). Más aún, se ha demostrado que mientras en las cepas sensibles a CQ el GSH está regulado por la vía de la GR, en las cepas resistentes a CQ existen altos niveles de GSH ocasionados por la activación de la síntesis de novo. Estos resultados sugieren que la reducción de los niveles de GSH, podrían sensibilizar a las cepas parasitarias CQ-resistentes (Ginsburg y col., 1998; Becker y col., 2004).

4. JUSTIFICACIÓN

La elevación de las ERO en el hospedador, generadas durante el EO presente en el curso de la infección por parásitos del género *Plasmodium*, además de constituir uno de los aspectos importantes en la fisiopatología de la enfermedad, representa un mecanismo de defensa del hospedador contra la presencia del parásito. Es así como, tanto en células rojas infectadas, como en el mismo parásito, se ha identificado la presencia y actividad de enzimas que participan en la defensa contra el EO, como son la SOD, la CAT, las enzimas del ciclo del glutatión, las enzimas del ciclo de la tiorredoxina y las enzimas productoras de $\text{NADPH} + \text{H}^+$ (cofactor importante en la activación de los ciclos del glutatión y la tiorredoxina) que es provisto por diferentes vías metabólicas energéticamente importantes

tanto para el parásito como para las células del hospedador vertebrado, como son la G6PDH, la 6PGDH, la IDH y la GDH.

Si bien la participación del eritrocito como célula hospedadora de los parásitos maláricos y proveedora de enzimas que participan en la defensa antioxidante del binomio parásito-hospedador, está bien documentada en la literatura, el desarrollo de anemia y la disminución del número de células rojas durante el curso de la enfermedad, podrían disminuir el poder reductor de los mismos. En este sentido, no hay amplia evidencia que demuestre la utilización del poder reductor de los hepatocitos como defensa frente al EO generado durante la infección. Los hepatocitos expresan enzimas que participan en las vías metabólicas, así como las que participan en los mecanismos de defensa contra el EO, por lo tanto representan una fuente de poder reductor que puede contribuir al restablecimiento del desbalance oxidativo generado por la respuesta del sistema inmune y por la propia infección malárica. En este sentido, está bien descrita la actividad del CPF, la presencia de las isoformas de la IDH y de la GDH que pueden proveer del $\text{NADPH} + \text{H}^+$. Por otra parte, el propio tejido hepático presenta lesiones que probablemente puedan deberse a la presencia del ambiente altamente oxidante que se presenta durante la infección, lo que indica que los sistemas de defensa antioxidante hepático pueden presentar modificaciones en estas condiciones. Esta población celular representa un tejido importante dentro del hospedador ya que el hígado es el órgano con mayor actividad metabólica dentro del organismo y constituye un tejido crucial dentro de las reacciones de detoxificación, respuesta inmune y defensa contra el EO, en general.

En base a lo expuesto con anterioridad, nos parece interesante abordar el estudio de la actividad de las enzimas productoras de $\text{NADPH} + \text{H}^+$, como la G6PDH (eritrocitaria y

hepática), la 6PGDH, la IDH y la GDH hepáticas, a fin de evaluar su contribución en los mecanismos de defensa antioxidante durante la infección por *Plasmodium*.

Por otro lado, se ha descrito el mecanismo de acción de la CQ a través de la inhibición de la producción de hemozoína por parte del parásito, lo que a su vez, genera un aumento de las ERO, tóxicas para el parásito e involucradas en las diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad. Adicionalmente, diferentes estudios han evidenciado que la participación de los sistemas enzimáticos de defensa antioxidante, juegan un papel importante tanto en el mecanismo de acción de la CQ, como en los mecanismos moleculares responsables de la resistencia de algunas cepas parasitarias frente a la acción del fármaco.

El propósito de este trabajo, es el de determinar la variación de la actividad de estas deshidrogenasas, en el hígado y en los eritrocitos de ratones infectados con *Plasmodium berghei* e infectados y tratados con CQ, con el fin de contribuir con el estudio de las relaciones parásito-hospedador, profundizando en la participación de cada entidad tisular en lo relacionado a su contribución en el desbalance redox que se presenta durante la infección malarica. Asimismo, el estudio de la participación del tratamiento con CQ en la modulación del desbalance redox resulta importante debido a que, aunque algunas cepas parasitarias presentan resistencia frente a la CQ, este fármaco se mantiene dentro del arsenal terapéutico antimalárico.

II. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

1.1 Evaluar la contribución del tejido hepático y de los eritrocitos en la producción de NADPH + H⁺, como poder reductor frente al estrés oxidativo característico de la infección, en ratones infectados con *Plasmodium berghei* y tratados con cloroquina.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1 Determinar la actividad de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH_E) en eritrocitos de ratones infectados con *P.berghei* en condiciones de baja parasitemia (<30%) y de alta parasitemia (<70%).

2.2 Determinar las actividades de las enzimas productoras de NADPH + H⁺ (G6PDH_H, 6PGDH, IDH y GDH) en hígado de ratones infectados con *P.berghei* en condiciones de baja parasitemia (<30%) y de alta parasitemia (<70%).

2.3 Determinar la actividad de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH_E) en eritrocitos de ratones infectados con *P.berghei*, en condiciones de baja parasitemia (<30%) y de alta parasitemia (<70%), tratados con cloroquina hasta cura parasitológica.

2.4 Determinar las actividades de las enzimas productoras de NADPH + H⁺ (G6PDH_H, 6PGDH, IDH y GDH) en hígado de ratones infectados con *P.berghei* en condiciones de baja parasitemia (<30%) y de alta parasitemia (<70%), tratados con cloroquina hasta cura parasitológica.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos

6-fosfogluconico deshidrogenasa, glucosa-6-fosfato, ácido 6-fosfogluconico, glicil-glicina, glutamato, isocitrato, NADP⁺, Tris-HCl, digitonina, cloroquina, sacarosa y ditiotreitolo fueron adquiridos a Sigma Chemical Co. (St.Louis, Mo.). Citrato de sodio, CuSO₄, K₂HPO₄, KCl, MgCl₂.6H₂O, Na₂CO₃, NaOH, tartrato de sodio-potasio, reactivo de Giemsa, reactivo Folin-Ciocalteu y trietanolamina fueron adquiridos a Riedel –De Haën AG. Seelze Hannover. Solución Fisiológica (NaCl 0,9%) fue donado por Laboratorios Behrens, Caracas.

2. Parásitos

Se utilizó *Plasmodium berghei*, cepa ANKA, sensible a Cloroquina, mantenida en ratones.

3. Estabilatos

Para la preparación de inóculos requeridos para la infección de animales se utilizaron estabilatos de sangre parasitada de ratón (90% sangre infectada; 10% de DMSO), alícuotada (0,5 ml) en viales de criopreservación, mantenida bajo congelación (Nitrógeno) y se ajustaron en base al porcentaje de parasitemia del ratón donante.

4. Animales de Experimentación

Se utilizaron ratones macho de la cepa INH, con pesos comprendidos entre 18 y 25 g, procedentes del Bioterio del Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel” (MPPS,

Caracas), mantenidos con dieta comercial para animales de laboratorio (Ratarina^R) y agua a voluntad hasta el momento de los experimentos.

5. Infección de Animales y Mantenimiento de la Cepa

Los ratones fueron infectados por vía intraperitoneal (i.p.) con un inóculo de 10^6 eritrocitos infectados con *P.berghei* proveniente de ratones donantes infectados con alta parasitemia (30 -50%), diluidos en solución fisiológica (NaCl 0,9%). El inóculo fue preparado, entonces, directamente a partir de sangre proveniente de animales infectados o bien mediante el uso de estabilatos de sangre infectada, como se describió antes. Los parásitos se mantuvieron en los ratones por pasajes sucesivos del inóculo a animales sanos. Los animales permitieron disponer de las siguientes preparaciones biológicas:

- Hemolizado de eritrocitos
- Homogenizados de hígado

6. Determinación de la Parasitemia

La parasitemia se siguió mediante el examen de extendidos de sangre obtenida de la cola de los animales infectados, fijados con metanol, teñidos con una solución recién preparada de reactivo de Giemsa en agua destilada (1:10) y observadas con un microscopio de luz objetivo 100X (Campbell y Hawley, 1928). Las parasitemias se expresaron en términos de porcentaje de eritrocitos infectados.

7. Determinación del Curso de la Parasitemia

Para determinar el curso de la infección experimental con *P.berghei* y su comportamiento en la cepa de ratones empleados, se levantó una Curva de Parasitemia vs tiempo de infección. Para ello, se procedió a la infección de animales con 10^6 eritrocitos infectados/ratón y se registraron los porcentajes de parasitemia diaria para cada animal (cantidad de hematíes infectados por cada cien eritrocitos). Esta curva permitió el establecimiento del curso temporal de la parasitemia en las condiciones del laboratorio y la conformación de los diferentes grupos de prueba incluidos en el diseño experimental.

