

# UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

**Departamento de Biología Animal, Parasitología,  
Ecología, Edafología y Química Agrícola.**



## **Óxido nítrico como modulador de la estrogiloidosis**

Memoria que presenta  
Ana Lucía Ruano Nieto para  
Optar al grado de Doctor

Salamanca, julio 2008

D. ANTONIO MURO ÁLVAREZ Profesor Titular de Parasitología y JULIO LÓPEZ ABÁN Profesor Ayudante Doctor de Parasitología del Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Salamanca.

CERTIFICAN: Que el presente trabajo titulado «**Óxido nítrico como modulador de la strongiloidosis**» realizado por D<sup>a</sup> Ana Lucía Ruano Nieto, ha sido desarrollado en el Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola bajo nuestra dirección y consideramos que reúne las condiciones necesarias para ser defendido y optar al título de Doctor.

Y para que así conste, a los efectos legales firmamos el presente certificado en Salamanca a veinticinco de julio de dos mil ocho.

Fdo: Antonio Muro Álvarez

Fdo: Julio López Abán

Memoria que presenta para  
Optar al grado de Doctor

Ana Lucía Ruano Nieto

Doctora en Medicina y Cirugía por la Universidad Central del Ecuador, (Quito, Ecuador) con fecha de 14 de septiembre de 1994. Homologado por el Ministerio de Educación y Ciencia de España a Licenciado en Medicina y Cirugía.

Master en Medicina Tropical, Sección Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Universidad Federal de Goias (Goiania, Brasil) con fecha de 14 de febrero de 2002.

**Atrio de la Catedral Metropolitana de Quito, Ecuador:**

ES GLORIA DE QUITO EL DESCUBRIMIENTO DEL  
RÍO AMAZONAS

Bien se podría gloriarse Babilonia de sus muros, Nínive de su grandeza, Atenas de sus letras, Constantinopla de su imperio, que Quito las vence por ser la llave de la Cristiandad y por conquistadora del mundo, pues a esta ciudad pertenece el descubrimiento del gran río de las Amazonas”.

Fray Gaspar de Carvajal,

**Atrio de la catedral de Zamora, España.**

Profundamente vivida, viejas tierras de León y de Castilla, rubias en verano, pardas en otoño y prodigiosamente verdes en primavera. Viejos campos donde siempre ha florecido la piedad sincera, el cristianismo convertido en jugo y vida, la seriedad de las costumbres y un cierto horror por las medias tintas que más de una vez os han salvado en algún momento difícil. Que nunca seáis indignos de vuestros abuelos, los que supieron infundir aliento heroico en una historia donde esta fe fue uno de los elementos principales. De vuestro cielo aprended la riqueza del alma. De vuestra tierra la generosidad austera y de vuestros ríos la profundidad y la riqueza de una fe que aquí, en esta Roma de todos, tiene su centro y su fundamento. 4 de Mayo de 1956.

*A la tierra de mis ancestros, que forjo gente como mis abuelos, padres, hermanos  
y sobrinos fundamento de mi vocación de trabajo y amor a la investigación*

*Uno puede devolver un préstamo de oro, pero está en deuda de por vida con aquellos que son amables (Proverbio).*

Es realmente complicado redactar estas frases de agradecimiento, son tantas las personas e instituciones a los que tengo que agradecer que temo no nombrar a todos, por eso expreso mis mas profundos agradecimientos a todas las personas que con el día a día me ayudaron a seguir adelante y aun sin saberlo contribuyeron en este periodo de mi formación.

No puedo dejar de agradecer a los seres que han sufrido de primera mano mi ausencia, la distancia, aquellos que me extrañan siempre y que esperan con impaciencia mi regreso: José Ignacio, padre querido, ejemplo y sabiduría. Señora Conchita; mi madre que aun en su inconciencia todas las mañanas reza por su hija a quien siente lejos y de la que no se olvida. Paulito porque me hubiera gustado estar a su lado en los difíciles años de adolescencia y de quien me siento orgullosa, por lo que es y será.

A todos mis hermanos y sobrinos, en especial a Verito, Juana, Cesar y Miguel; gracias por todo

Quiero también agradecer al Prof. Dr. Antonio Muro Álvarez, por el tiempo empleado en la realización de este trabajo, todos los buenos y malos momentos y sobre todo su buena predisposición final para que este trabajo llegue a buen termino.

A Prof. Dr. Julio López Abán, la persona que me ha orientado, ayudado y algunos momentos tolerado y que además de cotutor lo considero un buen amigo.

AL Prof. Alam Lane de Melo, porque sin su desinteresada participación, esta tesis no se hubiese podido realizar y con el a todo su equipo en Belo Horizonte-Brasil.

A la doctora Teresa Martín amiga entrañable, ejemplo de persona, madre y mujer, entereza en los momentos difíciles, compañera en la realización de esta tesis. Eres la hermana que la vida me regaló.

Al Prof. Dr. Fernando Simón Martín por siempre tener una palabra de entereza y de cariño durante todos estos años.

A los profesores Drs.; Francisco Collía, Miguel Cordero, José Miguel López Novoa, Faustino Mollinedo, Consuelo Gajate, Rosario Arévalo, por contribuir en realización de este trabajo.

A todos mis colegas del laboratorio, cuya convivencia forma parte de mi crecimiento personal, sobre todo a Rodrigo, Cristina, Martha Nelly, Nidia, Fariborz, Edward, Rubén y especialmente a Maria del Mar Siles.

A nuestra querida secretaria Teresa, por su buena predisposición para siempre escucharnos.

A la institución que se ha constituido en mi segunda casa en España “Baños de Retortillo” a todo el personal, en especial a los trabajadores de cocina, comedor y a mi querida Mary Tere, Mary Cruz, Isabel, Maria Belén, María Victoria, Flora, Ángel, Emilio, Joaquín; porque han soportado mis malos ratos, mi cambios de ánimo y humor, siempre sabiendo comprender sin criticarme.

Al Dr. Don Ricardo Vals, porque creyó en mí y me ha apoyado siempre en todas mis empresas, siendo a veces “mi paño de lágrimas” y por la ayuda en la parte final de este trabajo, lo respeto y admiro.

Al Sr. Sinfioriano Rodríguez, admirablemente paciente, leal, fraterno, comprensivo, gracias por haber hecho el papel de hermano mayor. Toda mi vida recordare cada uno de sus buenos oficios.

A mis grandes amigos, Estela, Pedro Luis, André, Luiz Fernando, María y Ramiro, porque me han dado todo lo que un amigo puede dar, llenando así mi vida de alegría, compañía y felicidad.

Al compañero, confidente, fuente de paz y protección; por su entrega, paciencia, dedicación y cariño. Salvador...

A Vitoriana por prácticamente adoptarme y a Jésu por sus consejos y estar siempre pendiente.

A todos los compañeros Becarios Santander por compartir luchas y sacrificios, esta tesis va por todos los que no pudieron pese a su esfuerzo y trabajo, concluir las suyas.

Al Sr. Camino Panadero y todo el personal de la Unidad de Difusión de la Universidad de Salamanca, porque siempre estuvieron atentos a nuestras necesidades y escucharon nuestros reclamos, reconociendo a quien criticar y censurar y a quien no.

A Fidel, Ángel, Maite, Maria y Renata; mi familia de la residencia Cuenca, por estos largos años de convivencia.

Al personal de Baños de Montemayor sobre todo a Pilar por su predisposición y buen trato.

No quiero olvidar a los animales como decía Francisco de Asís, “Nuestros hermanos animales” fundamento de la estudios experimentales. Por todos los que fueron sacrificados para este trabajo, ellos fueron parte fundamental del mismo.

A todos ustedes, muchas gracias, la terminación de esta tesis da satisfacción, pero la mayor satisfacción es haber convivido con cada uno de ustedes. Gracias a la Vida y a Dios por eso.

Ana Lucía Ruano Nieto ha sido beneficiaria de: Beca predoctoral de la Fundación Carolina para jóvenes investigadores de América Latina 2003-2005. Beca Doctoral del Banco Santander Central Hispano-Universidad de Salamanca; para estudios de doctorado destinada a alumnos iberoamericanos. 2005-2008.

Y ha recibido la contribución del profesor Alam Lane de Melo de la Universidad Federal de Minas Gerais. Belohorizonte con el ciclo del parásito *Strongyloides venezuelensis*, así como el adiestramiento para mantener en ciclo en el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca.

El Profesor José Miguel López ha contribuido con el donador de óxido nítrico LA419.

El profesor Miguel Cordero ha donado los fármacos inmunosupresores.

El profesor Francisco de Paula Collía ha realizado el estudio histológico.

El doctor Faustino Mollinedo y la doctora Consuelo Gajate han contribuido en la realización de técnica de TUNEL.

La profesora María del Rosario Arévalo ha intervenido en la realización de la técnica de Inmunohistoquímica.



## Abreviaturas

ADP:	Adenosin difosfato
AEHOT:	3,3-BIS (aminoethyl)-1-hydroxy-2-oxo-1-triazene.
AG:	Aminoguanidina.
ARNm:	Acido ribonucleico mitocondrial.
CaM:	Calmodulina.
CK (EC 2.7.3.2):	Enzima creatin-quinasa.
DETA:	Diethylenetriamine.
EDRF:	<i>Endothelium-derived relaxing factor</i> , Factor relajante derivado del endotelio.
EDTA:	Ácido etilendiaminotetracético
ELISA:	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> . Ensayo inmunoabsorbente ligado Enzimas.
FAD:	Flavín adenín dinucleótido o dinucleótido de flavina-adenina.
FMN:	Flavin mononucleótido o riboflavina-5'-fosfato.
GCs:	Guanilato ciclasa soluble.
GMPc:	<i>Cyclic guanosine monophosphate</i> .
GOT (EC 2.6.1.1):	Enzima aspartato transaminasa.
GPT (EC 2.6.1.2):	Enzima alanina transaminasa.
H-ALK:	Antígeno en medio alcalino de hembra.
H-ALK-DOC:	Antígeno en medio alcalino con ácido desoxicólico de hembra.
H-ES:	Antígeno de excreción/secreción de hembra.
HIV:	<i>Human immunodeficiency virus</i> , virus de inmunodeficiencia humana.
HTLV-1:	<i>Human T- cell lymphotropic virus</i> , virus linfotrópico humano tipo 1.
L1:	larvas de primer estadio.
L2:	Larvas de segundo estadio.
L3:	Larvas de tercer estadio.
L3-ALK:	Antígeno en medio alcalino de L3.
L3-ALK-DOC:	Antígeno en medio alcalino y ácido desoxicólico de larva 3.
L3-ES:	Antígeno de excreción/secreción de larva 3.
L3-PBS:	Antígeno en PBS de L3.
LA-419:	S-(6-nitro-oxi-hexahidro-furo [3,2-b] furan-3-1-il)thioacetate.
LDH (EC 1.1.1.27):	Enzima actato deshidrogenasa.
L-NAME:	N (G)-nitro-L- arginine methyl ester.
LPS:	<i>Lipopolysaccharide</i> lipopolisacarido
NADPH o NADP:	Nicotiamida-adenina dinucleotido fosfato.
ON:	Óxido Nítrico
ONS:	Enzima óxido nítrico sintetasa.
ONSe:	Óxido nítrico sintasa endotelial.
ONSi:	Óxido nítrico sintasa indusible.
ONSmt:	Oxido nítrico sintasa mitocondrial.
ONSn:	Óxido nítrico sintasa neuronal.
PBS:	<i>Phosphate buffer solution</i> , solución reguladora con fosfato.
PCR:	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa.
PMSF:	Phenilmethylsulfonylfluoride
RT-PCR:	<i>Reverse transcriptase polymerase chain reaction</i> , transcriptasa reversa y reacción en cadena de la polimerasa.
TBH-BH4:	Tetrahidrobiopterina.
TNF:	<i>Tumor necrosis factor</i> , factor de necrosis tumoral.
TUNEL:	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>

# Índice

Resumen .....	12
Summary .....	13
1. Introducción .....	15
1.1 Estrongiloidosis.....	16
1.1.1 Características biológicas .....	16
1.1.2 Epidemiología .....	21
1.1.3 Interacción parásito-hospedador.....	22
1.1.4 Manifestaciones clínicas.....	24
1.1.5 Diagnóstico.....	26
1.1.6 Tratamiento .....	28
1.1.7 Prevención y control.....	29
1.2 Óxido nítrico.....	31
1.2.1 Óxido nítrico sintasas.....	34
1.2.1.1 Óxido nítrico sintasa endotelial.....	36
1.2.1.2 Óxido nítrico sintasa neuronal.....	38
1.2.1.3 Óxido nítrico sintasa inducible.....	40
1.2.1.4 Óxido nítrico sintasa mitocondrial.....	41
1.2.2 Efectos del óxido nítrico.....	42
1.2.2.1 Efectos del óxido nítrico en el sistema cardio-vascular.....	43
1.2.2.2 Efectos del óxido nítrico en el sistema nervioso.....	44
1.2.2.3 Efectos en el tracto gastrointestinal.....	45
1.2.2.4 Efectos en el aparato respiratorio .....	45
1.2.2.5 Efectos en el sistema genito urinario.....	46
1.2.2.6 Efectos en el sistema inmunológico.....	47
1.3 Oxido nítrico y helmintos.....	50
1.3.1 Producción de óxido nítrico por helmintos.....	50
1.3.2 Modulación de la producción de óxido nítrico por las células del hospedador inducida por productos biológicos de helmintos.....	52
1.3.3 Efecto biológico de la producción de óxido nítrico sobre los helmintos.....	55
1.3.4 Consecuencias patológicas que se derivan de la producción de óxido nítrico en el hospedador .....	58
2. Hipótesis y Objetivos.....	60
3. Materiales y métodos.....	63
3.1 Animales.....	64
3.2 Mantenimiento del ciclo biológico de <i>S. venezuelensis</i> .....	65
3.3 Análisis coprológico.....	67
3.4 Descontaminación de larvas y hembras adultas de <i>S. venezuelensis</i> .....	67
3.5 Obtención de antígeno de larva 3 y hembra partenogenética de <i>S. venezuelensis</i> .....	68
3.5.1 Obtención de antígeno en PBS de larva 3 (L3-PBS).....	69
3.5.2 Obtención de antígeno en PBS con ácido desoxicolico de larva 3 (L3-DOC).....	69
3.5.3 Obtención de antígeno en medio alcalino de larvas 3 (L3-ALK).....	70

3.5.4	Obtención de antígeno en medio alcalino y ácido desoxicólico de larva 3 (L3-ALK-DOC).....	70
3.5.5	Obtención de antígeno de excreción/secreción de larva 3 (L3-ES). .....	71
3.5.6	Obtención de antígeno en medio alcalino de hembra (H-ALK). .....	72
3.5.7	Obtención de antígeno en medio alcalino y ácido desoxicólico de hembra (H-ALK-DOC). .....	72
3.5.8	Obtención de antígeno de excreción/secreción de hembra (H-ES). .....	73
3.6	Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). .....	74
3.7	Estudio de la presencia de óxido nítrico sintasa en <i>S. venezuelensis</i> . .....	75
3.7.1	Fijación de larvas 3 de <i>S. venezuelensis</i> . .....	76
3.7.2	Coloración inmunohistoquímica método ABC .....	76
3.8	Producción de óxido nítrico por macrófagos alveolares de rata por antígenos de <i>S. venezuelensis</i> . .....	77
3.8.1	Obtención y recuento de macrófagos alveolares de rata .....	78
3.8.2	Cultivo de macrófagos alveolares de rata.....	79
3.8.3	Determinación de la viabilidad de macrófagos alveolares de rata. ....	80
3.8.4	Técnica de Griess para medida de nitritos.....	80
3.8.5	RT-PCR para determinar óxido nítrico sintasa inducible en macrófagos alveolares de rata. ....	81
3.8.5.1	Extracción de ARN de macrófagos alveolares de rata. ....	82
3.8.5.2	Síntesis de la primera cadena de ADN complementario. ....	82
3.8.6	PCR de tiempo real para determinar óxido nítrico sintasa inducible en macrófagos alveolares de rata.....	83
3.8.6.1	Reacción en cadena de la polimerasa PCR de tiempo real.....	83
3.8.6.2	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). .....	84
3.8.6.3	Electroforesis de ADN en gel de agarosa con bromuro de etidio.....	84
3.9	Producción de óxido nítrico en ratones BALB/c infectados con <i>S. venezuelensis</i> . .....	85
3.10	Efecto de donadores de óxido nítrico <i>in vitro</i> sobre larvas 3 y hembras partenogénicas de <i>S. venezuelensis</i> . .....	86
3.11	Valoración de la viabilidad de larvas y hembras partenogénicas de <i>S. venezuelensis</i> . .....	87
3.11.1	Determinación y cuantificación de la movilidad.....	87
3.11.2	Cuantificación de la actividad fosfatasa alcalina en el medio de mantenimiento del parásito. ....	88
3.12	Tinción TUNEL para estudio de apoptosis en larvas 3 de <i>S. venezuelensis</i> . ....	89
3.13	Establecimiento de un modelo de infección de <i>S. venezuelensis</i> en ratones BALB/c. ....	90
3.14	Establecimiento de un modelo de infección con <i>S. venezuelensis</i> en ratones BALB/c tratados con dexametasona y ciclosporina. ....	91
3.15	Efecto de inhibidores y donadores de óxido nítrico sobre ratones BALB/c infectados con <i>S. venezuelensis</i> . .....	93
3.16	Efecto de inhibidores y donadores de óxido nítrico sobre ratones BALB/c tratados con dexametasona e infectados con <i>S. venezuelensis</i> . .....	94
3.17	Necropsia de ratones y ratas infectados con <i>S. venezuelensis</i> . .....	96
3.18	Corte histológico teñido con hematoxilina y eosina. ....	97
3.19	Análisis Estadísticos.....	98
4.	Resultados.....	99
4.1	Antígenos de larva 3 y hembra partenogénica de <i>S. venezuelensis</i> . .....	100