8. Diseño Experimental

En este estudio se incluyeron los siguientes grupos experimentales con un número de animales que varió de 3 a 8 por grupo:

8.1. Grupos Controles:

- Control: Animales sanos tratados con solución fisiológica (NaCl 0,9%).
- Cloroquina: Animales sanos tratados con Cloroquina en dosis de 25 mg/kg de peso corporal, una vez al día, por vía intra peritoneal (i.p.), en un volumen de 0,1 ml por 10 g de peso del ratón, por un período de 7 días.

8.2. Grupos Infectados:

- Baja Parasitemia: Animales infectados con *P.berghei* hasta alcanzar parasitemias no mayores del 30%.
- Alta Parasitemia: Animales infectados con *P.berghei* hasta alcanzar parasitemias mayores o iguales al 70%.

8.3. Grupos Infectados Tratados:

- Baja Parasitemia Tratados con Cloroquina: Animales infectados con *P.berghei* hasta alcanzar una parasitemia no mayor al 30% y tratados con cloroquina (25 mg/kg de peso, una vez al día, vía i.p.) hasta clarear la parasitemia.
- Alta Parasitemia Tratados con Cloroquina: Animales infectados con *P.berghei* hasta alcanzar una parasitemia igual o mayor al 70% y tratados con cloroquina (25 mg/kg de peso, una vez al día, vía i.p.) hasta clarear la parasitemia.

9. Hemolizado de Eritrocitos

Los animales de los diferentes grupos experimentales se anestesiaron con éter y se procedió a extraer, de cada animal, 0,5 ml de sangre por medio de punción cardiaca directa, usando inyectadotas de insulina cargadas con 0,5 ml de solución de citrato de sodio al 3,8% como anticoagulante. La sangre extraída se colocó en tubos Eppendorf y fueron centrifugados a 1000 x g por 15 min, en una microcentrífuga (Adams MHCT II). Se descartó el sobrenadante y los hematíes presentes en el sedimento se lavaron 4 veces con 5 ml de solución salina (NaCl 0,9%), el sedimento fue resuspendido suavemente en 1 ml de solución salina. En un tubo de centrifuga se colocó 1 ml de la suspensión de eritrocitos y se mezcló con 2 ml de solución de hemólisis [Solución saturada de Digitonina; Buffer trietanolamina 0,005 M, pH 7,5; agua destilada (3:7:10)], se mantuvo en hielo por 15 min y se centrifugó a 1000 x g por 15 min. El sobrenadante (hemolizado) fue utilizado para la determinación de la actividad de las diferentes enzimas de interés y de su contenido de proteínas, para el cálculo de la actividad enzimática específica (Fig. 16).

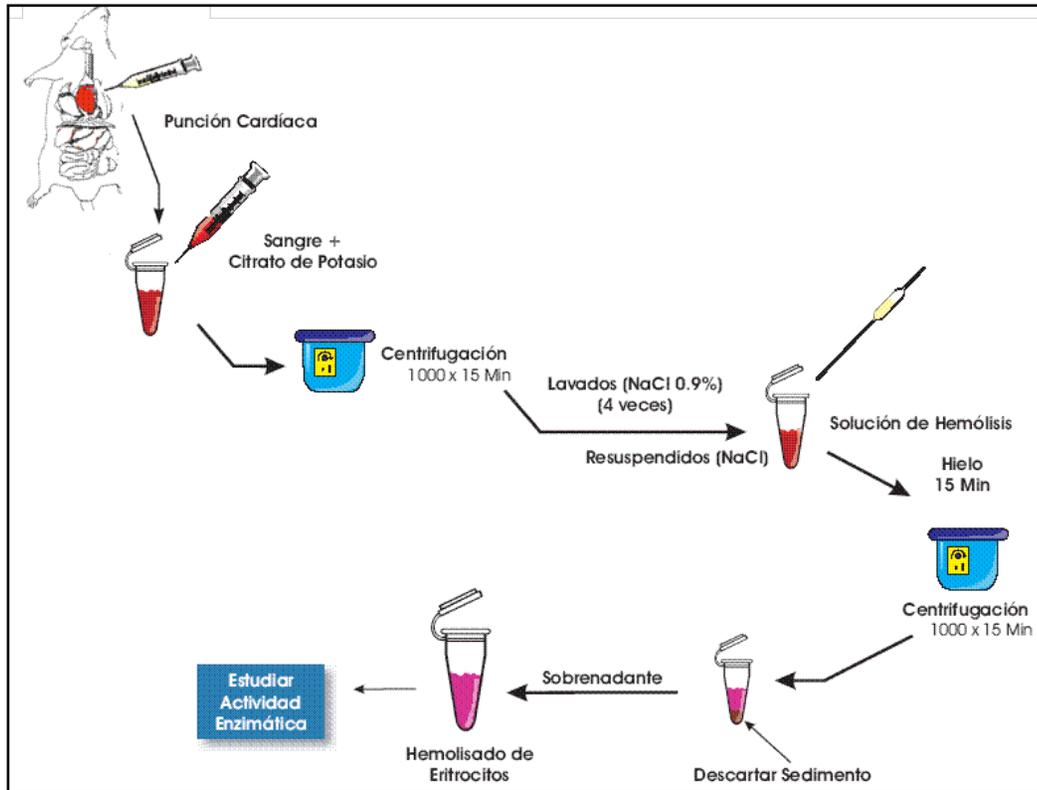


Fig.16: **Obtención de Hemolizado de Eritrocitos**

10. Homogenizado de Hígado

Los animales pertenecientes a los diferentes grupos experimentales se anestesiaron con éter y se les practicó un corte longitudinal en el abdomen para exponer las vísceras. Una vez abierta la caja torácica y previa identificación del hígado y estructuras asociadas, se procedió a la canulación del conducto colédoco para perfundir el hígado con solución fisiológica (NaCl 0,9%) hasta retirar, de esta manera, la sangre presente en los vasos hepáticos y eliminar la interferencia de las enzimas presentes tanto en los eritrocitos como en las formas sanguíneas del parásito. Los hígados perfundidos se retiraron por disección, se lavaron con solución salina en frío, se pesaron y se homogenizaron en una solución de sacarosa 0,25M; en volumen 1:5, utilizando un homogenizador de teflón sobre camisa de vidrio (GLAS COL 099CK44). El homogenado se filtró por gasa y el filtrado se centrifugó,

en ultracentrífuga (Sorvall OTD65) a 100.000 g por 45 min a 4°C. El sobrenadante (fracción soluble total) se dializó por 2 horas a 4°C, en tubos de diálisis (Cut Off de membrana = 1000) contra 1 L de buffer de diálisis [KCl 0,15 M; MgCl₂·6H₂O 5 mM; Ditiotretitol (DTT) 2 mM; pH 7] y se congeló a -10° C. Posteriormente, en cada dializado, se determinó la actividad de las diferentes enzimas y la concentración de proteínas presentes, a fin de expresar la actividad enzimática en términos de Actividad Específica (AE) (Fig.17).

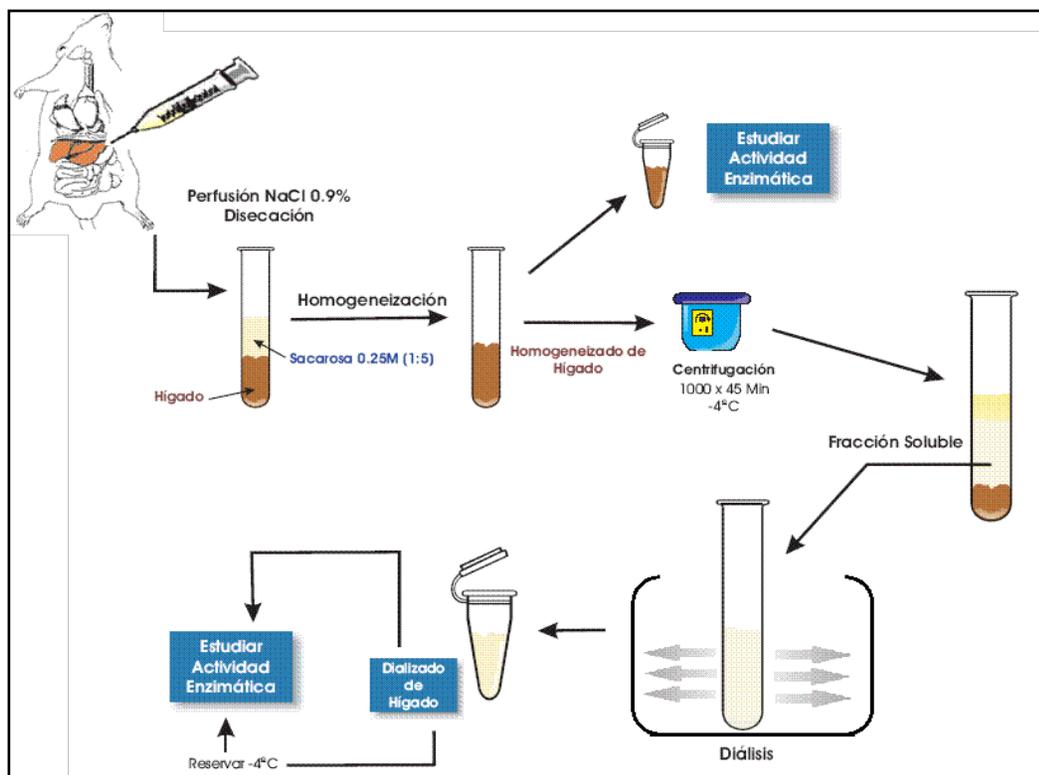


Fig.17: Obtención de Homogenizados de Hígado.