4.2	Producción de óxido nítrico por macrófagos alveolares estimulados por antígenos de <i>S. venezuelensis</i> .....	103
4.2.1	Producción de óxido nítrico por macrófagos alveolares estimulados con antígeno soluble en medio alcalino de larva 3 de <i>S. venezuelensis</i> (L3-ALK).....	105
4.2.2	Producción de óxido nítrico por macrófagos alveolares estimulados con antígeno excretor/secretor de hembras de <i>S. venezuelensis</i> (H-ES).....	110
4.3	Detección mediante inmunohistoquímica de diferentes isoformas de óxido nítrico sintasas (ONS) en <i>S. venezuelensis</i> .....	114
4.4	Efecto <i>in vitro</i> de donadores de óxido nítrico sobre larvas 3 de <i>S. venezuelensis</i> .....	116
4.4.1	Efecto <i>in vitro</i> de LA419 sobre larvas 3 de <i>S. venezuelensis</i> .....	117
4.4.2	Efecto <i>in vitro</i> de DETA sobre larvas 3 de <i>S. venezuelensis</i> .....	119
4.4.3	Efecto <i>in vitro</i> de AEHOT sobre larvas 3 de <i>S. venezuelensis</i> .....	121
4.5	Efecto <i>in vitro</i> de donadores de óxido nítrico sobre hembras partenogénicas de <i>S. venezuelensis</i> .....	123
4.5.1	Efecto <i>in vitro</i> de LA419 sobre hembras de <i>S. venezuelensis</i> .....	124
4.5.2	Efecto <i>in vitro</i> de DETA sobre hembras de <i>S. venezuelensis</i> .....	126
4.5.3	Efecto <i>in vitro</i> de AEHOT sobre hembras de <i>S. venezuelensis</i> .....	128
4.6	Apoptosis en larvas de <i>S. venezuelensis</i> tratadas con el donador DETA.....	130
4.7	Modelo de infección con <i>S. venezuelensis</i> en ratón BALB/c.....	132
4.8	Modelo de inmunosupresión con dexametasona y ciclosporina en ratones BALB/c infectados con <i>S. venezuelensis</i> .....	139
4.9	Producción de óxido nítrico en ratones BALB/c infectados con 3000 L3 de <i>S. venezuelensis</i> .....	144
4.10	Modelo de inmunomodulación con un donador e inhibidor de óxido nítrico en ratones BALB/c infectados con <i>S. venezuelensis</i> .....	145
4.11	Modelo de inmunosupresión con dexametasona en ratones BALB/c infectados con <i>S. venezuelensis</i> y tratados con inhibidores y donadores de la producción de óxido nítrico.....	150
5.	Discusión.....	156
5.1	Producción de por larvas de <i>S. venezuelensis</i> y por macrófagos alveolares estimulados con diferentes antígenos del parásito.....	157
5.2	Efecto <i>in vitro</i> de donadores de ON sobre larva y adultos de <i>S. venezuelensis</i> . Estudio de su mecanismo de acción.....	160
5.3	Modelo de infección en ratones normales y producción de ON en modelo experimental.....	162
5.4	Efecto <i>in vivo</i> de donadores e inhibidores de la producción de ON en un modelo de strongiloidosis experimental.....	164
5.5	Modelo de inmunosupresión en ratones utilizando dexametasona y ciclosporina e infectados con <i>S. venezuelensis</i> .....	166
5.6	Efecto <i>in vivo</i> de donadores e inhibidores de ON en un modelo murino de strongiloidosis experimental de inmunosupresión con dexametasona.....	168
6.	Conclusiones.....	170
7.	Bibliografía.....	172

## Resumen

La interacción parásito-hospedador se establece mediante un sistema complejo que permite la eliminación del parásito o su perpetuación en el hospedador. Esta relación depende del parásito y sus mecanismos de evasión ante la defensa del hospedador y de la respuesta del organismo parasitario frente a la agresión. En los mamíferos el sistema inmunitario provee protección por dos mecanismos que se correlacionan: la inmunidad adaptativa y la innata. La adaptativa se caracteriza por su especificidad y memoria y es mediada por linfocitos B y T. La innata es la primera línea de defensa contra microorganismos invasores y está mediada por macrófagos, células dendríticas, neutrófilos. Los macrófagos activados producen citocinas como  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 e IL-6 así como radicales libres de oxígeno y óxido nítrico (ON). El ON es una molécula simple que está implicada en la patogenia y el control de las enfermedades infecciosas y parasitarias. Se ha estudiado la acción del ON en diferentes protozoos como *Leishmania*, y *Trypanosoma* así como en helmintos: *Toxocara*, *Ascaris*, *Trichinella* o filarias. En unos el ON actúa como mecanismo de defensa ante el parásito y en otros permite que el parásito evada el sistema inmunológico del hospedador. Se desconocía el papel del ON en la estrogiloidosis, geohelminiosis cuya infección se perpetúa en el tiempo por su capacidad de auto-infección y de producir alta mortalidad en personas inmunosuprimidas, en infección diseminada. En este trabajo se evalúa la participación del ON en la estrogiloidosis experimental. Se estudia la presencia de ON en el parásito, se evalúa su producción *in vitro* en macrófagos alveolares estimulados con ocho antígenos y se desarrollan modelos experimentales de infección en ratones normales e inmunosuprimidos con el objetivo de analizar los efectos de la inhibición o la donación de este mediador inflamatorio. Los resultados muestran que existe producción de ON en estructuras de la larvarias del parásito. Los antígenos somáticos larvarios y metabólicos de adultos estimulan la producción de ON de forma específica y dosis dependiente. El ON desempeña un papel clave en la defensa de la estrogiloidosis estudiado tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. La falta de producción de ON en estrogiloidosis ocultas sometidas a tratamiento con corticoides es uno de los factores responsables del síndrome de hiperinfección de consecuencias fatales.

Palabras clave: *Strongyloides venezuelensis*, estrogiloidosis, óxido nítrico, inmunosupresión.

## Summary

The interaction between parasite and host is a complex balance that allows the parasite elimination or its perpetuation in the host. These relationships depend on the parasite and its evasion mechanism of the immune response of the host and the parasitic organism response against the defence. In mammals the immune system provide protection by two mechanisms: the adaptative and innate immunity. The adaptative characterizes by its specificity and memory and is lymphocyte B and T mediated. The innate is in the first line of defence against invading microorganism and is mediated by macrophages dendritic cells and neutrophils. Activated macrophages produce cytokines; TNF $\alpha$ , IL1 and IL-6 as well as oxygen free radicals and nitric oxide (NO). Nitric oxide is a very simple molecule that is involved in pathogenesis and the control of infectious and parasitic diseases. The action of NO was studied in protozoan as *Leishmania* and *Trypanosoma* as well as in helminth *Toxocara*, *Ascaris*, *Trichinella* and filariae. NO works as a defence mechanism against the some parasites but in others allows the parasite to evade the host immune system. It was unknown the role of NO en strongyloidosis, a long lasting geohelminthosis that is maintained in the time by its autoinfection ability and its high mortality in immunosuppressed human in disseminated infection. In this work we evaluate the participation of NO in the experimental strongyloidosis. We have studied the presence of NO in the parasite, we assessed the *in vitro* production in alveolar macrophages stimulated with eight antigens and *in vivo* developing infection experimental models in normal and immunosuppressed mice with the goal to analyse the effects of inhibition or donation of this inflammatory mediator. The results showed that exists NO production in larval structures of the parasite. The larval somatic antigens and adult metabolites stimulate specific and dose dependent NO production. NO plays an decisive role in the defence against strongyloidosis in *in vitro* model as well as *in vivo*. The lack of NO production in inapparent strongyloidosis treated with corticoid is one of responsible factors of the hyperinfection syndrome of fatal consequences.

Key words: *Strongyloides venezuelensis*, Strongyloidiasis, nitric oxide, immunosuppression

# **1. Introducción**

## 1.1 Estrongiloidosis.

Las infecciones parasitarias han acompañado la historia de la humanidad, actualmente se conoce mas de 300 especies de helmintos y 70 especies de protozoos que pueden parasitar al hombre. Los helmintos en particular tienen una prevalencia elevada en la población mundial, especialmente en áreas tropicales y subtropicales (Cox, 2002). *Strongyloides stercoralis* fue identificado por primera vez en julio de 1876 en el hospital naval de Tolón por el médico francés Louis Normand al examinar las heces de soldados que habían regresado del servicio militar en la Cochinchina.

Este versátil nematodo se desenvuelve perfectamente en el medio terrestre y en el organismo de los mamíferos, preferentemente el ser humano, pero también puede infectar a simios, perros y gatos. Es un parásito que en el medio exterior completa su ciclo vital y en el hospedador se puede multiplicar en un solo individuo (Genta, 1986).

### 1.1.1 Características biológicas

*Strongyloides stercoralis*, forma parte del *Phylum Nematoda*, Clase *Phasmida*, Orden *Rhabditata*, familia *Strongyloididae*, género *Strongyloides*. Las dos especies que parasitan a las personas son *Strongyloides stercoralis* y *Strongyloides fuelleborni*. Se han comunicado además infecciones aisladas en el ser humano por *S. canis*, *S. cebus*, *S. myopotami*, *S. planiceps* y *S. simiae*. En el género *Strongyloides* existen 52 especies, la mayoría no patógenas para el hombre, que infectan mamíferos, aves, reptiles y anfibios (Viney y Lok, 2007).



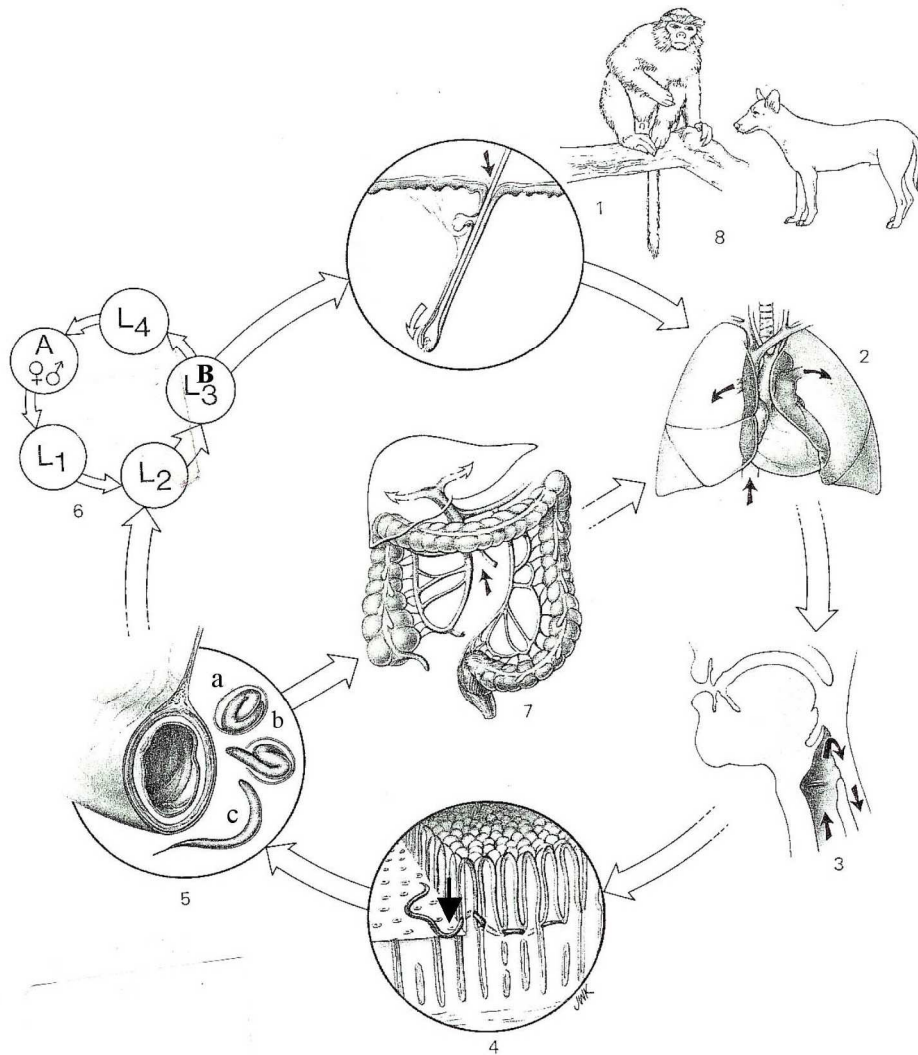
Las hembras parásitas son transparentes y se sitúan en túneles de la submucosa duodenal y de la primera porción del yeyuno. Son partenogenéticas, no necesitando al macho para producir huevos fértiles. Miden unos 2 mm, tienen esófago filariforme que ocupa el primer tercio de su cuerpo, la vulva en el segundo tercio y una cola roma (Figura 1.1). Las hembras parásitas no se suelen encontrar en las heces. Los adultos de vida libre miden alrededor de 1 mm de longitud y se pueden identificar machos y hembras. Las hembras, con un tamaño algo mayor que los machos, presentan hileras de huevos dentro del útero, vulva en la mitad del cuerpo. Los machos tienen espículas y el extremo posterior curvo.

Los huevos son expulsados diariamente y solamente se les puede observar en la materia fecal de individuos con diarrea muy intensa o después de la utilización de laxantes. Son elípticos, de pared fina y transparente, miden 40 a 70  $\mu\text{m}$  de diámetro (Figura 1.1). Eclosionan rápidamente, liberando larvas rabaditiformes que son las que se detectan en la heces. Por el contrario, en otras especies como *S. ratti* o *S. venezuelensis*, que son utilizados como modelos experimentales de infección, siempre se encuentran huevos en la materia fecal. La larva rabaditiforme (L1) es móvil, incapaz de invadir a través de la piel o mucosas. Anatómicamente tiene un extremo anterior romo, cavidad bucal corta y esófago que desemboca en el ano en el extremo posterior. La larva filariforme (L3) es muy móvil y tiene capacidad de invasión (Figura 1.1). En el extremo anterior dispone de una estructura en forma de estilete. El esófago es largo y se prolonga hasta la parte media del cuerpo. Su extremo posterior agudo termina bifurcado, rasgo que la diferencia de las larvas de *Ancylostoma* y *Necator* en los que termina en forma de gancho (Grove, 1996).



**Figura 1.1:** Fases biológicas del ciclo vital de *Strongyloides*: Huevos embrionados (A). Larva L1 (rhabditiforme) (B). Larva 3, filariforme (C). Parásito adulto, hembra partenogenética (D).

El ciclo biológico (Figura 1.2) comienza con la penetración a través de la piel intacta de las larvas filariformes (L3), después pasan al tejido conjuntivo subcutáneo ingresando en un capilar venoso. Posteriormente alcanzan el sistema circulatorio llegando al corazón derecho y los pulmones, atraviesan los capilares y llegan a los alvéolos. Durante este proceso mudan a larvas L4, ascienden por el árbol bronquial ayudadas por el mecanismo de expulsión de los cilios, hasta llegar a la traquea, laringe y faringe, donde son deglutidas. En el intestino delgado alcanzan su madurez, las hembras adultas (partenogenéticas) se encuentran en los túneles que forman en la submucosa del duodeno, yeyuno e ileon. Los huevos son liberados, transformándose rápidamente en larvas rabditiformes que son eliminadas con las heces. Las larvas rabditiformes pueden transformarse en el propio intestino a L3, filariformes, posibilitando de esta manera la autoinfección, al introducirse en la mucosa del colon o en la piel peri anal, ciclo homogónico. También las larvas rabditiformes se transforman a larvas filariformes las cuales mudan hasta adultos de vida libre. Estos son nematodos del suelo que se alimentan de materia orgánica. Las hembras son fecundadas y producen huevos que se desarrollan hasta L3 infectivas, las cuales pueden establecer un nuevo ciclo al penetrar en un nuevo hospedador, ciclo heterogónico (Viney 2006; Viney y Lok, 2007).



**Figura 1.2:** Ciclo biológico de *Strongyloides stercoralis*: 1. Entrada de larva L3 por piel intacta; 2. Llegada de larva L3 a los pulmones; 3. Paso de Larva L3 hacia el árbol bronquial y el aparato digestivo; 4. Parásito adulto en las vellosidades intestinales; 5. Producción de huevos a) huevo b) huevo larvado c) larva rhabditiforme; 6. Ciclo heterogónico en el medio ambiente; A) diferenciación sexual; B) larva L3 infectiva; 7. Auto infección por penetración de larva L3 en mucosa colónica o peri anal; 8. Otros hospedadores además del hombre.

### 1.1.2 Epidemiología

Se estima que de 50 a 200 millones de personas pueden estar infectados con *S. stercolaris* en el mundo. Las zonas más prevalentes son las tropicales y subtropicales (Viney, 2006). Stuerchler las clasifica en tres tipos de regiones, en función de la prevalencia de la estrogiloidosis: regiones en dónde la infección ocurre de forma esporádica, con prevalencia global menor del 1%, regiones endémicas con prevalencia entre 1-5% y regiones hiperendémicas con prevalencia superior al 5%. Todas las áreas agrupadas como hiperendémicas están situadas en los trópicos. En estos países la infección se da sobre todo en niños (Pires y Dreyer, 1993).

La estrogiloidosis es también un parásito de perros, gatos y primates, lo cual es importante ya que estos animales pueden completar el ciclo cerca del hombre y convertirse en fuente de contagio y diseminación de la enfermedad (Dillard y col., 2007). En Europa la estrogiloidosis sigue siendo endémica en algunos países como Rumania con prevalencia del 6,9% en niños con discapacidades (Panaitescu y col., 1995) o del 3% en el norte de Italia (Genta y col., 1988). En la mayoría de los países la estrogiloidosis es una enfermedad esporádica y la mayor parte de los casos son importados (73%), como se encontró en Francia en la región de Midi-Pyrénées (Magnaval y col., 2000).

*S. stercolaris* es una infección endémica en áreas de la costa mediterránea española en la que se encontró un 0,9% de positivos de 16.607 personas hospitalizadas a lo largo de 8 años de estudio (Román Sánchez y cols., 2001). La mayoría de estos casos se concentra en agricultores del área de Gandía, Valencia, en los que la prevalencia alcanza el 12,4%. Los factores asociados con la estrogiloidosis autóctona en esta zona fueron la edad avanzada, las labores agrícolas y el hábito de mantenerse descalzo durante el trabajo (Román Sánchez y cols., 2003).