11. Determinación de la Actividad de Enzimas Productoras de NADPH+H⁺ (G6PDH, 6PGDH, IDH y GDH)

La Actividad Específica (AE) de las enzimas productoras de NADPH⁺, se realizó por determinación espectrofotométrica de la tasa de reducción de NADP a NADPH + H⁺, siguiendo el incremento de absorción a 340 nm (ULTROSPEC 2000. UV/Visible Spectro -

Tabla I: Condiciones de los Ensayos Para la Determinación de la Actividad de las Enzimas Productoras de NADPH

ENZIMAS HEPÁTICAS	CONDICIONES DEL ENSAYO	
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH)	Buffer Glicil-Glicina/MgCl ₂ 0,25 M; pH 7,6 6-fosfogluconico deshidrogenasa (Sigma) NADP (2 mg/ml) Agua destilada Extracto dializado Glucosa-6-fosfato 0,05 M; pH 7	0,50 ml 0,04 ml 0,10 ml 0,26 ml 0,05 ml 0,05 ml
Glutámico deshidrogenasa (GDH)	K ₂ HPO ₄ 0,1 M; pH 7,4 NADP (2 mg/ml) Agua destilada Extracto dializado Glutamato 0,1 M; pH 7	0,20 ml 0,10 ml 0,53 ml 0,07 ml 0,10 ml
6-Fosfogluconico deshidrogenasa (6PGDH)	Buffer Glicil-Glicina/MgCl ₂ 0,25 M; pH 7,6 NADP (2 mg/ml) Agua destilada Extracto dializado Ácido 6-fosfogluconico 0,05 M; pH 7	0,50 ml 0,10 ml 0,25 ml 0,05 ml 0,10 ml
Isocitrato deshidrogenasa (IDH)	Buffer Tris-HCl 1,35 M; pH 7,4 MgCl ₂ 0,05 M; pH 7,4 NADP (2 mg/ml) Agua destilada Extracto dializado Isocitrato 0,05 M; pH 7	0,05 ml 0,05 ml 0,10 ml 0,74 ml 0,01 ml 0,05 ml
ENZIMAS ERITROCITO	CONDICIONES DEL ENSAYO	
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH)	Buffer Glicil-Glicina/MgCl ₂ 0,25 M; pH 7,6 6-Fosfogluconico deshidrogenasa NADP (2 mg/ml) Agua destilada Extracto hemolizado Glucosa-6-fosfato 0,05 M; pH 7	0,50 ml 0,04 ml 0,10 ml 0,30 ml 0,01 ml 0,05 ml

photometer), bajo condiciones óptimas de pH, concentraciones de cofactores y sustratos específicos para cada enzima (Bergmeyer, 1976). Los volúmenes de fracción soluble de hígado o hemolizado de eritrocitos se determinaron previamente, durante el proceso de estandarización de la metodología. Las condiciones de cada ensayo se encuentran listadas en la Tabla I.

Para el cálculo de la AE de cada enzima se utilizó la siguiente expresión matemática:

$$AE = \frac{\Delta E_{340}/\text{min} \times V_f}{\epsilon_{\text{NADPH}}^0 \times V_{\text{ext}} \times [P]}$$

Donde: $\Delta E_{340}/\text{min}$ representa actividad de la enzima obtenida de la variación de la absorbancia, a 340 nm, por minuto; V_f representa el volumen final de la mezcla de reacción dentro de la cubeta de 1 cm; $\epsilon_{\text{NADPH}}^0$ representa el coeficiente de extinción molar del NADPH ($6,3 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Bergmeyer, 1975); V_{ext} es el volumen de extracto de fracción soluble de hígado o hemolizado de eritrocitos usado para la determinación en ml; y $[P]$ la concentración de proteínas presentes en la muestra en mg/ml. La actividad específica, entonces, se expresó en Unidades por miligramo de proteína (U/mg prot.) (Wilson y Walker, 2000). Las determinaciones de actividad enzimática para cada muestra se realizaron por duplicado, y la actividad enzimática específica para cada grupo de animales de experimentación representa el promedio de las actividades calculadas para cada animal.

12. Determinación de Proteínas

Para la estimación de la AE se determinó la concentración de proteínas presentes en los extractos correspondientes, utilizando el método de Lowry, adaptado a microplacas de 96

pozos (Guillén y Rojas, 2002). Este método se fundamenta en la medición espectrofotométrica del desarrollo de coloración azul por la reacción de óxido-reducción entre los residuos de aminoácidos aromáticos, triptofano y tirosina, presentes en la muestra, y el reactivo de Folin-Ciocalteu, a una $\lambda = 655$ nm, y su comparación con una curva patrón elaborada con albúmina sérica de bovino (BSA) como proteína estándar. Los patrones y las muestras se colocaron, por triplicado, en una placa de 96 pozos y se trataron con Solución A de Lowry [Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0,1 N: Tartrato de sodio-potasio al 2% en agua: CuSO_4 al 1% en agua (100:1:1)], después de mezclarse se agregó Solución B de Lowry [Reactivo Folin-Ciocalteu: agua (1:1)]. Tras incubar por 45 min., se leen las absorbancias a una $\lambda = 655$ nm en un Lector de Microplaca (Microplate Reader. BENCHMARK. Biorad). Los valores estimados representaron el promedio de las tres determinaciones para cada muestra.

13. Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos para el cálculo de actividad específica de cada grupo de animales, se compararon mediante una prueba ANOVA de una sola vía seguida por una Prueba de Comparación Múltiple de Bonferroni, utilizando el programa GraphPadPrism 5, tomando como nivel de significación un 95% de probabilidad ($p \leq 0,05$). La actividad de cada enzima se expresó como la media \pm ESM.

IV. RESULTADOS

1. DETERMINACIÓN DEL CURSO TEMPORAL DE LA INFECCIÓN POR *Plasmodium berghei* EN RATONES.

Al realizar un registro diario del porcentaje de parasitemia en un grupo de animales de experimentación, se logró determinar el curso temporal de la infección por nuestra cepa de *P.berghei* en la cepa de ratones utilizados. Con los resultados obtenidos, se obtuvo una curva de parasitemia (Fig. 18) que permitió separar a los animales en los grupos experimentales utilizados para los diferentes ensayos.

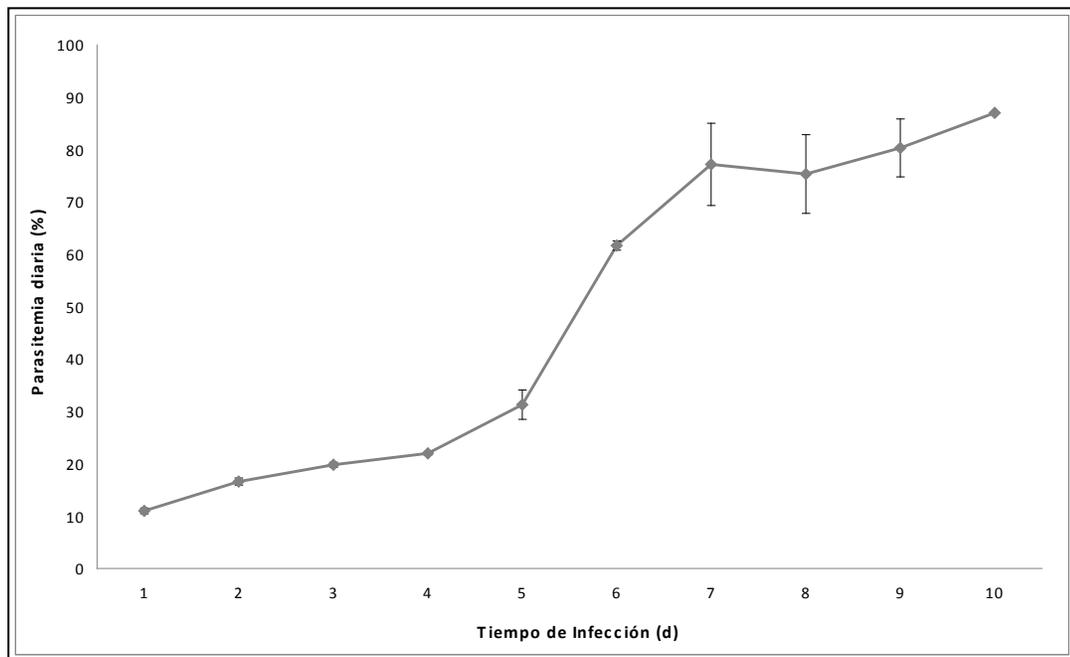


Fig.18: **Curso temporal de la parasitemia en ratones INH infectados con *Plasmodium berghei*.** Los puntos representan la media \pm ESM ($n=5$).