### 1.1.3 Interacción parásito-hospedador

La interacción entre el *S. stercoralis* y el hospedador ocurre en tres lugares: la piel, el pulmón y el intestino. Las características de la piel del hospedador y la capacidad del parásito para atravesarla son importantes. El ácido urocánico, la histidina y secreciones de la piel actúan como un atrayente de los mamíferos hacia *Strongyloides*. La actividad de atracción del ácido urocánico es inhibida por iones metálicos, que podría ser una estrategia para impedir la infección (Safer y cols., 2007). Por otra parte, la L3 de *S. stercoralis* posee neuronas termosensoriales que permiten al parásito orientar su camino hacia la piel del hospedador (Ashton y cols., 2007). Las L3 secretan una potente metaloproteasa histolítica con actividad de elastasa, de 40 kDa, que degrada la matriz dérmica favoreciendo la penetración en la piel. Posteriormente, la larva migra hasta llegar a vasos linfáticos y sanguíneos, alcanzando una velocidad de hasta 10 cm/h (McKerrow y cols., 1990).

En los pulmones; *S. stercoralis* produce daño pulmonar no permanente. El proceso inflamatorio se acompaña de hipersecreción mucosa, engrosamiento del epitelio bronquial y de las capas musculares, aumento local de IgE y del número de eosinófilos y macrófagos alveolares. El aumento de eosinófilos en el parénquima pulmonar puede encontrarse con o sin eosinofilia periférica siendo descrito como síndrome de Löffler (Chitkara y Krishna, 2006). Estudios en ratas infectadas con *S. venezuelensis* han demostrado que la contracción del músculo bronquial podría afectar la progresión de las larvas a través del pulmón y disminuir el número de parásitos que pueden llegar al intestino. Se ha encontrado aumento de citocinas inflamatorias como IL-10 e IL-4, durante este paso (Ferreira y cols., 2007). Otras citocinas inflamatorias como IL-5 e IFN-gamma aparecen aumentadas junto a un aumento en la producción de inmunoglobulinas IgG e IgG1 (Machado y cols., 2007). Creemos, que al igual que ocurre con otras

nematodosis que atraviesan el pulmón, mecanismos inmunológicos en los que intervienen macrófagos alveolares y sus mediadores inflamatorios, deben tener un papel decisivo en la defensa frente a *S. stercoralis* (Espinoza y cols., 2002).

En el intestino, se ha observado en estudios experimentales que la capacidad para expulsar al parásito, parece estrechamente asociada con el nivel de mastocitos generado por la infección. El mecanismo de defensa está relacionado con los carbohidratos sulfatados que se encuentran en los gránulos de los mastocitos como el condroitín sulfato que interferirían en la adhesión de las hembras adultas a la hora de penetrar en la mucosa (Maruyama y cols., 2000). Los mastocitos intestinales poseen receptores Fc (FcR) los cuales se encuentran presentes en la mayoría de las células efectoras del sistema inmunológico y actúan en la formación de complejo antígeno-anticuerpo, median fagocitosis, activan anticuerpos dependientes de la citotoxicidad mediada por células y participan en otras respuestas efectoras como la expresión de IgE mediada por la desgranulación de los mastocitos. Los receptores de alta afinidad Fc $\alpha$ RI, deben poseer la subunidad gamma para realizar su función. En estudios realizados en animales experimentales carentes de esta subunidad, se observó una mayor duración e intensidad de la infección (Onah y col. 2000). La producción de citocinas inflamatorias como IL-2 y IL-18 induce aumento significativo del número de mastocitos en la mucosa intestinal expulsando rápidamente los parásitos adultos de *Strongyloides venezuelensis* implantados en la mucosa y submucosa intestinal, en cooperación con respuestas Th2 (Sasaki y cols., 2005). También la IL-3 está relacionada con la producción de mastocitos y la expulsión de los vermes adultos (Maruyama y cols., 2000).

Se ha visto que la protección en ratones está relacionada con respuestas Th2 con aumento de IL-4 e IL-5. La muerte de larvas está relacionada con aumento de eosinófilos. Estos contienen productos que son capaces de matar estas larvas (Herbert y cols., 2000).

Por el contrario, se ha demostrado que en pacientes co-infectados con el virus con tropismo por linfocitos T humanos 1 (HTLV-1), los niveles séricos de IgE y periféricos de eosinófilos son significativamente menores en comparación con los pacientes sin infección por este virus. Además, el efecto antihelmíntico de la ivermectina fue significativamente menor en los pacientes con infección por HTLV-1 en comparación con los pacientes sin esta infección (Hirata y cols., 2006). También se ha encontrado que las IgG y IgM junto con los eosinófilos se encuentran disminuidos en individuos con estrongiloidosis graves. Estos hallazgos sugieren que los anticuerpos y los eosinófilos desempeñan un papel en la protección inmunitaria frente a las larvas de *S. stercoralis* en el ser humano (Ligas y cols., 2003). En este sentido la migración larvaria provoca una respuesta inflamatoria bronquial con infiltrado de eosinófilos y IgE (Silveira y col., 2002).

#### 1.1.4 Manifestaciones clínicas

La mayoría de los pacientes infectados por *Strongyloides stercoralis* permanecen asintomáticos durante años. La única manifestación de la enfermedad en pacientes de áreas endémicas puede ser la presencia de eosinofilia, hecho que ocurre hasta en el 82% de los casos. De esta manera los pacientes que presentan recuentos mayores de 400 eosinófilos/ $\mu$ l constituyen un grupo de riesgo y deben ser estudiados (Román-Sánchez y cols., 2001 y 2003). Cuando la estrongiloidosis presentan manifestaciones clínicas, estas pueden ser cutáneas (prurito, urticaria, *larva currens*), respiratorias (tos, sibilancias, hemotipsis) o intestinales (diarrea, dolor abdominal, prurito anal, náuseas, vómitos) (Román-Sánchez y cols., 2001; Keiser y Nutman 2004; Vadlamudi y cols., 2006).

De las manifestaciones cutáneas, la *larva currens* es patognomónica de esta parasitosis. Los pacientes presentan una lesión cutánea serpiginosa de varios centímetros de tamaño, localizada en nalgas o cintura y que a diferencia del síndrome de larva cutánea



migrans, se mueve varios centímetros por hora y suele desaparecer en 1 o 2 días. Más frecuente, sin embargo es la aparición de un exantema urticariforme inespecífico. Ocasionalmente se ha descrito un exantema generalizado similar al aparecido en las toxicodermias. Ly y cols., 2003

Las manifestaciones respiratorias suelen aparecer los primeros días post-infección como consecuencia de la migración larvaria, apareciendo infiltrados pulmonares con eosinofilia intensa. Algunos autores han promulgado que *S. stercoralis* pudiera ser un agente causal o modular la enfermedad bronquial (EPOC y asma). Dos hechos han contribuido a esta hipótesis la respuesta inflamatoria bronquial provocada por migración larvaria (con infiltrado de eosinófilos e IgE) y la disminución de reactivaciones bronquiales en pacientes infectados tras tratamiento antiparasitario. Sin embargo, ninguno de los estudios realizados refieren que pacientes infectados y tratados mejoren la función respiratoria (Silveira y cols., 2002).

Las manifestaciones intestinales de la estrogiloidosis son inespecíficas y los pacientes pueden o no presentar dolor abdominal leve, diarrea intermitente o menos frecuentemente estreñimiento asociado a mal estado general con debilidad y pérdida de peso. La capacidad que posee *Strongyloides stercoralis* para realizar su ciclo homogónico dentro del hospedador, se denomina auto-infección y es la principal característica que separa a este parásito de otros helmintos. Esta característica es una de las responsable de la persistencia de la infección en pacientes inmunocompetentes durante largos periodos de tiempo. Otra causa es la capacidad de las hembras partenogénicas de permanecer vivas y de producir huevos durante largos periodos de tiempo, haciendo que los parásitos adultos se renueven periódicamente en las criptas intestinales (Mansfield y cols., 1996). Estudios endoscópicos en individuos parasitados muestran principalmente edema y

eritema de la mucosa duodenal, coloración blanquecina, atrofia e inclusive destrucción de las vellosidades intestinales, hasta en el 92% de los pacientes (Kishimoto y cols., 2008).

En situaciones de inmunosupresión por tratamientos con inmunosupresores en determinadas dolencias y transplantes, en la infección por virus como HTLV-1 o en el virus de la inmunodeficiencia humana y estados de malnutrición, las larvas rabditiformes de *S. stercoralis* mudan rápidamente a larvas filariformes, acelerando la autoinfección y constituyendo el síndrome de hiperinfección (Keiser y Nutman, 2004). La clínica de estos pacientes se caracteriza por dolor abdominal intenso, diarrea líquida, pérdida de peso, náuseas, vómitos y ocasionalmente sangrado intestinal. Se observan síntomas parecidos al asma como tos y sibilancias, neumonía o hemorragias pulmonares. También puede aparecer un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica con distress respiratorio y posible evolución a meningitis y posterior choque séptico (Tanton y cols., 2002). Finalmente cuando parásito se encuentra fuera de su lugar habitual los pulmones y el intestino, se denomina strongiloidosis diseminada. Los síntomas son muy variados y cuando ocurre en personas inmunocomprometidas se produce alta mortalidad.

### **1.1.5 Diagnóstico**

La estrongiloidosis se puede sospechar a partir de los signos y síntomas, como la presencia de eosinofilia, pero el diagnóstico definitivo se establece cuando se identifican las larvas de *Strongyloides* (Siddiqui y cols 2001). El hallazgo de larvas en las heces es el modo más extendido para el diagnóstico de la enfermedad que resulta inequívoco cuando el resultado es positivo. El examen coprológico único de heces en fresco tiene una sensibilidad del 30%, que aumenta al 50% con exámenes repetidos, por lo que se han desarrollado varias técnicas para mejorar el rendimiento diagnóstico (Sato y cols., 1995; Hernández y Avendaño, 2001; Siddiqui y cols 2001). Los métodos de concentración de

larvas permiten mejorar este rendimiento. Los más empleados son los de concentración en formalina-éter, los de concentración por migración larvaria de Baermann (basado en la capacidad migratoria de las larvas rabadiformes cuando se introducen las heces frescas en medio líquido), el cultivo en papel de filtro de Harada-Mori y el cultivo en placas de agar nutritivo. La obtención de muestras de fluido duodenal mediante aspirado presenta alta sensibilidad, aunque tiene como principal desventaja su carácter cruento y por tanto su baja utilidad en el diagnóstico. La extracción de contenido duodenal mediante enterotest es un método relativamente sencillo y su utilidad en el diagnóstico de la estrogiloidosis ha quedado demostrada (Vighi cols., 1989). Sin embargo, dada las similitudes morfológicas entre las larvas de *Strongyloides* y las de los ancilostomas, es preciso siempre realizar métodos de tinción (lugol, Ziehl Nielsen u otros) para observar las diferencias morfológicas. Se debe tener en cuenta que en la infección por ancilostomas se eliminan huevos en las heces, en tanto que *S. stercoralis* elimina larvas rabadiformes. Cuando existe duda en la diferenciación se suele realizar cultivo con carbón vegetal u otro material inerte como la vermiculita 24 horas, con el propósito de analizar morfológicamente las larvas obtenidas. En pacientes con hiperinfección también se aísla frecuentemente en esputo, lavado broncoalveolar y líquido pleural. Otros métodos de diagnóstico directo como la detección de coproantígenos mediante ELISA de captura han demostrado su utilidad en la infección experimental por *S. ratti* (Nageswaran y cols., 1994). En la actualidad no hay estudios sobre el diagnóstico molecular por PCR en la estrogiloidosis.

El diagnóstico indirecto de la infección se ha abordado desde distintas técnicas inmunológicas pero con éxito limitado (Siddiqui y cols 2001). Se ha encontrado dificultades en cuanto a la diferenciación de infecciones activas y tratadas, así como al diagnóstico de infecciones leves. También se ha encontrado reactividad cruzada con

infecciones por filarias, *Ascaris lumbricoides*, y *Schistosoma* spp. La mayor parte de estas técnicas se basan en la detección de anticuerpos. Se ha empleado inmunofluorescencia indirecta con larvas fijadas, fijación del complemento, radioalergoabsorción para IgE específicas, aglutinación de partículas de gelatina, aglutinación con látex y distintas técnicas de ELISA que ofrecen los resultados más esperanzadores (Koosha y cols., 2004). Se han utilizado distintos antígenos en bruto y purificados tanto de larvas de *S. stercoralis* como de *S. ratti* y *S. venezuelensis*. La mayoría de los estudios realizados mediante la técnica de ELISA con antígenos en bruto ofrecen sensibilidades superiores al 90% con especificidad que varía entre el 40-96% (Van Doorn y cols., 2007). La técnica de enzimoimmunotransferencia-blot (EITB) permite mejorar la especificidad del ELISA, detectando grupos proteicos específicos de la infección por *S. stercoralis* que tienen pesos moleculares entre 6 y 124 kDa. Una proteína de aproximadamente 26 kDa ha sido descrita con alta frecuencia en muestras de personas con diagnóstico coprológico de estrogiloidosis, siendo observada en 7 de 64 personas no infectadas o infectadas por otros helmintos. Dos bandas adicionales, una de aproximadamente 33 kDa y otra de aproximadamente 21 kDa, se han descrito también con alta frecuencia. Sin embargo estas bandas se han observado en pacientes portadores de otras parasitosis (Sudré y col., 2007). Se han desarrollado técnicas de reacción cutánea con antígenos de larva (Neva y cols., 2001).

### 1.1.6 Tratamiento

El tratamiento de elección se realiza con ivermectina en dosis única de 0,2 mg/kg vía oral con cura parasitológica de 88,9%. Como tratamiento de segunda elección se puede utilizar el albendazol 400 mg/día durante 7 días, que muestra disminución en la recuperación de larvas en heces en un 60% (Aparicio y cols., 2003; Suputtamongkol y cols., 2008). El tiabendazol, con dosis de 25-50 mg/kg/día repartidos en dos dosis durante

3-5 días y dosis máxima diaria de 3 g, mostró reducciones del 91% en el número de larvas en las heces de individuos estudiados. El tiabendazol no tiene ningún efecto sobre las larvas en la piel o los pulmones, pero sí reduce la fecundidad de las hembras adultas en el intestino (Grove, 1982). En pacientes con hiperinfección por *S. stercoralis*, la aparición de un íleo paralítico, puede interferir la absorción de los antihelmínticos orales. El empleo de ivermectina por vía rectal o parenteral ha mostrado buena eficacia en el tratamiento de estos pacientes (Tarr y cols., 2003). Finalmente hay que reseñar que dada la gravedad de este síndrome es preciso disponer de medidas de soporte vital que incluya tratamiento antibiótico de amplio espectro cubriendo gérmenes intestinales, fundamentalmente enterobacterias y anaerobios.

### **1.1.7 Prevención y control**

Para disminuir la prevalencia de la estrogiloidosis la principal medida es intentar disminuir la transmisión. En las regiones endémicas se debe elaborar programas de control para las geo-helminosis, resaltando el cuidado de los hábitos higiénicos como son el lavado de las manos y el uso de calzado. También se deben realizar mejoras de ingeniería sanitaria, de la alimentación y de la educación sanitaria de la población en riesgo. Es importante, el diagnóstico de individuos parasitados para proceder a aplicarles el tratamiento adecuado con el objetivo de eliminar las fuentes de infección. Los individuos que van a someterse a tratamiento inmunosupresor sobre todo con corticoides, o en portadores de virus como el VIH y HTLV-1, deben ser diagnosticados por la probabilidad de desarrollar hiperinfección o diseminación de la infección. Se recomienda el uso profiláctico de tiabendazol 2 o 3 días mensualmente para evitar las posibles recidivas de la enfermedad (Dillard y col 2007). En el momento actual no existe todavía una vacuna considerada eficaz contra la estrogiloidosis. La protección inmunitaria frente a las larvas de *S. stercoralis* se ha estudiado en ratones para determinar la forma en que la

---

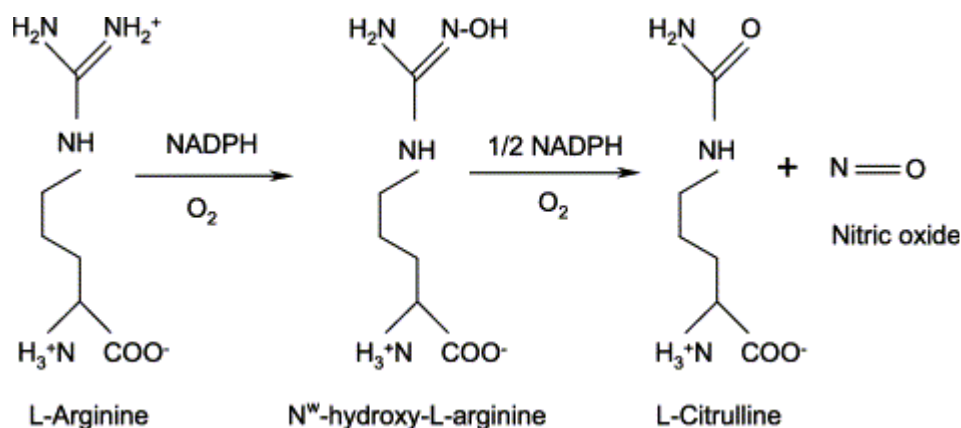
respuesta está regulada y sus componentes esenciales. Fue inducida inmunidad protectora en ratones por vacunación, ya sea con larvas vivas o muertas, considerando que este tipo de inmunidad era dependiente de IL-4 e IL-5. Se consiguió también transferencia de inmunidad pasiva sólo con el isotipo de anticuerpos IgM que es dependiente de la activación del complemento. Se ha utilizado también extractos de larvas L3 (extracto en PBS y DOC) con el objetivo de inducir inmunidad protectora, encontrándose relación del aumento de IgG con la disminución de parásitos (Herbert y cols., 2002). Se han utilizado genes clonados en plásmidos de ADN con los que se ha conseguido una reducción del 35% en la supervivencia de las larvas frente a su grupo control (Kerepesi cols., 2005).

## 1.2 Óxido nítrico.

En 1980, Furchgott y Zawadzki al estudiar la relajación que producía la acetilcolina sobre los anillos de la aorta torácica de ratas, observaron que este efecto dependía de un endotelio intacto y que esta acción estaba mediada por un factor humoral lábil, que posteriormente se llamó factor relajador derivado del endotelio (EDRF). Después de varios experimentos se demostró que las células del endotelio vascular liberaban un gas, el óxido nítrico (ON) y que este era diferente al EDRF aunque los dos compuestos producían efectos análogos (Moncada y cols.,1987).

El ON es un gas diatómico e hidrofóbico, constituye una pequeña molécula (30 Da) que difunde en líquidos y tejidos corporales, con una vida media muy corta, de pocos segundos a algún minuto. Se libera por una extensa variedad de células y su síntesis se puede iniciar por varios estímulos. Las enzimas necesarias para la síntesis del ON se encuentran en el citoplasma de las células que lo sintetizan. Bioquímicamente, la formación de ON es una reacción que consta de dos pasos oxidativos los que convierten L-arginina, a partir de los átomos de nitrógeno de su grupo guanidino terminal, a NO y L-citrullina a través de NO-hidroxi-L-arginina (NO-arginina) como producto intermedio (Aktan, 2004, Palmer y cols., 1988). Este proceso se realiza por acción de las enzimas óxido nítrico sintasas (ONS). Los nitrógenos son tomados enzimáticamente utilizando en algunos casos la calmodulina, dependiendo de la ONS que actúe, y de por lo menos 4 co-factores: Flavín mononucleótido (FMN), flavin adenin dinucleotido (FAD),

tetrahidrobiopterina (TBH) y nicotinamida adenina dinucleotidofosfato (NADPH) (Figura 1.3).



**Figura 1.3:** Reacciones químicas de la síntesis de óxido nítrico.

El ON formado por la reacción anterior presenta un electrón desapareado que le permite reaccionar rápidamente con otros átomos que son abundantes en los sistemas biológicos, como el nitrógeno, el azufre y el hierro, que forman parte de las proteínas. La unión del ON a las proteínas u otras moléculas es la base química que le permite ejercer diversas funciones en el organismo. Pese a su simplicidad química, el ON es una molécula con gran versatilidad, lo que le permite regular de un modo fino y complejo una gran variedad de funciones de importancia para la vida de los organismos vivos. Además, el ON reacciona rápidamente con el oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) y con diferentes formas reactivas de oxígeno, como son algunos radicales libres (superóxido e hidroxilo), lo que genera peroxinitrilo y otras formas reactivas de nitrógeno tóxicas. En ausencia de TBH, la óxido nítrico sintasa genera peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), superóxido y ON. Teniendo en cuenta la abundancia de oxígeno intracelular, la combinación del ON con las formas reactivas del O<sub>2</sub> constituye el principal mecanismo mediante el cual el ON puede dañar a



las células (Pagliaro, 2003). Se ha determinado que la disminución de BH<sub>4</sub> Once no solo produce ON, sino que se convierte en desacoplados de L-arginina y la oxidación molecular, provocando reducción de oxígeno a formas de superóxido (Vásquez-Vivar y cols., 1998, 2003; Landmesser y cols., 2003), lo que significa que habría una desensibilización de la vía NO-GMPc (Adlam D y cols., 2007

El ON es claramente una molécula de señalización celular que controla potencialmente los gradientes de O<sub>2</sub> en los tejidos, a través de su interacción con el grupo hemo que contiene guanilato ciclasa soluble. La acción de esta enzima junto con el citocromo C oxidasa son probablemente las vías de señalización y actúan como agentes importantes en varios aspectos de las interacciones con las mitocondrias, incluido el control de la respiración y de la biogénesis mitocondrial (Shiva y cols., 2005). La medida en que ON inhibe la respiración *in vivo* en órganos como el corazón, músculo liso y neuronas es influenciada probablemente por la mioglobina, que puede intensificarse con la presencia de óxido nítrico sintasa inducible (ONSi) o hipoxia. Las mitocondrias pueden producir y consumir ON, estimulando la biogénesis mitocondrial a través de GMPc por regulación de factores de transcripción. El ON también puede inducir apoptosis, principalmente a través de *stress* oxidativo. El ON además puede inducir necrosis, principalmente por el agotamiento de la energía. (Brown, 2007).

El ON se puede medir bien directa o indirectamente. La medición tipo directo es difícil de realizar ya que es una molécula de vida media muy corta y que rápidamente difunde a los tejidos para realizar su acción. Los métodos indirectos son los más utilizados para la detección de este mediador inflamatorio. Entre estos últimos podemos considerar los que detectan productos de su metabolismo (nitritos o nitratos) o los que miden expresión de su enzima. Para medir los productos metabólicos (nitritos) se utiliza rutinariamente la técnica de Griess, basada en la propiedad que tienen los nitritos de

reaccionar con aminas primarias aromáticas en medio ácido, originando compuestos de diazonio. Estos compuestos poseen una coloración rosácea que se mide por espectrofotometría. La detección de ONS se puede realizar mediante inmunocitoquímica o Western-Blot, o analizando su expresión génica por RT-PCR o PCR a tiempo real.

### **1.2.1 Óxido nítrico sintasas.**

La producción de ON en el cuerpo es catalizado por una familia de enzimas llamadas óxido nítrico sintasas (ONS) (130-160 kDa). Estas enzimas constan de diferentes subtipos en función de los tipos de tejido, aunque todas comparten entre el 51-57% de su secuencias en el hombre (Alderton y Cols., 2001). Las isoformas de ONS contienen nucleótidos flavínicos como FMN y el FAD debiendo recordar que la única molécula mamífera con contenido conocido de ambas flavinas y que muestra una identidad de secuencias con las ONS es el NADPH-citocromo P-450 óxido reductasa (Li, 2005). De esta manera todas las isoformas de ONS tienen una estructura molecular similar y requieren para su acción como ya se describió por lo menos de tres sustratos: arginina, NADPH y O<sub>2</sub> así como cinco cofactores o grupos prostéticos: FAD, FMN, calmodulina, H<sub>4</sub>B y el grupo hemo (Wei, 2008).

Se han aislado y clonado, tres tipos de ONS: óxido nítrico sintasa endotelial (ONSe), óxido nítrico sintasa inducible (ONSi) y óxido nítrico sintasa neuronal (ONS<sub>n</sub>). Los tres genes de ONS existentes en seres humanos poseen una sola copia de cada haploide en el genoma humano. (Tabla 1.1).

**Tabla 1.1.** Estructura y tamaño del gen, localización cromosómica, número de aminoácidos, número de acceso de *Gene Bank* y regulación de las isoformas de las enzimas óxido nítrico sintasas (ONS) humanas.

<b>Isoformas humanas</b>	<b>Estructura y tamaño del gen</b>	<b>Localización Cromosómica</b>	<b>Nº de aminoácidos</b>	<b>Nº <i>Gene bank</i></b>	<b>Regulación</b>
ONSn	29 exones, 28 intrones, >200 kp.b..	12q24,2–12q24,3 Cromosoma 12	1.434 aa, 1,61 kDa	L02881, U11422	Ca <sup>++</sup> Calmodulina
ONSi	26 exones, 25 intrones, 37kbp	17cen–q11.2 Cromosoma 17	1.153 aa, 1,31 kDa	LO9210, L24553, X73029	Citocinas y endotoxinas
ONSe	26 exones, 25 intrones 21–22kbp	7q35–7q36 Cromosoma 7	1.203 aa, 133 kDa	M93718, M95296	Ca <sup>++</sup> Calmodulina

Las isoformas de ONS tienen genes con estructura similar, que sugieren un gen primitivo. La clonación de genes que codifican la síntesis de estas proteínas y los requerimientos de calcio para su formación y función han llevado a designar a dos de ellas, ONSe y ONSn como constitutivas porque están constantemente presentes en las células en reposo. Estas enzimas y se activan por el calcio en presencia de calmodulina (CaM). La ONSi se sintetiza en las células después de la inducción de citocinas o endotoxinas bacterianas y no depende de la concentración de Ca<sup>++</sup> o calmodulina (Alderton y cols., 2001). Aunque todas las isoformas catalizan reacciones para permitir el transporte de electrones en las reacciones de formación de ON y citrulina, cada una tiene su propia estructura y localización. Estas características determinan diferencias en la activación de las vías, así como la especificidad de los inhibidores. Los elementos característicos del óxido nítrico y de las diferencias funcionales entre las óxido nítrico sintasas determinan su papel en la regulación de muchos procesos fisiológicos y fisiopatológicos (Arzumanian, 2003).

### 1.2.1.1 Óxido nítrico sintasa endotelial.

La óxido nítrico sintasa endotelial (ONSe) se identificó por primera vez en las células endoteliales (Palmer y cols. 1987). El uso de un anticuerpo específico para ONSe en inmunohistoquímica permitió identificar la enzima en las células endoteliales de diversos tipos de arterias y venas de muchos tejidos, como las neuronas del hipocampo en la rata y los vasos de las neuronas motoras en humanos, entre otras células (Förstermann, 1998) (Tabla 1.2).

En diferentes preparaciones endoteliales se ha caracterizado la enzima que sintetiza ON a partir de la L-arginina (Busse R y Mülsch, 1990). Para que esta enzima se produzca deben existir constantes estímulos, como el flujo pulsátil y el *stress* de estiramiento dando como resultado un efecto constante que constituye el tono vascular (Moncada y cols. 1991).

**Tabla 1.2** Tipos de células donde ha sido identificada la ONSe, la especie y el método de identificación

<b>Tipos de células</b>	<b>Especies</b>	<b>Métodos de detección</b>
Endoteliales	Humana, bovina	Inmunohistoquímica, western blot
Neuronas	Humana, ratas	Inmunohistoquímica,
Células de la médula ósea, células trabeculares revestimiento, osteoclastos, osteoblastos, células del estroma.	Humana	Inmunohistoquímica, RT-PCR
Fibroblastos dérmicos	Rata, gato, ovina	Inmunohistoquímica, RT-PCR
Queratocitos epidérmicos	Humana	Inmunohistoquímica,
Células epiteliales del endometrio	Humana	Tinción NADPH-diaforasa, northern blot, RPA
Células de Leydig y células de Sertoli,	Humana	Inmunohistoquímica,
Megacariocitos	Humana	Western blot, RT-PCR
NCI-H441 células epiteliales bronquiales	Humana	Western blot, RT-PCR
Sincitiotrofoblastos placentarios	Humana	Tinción NADPH-diaforasa, hibridación <i>in situ</i> .
Plaquetas		Western blot, RT-PCR
Linfocitos T	Humana	Inmunocitoquímica, RT-PCR
Células foliculares tiroideas	Humana	Inmunocitoquímica, RT-PCR
Monocitos	Humana	Inmunocitoquímica, RT-PCR
Miocytes cardíacos	Rata	Inmunocitoquímica, northern blot
Miocytes del diafragma	Rata, ratón	Western blot
Células de la mucosa gastrointestinal	Rata	Western blot
Hepatocitos	Rata	Inmunohistoquímica
Células musculares lisas	Rata	Western blot
Estroma ovárico, células de la granulosa en la superficie de ovocitos	Rata	Western blot, inmunohistoquímica
C6 células del glioma c	Ratón	Inmunocitoquímica
Astrocytes del sistema nervioso central	Ratón	Inmunohistoquímica
Células intersticiales de colon	Conejo	Inmunohistoquímica
LLC-PK1 células epiteliales tubulares renales	Cerdo	Western blot, RT-PCR

La forma constitutiva endotelial se encuentra en las membrana y citosol celular. Esta enzima se pone en acción después de una señal molecular que es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina, uniéndose al hierro del grupo hemo de la guanilato ciclasa soluble para producir el segundo mensajero GMPc, que media la síntesis del cofactor tetrahidrobiopterina (BH4), que a su vez modula una serie de mediadores como canales iónicos, proteínas cinasas y fosfodiesterasas y permite la relajación del músculo liso interviniendo en la regulación de la presión arterial (Ignarro, 1992). La estimulación de la guanilato ciclasa soluble por ON, elevó los niveles intraplaquetarios de GMPc inhibiendo la agregación plaquetaria y su capacidad de adhesión (Radomski y Sales, 1995).

#### **1.2.1.2 Óxido nítrico sintasa neuronal.**

Óxido nítrico sintasa neuronal (ONSn) fue caracterizada y purificada, en cerebelo de ratas y cerdos (Mayer, 1990). Desde entonces, se sabe que ONSn tienen una amplia distribución en determinadas neuronas del sistema nervioso central y periférico. La lista de neuronas que producen ONSn sigue creciendo, y hasta la fecha es difícil encontrar un órgano que no este innervado por neuronas en las que no este involucrado la producción de ON (Vincent, 1992). La forma constitutiva neuronal desempeña un papel importante no sólo en las funciones fisiológicas neuronales como son la liberación de neurotransmisores, el desarrollo neurológico, la regeneración, la plasticidad sináptica y la regulación de la expresión génica, sino también en una variedad de trastornos neurológicos en los que la excesiva producción de ON conduce a la lesión neuronal. Sin embargo, su expresión no se limita a las células neuronales. En varias especies, se ha encontrado ONSn interfiriendo en la transcripción de ARNm y en la síntesis de proteínas en células no neuronales. (Förstermann, 1998) (Tabla 1.3).

Varios estudios *in vivo* demuestran aumento de la ONSn después de la hipoxia. Este exceso de producción de ON puede ser debido a dos mecanismos diferentes: en respuesta a un estrés celular y directamente a la activación de la ONSn a través de la transcripción de genes inducida por la hipoxia (Kvietikova I. 1995).

**Tabla 1.3.** Tipos de tejidos y células, especies y método de identificación de la óxido nítrico sintasa neuronal (ONSn).

Tejidos	Tipos de células	Especies	Métodos de detección
Cerebro (bulbo olfativo accesorio, capa molecular del cerebelo, pedúnculo pontino tegumental y núcleo del tronco cerebral.	Neurona	Humana, primates, ratón, rata.	Inmunohistoquímica, hibridación <i>in situ</i> , western blot
Hipotálamo	Neurona	ratón, rata	Inmunohistoquímica, western blot
Glándula pineal	Neurona	Rata, ovina.	Inmunohistoquímica, western blot
Médula espinal	Neurona	Rata, gatos, ovejas.	Inmunohistoquímica
Inervación de distintos órganos		Humana, ratón, rata, criceto, cobaya, gato.	Inmunohistoquímica
Músculo esquelético	Miocito	Humana, rata, cobaya.	Inmunohistoquímica, RT-PCR, western blot
Pulmón	Células epiteliales	Humana rata.	Inmunohistoquímica, RT-PCR
Riñón	Células de la mácula densa	Humana, rata.	Inmunohistoquímica, RT-PCR,
Testículo		Humana	Western blot, RT-PCR
Cuerpos cavernosos del pene, la uretra y la próstata		Rata	Northern blot, RT-PCR
Piel	Mastocitos		Inmunohistoquímica
Hipófisis	Células foliculares	Rata	Northern blot, western blot
Glándula suprarrenal	Neutrófilos	Humana	Inmunohistoquímica, RT-PCR

### 1.2.1.3 Óxido nítrico sintasa inducible.

En 1981, Breen y cols., describieron la excreción y síntesis endógena de nitratos ( $\text{NO}_3$ ), observando que la excreción urinaria aumentaba en individuos afectados con diarrea y fiebre. Además, experimentalmente se vio aumento de la excreción de nitratos en ratones a los que se había administrado lipopolisacárido de *Escherichia coli* y en macrófagos peritoneales de ratón activados, se demostró que la L-arginina era esencial para este aumento, lo que sugería una correlación entre la inmunoestimulación y el aumento de la síntesis de  $\text{NO}_3$ , (Inyengar y cols., 1987). Se determinó que el  $\text{NO}_2$  y el  $\text{NO}_3$  eliminados eran derivados de los átomos de nitrógeno guanidínico terminal de la L-arginina, aminoácido indispensable para la formación de L-citrulina y ON. Estos estudios demostraron la presencia de una enzima que inducía la formación de ON en macrófagos. A esta enzima se la denominó óxido nítrico sintasa inducible (ONSi) que no está presente en las células en reposo y que genera ON independientemente de las concentraciones de calcio intracelular, esta característica le da el nombre de no constitutiva y una vez que se expresa, libera cantidades nanomolares de ON durante un periodo de tiempo prolongado. Esta enzima desempeña un papel importante en numerosos y diversos procesos fisiopatológicos, de los que el principal es ser el mediador de las acciones tumoricida y microbicida de los macrófagos. La enzima se expresa en muchos tipos de células en respuesta a una amplia gama de citocinas inflamatorias, incluidas IL-1, IL-2, interferón gamma, TNFalfa y metabolitos bacterianos tales como lipopolisacárido (LPS). La actividad de ONSi da como resultado la producción de alto rendimiento de ON, lo que es citotóxico y citostático a una serie de agentes patógenos y a las células tumorales. Estos procesos están mediados por la inhibición de diversas enzimas dentro de las células diana, incluidos los complejos I y IV de la cadena respiratoria mitocondrial, ribonucleótido reductasa, aconitasa y gliceraldehído-6-fosfato deshidrogenasa, a través de la



modificación del ADN (Connelly y cols., 2000). La producción de ON por ONSi difiere de acuerdo a los mecanismos inductores y a la estirpe y especies de animales estudiados. Así, en macrófagos bovinos y murinos se generan cantidades considerables de ONSi en respuesta a la estimulación con citocinas, pero en los macrófagos humanos las cantidades son menores (Jungi y cols., 1996). La biosíntesis de ON es regulada por una variedad de mecanismos en el nivel transcripcional y postraduccionales en macrófagos activados y otras células. La actividad de ONSi en los macrófagos esta modulada y regulada por receptores de las moléculas celulares, como los receptores *toll-like* y los receptores CD14. El CD14 es el receptor de lipopolisacárido (LPS) y desempeña un papel esencial en favor de la respuesta inflamatoria en monocitos y macrófagos. CD14 tiene dos formas distintas; forma CD14 anclada (CD14m) y CD14 soluble (CD14). El mCD14 realiza su efecto directamente por la estimulación de la vía del *toll-like* receptor-4 (TLR-4) (Du y Low, 2001). El IFN-gamma induce formación de ONSi por medio de la vía Jak-STAT, coenzimas encargadas de la transducción de la señal intracelular (Rao, 2000). El conocimiento de las vías de producción de ON por la ONSi es importante con el objetivo de conseguir la inhibición de la sobreproducción de ON y evitar los trastornos relacionados (Aktan, 2004).