Es así como, los animales con parasitemias aproximadas del 30%, alcanzada entre el cuarto y quinto día de infección, conformaron los grupos de **Baja Parasitemia**. Por otra parte, entre el sexto y séptimo día de infección las parasitemias alcanzaron niveles iguales o superiores al 70%, siendo este grupo de animales considerado como de **Alta**

Parasitemia. En ambos casos, algunos animales fueron sacrificados para realizar los ensayos enzimáticos y otros fueron tratados, a partir de ese momento, con CQ (25 mg/kg de peso, una vez al día, vía i.p. hasta clarear la parasitemia.

2. EFECTO DE LA PARASITEMIA SOBRE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS PRODUCTORAS DE NADPH + H⁺ EN RATONES INFECTADOS CON *P.berghei*

2.1. Efecto de la Infección por *P.berghei* Sobre la Actividad de G6PDH Eritrocitaria y Hepática, en Ratones

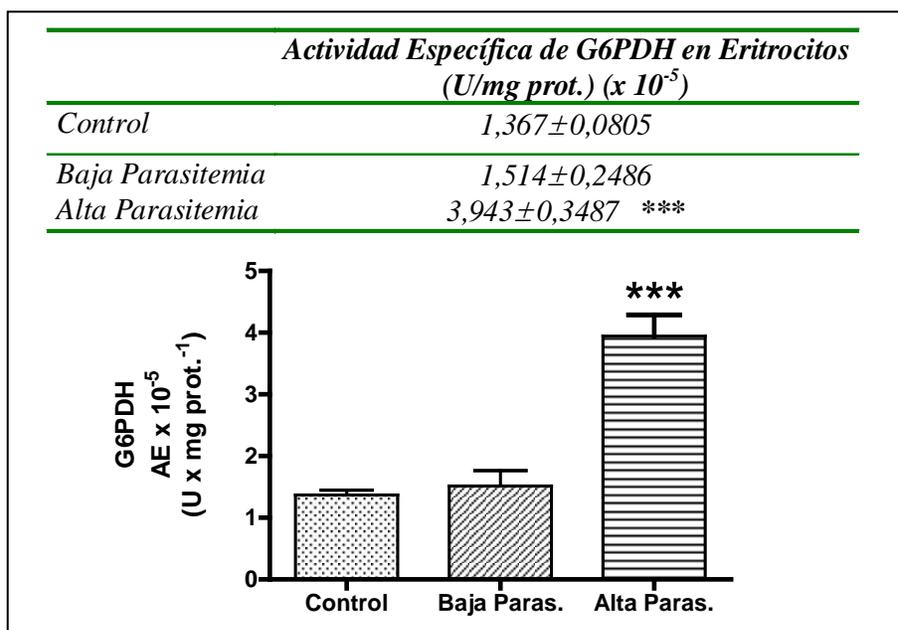


Fig.19: Efecto de la infección por *P.berghei* sobre la actividad de G6PDH en eritrocitos de ratón. (***) $p < 0,001$ con respecto al control)

En las figuras 19 y 20, se muestra el efecto de los diferentes niveles de infección por *P.berghei* sobre los valores de actividad de las enzimas G6PDH eritrocitaria (G6PDH_E) y G6PDH hepática (G6PDH_H), respectivamente. En ambos casos, la actividad enzimática mostró un comportamiento similar. Mientras que a bajos niveles de parasitemia (aproximadamente 30%), la actividad tanto de la G6PDH_E como la actividad de la G6PDH_H no muestran una diferencia significativa con respecto a la actividad de G6PDH_E y

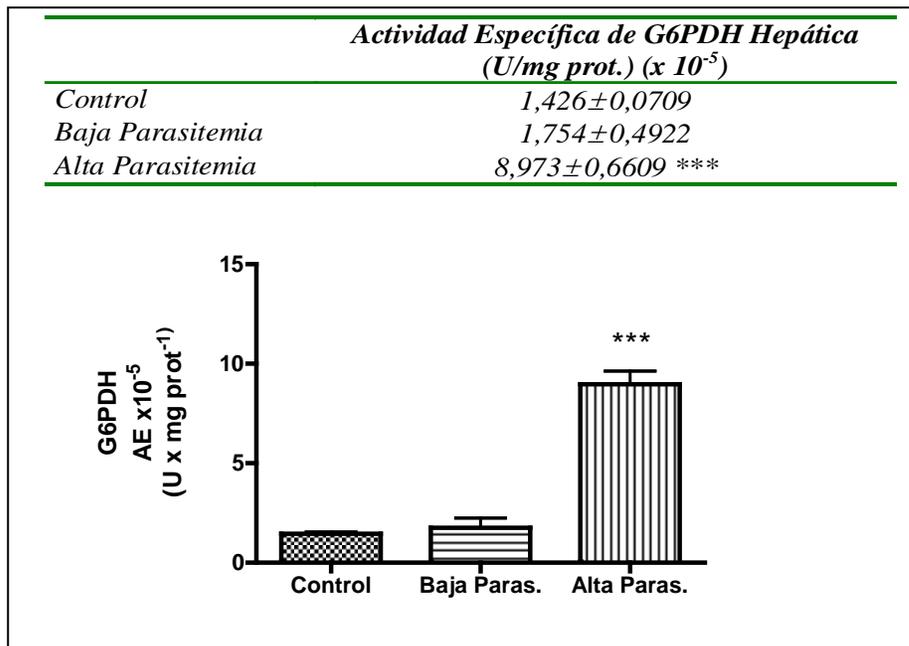


Fig.20: Efecto de la infección por *P.berghei* sobre la actividad de G6PDH en hepatocitos de ratón. (***) $p < 0.001$ con respecto al control)

G6PDH_H en los animales controles sin infección, las actividades enzimáticas se elevan significativamente cuando el nivel de parasitemia aumenta hasta valores iguales o superiores a 70%. En el caso de la actividad de G6PDH_E, se puede observar un aumento de hasta tres veces con respecto al control y para la G6PDH_H el aumento de la actividad, sextuplica la de los controles.

2.2. Efecto de la Infección por *P.berghei* Sobre la Actividad de 6PGDH Hepática, en Ratones

El efecto de la infección sobre la actividad de la 6-fosfogluconato Deshidrogenasa hepática (6PGDH_H) se muestran en la figura 21. Los niveles de parasitemia de aproximadamente 30%, no modifican significativamente la actividad de esta enzima con relación a los

controles, pero las parasitemias altas producen una activación muy significativa de la enzima, con respecto a la actividad específica de la 6PGDH_H registrada en ratones controles sanos.

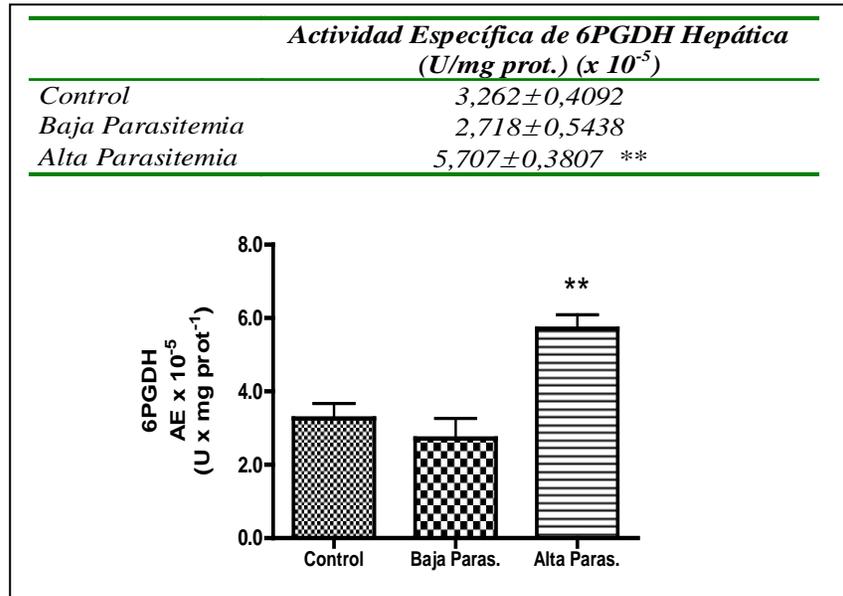


Fig.21: Efecto de la infección por *P.berghei* sobre la actividad de 6PGDH en Hepatocitos de ratón. (** p < 0,01 con respecto al control).