También se ha comprobado la presencia de ONSi después de la estimulación inmunológica o inflamatoria en macrófagos, astrositos, microglía y otras células que producen grandes cantidades de NO (Guix y cols., 2005).

#### **1.2.1.4 Óxido nítrico sintasa mitocondrial.**

Se ha descrito la existencia de una enzima ONS diferente de las tres isoformas ya purificadas y clonadas denominada la óxido nítrico sintasa mitocondrial (ONSmt), la cual es considerada como isoforma de la ONSn presente en la membrana interna mitocondrial

(Guix FX y col 2005). La producción de ON en la mitocondria es catalizada por esta enzima que es dependiente del calcio y que participa de forma relevante en el metabolismo celular oxidativo. La enzima fue localizada en tejidos de ratas y ratones, como hígado, timo, músculo esquelético, corazón y cerebro. La ONSmt requiere los mismos cofactores y sustratos que las otras ONS constitutivas y en términos fisiológicos, modula los gradientes de oxígeno en el interior de los tejidos, participando en procesos como la apoptosis y el estrés oxidativo. Por su reciente descripción, se desconocen muchos aspectos de su regulación y su relación con las demás isoformas de ONS (Aktan, 2004).

Finalmente se ha demostrado una actividad asociativa de las diferentes formas de ONS, así se ha determinado la mejoría de la expresión y de la actividad de ONS<sub>i</sub> producida por la presencia de ONS<sub>e</sub>, en parte, a través de la activación de la sGC y de la producción de GMPc (Connelly y col., 2003).

### **1.2.2 Efectos del óxido nítrico**

Las reacciones directas mas importantes desde el punto de vista biológico de ON son: La reacción con oxígeno molecular, la reacción con radicales superóxidos, con metales de transición y con otros radicales libres, como el radical tirosilo de la ribonucleótido reductasa. La interacción con radicales superóxido forma radicales libres peroxinitrilo. Finalmente, al interaccionar con metales de transición forma complejos habitualmente incluidos en la estructura de la metaloproteínas. Globalmente los productos derivados de la liberación de ON pueden clasificarse en: a) Hemoproteínas: guanilato-ciclasas, ciclooxigenasas, hemoglobina. b) Proteínas con núcleo activo tiol: receptores (sobre todo neuronales), sistema de ampliación de señales. c) Sistemas de transcripción nuclear, enzimas detoxificantes y proteínas circulantes. d) Sistemas del metabolismo

energético en los que están implicadas diversas enzimas como: la aconitasa/IRE-BP mitocondrial, complejos oxidorreductasas I, gliceraldehido3-fosfato deshidrogenada. e) Síntesis de ADN.

El ON y sus derivados participa en casi todos los procesos fisiológicos esenciales, siendo los más importantes el control del tono vascular, la neurotransmisión y la defensa antiinfecciosa, describiremos estas acciones tomando en cuenta los órganos y sistemas en los que interviene:

#### **1.2.2.1 Efectos del óxido nítrico en el sistema cardio-vascular.**

El descubrimiento del ON demostró que las propiedades vasodilatadoras y relajantes vasculares, axial como la inducción de la síntesis del péptido atrial natriurético que activan la Guamilato-Ciclasa para aumentar los niveles de GMPc a nivel del tejido vascular en los dos compuestos, era idéntica (Palmer y cols., 1987). La producción de ON y GMPc de forma constante como ya se dijo por el estímulo constante del flujo pulsátil y el estrés de estiramiento da como resultado un efecto mantenido que constituye el tono vascular (Moncada y cols., 1991). Esta misma acción modula la proliferación de células musculares lisas y su efecto relajante que es responsable del efecto vasodilatador. El ON posee una elevada afinidad de fijación al hierro del grupo hemo y por consiguiente reacciona con hemoproteínas como la guanidil-ciclasa soluble que produce la formación de GMPc, el cual regula la disminución de calcio intracelular aumentando la velocidad de la bomba de intercambio de  $\text{Ca}^{+2}$  indispensable para la formación de la ONSe y la producción de ON que dependen del calcio intracelular que relaja la célula muscular lisa, produciendo vasodilatación e inhibiendo la agregación plaquetaria (Matsuoka y cols., 1989). El ON está involucrado también en la regulación de la interacción leucocitos y pared de los vasos, ya que inhibe la activación de los leucocitos *in vitro* y *in vivo*. Por lo

tanto, el ON está involucrado en la homeostasis general del control de los vasos y los trastornos en su liberación y producción pueden contribuir al vasoespasmo y a la arteroesclerosis (Moncada y cols., 1991). Otra de las acciones sobre el sistema cardiovascular es la neuromodulación sobre el control cardiovascular producida por la capacidad de ON para actuar como neurotransmisor, desde neuronas barosensibles aferentes hacia los núcleos del tracto solitario, controlando de la frecuencia cardiaca y el tono vascular (Machado y Banagamba, 1992).

### **1.2.2.2 Efectos del óxido nítrico en el sistema nervioso.**

Ya en 1977 se encontró que el ON estimulaba la guanilato ciclasa en homogenizados del córtex cerebral de ratón (Miki y cols., 1977). Posteriormente se identificó a la L-arginina como el activador de la guanilato ciclasa soluble en el cerebro y como un elemento fundamental para la formación de ON. Cuando es sintetizado por la forma neuronal de ON sintasa (ONSn), funciona como un neurotransmisor y neuromodulador, participando en la sinaptogénesis, la memoria, la formación de la secreción neuroendocrina y en la regulación de la neurogénesis en la zona subventricular de los ratones adultos (Chen, y cols, 2008). El ON se ha vinculado a una serie de procesos neuronales, como la liberación y captación de neurotransmisores, en particular, la dopamina. También está implicado en varias alteraciones del comportamiento relacionados con el desequilibrio dopaminérgico, como la enfermedad de Parkinson, la esquizofrenia y la toxicomanía (Itzhak y Ali, 2006). Sin embargo, en condiciones de excesiva formación, el ON es un importante mediador de neurodestrucción. Se convierte en un importante agente de muerte de neuronas motoras. Se ha propuesto a los glucocorticoides como los principales fármacos para retrasar este efecto (Chen y cols., 2008).

### 1.2.2.3 Efectos en el tracto gastrointestinal.

El óxido nítrico es una gran molécula de señalización en el tracto gastrointestinal, actúa inhibiendo la contracción muscular. Las acciones del ON son mediadas por la estimulación de la guanilato ciclasa soluble (GCs) y un posterior aumento en la concentración de GMPc. Se ha demostrado la presencia de ONSn productora de ON en esófago, estómago, intestino delgado e intestino grueso (Lino y cols., 2008). Se ha comprobado que el ON en el aparato gastrointestinal, actúa también como transmisor en algunos nervios no adrenérgicos y no colinérgicos y aumenta la respuesta contráctil a la estimulación no adrenérgica, estimulando inclusive la motilidad de la vesícula biliar. En 1989, Li y Rand demostraron que en el músculo anocoxigeo del ratón y rata, el ON actúa relajando sus fibras, encontrándose un efecto similar en la unión ileocólica del perro, siendo la ONSn la responsable de la expresión y síntesis de ON, el cual relaja el *fundus* gástrico y promueve la relajación adaptativa del estómago ante el aumento de presión (Bult y col., 1990). Existen algunos moduladores que al parecer interactúan con la síntesis de ON bajo ciertas situaciones patológicas, así la COX-1 derivada de las prostaglandinas ejercen un efecto inhibitorio sobre la ONSi gástrica durante la endotoxemia, y esto puede representar un potencial mecanismo citoprotector, ya que la regulación de la ONSi es fundamental para la expresión de ON deletéreo en algunos tejidos cuando se produce exageradamente (Best y cols., 2008).

### 1.2.2.4 Efectos en el aparato respiratorio

En los vasos procedentes del pulmón, se ha observado relajación del endotelio dependiente. Sin embargo hay evidencias de que en la circulación de este órgano puede existir una menor liberación basal de ON, similar con el lado venoso de la circulación sugiriendo que los sistemas circulatorios de baja presión tienen menos necesidad de un

tono vasodilatador dependiente del ON, En la vasoconstricción hipóxica hay una generación aumentada de ON para contrarrestar la constricción (Persson y cols, 1990). Se ha demostrado que ON administrado por inhalación a animales y a seres humanos revierte la vasoconstricción debida a hipoxia o a hipertensión pulmonar y si es inhalado en bajas dosis (18-36 p.p.m.) protege frente al síndrome de distres respiratorio del adulto. (Kass y Apkon, 1998) y en recién nacidos prematuros prevendría la morbi-mortalidad al disminuir la displasia broncopulmonar (Barrington y Finer, 2007).

#### **1.2.2.5 Efectos en el sistema genito urinario.**

La actividad del ON en el tracto urinario está en relación con la hiperreactividad de uréteres y vejiga urinaria, propiciando disminución de la capacidad de la vejiga o produciendo dilatación del cuello y de la uretra, con disminución de la contractibilidad de los uréteres. Éstas características han sido demostradas sobre todo en enfermedad obstructiva (Chertin y cols., 2004). Utilizando inmunoelectrones por microscopía, se ha demostrado en la vejiga con diversas lesiones y una anormal diferenciación de las células superficiales del urotelio, inducción de la expresión de NOS en las mitocondrias de las células parcialmente diferenciadas (Romih y cols., 2008). En el tracto genital está muy sustentado la actividad del ON en órganos genitales femeninos por medio de los nervios no colinérgicos y no adrenérgicos, actuando sobre las secreción de glándulas sexuales e incrementando el moco cervical y la ovulación entre otras funciones (Mörlin y Hammarström, 2005). En el aparato genital masculino es bien conocida su función en la vasodilatación de los cuerpos cavernosos. En los testículos y en el epidídimo no se ha encontrado actividad significativa de la ONS. En los conductos deferentes, próstata, vesícula seminal y cuerpos cavernosos debido a sus altos niveles de  $Ca^{++}$  que modula la actividad ONSn y ONSe, se ha encontrado alta producción de ON. En conclusión, el ON

funciona como un importante mediador en procesos como la erección y en el reflejo de micción (Ehren y cols., 1994).

#### **1.2.2.6 Efectos en el sistema inmunológico.**

La producción de ON por la ONSi producida principalmente por los macrófagos activados y los polimorfonucleares, se ha identificado como el principal mecanismo de acción citostática y citolítica de los macrófagos activados sobre la célula diana, desempeñado un papel importante en la actividad microbicida. Esto se produce por la acción de la combinación de ON con centros de azufre-hierro en las enzimas clave del ciclo respiratorio y de la vía de síntesis del ADN en las células diana. Sin embargo, los mismos agentes y enzimas oxidativas pueden ser liberados y atacar no sólo los agentes patógenos intra y extracelulares sino que también contribuyen a nitrosilación, estrés y lesiones de tejidos. Se ha demostrado que parte de este efecto tóxico también es producido por la nitrosilación elevada que parte de mecanismos producidos por células de primera línea de defensa como los macrófagos y polimorfonucleares neutrófilos sobre todo cuando actúa frente a patógenos como parásitos (Forlenza y cols., 2008; James y Hibbs, 1990). La inflamación aguda depende de la liberación de mediadores químicos. La formación de edema es uno de los signos de inflamación y es producida por la extravasación de líquidos y proteínas de la microcirculación local, además del acúmulo de leucocitos polimorfonucleares en el lugar de la inflamación. Múltiples estudios realizados con inhibidores e inductores de ON muestran que el ON actúa de forma importante en la extravasación vascular incrementándola por el aumento del flujo sanguíneo local (Ialenti y cols., 1992). Se ha estudiado la modulación producida por la vía L-arginina en una enfermedad crónica inflamatoria característica como la artritis experimental, en la que se ha encontrado que la producción de ON incrementa la artritis y sus signos inflamatorios, edema, calor, rubor. Otra de las enfermedades en la que se ha estudiado la acción del ON

en la inflamación crónica es el asma, demostrando el papel importante de la molécula en la inflamación pulmonar, ya que actúa entre otras funciones en la modulación de las vías respiratorias y el tono del músculo liso vascular. Se ha demostrado que la enzima inducible ONSi ha sido la principal isoforma determinante de la acción y ha sido considerada como un objetivo terapéutico, aunque la función de la ONSe en la enfermedad de la vía aérea también se ha estudiado (Esposito y Cuzzocrea, 2007).

Por otro lado la L-arginina ejerce un efecto trófico sobre el timo y potencia el recuento de los linfocitos de la glándula y mejorando su respuesta a mitógenos, el rechazo de injertos cutáneos y la regresión tumoral, así como aumentando la actividad de las células *natural-killer* activadas por linfocinas. Estas características ayudan en la evolución crónica de la inflamación disminuyendo sus efectos a largo plazo (Park y col., 1991).

Una primera respuesta inflamatoria innata a los componentes bacterianos, virales o parasitarios comienza con una respuesta inmune adaptativa con el reclutamiento y la activación de macrófagos, fagocitos mononucleares y linfocitos T. La liberación de citocinas y mediadores de la inflamación, como la bradicinina e histamina entre otras, activan la producción de ON por las células. Para que esto ocurra debe existir una expresión génica de ONSi. El ON entonces es una molécula efectora de las acciones citotóxicas de células como los macrófagos activados frente a microorganismos invasores y células tumorales y por lo tanto ON sintetizado por ONSi puede contribuir al daño tisular dependiente de la activación de macrófagos, como se ha demostrado en estudios experimentales (Moncada y cols., 1991). Se ha comprobado además que la vía L-arginina ayuda al desarrollo de linfocitos T citotóxicos y potencia la expresión de receptores de IL-2 en linfocitos T activados, determinado que el ON modula la síntesis de esta y otras citocinas y al hacerlo regula la respuesta inmunológica (Reynolds y cols., 1988).



La producción de NO a través de la vía ONSi es regulada principalmente a nivel transcripcional. Los glucocorticoides inhiben la producción de ON en varios tipos de células incluyendo las células endoteliales vasculares, las células epiteliales y los macrófagos, pero no lo hacen en algunos tipos de células como los condrocitos. Los glucocorticoides pueden inhibir la producción de ON y la expresión ONSi por varios mecanismos distintos pero simultáneos que pueden variar en función del tipo de células y los estímulos inflamatorios. Alguno de ellos son: a) La inhibición de la síntesis de un cofactor tetrahidrobiopterina y el transporte del sustrato L-arginina en la célula. b) La inducción de la arginasa II, que consume el sustrato L-arginina, c) La inhibición del factor de transcripción NF-KB. d) La desestabilización de ARNm de la ONSi. e) El silenciamiento transcripcional por desacetilación de histonas (Betters, 2008).

### **1.3 Óxido nítrico y helmintos.**

El estudio de la relación entre el óxido nítrico y los helmintos incluye varios apartados diferentes. En primer lugar, revisaremos la producción de óxido nítrico por diferentes fases del ciclo biológico de estos parásitos, así como las funciones que desempeña esta molécula en su biología. En segundo lugar, estudiaremos los productos biológicos de helmintos que son capaces de modular la producción de óxido nítrico por células del hospedador y los efectos concretos de los mismos. Posteriormente, sintetizaremos la información disponible acerca del efecto, aislado o combinado del óxido nítrico sobre algunos helmintos. Finalmente, indicaremos las consecuencias que tiene el aumento de la producción de óxido nítrico durante algunas helmintosis.

#### **1.3.1 Producción de óxido nítrico por helmintos.**

En la actualidad disponemos de una información muy fragmentaria sobre la producción de ON por los diferentes helmintos y de las funciones que desempeña esta molécula. Esta información se debe a la variabilidad en el empleo de diferentes técnicas: inmunohistoquímica, técnicas histoquímicas (NADPH diaforasa), estudios funcionales (conversión de arginina en citrulina, empleo de inhibidores).

Desde un punto de vista estructural, se ha detectado la presencia de diversas isoformas de ONS o de productos derivados de la actuación del óxido nítrico (nitritos o nitrotirosina) en diferentes localizaciones de formas adultas de helmintos. Así, en esquistosomas se ha detectado ONS neuronal principalmente en tejido nervioso de *S. mansoni* (Kohn y cols., 2001) y ONS inducible en el parénquima de *S. mansoni* y en el

subtegumento de *S. japonicum* (Long y cols., 2004). Estudios recientes demuestran la detección de ON en esquistosomas vivos, indicando un papel importante de este mediador en la fisiología del parásito (Kohn y cols. 2006). En lo que respecta a *Áscaris suum* se ha demostrado la presencia de ONS, con actividad funcional, en estructuras nerviosas sistema nervioso central, y periférico, intestino y en la hipodermis (Bascal y cols., 1995; Bowman y cols., 1995; Bascal y cols., 2001). Una distribución estructural similar a la de *A. suum* aparece en *Toxocara canis* (Fan y cols., 2004). En varias especies de filarias (*B. malayi*, *D. immitis*, *A. vitae*), la actividad ONS se localiza en adultos, en la pared muscular (Pfarr y Fuhrmam, 2000 Pfarr y cols., 2001). En *Trichinella britovi*, se ha detectado la expresión de ONS de tipo endotelial en la cutícula y esticosoma (Masetti y cols., 2004). En el líquido hidatídico de *E. granulosus* fértiles se han detectado nitritos, aunque no se ha identificado exactamente la localización de las ONS (Amanvermez y Celik, 1995).

Además de identificar estructural y funcionalmente la producción de ON en formas adultas de helmintos, también se ha demostrado la expresión de ONS en otras fases del ciclo biológico como huevos, esporocistos y cercarias de *Schistosoma* sp. (Long y cols., 2004), oocitos, espermatozoides y formas embrionarias de *Brugia malayi* (Pfarr y Fuhrmam, 2000).