2.3. Efecto de la Infección por *P.berghei* Sobre la Actividad de IDH Hepática, en Ratones

La enzima Isocitrato Deshidrogenasa hepática (IDH_H) muestra un comportamiento contrario al de las G6PDH_E, G6PDH_H y 6PGDH_H. Mientras que estas últimas aumentaron su actividad en relación directa con el aumento de la parasitemia, en el caso de la IDH_H la actividad, tanto en condiciones de baja parasitemia, como de alta parasitemia, disminuyeron significativamente con respecto a la actividad de la IDH_H en hepatocitos de animales sin infección, evidenciando una inactivación creciente de la enzima que se corresponde con el incremento en los valores de parasitemia (Fig. 22).

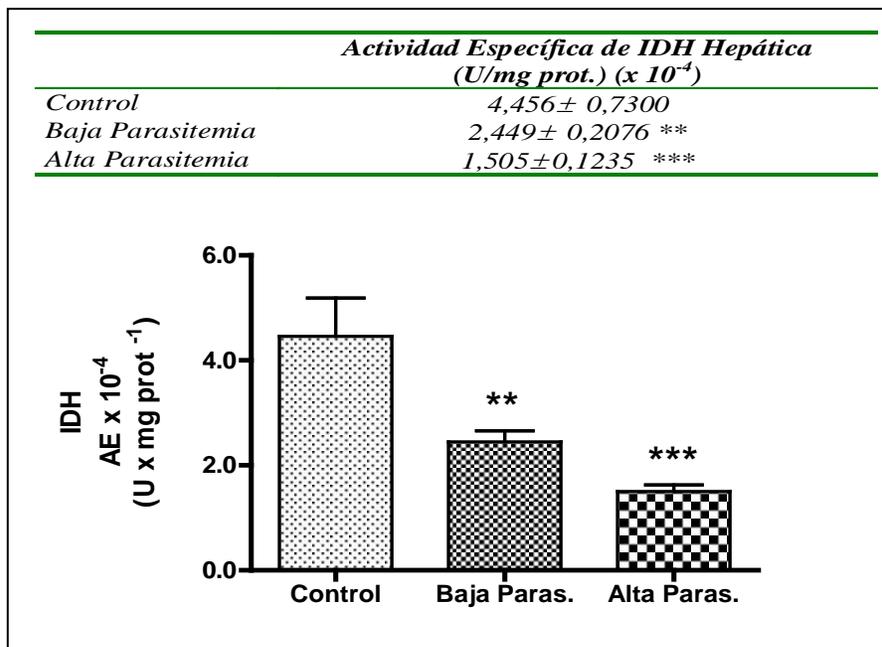


Fig.22: Efecto de la infección por *P.berghei* sobre la actividad de IDH en Hepatocitos de ratón. (***) $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ con respecto al control)

2.4. Efecto de la Infección por *P.berghei* Sobre la Actividad de GDH Hepática, en Ratones

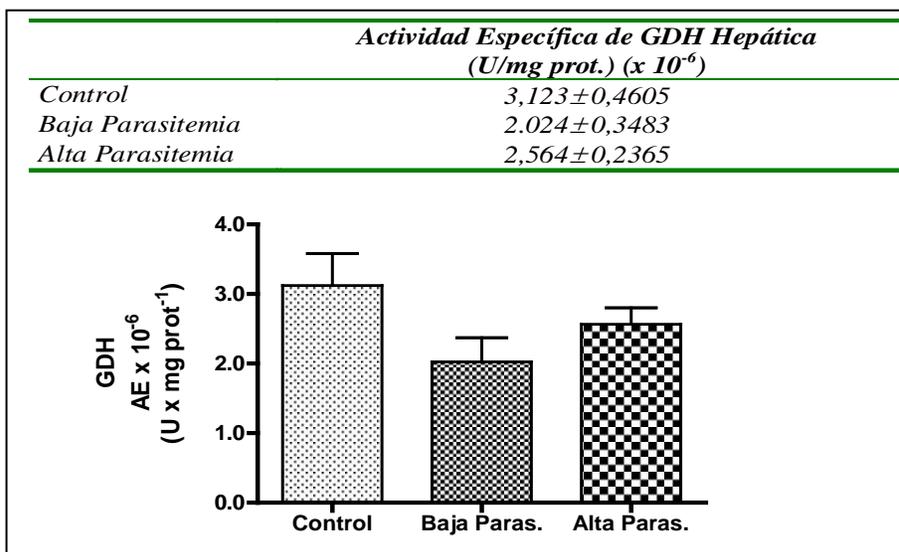


Fig.23: Efecto de la infección por *P.berghei* sobre la actividad de GDH en hepatocitos de ratón.

La comparación de las actividades de la Glutámico Deshidrogenasa hepática (GDH_H) determinadas en animales con diferentes niveles de infección con *P.berghei* con respecto a los controles sanos, se muestra en la figura 23. Los resultados obtenidos indican que la actividad de esta enzima hepática no se modifica significativamente durante el curso de la infección malarica.

3. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON CLOROQUINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS PRODUCTORAS DE NADPH EN RATONES INFECTADOS CON *P.berghei*

3.1. Efecto del Tratamiento con CQ Sobre la Actividad de G6PDH Eritrocitaria y Hepática en Ratones Infectados con *P.berghei*.

El efecto del tratamiento con CQ en ratones con diferentes grados de infección por *P.berghei* sobre la actividad de la G6PDH_E se muestra en la figura 24. En el grupo de ratones sin infección (sanos), la actividad enzimática que se aprecia es la que corresponde a la enzima presente exclusivamente en los eritrocitos, donde se observó que el tratamiento con cloroquina no afectó significativamente los valores de actividad de la G6PDH_E. Mientras que, en la determinación de la actividad enzimática en eritrocitos infectados se mide la actividad tanto de la G6PDH que está presente en el eritrocito como la de la enzima que se encuentra en las formas parasitarias que infectan al mismo eritrocito. Cuando se compara la actividad de la G6PDH en eritrocitos de ratones infectados con baja parasitemia sin tratamiento con respecto a los tratados con CQ, no se observa una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos experimentales, al igual que los resultados observados para los grupos de ratones sanos.

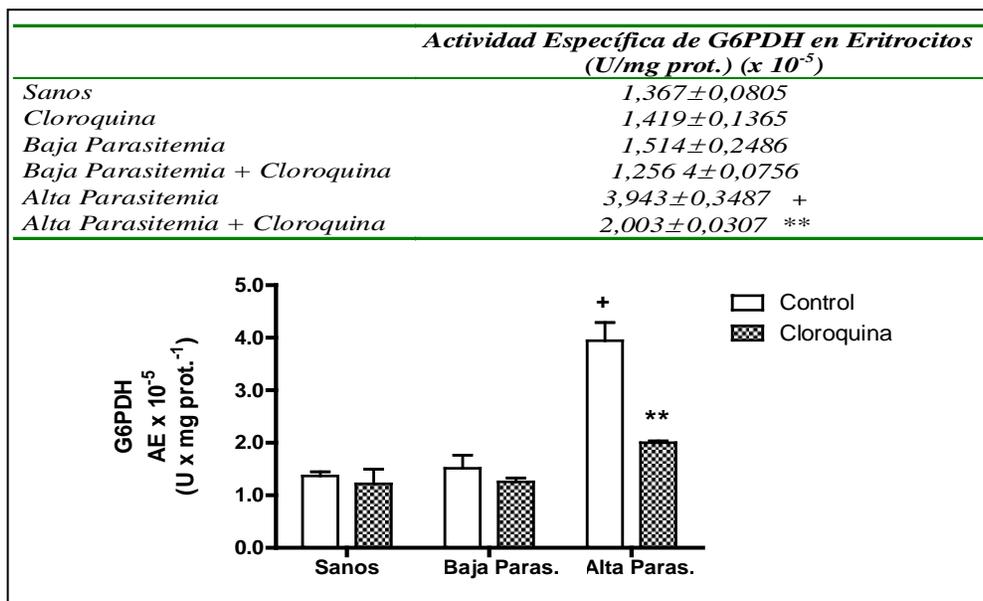


Fig.24: Efecto del tratamiento con cloroquina (CQ) sobre la actividad de G6PDH en eritrocitos de ratones infectados con *P.berghei* (+ p< 0,001 con respecto al grupo control; ** p< 0,01 con respecto al grupo con Alta Parasitemia).