Las funciones desempeñadas por el ON en la biología de los helmintos son de cuatro tipos fundamentales. Una de las mejores identificadas es la neurotransmisión y la transmisión neuromuscular (Bascal y cols., 1995; Martínez, 1995; Kohn y cols., 2001), siendo, en general, considerado un agente implicado en la relajación muscular. También en este sentido, en algunos helmintos se ha demostrado que el ON es un mediador de varios neuropéptidos sobre la actividad de los canales iónicos, por ejemplo de potasio (Bowman y cols., 2002). La detección de ONS en fases embrionarias de varios helmintos,

y el papel de este mediador en otras especies como *Drosophila* sugiere que el óxido nítrico desempeña un papel importante en el control de la proliferación y diferenciación durante la embriogénesis (Pfarr y cols., 2000). Finalmente, al menos en dos tipos de helmintos, el ON desempeña un papel importante en la detoxificación de radicales libres de oxígeno: (i) participando junto a una forma octamérica de hemoglobina en el líquido perientérico de *Ascaris lumbricoides* (Minning y cols., 1999; Barrett y Brophy, 2000) y (ii) estimulando la actividad hemo-oxigenasa en la célula nodriza de *T. britovi*, útil para controlar el “estallido oxidativo” que tiene lugar tras la invasión de las células musculares (Masetti y cols., 2004).

### **1.3.2 Modulación de la producción de óxido nítrico por las células del hospedador inducida por productos biológicos de helmintos.**

El efecto de los helmintos sobre la generación de ON por células del hospedador se ha evaluado de diferentes formas. En primer lugar, se ha medido directamente la presencia de productos derivados de esta molécula, principalmente nitritos y nitratos, en el suero de humanos con varios tipos de parasitosis. Así, se ha comprobado que tanto en la hidatidosis como en la esquistosomosis humanas hay aumento de estos productos (Touil-Boukffa y cols., 1998; Abo-Shousha y cols., 1999). Algunos autores indican que el aumento de la producción de nitritos podría estar relacionado con la formas clínicas graves en la hidatidosis (Ait Aissa y cols., 2006).

Un segundo grupo de estudios está formado por modelos experimentales de infección, en los que se evalúa por diferentes métodos la modificación de la producción de este mediador. Así, por ejemplo, la infección experimental por *E. multilocularis* en ratones se asocia a un aumento de la expresión de ONSi en macrófagos peritoneales, tanto durante la fase temprana, como en la tardía (Dai y Gottstein, 1999). Por otro lado, en un modelo de esquistosomosis hepática inducida por huevos de *S. japonicum*, se ha

observado aumento de la expresión de ONSi en células inflamatorias como neutrófilos, macrófagos, células de Kupffer y hepatocitos (Hirata y cols., 2001). También en la toxocariosis experimental se ha visto aumento de la concentración de nitritos en suero, así como acumulación de productos nitrosilados (nitrotirosina) y de la expresión de ONSi en células inflamatorias hepáticas (Fan y cols., 2004). Finalmente, en la infección experimental con larvas de *Trichinella spiralis*, se ha documentado la expresión de ONSi transmural en yeyuno (Hogaboam y cols., 1996). En otros trabajos, la administración *in vivo* de moléculas parasitarias como el antígeno P38 y específicamente su antígeno inmunodominante P4 de *S mansoni*, que da lugar, en el contexto de una presentación adecuada (asociado a IL-12), a granulomas en los que se detecta un mayor expresión de ONSi (Chen y Boros, 1999).

Finalmente, en otro grupo de trabajos, se evalúa el efecto de antígenos parasitarios sobre la producción de ON en cultivos de células del hospedador. En estos estudios los resultados obtenidos aportan datos variables dependiendo del tipo de helminto, del tipo de antígeno de un mismo parásito, de la especie de hospedador de la que se obtienen las dianas celulares o del tipo de célula inflamatoria empleada. En cuanto a la variación en la producción de ON respecto al tipo de helminto utilizado, los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación muestran que existen tres aspectos bien diferenciados. En primer lugar, existen efectos opuestos en los distintos grupos de helmintos estudiados. De forma general, podemos considerar un efecto de inhibición en la producción de ON por macrófagos preestimulados ejercidos por antígenos de pared quística y capa laminar de los cestodos *Echinococcus granulosus* y *E. multilocularis* (Andrade y cols., 2004). Diversos efectos son ejercidos por dos de los trematodos estudiados que acceden al aparato respiratorio en trematodosis humanas. Mientras que antígenos excretores secretores de *Paragonimus mexicanus* estimulan la producción de ON, no se observa el

mismo efecto cuando se emplean antígenos excretos secretores de *Schistosoma bovis*. Esto se puede deber a que mientras que en trematodosis con localización definitiva pulmonar, paragonimosis, hay una estimulación específica y dosis dependiente, en trematodosis de paso por el pulmón y asentamiento definitivo en otros órganos, esquistosomosis, no se produce esta estimulación específica (Andrade y cols, 2005). Aunque existen variaciones respecto a los tipos de antígenos utilizados, en todos los nematodos estudiados existe estimulación de la producción de ON (Andrade y cols, 2005a, 2005b, 2007).

En segundo lugar, existen diferentes efectos en especies de un mismo género. En este sentido, hemos observado diferencias entre las especies quísticas y no quísticas de *Trichinella* en su capacidad para estimular la producción de ON en macrófagos alveolares (Andrade y cols., 2007). Estas diferencias pueden estar relacionadas con la formación completa e incompleta de las células nodrizas en la triquinelosis.

Por último hemos estudiado el efecto de diferentes antígenos, somáticos y excretos secretores de fases larvarias y adultas de nematodos, sobre la producción de ON. Hemos identificado qué antígenos somáticos de larva de tercera fase y excretos secretores de vermes adultos de *Toxocara canis* son los responsables de la producción de ON en macrófagos alveolares (Espinoza y cols., 2002a). Esto podría atribuirse al contacto directo con antígenos larvarios a su paso por el pulmón, así como a la posible eliminación de estos antígenos en su fase adulta.

Tratamos de identificar moléculas aisladas de estos antígenos responsables de la inducción de ON. Para ello separamos el antígeno excretor secretor de vermes adultos de *Áscaris suum* en diez fracciones. La fracción 2, compuesta por tres bandas de 37, 44 y 46 kDa, era la única fracción que estimulaba la producción de ON. Mediante

espectrometría de masas (MALDI-TOF) se identificaron dos de ellas correspondientes a dos enzimas glucolíticas (enolasa y fosfoglicerato cinasa) y una más perteneciente a una proteína que cataliza el alargamiento de las cadenas peptídicas, denominado factor de elongación *Tu* (Andrade y cols., 2005a). Con el mismo objetivo tratamos de definir los antígenos implicados en la estimulación de ON en *Dirofilaria immitis*. Identificamos una banda de 35 kDa que no forma parte del endosimbionte *Wolbachia* y que está íntimamente relacionada con proteínas de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Andrade y cols., 2005b).

En algunos casos, se han identificado de forma precisa los receptores celulares sobre los que actúan estos antígenos (Tezuka y cols., 2002) e incluso las vías de transducción intracelular. En este sentido nuestro grupo investigó las rutas de señalización intracitoplasmáticas involucradas en la producción de ON tras ser estimulados con antígeno excretor secretor de *Toxocara canis* (Espinoza y cols., 2002b). Los resultados demuestran que la principal vía de señalización es la que utiliza ácido araquidónico y sus productos.

### **1.3.3 Efecto biológico de la producción de óxido nítrico sobre los helmintos.**

El papel del óxido nítrico en la defensa frente a los helmintos se sustenta en varios tipos de estudios experimentales, pudiendo en ocasiones aportar resultados diferentes.

Los estudios más simples son los que emplean donadores de ON (tanto *in vivo* como *in vitro*) y evalúan su acción sobre fases del ciclo biológico de los helmintos. Esta estrategia se ha utilizado para evaluar el efecto de esta molécula sobre *Echinococcus granulosus*, *Brugia malayi* y *Trichinella spiralis*. Así, empleando SNAP, se ha podido comprobar histológicamente la lesión y muerte celular de *E. granulosus* (Steers y cols., 2001). Por otro lado, el empleo de SIN-1 *in vitro* ejerce un efecto citostático tanto sobre

microfilarias como formas adultas de *B. malayi*, siendo más resistentes los adultos (Thomas y cols., 1997). Además, en un modelo experimental de esta filariosis, el empleo de otro donador (DAE/NO) inhibe el desarrollo de formas adultas y altera su motilidad (Rajan y cols., 1996). Por el contrario, en un modelo experimental de triquinelosis, se ha observado que diferentes donadores de ON incrementan la carga parasitaria (Hadas y cols., 2002; Wandurska-Nowark y cols., 2003). Nuestro grupo de investigación estudió los efectos de dos donadores de ON, SIN-1 y SNOG sobre larvas de *Toxocara canis*, a diferentes concentraciones y a lo largo del tiempo. Los resultados obtenidos demuestran que con ninguna de las concentraciones utilizadas durante el periodo de estudio, el ON de forma aislada o en combinación con radicales libres de oxígeno ejerce efecto citotóxico sobre las larvas de *Toxocara canis* (Espinoza y cols., 2002c).

Un enfoque complementario consiste en evaluar el efecto de células del hospedador, principalmente macrófagos activados mediante IFN $\gamma$ , sobre los helmintos. Es interesante indicar que en este tipo de experimentos la acción antiparasitaria puede ser debida no sólo al efecto directo del ON si no a la interacción con otras moléculas como los radicales libres de oxígeno o inmunoglobulinas. Estos métodos se han empleado en *E. multilocularis*, observando que el cultivo de protoescolices con macrófagos previamente estimulados lleva a la destrucción del parásito, siendo el ON y no los radicales libres de oxígeno los mediadores implicados (Kanazawa y cols., 1993). También en *E. granulosus*, los macrófagos peritoneales estimulados con IFN $\gamma$  desencadenan lesiones sobre el parásito similares a las producidas por donadores de ON (Steers y cols., 2001). Un efecto similar tiene lugar cuando se cultivan microfilarias de *B. malayi* u *Oncocerca lienalis* con macrófagos activados por IFN $\gamma$  (Taylor y cols., 1996). Finalmente, no sólo los macrófagos sino también otras estirpes celulares como los



hemocitos de *Biomphalaria* son capaces de destruir formas parasitarias como los esporocistos de *S. mansoni* (Hahn y cols., 2001).

En tercer lugar, se han utilizado inhibidores de la síntesis de ON *in vivo* para evaluar el efecto de esta molécula sobre la infección parasitaria. Ésta estrategia se ha utilizado principalmente en modelos experimentales de filariosis por *B. malayi* (Rajan y cols., 1996), toxocariosis (Espinoza y cols., 2002c) y triquinelosis (Kolodziej y cols., 2006). Los resultados obtenidos son opuestos, ya que el uso de aminoguanidina disminuye las lesiones en la toxocariosis, mientras que aumenta la carga parasitaria en la infección por filarias.

Además de los métodos indicados, el uso de varios antihelmínticos como el praziquantel, la ivermectina y la dietilcarbamacina se asocia a un aumento en la concentración sérica de nitritos y nitratos, por lo cual se ha interpretado que la actividad antiparasitaria de estos fármacos depende de la liberación de óxido nítrico (Ammar y cols., 2002; Winkler y cols., 1998).

Antes de cerrar este apartado, hay que señalar que, empleando diferentes métodos de estudio, se obtienen conclusiones aparentemente contradictorias. Así, por ejemplo, mientras que estudios *in vitro* demuestran el papel del ON en la destrucción de esquistosómulas (James y Glaven, 1989), estudios *in vivo* afirman lo contrario (Coulson y cols., 1998). Probablemente tras la entrada en el torrente sanguíneo, las esquistosómulas están protegidas del efecto del ON por la hemoglobina de los hematíes. Por otro lado, frente a los resultados mencionados previamente acerca del papel del ON en el control de la filariosis linfática (Taylor y cols., 1996, Rajan y cols., 1996), otros autores, usando varios tipos de animales singénicos y *knock-out* cuestionan el papel de esta molécula en el aclaramiento de microfilarias (Gray y Lawrence, 2002).

#### **1.3.4 Consecuencias patológicas que se derivan de la producción de óxido nítrico en el hospedador**

El aumento de la producción de ON por las células del hospedador en respuesta a la infección por helmintos y, ocasionalmente la propia liberación de este mediador por el propio helminto (Mupanomunda y cols., 1997; Kaiser y cols., 1998), pueden ocasionar efectos adversos. Los principales efectos son la lesión directa o alteración funcional tisular, inmunosupresión y carcinogénesis. Así, encontramos ejemplos de lesión directa, estructural y funcional, en los modelos de triquinelosis (Lawrence y cols., 2000; Garside y cols., 2000; Torrentes y cols., 2003), esquistosomosis (Ballemba y cols., 2002) y dirofilariosis (Kitoh y cols., 2001). Por otro lado, se ha comprobado que el ON liberado en respuesta a algunos helmintos da lugar a inmunosupresión, con escasa respuesta proliferativa de esplenocitos o inducción de apoptosis de linfocitos CD4. Los ejemplos mejor caracterizados son la infección por *E multilocularis* (Dai y Gottstein, 1999; Dai y cols., 2003) y filarias (Jenson y cols., 2002). Finalmente, la liberación de ON en respuesta a la infección por *Shaematobium* parece desempeñar un papel importante en la carcinogénesis vesical, a través de modificaciones de la proteína p53 (Warren y cols., 1995).

La inhibición de la producción de ON en un modelo experimental de toxocarosis indicó de forma clara que la inhibición *in vivo* de la ONSi disminuía las lesiones inducidas por *T. canis* (Espinoza y cols., 2002a). Uniendo estos datos a los obtenidos en apartados anteriores, podemos afirmar que en esta helmintosis la liberación de ON por las células del sistema mononuclear fagocítico constituye un mecanismo de evasión del parásito. Se estudió la producción de prostaglandina E2 (PGE2), molécula relacionada con el ON y con efectos similares como vasodilatación o supresión de la respuesta inmunitaria. Los resultados indican que el antígeno excretor secretor de *T. canis* induce

un aumento significativo de la síntesis de prostaglandinas por los macrófagos alveolares. Además la adición de L-canavanina disminuye significativamente su producción. Por tanto, estos estudios indican que existe una inducción de la producción de PGE2 por antígenos excretos secretores de *T. canis* y que dicha producción está mediada por ON.

Antes de terminar este apartado, debemos mencionar que, en algunas helmintosis de patogenia especialmente compleja, tanto el exceso como el defecto de ON pueden tener efectos deletéreos para el hospedador (Hoffman 2000; La Flamme y cols., 2001; Patton y cols., 2002). Así, la excesiva producción de ON en la esquistosomosis desencadenan una respuesta aguda, con hepatotoxicidad directa y formación de granulomas con escasa fibrosis, mientras que la escasa producción de este mediador se asocia a formas crónicas con desarrollo de intensa fibrosis y granulomas de gran tamaño.

## **2. Hipótesis y Objetivos**

---

La estrongiloidosis es una parasitosis de distribución mundial. Su incidencia es mayor en países tropicales y subtropicales. El diagnóstico es difícil por lo que no se conoce su prevalencia real. *Strongyloides* tiene la capacidad de producir auto infección , pudiendo perpetuarse en el hospedador durante décadas. En condiciones de inmunosupresión puede diseminarse, acompañándose casi siempre de infecciones bacterianas que provocan septicemias y mortalidad hasta del 80%. La fisiopatología de esta parasitosis tiene algunos puntos no aclarados. El óxido nítrico es una molécula importante en los procesos de inflamación y defensa del organismo. Se ha comprobado su importancia en la modulación de infecciones producidas por bacterias, virus y parásitos.

Estudios realizados en distintas helmintosis pulmonares ha puesto de manifiesto la participación del óxido nítrico en estos procesos. Dado que *Strongyloides* accede al pulmón en las primeras etapas de su ciclo biológico y no existiendo ningún estudio sobre la implicación de este mediador inflamatorio en esta helmintosis, nos proponemos como hipótesis de trabajo valorar la implicación del óxido nítrico en la patogenia de la infección experimental producida por *Strongyloides* , estudiando su papel en animales con y sin inmunosupresión.

- Evaluar el efecto de diferentes antígenos, obtenidos tanto de la fase larvaria como de la fase adulta de *Strongyloides venezuelensi*, sobre la producción de óxido nítrico en cultivos de macrófagos alveolares de rata.

- Estudiar el efecto *in vitro* de donadores de óxido nítrico en cultivos con larvas de tercer estadio y hembras partenogenéticas de *Strongyloides venezuelensis* y determinar su mecanismo de acción.

- Establecer un modelo de infección en ratones BALB/c, describiendo indicadores de infección.
- Desarrollar un modelo de inmunosupresión *in vivo* utilizando dexametasona y ciclosporina en ratones infectados con *Strongyloides venezuelensis*
- Valorar el efecto *in vivo* de donadores e inhibidores de óxido nítrico en un modelo de estrogiloidosis experimental.
- Estudiar el efecto *in vivo* de donadores e inhibidores de la producción de óxido nítrico en un modelo de inmunosupresión por corticoides e infección con *Strongyloides venezuelensis*.

### **3. Materiales y métodos.**

### **3.1 Animales.**

Se utilizaron ratones BALB/c machos, de pesos entre 14,6 a 21,8 g (IFFA-CREDO, Barcelona, España) distribuidos según el desarrollo de cada experimento. También se emplearon ratas wistar de 75 a 250 g procedentes del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca que fueron utilizadas tanto para el mantenimiento del ciclo biológico de *S. venezuelensis* como para la obtención de macrófagos alveolares en los estudios de producción de óxido nítrico.

Todos los animales fueron alojados en jaulas de policarbonato y alambre, manteniéndose dentro de un aislador con flujo laminar (Pharmatechnik, Emmendingen, Alemania) ubicado en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca. Los animales tuvieron acceso libre de comida y agua. Las condiciones de fotoperíodo fueron de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y la temperatura se mantuvo entre 18 y 22°C. Todos los animales fueron tratados de acuerdo con la legislación sobre protección animal vigente en España RD 1201/2005 de 10 de octubre sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos que desarrolla la Directiva 86/609/CEE del Consejo de la Unión Europea, de 24 de noviembre de 1986, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros de la Unión Europea en lo que se refiere a la protección de los animales utilizados para dichos fines.



### 3.2 Mantenimiento del ciclo biológico de *S. venezuelensis*.

Las larvas infectivas de tercer estadio (L3) de *S. venezuelensis*, se obtuvieron a partir de la cepa que se mantiene en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Farmacia de La Universidad de Salamanca por pases sucesivos en ratas wistar. Esta línea procede del Laboratorio de Taxonomía y Biología de Invertebrados del Departamento de Parasitología (Universidad Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil) y fue cedida por el Profesor Alan L. de Melo.

El ciclo se realizó de acuerdo con la técnica de **Martins y cols. (1999)**, donde a partir de heces de animales infectados se recuperan huevos de *S. venezuelensis*, para permitir el desarrollo de estos a larvas de primero (L1), segundo (L2) y tercer estadio (L3). Se mezclaron las heces con un sustrato inerte formado por vermiculita., posteriormente se recogían las L3 mediante la técnica de Baermann con modificaciones (**Rugail y cols., 1954**). Esta técnica se fundamenta en el termo-hidrotropismo característico de esta fase parasitaria (**Figura 3.1.**) Se contaban las Larvas L3 y se confirmaba que al menos el 80% tuvieran movilidad. Finalmente se ponían en una concentración de 3.000 L3 en 0,5 ml de solución salina que eran inyectados por vía subcutánea a ratas macho de 60-120 g.

#### Materiales:

- Heces de ratas con infección del séptimo al décimo día de infección con *S. venezuelensis*.
- Varilla de vidrio de 6 mm de diámetro y 25 cm de largo.
- Recipientes de plástico de 150 ml para recoger muestras de orina.
- Vermiculita. (Termita-Asfaltex, San Cugat del Valles, España).
- Rejilla de malla electrosoldada con luz de 0,5 mm para fondo de las jaulas que permite el paso de las heces.
- Embudos de vidrio de 12 cm de diámetro unido a un trozo de 15 cm de manguera de silicona de 10 mm de diámetro.
- Gasas de algodón de 10 hilos/cm<sup>2</sup>.

- Tubos de ensayo de plástico de 12 ml.

Procedimiento:

- Colocar los animales infectados en jaulas sobre la rejilla. En el fondo era necesario poner papel de filtro humedecido para evitar la desecación de las heces.
- Recoger y mezclar las heces de 24 horas con 20 ml de agua destilada y vermiculita en cantidad suficiente para mantener saturación de humedad y buena aireación.
- Incubar 3-7 días a 28°C con humedad relativa superior a 80%.
- Retirar el coprocultivo de la estufa y envolverlo en doce capas de gasa.
- Colocar las envolturas individualmente en agua a 42°C dentro de los embudos conectados a tubos de ensayo por medio de la manguera de silicona durante por lo menos 45 minutos.
- Retirar los tubos de ensayo, eliminar el sobrenadante y colocar 1 ml de agua destilada sobre el sedimento de L3.
- Centrifugar un minuto a 1.000 g, eliminar el sobrenadante y colocar 1 ml de agua destilada sobre el sedimento.
- Con una micropipeta tomar 10  $\mu$ l de la suspensión bien homogenizada, colocar en un porta objetos en el microscopio óptico a 40x y contar el número de larvas.



**Figura 3.1.** Aparato Baermann para la obtención de L3 de *Strongyloides venezuelensis*.

### 3.3 Análisis coprológico.

La observación de huevos en las heces de ratas infectadas con *S. venezuelensis* se realizó con la técnica parasitológica de sedimentación descrita por Pons y cols. (2007) modificado para tubos de ensayo en nuestro laboratorio.

Materiales:

- Heces de ratas.
- Tubos de ensayo 12 ml de plástico.
- Gasa de 10 hilos/cm<sup>2</sup>.

Procedimiento:

- Homogenizar 0,5 g de heces en 10 ml de agua destilada.
- Pasar el homogeneizado por 2 capas de gasa.
- Dejar sedimentar durante 5 minutos.
- Tomar con una pipeta Pasteur una muestra de sedimento, colocar una gota en un portaobjetos, cubrirla con el cubreobjetos y observar a 100x.

### 3.4 Descontaminación de larvas y hembras adultas de *S. venezuelensis*.

Las larvas y hembras partenogénicas de *S. venezuelensis* obtenidas de coprocultivo y necropsias no reúnen las características suficientes para ser cultivadas ya que la flora microbiana del medio en el que han sido obtenida podría contaminar los medios de cultivo. Por todo esto se les sometió a un proceso para eliminar estos microorganismos contaminantes con hipoclorito sódico, antibióticos y antifúngicos en agua destilada estéril siguiendo la técnica de Martins y cols. (1999).

Materiales.

- Larvas o hembras adultas de *S. venezuelensis* recién obtenidas.
- Hipoclorito de sodio 5% (212297, Panreac).
- Penicilina Estreptomina (P-4333, Sigma -Sigma-Aldrich, Inc., San Luis, EE.UU.).
- Fluconazol (F-8929, Sigma).

Procedimiento:

- Lavar tres veces las larvas L3 o hembras partenogénicas con agua destilada que contenga penicilina 100 UI/ml, estreptomicina 0,1 mg/ml y fluconazol 0,8 mg/ml.
- Dejar 10 minutos en agua destilada con hipoclorito de sodio al 0,25%.
- Lavar tres veces con agua destilada con penicilina 100 UI/ml, estreptomicina 0,1 mg/ml y fluconazol 0,8 mg/ml.
- Centrifugar a 1.000 g 60 segundos, eliminar el sobrenadante y almacenar los parásitos a -20°C o bien cultivarlos en los medios específicos utilizados a 28°C.

### 3.5 Obtención de antígeno de larva 3 y hembra partenogénica de *S. venezuelensis*

Se obtuvieron un total de ocho extractos proteicos y productos metabólicos procedentes de larvas L3 y de hembras partenogénicas de *S. venezuelensis*. En los protocolos siguientes, utilizados para la obtención de los antígenos parasitarios, se utilizaron varios materiales, que se enumeran a continuación.

- Ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 1M en agua destilada (E-9884, Sigma)
- *Phenilmethylsulfonylfluoride* (PMSF) 0,33M en etanol (P-7626, Sigma).
- Chemostatina en agua (C-7268, Sigma).
- Aprotinina en solución salina NaCl 0,9% (A-6012, Sigma).
- Pepstatina A 1M en etanol. (P4265. Sigma).
- Solución tampón con fosfato (PBS) NaCl 0,14 M, KCl 2,7nM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 nM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6,5 nM.
- Hidróxido de sodio 0,01 M. (621845, Panreac).
- Ácido Clorhídrico 1 M (181021, Panreac).
- Membranas semipermeables de celofán.
- Kit de determinación de proteínas BCA: Micro BCA Protein Assay Kit (23235 Pierce).
- Homogenizador de cristal
- Sonicador
- Centrífuga
- Cámara fría a 4°C
- Agitador termostatazo

### 3.5.1 Obtención de anfígeno en PBS de larva 3 (L3-PBS).

El anfígeno soluble en solución tampón con fosfato (PBS) de larvas L3 de *S. venezuelensis* se obtuvo tras someter a las larvas a la acción de congelación/descongelación, homogeneización y sonicación mediante ultrasonidos. Este procedimiento se realizó en una solución con inhibidores de proteasas (Conway y cols., 1994).

#### Material:

- Larvas 3 de *S. venezuelensis* descontaminadas.

#### Procedimiento:

- Resuspender las larvas L3 a una concentración aproximada de  $2 \times 10^5$ /ml de PBS con EDTA 5mM, PMSF 2mM y aprotinina 100 UI/ml, pepstatina A 1  $\mu$ M y chemostina 1 mM.
- Homogenizar la suspensión en baño de hielo y agua 60 minutos.
- Posteriormente sónicas en baño de hielo y agua 8 veces durante 20 segundos a 70 kHz.
- Dejar macerar 1 hora y posteriormente centrifugar a 13.000 g 30 minutos a 4°C.
- Recoger el sobrenadante y almacenarlo a -20°C.
- Determinar la concentración de proteínas en el sobrenadante.
- Comprobar las bandas en un gel de poliacrilamida con sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE) al 12,5% teñido con azul de Coomassie.

### 3.5.2 Obtención de antígeno en PBS con ácido desoxicólico de larva 3 (L3-DOC).

Para obtener este extracto se utilizó el sedimento formado en la obtención del extracto soluble en PBS de larvas L3 (L3-PBS). En este caso se resuspendió el sedimento en PBS con inhibidores de proteasas y ácido desoxicólico con el que se solubiliza esta fracción proteica (Conway y cols., 1994, Herbert y col., 2002).

#### Material:

- Sedimento sobrante de la elaboración del extracto L3PBS.

Procedimiento:

- Suspender el sedimento obtenido después de la síntesis L3PBS en un volumen original de PBS con 1% de ácido desoxicólico con EDTA 5mM, PMSF 2mM y aproptinina 100 UI/ml, pepstatina A 1µM y chemostatina 1mM.
- Mantener en balanceo toda la noche a 4°C.
- Centrifugar a 13.000 g durante 30 minutos a 4°C y retirar el sobrenadante.
- Dializar en PBS 24 horas y almacenarlo a -20°C.
- Determinar la concentración de proteínas y comprobar en un gel SDS-PAGE de 12,5% teñido con azul de Coomassie.

### 3.5.3 Obtención de antígeno en medio alcalino de larvas 3 (L3-ALK).

Este extracto se obtiene exponiendo a las larvas L3 de *S. venezuelensis* a una solución isotónica alcalinizada con hidróxido sódico (Machado y cols., 2003, Faccioli y cols., 2003), agregándose en la fase final del procedimiento inhibidores de proteasas.

Material:

- Larvas 3 de *S. venezuelensis* descontaminadas.

Procedimiento:

- Suspender las L3 a una concentración aproximada de  $2 \times 10^5$ /ml en PBS con EDTA 5 mM, PMSF 2 mM, aproptinina 100 UI/ml, pepstatina A 1 µM y chemostatina 1 mM.
- Añadir a la suspensión 1 ml de 0,15 M hidróxido de sodio por cada 10 ml de suspensión y mantener en balanceo durante 18 horas a 4°C.
- Agregar ácido clorhídrico 0,3 M hasta obtener pH 7,0.
- Centrifugar a 13.000 g 30 minutos a 4°C, recoger el sobrenadante y conservar congelado a -20°C.
- Determinar la concentración de proteínas y comprobar en un gel SDS-PAGE de 12,5% teñido con azul de Coomassie.

### 3.5.4 Obtención de antígeno en medio alcalino y ácido desoxicólico de larva 3 (L3-ALK-DOC).

Para obtener este extracto se utilizó el sedimento formado en la obtención del sustrato soluble en medio alcalino L3-ALK. (Machado y cols., 2003). A continuación se resuspendió el sedimento en PBS añadiendo inhibidores de proteasas y ácido desoxicólico 1%.

**Material:**

- Sedimento de la elaboración del extracto L3-ALC.

**Procedimiento:**

- Suspender el sedimento obtenido después de la síntesis de L3ALC en un volumen original de PBS con 1% de ácido desoxicólico con EDTA 5 mM, PMSF 2 mM y aproptinina 100 UI/ml, pepstatina A 1  $\mu$ M y chemostatina 1 mM .
- Mantener en agitación 12h a 4°C.
- Centrifugar a 13.000 g 30 minutos a 4°C, retirar el sobrenadante, dializar en PBS 24 horas a 4°C y conservar a -20°C.
- Determinar la concentración de proteínas y comprobar en un gel SDS-PAGE de 12,5% teñido con azul de Coomassie.

**3.5.5 Obtención de antígeno de excreción/secreción de larva 3 (L3-ES).**

Las larvas 3 de *S. venezuelensis* se mantienen en agua destilada en una estufa a 28°C con puerta transparente para que tengan iluminación suficiente. Debido a la baja actividad alimentaria de las L3, es necesario cultivarlas durante 5 a 10 días para poder recoger los productos de excreción secreción del parásito (Brindley y cols., 1988).

**Material:**

- Larvas 3 de *S. venezuelensis* descontaminadas.
- Frascos de cultivo celular de 100 ml.
- Estufa a 28°C con puerta transparente.
- Liofilizador

**Procedimiento:**

- Colocar 1.500 L3/ml en frascos de cultivo celular de 20 ml de PBS con penicilina 100 UI/ml, estreptomycin 0,1 mg/ml, fluconazol 0,8 mg/ml, EDTA 5 mM, PMSF 2 mM y aproptinina 100 UI/ml, pepstatina A 1  $\mu$ M y chemostatina 1 mM.
- Colocar en la estufa a 28°C, con humedad del 80%.
- Comprobar diariamente que las larvas tengan movimiento. Se realizó recuento de L3 móviles sobre cien larvas. Si se detecta contaminación bacteriana mediante tinción de Gram desechar el cultivo.
- Mantener el cultivo hasta que las L3 móviles sean del 30%.
- Centrifugar el cultivo a 1.000 g, 5 minutos, recoger el sobrenadante y liofilizarlo.
- Pesar el liofilizado y rehidratar lo para obtener una concentración en torno a 1  $\mu$ g/ $\mu$ l.

- Determinar la concentración de proteínas y comprobar en un gel SDS-PAGE de 12,5% teñido con azul de Coomassie. Conservar a -20°C.

### 3.5.6 Obtención de antígeno en medio alcalino de hembra (H-ALK).

El extracto en medio alcalino de hembras partenogenéticas (H-ALK) se obtuvo siguiendo un procedimiento similar a la obtención del extracto L3-ALK con la técnica de **Machado y cols., (2003)** y **Northern y Glove (1990)**. Se realizó después de este procedimiento sonicación de los parásitos y finalmente se añadió inhibidores de proteasas.

Material:

- Hembras partenogenéticas descontaminadas.

Procedimiento:

- Poner 1.000 hembras en 20 ml de PBS con EDTA 5 mM, PMSF 2 mM y aproptinina 100 UI/ml, pepstatina A 1 µM y chemostatina 1mM.
- Homogenizar con homogenizador de cristal durante una hora.
- Agregar 1 ml de NaOH 0,15 M a 20 ml de la suspensión de parásitos y dejar en agitación toda la noche a 4°C.
- Añadir posteriormente HCl 0,3 M hasta obtener un pH de 7.
- Sonicar la suspensión en hielo, 8 ciclos de 20 segundos a 70 kHz.
- Centrifugar a 4°C 30 minutos a 13.000 g, retirar el sobrenadante y centrifugarlo a 4°C a 13.000 g durante 30 minutos.
- Retirar el sobrenadante y almacenarlo a -20°C.
- Comprobar las bandas en un gel de poliacrilamida con sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE) al 12,5% teñido con azul de Coomassie.

### 3.5.7 Obtención de antígeno en medio alcalino y ácido desoxicólico de hembra (H-ALK-DOC).

Para obtener este extracto se empleó un procedimiento similar a la obtención del extracto L3ALC-DOC a partir del sedimento de la producción de extracto en medio alcalino de hembras partenogenéticas de *S. venezuelensis*.

Material.

- Sedimento obtenido en la producción de H-ALC.



**Procedimiento:**

- Suspender el sedimento obtenido después de la síntesis del extracto H-ALC en un volumen original de PBS con un 1% de ácido desoxicólico con EDTA 5 mM, PMSF 2 mM y aproptinina 100 UI/ml, pepstatina A 1  $\mu$ M y chemostatina 1 mM.
- Mantener el homogeneizado toda la noche en agitación a 4°C.
- Centrifugar a 13.000 g 30 minutos a 4°C.
- Retirar el sobrenadante y almacenarlo a -20°C.
- Comprobar las bandas en un gel SDS-PAGE al 12,5% teñido con azul de Coomassie.

**3.5.8 Obtención de antígeno de excreción/secreción de hembra (H-ES).**

Las hembras partenogenéticas de *S. venezuelensis* una vez descontaminadas se pueden mantener en el laboratorio durante aproximadamente una semana con medios de cultivos celulares de uso común, agregando una cierta cantidad de glucosa y ambiente de anhídrido carbónico. La técnica empleada está basada en la de Maruyama y Nawa (1997).

**Material:**

- Hembras partenogenéticas de *S. venezuelensis* descontaminadas.
- Medio de cultivo Dulbecco.
- Glucosa al 50% en PBS.
- Frascos de cultivo celular de 100 ml.
- Estufa con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.
- Liofilizador.

**Procedimiento**

- Colocar a razón de 30 hembras/ml en 20 ml de PBS con glucosa al 1%, penicilina 100 UI/ml, estreptomycinina 0,1 mg/ml, fluconazol 0,8 mg/ml, EDTA 5 mM, PMSF 2 mM y aproptinina 100 UI/ml, pepstatina A 1  $\mu$ M y chemostatina 1 mM, en frascos de cultivo celular a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y 80% de humedad.
- Agregar glucosa diariamente para mantener un mínimo del 1%, comprobando la movilidad de 100 hembras y la contaminación haciendo tinción de Gram en el medio de cultivo.
- Retirar el medio de cultivo cada 3 días hasta que la movilidad este por debajo del 70%.
- Centrifugar el cultivo a 1.000 g durante 5 minutos, recuperar el sobrenadante congelarlo a -80°C y liofilizarlo.
- Rehidratar el liofilizado hasta obtener una concentración aproximada de 1 mg/ml de proteínas.
- Retirar el sobrenadante y almacenarlo a -20°C.

- Comprobar las bandas en un gel SDS-PAGE al 12,5% teñido con azul de Coomassie.

### 3.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

La electroforesis es un método analítico, en el que se separan biomoléculas, dependiendo de su carga eléctrica, su masa molecular y su estructura. La velocidad de migración de la molécula depende de la relación carga/ masa molecular, del voltaje aplicado y del tamaño de poro del gel de electroforesis **D'Amici y col. (2008)**. La técnica se realizó siguiendo el manual de **Sambrook et al. (1989)**.