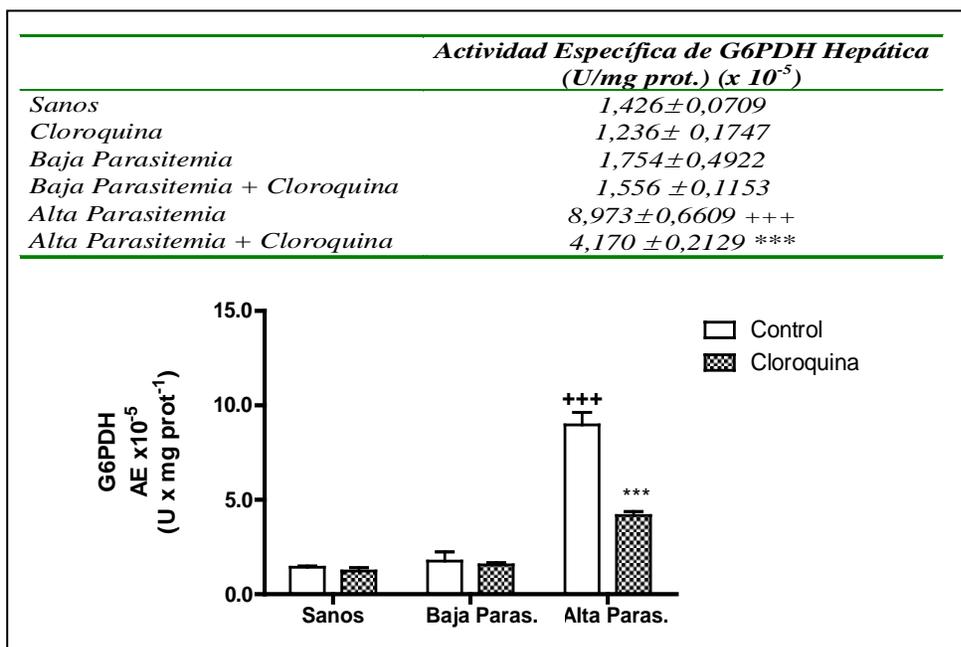


Fig.25: Efecto del tratamiento con cloroquina (CQ) sobre la actividad de G6PDH en hepatocitos de ratones infectados con *P.berghei*. (+++ p< 0.001 con respecto al control; *** p< 0,001 con respecto al grupo con Alta Parasitemia).

Sin embargo, los resultados de la actividad específica de la G6PDH_E, en el grupo experimental de alta parasitemia si difieren significativamente en el grupo tratado con CQ con respecto a los no tratados, evidenciándose una inhibición de la actividad enzimática que puede corresponder, a la disminución de la G6PDH parasitaria más que a la del eritrocito infectado propiamente dicha. El ANOVA practicado a estos grupos determina que si hay diferencia estadísticamente significativa entre las actividades de G6PDH correspondientes a los grupos de eritrocitos sanos y a los parasitados presentes en animales con alta parasitemia ($p < 0,001$).

En la figura 25, se muestran los efectos del tratamiento con CQ sobre la actividad de la G6PDH_H en los diferentes grupos experimentales. La isoenzima hepática también parece mostrar sensibilidad a la CQ, de igual forma como la observada para la G6PDH_E. Sin embargo, en el caso de los hepatocitos, los resultados observados se refieren exclusivamente presencia de la enzima hepática, ya que en nuestro modelo experimental, al no seguir un modelo de infección natural, los hepatocitos no presentaron formas parasitarias. Mientras que a bajos niveles de parasitemia (aprox. 30%), no se observa efecto inhibitorio de la CQ sobre la actividad de la enzima respecto a su control, a altas parasitemias se observa una disminución significativa de la actividad de G6PDH_H ($p < ,001$), que tiende a conducir a los valores de actividad hacia los observados en los grupos sanos.

3.2. Efecto del Tratamiento con CQ Sobre la Actividad de 6PGDH Hepática en Ratones Infectados con *P.berghei*.

Los efectos del tratamiento con CQ sobre la actividad enzimática de la 6PGDH hepática, se muestran en la figura 26. Se puede observar que el comportamiento de esta enzima en

los diferentes grupos experimentales, es similar al de la G6PDH_H. Al igual que en los grupos sanos, los grupos de baja parasitemia no presentan diferencias estadísticamente significativas de actividad de 6PGDH_H cuando son tratados con CQ, poniendo en evidencia, nuevamente, que la cloroquina no parece afectar directamente la actividad de la enzima presente en el hepatocito. Sin embargo, al aumentar la infección, la CQ inhibe en forma significativa ($p < 0,05$) el aumento de actividad de 6PGDH_H generada por la presencia del parásito.

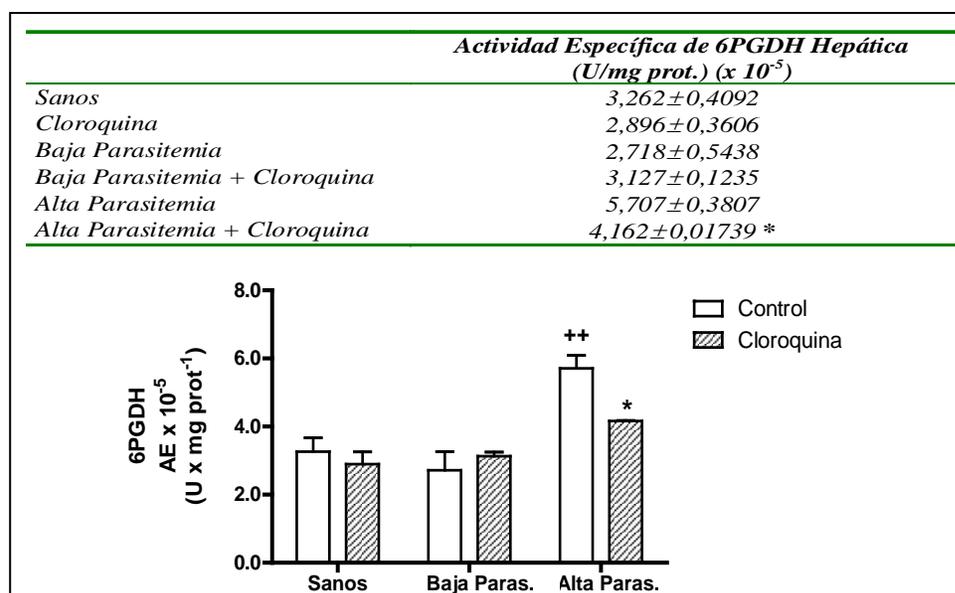


Fig.26: Efecto del tratamiento con cloroquina (CQ) sobre la actividad de 6PGDH en hepatocitos de ratones infectados con *P.berghei*. (++) $p < 0.01$ con respecto al control; * $p < 0,05$ con respecto al grupo Alta Parasitemia)

3.3. Efecto del Tratamiento con CQ Sobre la Actividad de IDH Hepática en Ratones Infectados con *P.berghei*.

Los resultados encontrados en la determinación del efecto del tratamiento con CQ sobre la actividad de la enzima Isocitrato Deshidrogenasa hepática (IDH_H) de ratones con diferentes niveles de parasitemia (Fig. 27), indican un efecto inhibitorio significativo de la CQ sobre la actividad de la IDH_H ($p < 0,001$), en ratones sanos. Sin embargo, no se

produjeron cambios significativos entre los grupos infectados y tratados con CQ, con respecto a sus respectivos controles.

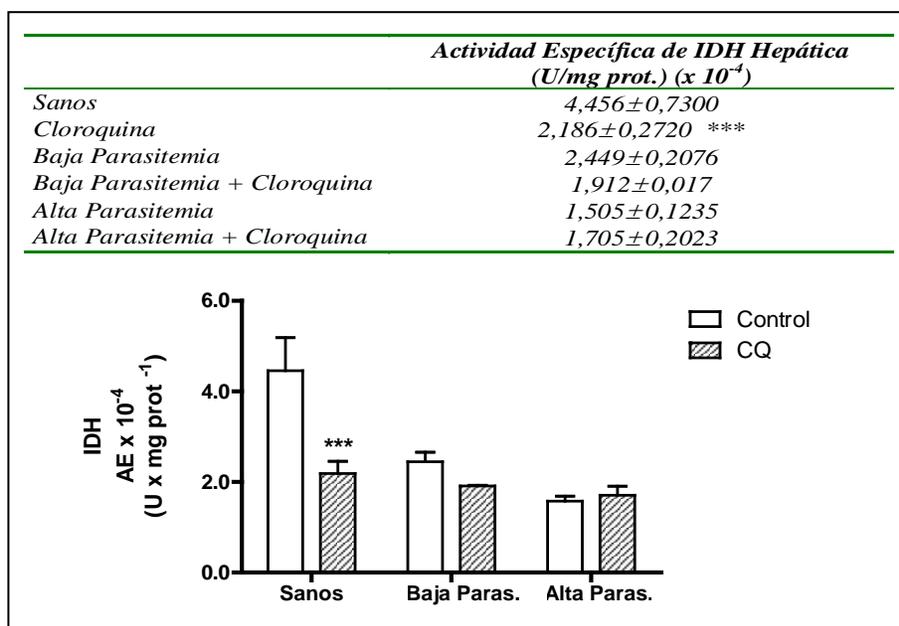


Fig.27: **Efecto del tratamiento con cloroquina (CQ) sobre la actividad de IDH en hepatocitos de ratones infectados con *P.berghei*.** (***) $p < 0,001$ con respecto al control)

En los grupos de animales infectados, como se indicó con anterioridad, la actividad de la IDH_H, disminuye conforme aumenta el grado de infección por *P.berghei* y, al mismo tiempo, el tratamiento con CQ, que tiene como efecto una disminución de la parasitemia, conduce a una disminución del grado de inhibición que genera la infección por sí misma. Por otro lado, el tratamiento con CQ en ratones sin infección mostró una disminución significativa de la actividad de la IDH_H con respecto a los controles sanos, lo que indicó un grado de sensibilidad de la enzima a la presencia de CQ. Esta inhibición, producto del tratamiento con CQ, explicaría el hecho de que pese a la desaparición de la infección, los valores de actividad de IDH_H no tienden al restablecimiento de los valores de actividad de IDH_H observados en los controles sanos, sino más bien se observa una tendencia al mantenimiento de los valores de actividad de IDH_H determinados en el grupo de animales sanos tratados con CQ.

3.4. Efecto del Tratamiento con CQ Sobre la Actividad de GDH Hepática en Ratones Infeccionados con *P.berghei*.

Los efectos del tratamiento con CQ sobre la actividad de la GDH hepática (GDH_H) de ratones infectados con *P.berghei*, con altos y bajos niveles de parasitemia se muestran en la figura 28. Los resultados indican que, al igual que en el caso de la IDH_H, en los animales sin infección, el tratamiento con CQ inhibe significativamente la actividad de la GDH_H ($p < 0,001$), mientras que en hepatocitos de animales infectados la actividad de la GDH_H, no se detecta.

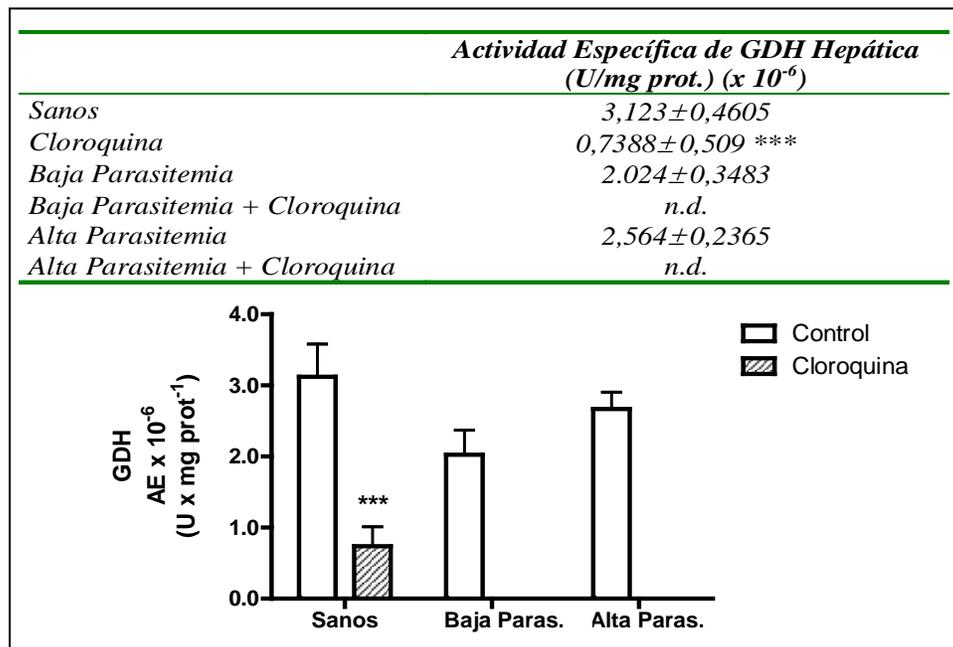


Fig.28: Efecto del tratamiento con cloroquina (CQ) sobre la actividad de GDH en hepatocitos de ratones infectados con *P.berghei*. (***) $p < 0,001$ con respecto al control)

El hecho de que la depuración de la parasitemia no restaure los valores de actividad enzimática hacia los valores determinados para los controles sanos, como se observa en los grupos parasitados y tratados con CQ, parece evidenciar un aumento de la sensibilidad de la GDH_H a la CQ por efecto de la infección.

V. DISCUSIÓN

Se ha postulado que el aumento de las ERO, asociadas al EO, observadas en el curso de la infección generan un medio extracelular agresivo extremadamente oxidativo en torno a las células hospedadoras parasitadas, que se traduce en una alteración del estado de oxido-reducción. Como ya hemos mencionado en líneas anteriores, el aumento de las ERO tiene su origen en la alta actividad metabólica desarrollada por el parásito dentro del hospedador debido a su rápido crecimiento y multiplicación, en la actividad metabólica de los propios eritrocitos y hepatocitos infectados, y en la actividad de las células fagocíticas del hospedador como respuesta del sistema inmune a la presencia de los parásitos (Ohno y col., 1982_a; Ohno y col., 1982_b; Siddiqi y col., 1999; Becker y col., 2004).

La actividad hemoglobinolítica que realiza el parásito en el eritrocito hospedador, genera subproductos tóxicos, que incluyen al grupo hemo; este, al oxidarse conduce a la formación de H_2O_2 , O_2^- y al degradarse, a través de reacciones que consumen glutatión (Atamna y Ginsburg, 2005), libera Fe^{+2} . El ión ferroso, por su parte, participa en la reacción de Fenton, en la cual se transforma el H_2O_2 en el radical $\cdot OH$, altamente oxidante. Alternativamente, una proporción del hemo liberado, es usado por el parásito para formar parte del pigmento malárico o hemozoína, el cual también posee una alta actividad pro-oxidante (Guha y col., 2006). Es así como, tanto la actividad parasitaria como la del hospedador generan el aumento de las ERO que se correlaciona con el desarrollo de complicaciones producidas por la malaria.

Dentro de los sistemas de defensa antioxidante del hospedador y del mismo parásito, se encuentran enzimas de primera línea como son la SOD, la CAT, las enzimas del ciclo del glutatión y las del sistema de la tiorredoxina (Dive y col, 2003; Becker y col., 2004).

Aunque existe diferencia entre los resultados que arrojan los estudios realizados en diferentes modelos animales, la mayoría de los autores evidencian una disminución en los niveles de actividad plasmática y hepática tanto para la CAT, SOD, GPx, así como para otros antioxidantes como albúmina, GSH, ascorbato y tocoferol plasmático (Srivastava y col., 1992; Srivastava y col., 1999; Guha y col., 2006). Estas condiciones favorecen la elevación de las ERO (radical hidroxilo y anión superóxido) durante la infección.

Las enzimas productoras de NADPH constituyen una importante línea de defensa contra el daño producido por las ERO generadas durante el EO. El NADPH + H⁺ es un cofactor reducido, poder reductor, esencial para la actividad de dos ciclos importantes por su actividad como defensa antioxidante: uno es el ciclo del glutatión (GSH) y otro es el de la tiorredoxina, ambos presentes en los hepatocitos (Srivastava y col., 1992; Oblong y Powis, 1993). La actividad de la GSH reductasa (GR), es esencial para asegurar la función continua de la CAT como detoxificadora del H₂O₂, actuando como modulador alostérico. La GR, cataliza la reducción del GSSG, en presencia de NADPH, asegurando la presencia de GSH como donador de electrones necesarios para la reducción de peróxidos por efecto de la GPx. y la degradación del hemo libre. Esto constituye, por sí mismo, un mecanismo de detoxificación de ERO y por otro lado asegura bajos niveles de H₂O₂ que permitirían la actuación de la CAT (Kirkman y col, 1987; Siddiqi y Pandey, 1999). Entonces, el NADPH provisto por deshidrogenasas como la G6PDH, la 6PGDH, la IDH y la GDH, resultaría esencial para la reducción del GSSH, por efecto de la GR, con el fin de mantener niveles apropiados de GSH (Van der Jagt, 1989; Atamna y col., 1994; Luzzatto, L., 1995; Atamna y col, 2005).

La primera de las reacciones que ocurren dentro del segmento oxidativo del CPF, corresponde a la formación de 6PG a partir de G6P debido a la actividad de la G6PDH,

con la consecuente producción de NADPH. Nuestros resultados, en relación a la actividad de la G6PDH_E y de la G6PDH_H en presencia de la infección por *P.berghei*, indican que ambas formas de la enzima siguen el mismo comportamiento. Mientras que a bajas parasitemias ($\leq 30\%$) no se evidencia una diferencia significativa con respecto a los controles, estas tienden a aumentar significativamente su actividad a altas parasitemias ($\geq 70\%$), siendo más pronunciado el efecto de aumento de actividad de la isoforma hepática en comparación con la eritrocitaria (Figs. 19 y 20). El aumento observado, en la actividad de la G6PDH_E en eritrocitos infectados con *P. berghei*, es consistente con los valores de actividad de esta enzima reportados en estudios que anteceden esta investigación y corresponden a la participación tanto de la enzima parasitaria como de la eritrocítica (Mishra y col., 1994; Rodrigues, 2003; Becker y col., 2004). En efecto, la G6PD de origen parasitario, se ha identificado, aislado y caracterizado en *P. falciparum* y *P. berghei* (Luzzatto, 1995; Bozdech y Ginsburg, 2005), sin embargo, su actividad por sí sola, no parece suficiente para sustentar el desarrollo del parásito, dentro de su célula hospedadora bajo las condiciones de estrés oxidativo imperantes. En apoyo a esta conclusión, la deficiencia de G6PDH, debido a alelos mutantes en la enzima hospedera, que conduce a la insuficiente provisión de NADPH, o el reemplazo de un solo aminoácido en los sitios de unión de la coenzima o del sustrato, generan resistencia del hospedador vertebrado contra la infección malarica (Beutler, 1994; Ginsburg y col., 1999; Becker y col., 2004). En consecuencia, cabe la interpretación de que la activación de la G6PDH, importante como proveedora de NADPH, es necesaria para garantizar la supervivencia del binomio parásito-eritrocito. Por su parte, la elevación de la actividad de G6PDH_H reportada en esta investigación, indicaría también un aumento en la actividad del CPF dentro de los hepatocitos. En este caso, la actividad G6PDH_H observada, correspondería a la isoenzima hepática, ya que el modelo de infección experimental utilizado, no permite el desarrollo de estadios hepáticos del parásito, y por otra parte, la perfusión del hígado practicada, antes

de la preparación de los correspondientes homogeneizados del tejido, garantiza la eliminación de la contaminación con formas sanguíneas presentes en los lechos vasculares hepáticos. Por lo tanto, cuando se compara la proporción de la elevación de la actividad de la G6PDH_E (288% aprox.) con la de la G6PDH_H (629% aprox.), se evidencia que la actividad de la isoforma hepática aumenta en una mayor proporción que la observada para el eritrocito infectado, en relación a sus respectivos controles sin infección. El paso metabólico que sigue a la formación de 6PG, es la descarboxilación del ácido 6PG catalizado por la 6PGDH, para formar ribulosa-5-fosfato y una segunda molécula de NADPH. Los resultados obtenidos en este estudio para la actividad de la 6PGDH_H en presencia de la infección por *P.berghei*, muestran un comportamiento similar al de la G6PDH_H, presentando una elevación significativa en los grupos experimentales con alta parasitemia, lo que apunta en forma consistente al aumento del flujo a través de todo el segmento oxidativo del CPF, con la consiguiente formación de grandes cantidades de NADPH que se consumirían en los mecanismos de defensa antioxidante.

En base al aumento observado en la actividad de las enzimas hepáticas G6PDH_H y 6PGDH_H, inferimos la contribución del tejido hepático en el control del desbalance redox producido por la infección por *P. berghei* en los animales de experimentación, a través del aumento del flujo del CPF para la producción de NADPH y ribulosa- 5 fosfato.

Las reacciones catalizadas por la IDH y por la GDH representan dos mecanismos adicionales para la producción de NADPH en diversos organismos, entre los cuales se incluye a los parásitos del género *Plasmodium* y células eucariotas superiores (Roth y col., 1982; Vander Jagt y col., 1989; Sahni y col., 1999). Como ya fue comentado anteriormente, en los hepatocitos existen varias formas isoenzimáticas de IDH: citoplasmática, mitocondrial y peroxisomal (Sahni y col., 1992). La función más importante

de esta isoforma de IDH es proveer el NADPH esencial para las reacciones reductivas como la síntesis de lípidos, la reducción de hidroperóxidos y la producción de GSH, mientras que la isoforma mitocondrial, dependiente de NAD, funciona principalmente como productor de α -oxoglutarato para el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Entonces, la IDH/NADP, provee del poder reductor necesario para la defensa en contra del daño oxidativo citosólico y mitocondrial (Wrenger y Müller, 2003; Bozdech y Ginsburg, 2005). Los resultados obtenidos para la IDH_H en ratones infectados por *P.berghei*, muestran que el comportamiento de la enzima es contrario al de las deshidrogenasas que participan en la fase oxidativa del CPF. De esta manera, la actividad de la IDH_H disminuyó significativamente en los animales con baja parasitemia (54% aprox.) y en los animales con alta parasitemia (34% aprox.), con respecto a la actividad de la IDH_H de animales sanos, mostrando un grado de inhibición que aumentó en forma directa con el incremento de la parasitemia. Por el contrario, la actividad de la IDH/NADP de eritrocitos infectados con *Plasmodium*, aumenta en forma directa al grado de infección. Este efecto corresponde, principalmente, a la enzima de origen parasitaria (Wrenger y Müller, 2003), la cual se ha reportado en los estadios eritrocíticos de *Plasmodium knowlesi* (Sahni y col, 1992) y de *Plasmodium falciparum* (Vander Jagt y col, 1989). La disminución de la actividad de la IDH_H parece estar relacionada con el aumento del EO y al elevación de los niveles de anión peroxinitrito (ONOO⁻) que prevalecen durante la infección. Este anión (ONOO⁻) se postula como un potente inhibidor de la actividad de las isoformas mitocondriales y citoplasmáticas de la IDH dependiente de NADP, mediante la S-nitrosilación de residuos de cisteína en la molécula de la enzima (Lee y col., 2003). El ONOO⁻, es un agente oxidante generado de la interacción del NO y del anión superóxido (O₂^{*}), cuya producción está aumentada durante la infección malárica (Sharma y col., 2004; Becker y col., 2004). Tomando en cuenta que: el NO es la única molécula endógena que compete con la SOD por el O₂^{*} disponible en condiciones fisiológicas (Lee y col., 2003),

que los niveles de NO se encuentran aumentados por la actividad de células hepáticas con actividad inmune (Adachi y col., 2001), y que la actividad de la SOD en hepatocitos de hospedadores infectados se encuentra disminuida (Guha y col., 2006), es altamente probable la elevación de las concentraciones de ONOO^- que pudieran ocasionar la inhibición de la IDH_H como la mostrada en nuestro modelo experimental. Adicionalmente, las lesiones morfo-funcionales evidenciadas por diferentes estudios, sobre el hígado, en presencia de la infección malárica (Siddiqi y col., 1999; Guha y col., 2006; Acosta 2010) pudieran, afectar en forma negativa la actividad de la enzima y, en consecuencia, esta inactivación ocasionaría una disminución de los niveles de NADPH y de GSH, conduciendo a una condición pro-oxidante.

La enzima GDH, es la enzima que cataliza la formación de glutamato a partir del sustrato α -oxoglutarato, con la consiguiente formación de NADPH. Esta enzima no está presente en los eritrocitos, sin embargo, se ha identificado y caracterizado en los diferentes estadios del ciclo de vida del parásito (Gamboa y Rodríguez, 1996; Bozdech y Ginsburg 2005) y su actividad se ha evidenciado en eritrocitos infectados con *P.berghei* (Rodrigues, 2003). La GDH, cuya actividad conecta el metabolismo del nitrógeno con el metabolismo redox del parásito, es considerada por algunos autores como la fuente principal del NADPH requerido para la reducción del glutatión, en los estadios eritrocíticos del parásito (Vander Jagt, 1989), evidenciando su participación tanto en la energética de los mismos como su función en el equilibrio redox del sistema eritrocito-parásito (Gamboa y Rodríguez, 1996); estas importantes funciones la convierten en un blanco prometedor para el diseño de agentes antimaláricos que actúen sobre las formas parasitarias eritrocíticas.

Los resultados obtenidos en relación a la actividad de la GDH_H , de animales infectados respecto a los controles sanos, contrario a lo esperado, sugieren que la misma no sufre

modificaciones estadísticamente significativas en ambas condiciones. Este comportamiento, marca una diferencia entre la isoenzima parasitaria y la enzima del hospedador, y refuerza la tesis de la GDH_P como diana para el diseño de antimaláricos más específicos.

Analizadas las modificaciones que ejerce la infección por *P.berghei*, sobre las enzimas hepáticas productoras de NADPH, podemos concluir que el aumento del flujo a través del segmento oxidativo del CPF, por activación de la G6PDH y la 6PGDH, es el responsable de la generación de la mayor cantidad de equivalentes de reducción necesarios para la conservación de los niveles de GSH hepático, como mecanismo de defensa frente a la presencia de ERO. En las mismas condiciones, los sistemas metabólicos donde participan la IDH_H y la GDH_H, por el contrario, no contribuyen a la regulación del desbalance redox.

La CQ es el derivado 4-aminoquinolínico más ampliamente utilizado en el tratamiento de la malaria y su mecanismo de acción más aceptado es la inhibición de la formación de la β-hematina por las formas eritrocíticas del parásito. Sin embargo, los estudios sobre la actividad del fármaco indican que a este efecto antimalárico también contribuye su actuación como inmunomodulador. Nuestros resultados, demuestran el efecto inhibitorio de la CQ sobre las enzimas G6PDH_E y G6PDH_H

Agradecimientos al CDCH, por el financiamiento de este trabajo a través del proyecto PG 06 30 5125 2007