#### Materiales:

- Cristales y cubeta de electroforesis mini-Protean (165-5053, Bio-Rad).
- Mezcla de acrilamida al 30%: Acrilamida 29% (A-3553, Sigma) *N<sub>2</sub>N'*methylenebisacrylamide 1% (M-7279, Sigma) en agua destilada.
- Tris-Cl pH 8,8 1,5M: Tris 181,65 g (Fluka BioChemika, 07066) agua destilada hasta 1 l. Ajustar el pH 8,8 con HCl 36% (Panreac, 141020).
- Tris-Cl pH 6,8 1,0 M: Tris 121,1 g (Fluka BioChemika, 07066) agua destilada hasta 1 l. Ajustar el pH 6,8 con HCl 36% (Panreac, 141020).
- SDS 10%: Docecil sulfato sódico 10% en agua destilada (B-2787, Sigma).
- Persulfato Amónico 10% (A-3678, Sigma) en agua destilada. Almacenar a 4°C.
- TEMED: *N,N,N',N'*-Tetramethylethylenediamine (T-9281, Sigma).
- Tampón de electroforesis: Tris 30 g (Fluka BioChemika, 07066), glicina 144 g (Sigma, G-7126) SDS 5 g (Sigma B-2787)
- Tampón de muestra 3x: Mercaptoetanol (161-0710, Bio-Rad) 2,31 ml, SDS 3,0 g, tampón Tris pH 6,8 1,0 M 12 ml, glicerina 15 ml, (141922, Panreac), 10 ml, azul de bromofenol 0,2% 2 ml (161-0404, BioRad) agua destilada hasta 50 ml.
- Patrón de proteínas preteñido (TOT SM0671, Pageruler, Fermentas).
- Fuente de corriente PowerPac 200, Bio-Rad.
- Colorante de Coomassie: Azul brillante de Coomassie R250 0,25 g (B-0149) en 90 ml de metanol:agua 1:1 y 10 ml de ácido acético glacial. Filtrar a través de un papel de filtro Whatman n°1
- Solución decolorante 90 ml de metanol:agua 1:1 y 10 ml de ácido acético glacial.

**Tabla 3.1** Reactivos y cantidades para la preparación de los geles de separación al 12 y 20% de acrilamida y el gel de carga al 5%.

Reactivo	Gel de separación		Gel de carga
	12%	20%	5%
Agua destilada	1,6 ml	0,3 ml	1,4 ml
Mezcla de acrilamida al 30%.	2,0 ml	3,3 ml	330 µl
Tris-Cl pH 8,8 1,5M	1,3 ml	1,3 ml	
Tris-Cl pH 6,8 1,0M	-	-	250 µl
SDS 10%	50 µl	50 µl	20 µl
Persulfato amónico 10%	50 µl	50 µl	20 µl
TEMED	2 µl	2 µl	2 µl
Volumen total	5 ml	5 ml	2 ml

#### Procedimiento

- Limpiar los cristales con etanol al 70% y montar los cristales en el equipo de electroforesis.
- Preparar gel de poliacrilamida con el porcentaje apropiado de acuerdo a la Tabla 3.1.
- Colocar la mezcla entre los cristales montados y poner agua destilada para evitar el contacto con el aire y esperar a que la mezcla polimerice.
- Completar el espacio restante de los cristales con el gel de carga (Tabla 3.1).
- Introducir molde para formar los pocillos de carga y esperar que polimerice.
- Colocar los cristales en la cubeta de electroforesis, añadir el tampón de electroforesis y verificar que los pocillos estén íntegros.
- Hervir las muestras con el tampón de muestra 5 minutos para desnaturalizar las proteínas (1:3, muestra: tampón de muestra).
- Cargar el patrón y las muestras en el gel y poner a 80 V hasta que entren en el gel de separación y después aumentar a 100-150 V.
- Una vez el frente de la electroforesis llega al final del gel, extraerlo y colocarlo en el colorante de Coomassie de 30 minutos a 1 hora.
- Retirar del baño con el colorante y desteñir hasta que se aprecien las bandas de proteína.

### 3.7 Estudio de la presencia de óxido nítrico sintasa en *S. venezuelensis*.

Se estudio la presencia de óxido nítrico sintasa basándose en técnicas empleadas para otros helmintos por inmunohistoquímica en L3. Se investigaron las enzimas óxido nítrico de tipo endotelial (ONSe), neuronal (ONSn) e inducible (ONSi) (Masetti y col 2004)

### 3.7.1 Fijación de larvas 3 de *S. venezuelensis*.

Para conseguir la correcta fijación de las larvas para los posteriores tratamientos, lavados y coloraciones se procedió a fijar las L3 en portaobjetos de policina.

Materiales:

- Larvas 3.
- Paraformaldehído 4% en agua (158127, Sigma).
- Portaobjetos de policina (J2800AMNZ, Menzel-Gliser)

Procedimiento:

- Lavar las L3 con PBS a 1.500 r.p.m. 3 minutos.
- Poner a razón de 20 L3/ml de paraformaldehído 4% no más de 30 minutos para fijarlas y lavarlas con PBS tres veces.
- Colocar las L3 fijadas en los portaobjetos de policina
- Dejar que se adhieran durante 24 horas en estufa a 37°C.
- Pre-tratar las larvas con tripsina con EDTA al 0,25% durante 3 minutos en baño de hielo y agua.
- Tomar 50-100 µl de suspensión larvaria y extender en un portaobjetos tratado con polisina. Después colocar los portaobjetos en una caja y secarlos cubiertos con papel de aluminio en una estufa a 37°C durante un mínimo de 2 días.

### 3.7.2 Coloración inmunohistoquímica método ABC

Para realizar la inmunohistoquímica se permeabilizaron las larvas para favorecer la penetración de los anticuerpos y los colorantes necesarios.

Materiales:

- Larvas 3 pre-incubadas en portaobjetos de policina.
- Tripsina-EDTA (Gibco).
- PBS 0,1 M pH 7,4.
- Anticuerpos monoclonales contra las óxido nítrico sintasas endotelial, neuronal e inducible.
- Suero no-inmune 5%.
- Tritón X-100 0,02%.
- Tris-HCl 0,1 M, pH 7,6 y Tris-HCl 0,2 M, pH 7,6.
- Diaminobencidina al 0,025% (D-5637 Sigma).
- Agua oxigenada (0,0033%).

### Procedimiento

- Pretratar con tripsina-EDTA al 0,25% durante 3 minutos en baño de hielo y agua.
- Eliminar la tripsina lavando tres veces con PBS.
- Incubar con el anticuerpo primario correspondiente (ver tabla) disuelto en PBS durante 2 días a 4°C. Para facilitar la penetración del anticuerpo la solución también contenía suero no inmune al 5% y Tritón X-100 al 0,02 %. En cada caso se utilizó suero procedente de la misma especie que el anticuerpo secundario para reducir las uniones inespecíficas.
- Lavar con PBS y mantener durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario biotilado apropiado a 1:250 en todos los casos. Lavar el exceso de anticuerpo secundario.
- Incubar 1 hora con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (kit ABC, Vector) a una concentración de 1:250 media hora antes de su uso.
- Tras lavar las larvas en PBS, lavar 5 minutos en tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 7,6.
- Revelar con diaminobencidina al 0,025% y agua oxigenada (0,0033%) en tampón Tris-HCl 0,2 M, pH 7,6.
- Controlar la reacción observando al microscopio. Detener mediante sucesivos lavados con tampón Tris-HCl.

### **3.8 Producción de óxido nítrico por macrófagos alveolares de rata por antígenos de *S. venezuelensis*.**

Para evaluar la producción de óxido nítrico *in vitro* se utilizaron macrófagos alveolares de rata obtenidos mediante lavado broncoalveolar. Estos fueron cultivados y expuestos a dosis crecientes de antígenos de *S. venezuelensis*, determinándose su viabilidad. En todas las condiciones estudiadas se recogió el sobrenadante para medir la producción de óxido nítrico mediante la técnica colorimétrica de Griess. También se conservaron las células de cada pocillo con el objetivo de analizar la viabilidad y la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (Andrade y cols., 2004).

### 3.8.1 Obtención y recuento de macrófagos alveolares de rata

Con el propósito de obtener macrófagos alveolares, se realizaron lavados broncoalveolares a ratas según indica Andrade y cols., (2005).

#### Materiales:

- Ratas wistar de 250-300 g.
- Éter dietílico (142770, Panreac).
- Alcohol etílico (141086, Panreac).
- Catéter de teflón de 18 mm Gauge 22 (123.06, Vycon).
- Pipeta Thoma
- Microaspirador (258 00, Brand).
- Líquido de Türk (251390, Panreac).
- Cámara de Neubauer.

#### Procedimiento:

- Anestesiarse al animal con éter colocándolo en una campana de vidrio.
- Colocar la rata en decúbito supino sobre la tabla de disección, limpiar con alcohol etílico al 70% la parte inferior del cuello.
- Incidir la piel y retirar la musculatura y el tejido conjuntivo que rodea la tráquea.
- Introducir un catéter de teflón en la luz de la tráquea.
- Inyectar lentamente con una jeringa de 5 ml de suero PBS estéril pH 7,4, seguidamente extraer suavemente el líquido y depositar en un recipiente estéril siliconado en un baño con agua y hielo. Repetir el lavado entre 10 y 15 veces.
- Pasar el líquido de lavado a través de dos capas de gasa quirúrgica estéril.
- Centrifugar a 1.000 g durante 10 minutos a 4°C y conservar el botón de células.
- Resuspender los macrófagos obtenidos en 1 ml de PBS, separar una alícuota de 50 µl para realizar el recuento.
- Cargar una pipeta Thoma hasta la marca de 50 µl de esta suspensión. La pipeta de Thoma se carga ayudándose con un microaspirador.
- Aspirar líquido de Türk hasta la marca de 1,1 ml y agitar suavemente.
- Desechar las tres primeras gotas y llenar la cámara de Neubauer.
- Contar las células al microscopio óptico y expresar el resultado en millones de células por mililitro.

### 3.8.2 Cultivo de macrófagos alveolares de rata.

Los macrófagos alveolares de rata fueron expuestos a distintas concentraciones de extractos de *S. venezuelensis*, utilizando sus correspondientes controles positivos y negativos. El procedimiento se basó en la técnica descrita por Espinoza y cols. (2002) y Andrade y cols. (2005).

#### Materiales:

- Medio de cultivo Dulbecco 44 ml (D-0819, Sigma).
- Suero fetal bovino (12003C, Sigma).
- Penicilina y estreptomicina 100 U.I/10 mg P-4458, Sigma).
- Glutamina (G-5792, Sigma).
- Placa de poliestireno de 96 pocillos (M-4034, Sigma).
- Estufa de CO<sub>2</sub> (Galaxy St, BIOTECH).
- Lipopolisacárido de *Escherichia coli* serotipo O55:B5 (LPS) (L-2880, Sigma).
- Polimixina B (PMB P-4932, Sigma)
- L-NAME: N $\omega$ -Nitro-L-arginine methyl, ester hydrochloride (N-5751, Sigma)
- L-canavanina (C-9758, Sigma)
- Tripsina de páncreas bovino (T9935, Sigma).

#### Procedimiento:

- Poner 500.000 células de lavado broncoalveolar, por pocillo, en 1 ml de medio de cultivo e incubar durante 2 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> para que las células se peguen a las paredes de plástico de los pocillos.
- Aspirar el sobrenadante de cada pocillo con precaución de no tocar el fondo, lavar las células con 2 ml de medio de cultivo y añadir 1 ml de medio de cultivo.
- Tratar por triplicado cada pocillo según las condiciones escogidas: Testigo negativo ( $\emptyset$ ), testigo positivo pocillo tratado con 10 $\mu$ g/ml de LPS. Pocillos con los tratamientos programados: Antígenos en concentraciones crecientes desde 0,1 a 100  $\mu$ g/ml.
- Cuando sea preciso estimar la presencia de LPS en la muestra y determinar la especificidad al óxido nítrico se trataban los macrófagos alveolares con antígenos 50 $\mu$ g/ml durante 2 horas y posteriormente con polimixina a 80 $\mu$ g/ml o L-NAME 10 $\mu$ g/ml, y L-canavanina 10 $\mu$ g/ml.
- Incubar a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y humedad de 80% durante 24 horas.
- Recoger el sobrenadante del cultivo de cada pocillo, centrifugar 1.000 g 15 minutos y conservar a -20 °C hasta que sea utilizado.
- Añadir 500  $\mu$ l de tripsina de medio de cultivo, dejar actuar durante 1 minuto a 37°C y centrifugar a 1.000 g durante 3 minutos.

- A continuación lavar tres veces el sedimento con PBS a pH 7,4 centrifugando cada vez a 1.000 g durante 5 minutos a 4°C. Utilizar las células en fresco o conservar a -40°C.

### **3.8.3 Determinación de la viabilidad de macrófagos alveolares de rata.**

Utilizamos el método que se basa en la transformación de MTT por la mitocondria de la célula viva en cristales de formazán solubles en alcohol etílico o dimetil sulfóxido que son fácilmente cuantificables por espectrofotometría. Esta determinación se realiza una vez terminada la incubación (**Colangelo y cols., 1992**).

Materiales:

- Espectrofotómetro (Easy Reader EAR 400FT)
- MTT: 1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan thiazolyl blue (M-2003, Sigma)
- Dimetil sulfóxido (DMSO, 07-4872, Sigma).
- Placa de poliestireno de 96 pocillos (M-4034, Sigma).

Procedimiento:

- Poner 500 µl de colorante MTT al 20% en cada pocillo e incubar 15 minutos en una estufa a 37°C, desechando la fase acuosa
- Poner en cada pocillo 200 µl de DMSO, colocarlo en una placa de 96 pocillos para leer la absorbancia a 550 nm con filtro de 620 nm como referencia.
- Expresar la viabilidad como porcentaje en proporción a la viabilidad de los pocillos de los cultivos de macrófagos no sometidos a tratamiento.

### **3.8.4 Técnica de Griess para medida de nitritos.**

Para medir óxido nítrico en el sobrenadante de los cultivos celulares se empleó la técnica de Griess que está basada en la propiedad que tienen los nitritos de reaccionar con aminas primarias aromáticas en medio ácido, originando compuestos de diazonio que dan coloración rosada (**Green y cols., 1982; Campisi y cols., 2002**).



#### Materiales:

- Solución A: sulfanilamida 0,12 M (S-9251, Sigma) en H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,36 M.
- Solución B: dihidrocloruro de N-(1-naftil) etilendiamina 7,7 mM (N-5889, Sigma) en H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,36 M.
- Recta patrón a partir de una solución madre 1 M de NaNO<sub>2</sub> (S-2252-500G, Sigma).
- Espectrofotómetro (Easy Reader EAR 400FT).

#### Procedimiento:

- Hacer distintas diluciones, en el medio en el que se deba determinar los nitritos desde 1 µM a 100 µM.
- Preparar del reactivo Griess mezclando la solución A y B a partes iguales inmediatamente antes de su utilización.
- Añadir 100 µl por pocillo de blanco, patrones y muestras problemas por triplicado en una placa de 96 pocillos.
- Agregar 50 µl por pocillo de reactivo de Griess, esperar al menos 15 minutos y no más de 60 y leer la absorbancia a 550 nm con 620 nm de referencia en un espectrofotómetro.

### **3.8.5 RT-PCR para determinar óxido nítrico sintasa inducible en macrófagos alveolares de rata.**

Se determina la ONSi en macrófagos alveolares de rata tras el cultivo y la determinación de la viabilidad. Se extrae el ARN de los macrófagos siguiendo las instrucciones del kit comercial Rneasy Mini Kit (QUIA-GEN). Seguidamente se obtuvo la primera hebra de ADN complementario con transcriptasa inversa utilizando un kit comercial kit for RT-PCR (Roche 1483188). La amplificación del inserto de ONSi se realizó con los cebadores descritos por **Hattori y cols. (1995)**. Como testigo en la ejecución de la técnica se utilizaron los cebadores de gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH). La expresión de ONSi en cada condición problema se comparó con la de los macrófagos no estimulados y estimulados con LPS (**Andrade y cols., 2005**).

### 3.8.5.1 Extracción de ARN de macrófagos alveolares de rata.

Se realizó con el kit comercial Rneasy Mini Kit (QUIA-GEN).

Procedimiento:

- Agregar 600µl de buffer RLT preparado con 10 µl de beta-mercaptoetanol para homogeneizar. Centrifugar la mezcla a 10.000 r.p.m. 3 minutos y recoger el sobrenadante en un vial estéril sin ARNasas.
- Agregar 600 µl de etanol 70% y mezclar.
- Tomar 600 µl de la mezcla sin precipitado y poner en la mini-columna RNeasy dentro del tubo de 2 ml. Centrifugar 15 segundos a 10.000 r.p.m.
- Lavar la columna con 700 µl de RW1 centrifugando 15 segundos a 10.000 r.p.m.
- Hacer dos lavados con 500 µl *buffer* REP centrifugando a 10.000 r.p.m. el primero 15 segundos y el segundo 2 minutos para asegurar que la membrana de gel de sílice quede libre de etanol.
- Eluir el ARN con 30 µl de agua libre de ARNasas y centrifugar a 10.000 r.p.m.

### 3.8.5.2 Síntesis de la primera cadena de ADN complementario.

Se realizó con el kit para RT-PCR (11483188001, Roche) a partir del ARN extraído de los macrófagos alveolares de rata. Se forma la primera cadena de ADN complementario en dos pasos, síntesis a 42°C y desnaturalización a 95°C (**Andrade y cols., 2005**).

Materiales:

- Viales de 0,5 ml estériles.
- Termociclador (Perkin Elmer Instrument, Norwalk, EE.UU).
- Oligonucleótidos OligodT (27-7858, Pharmacia Biotech).
- Mastermix (ADNc).
- Agua libre de nucleasas (DEPC).

Procedimiento:

- Poner 1 µg de ARN.
- Agregar 1 µl de oligodT y 10 µl de Mastermix (ADNc).
- Completar el volumen hasta 20 µl con agua DEPC.
- Colocar la muestra en el termociclador y programar 75 minutos a 42°C para la síntesis, 10 minutos a 95°C para desnaturalizar.
- Retirar del termociclador y poner en una mezcla agua/hielo 5 minutos.
- Dar un pulso de centrifugación a la muestra y hacer una dilución (1:4) con 60 µl de agua DEPC. a 4°C y guardar a -20°C.

### 3.8.6 PCR de tiempo real para determinar óxido nítrico sintasa inducible en macrófagos alveolares de rata.

#### 3.8.6.1 Reacción en cadena de la polimerasa PCR de tiempo real.

La reacción en cadena de la polimerasa de tiempo real (**Overbergh y col. 1999**) se realizó con el SYBR green RT-PCR kit QUANTI TECTM (204243, Quiagen). Se utilizaron los cebadores descritos por **Hattori y Gross (1993)** y **Hattori y cols., (1995)** para la ONSi *forward*: CAg CTg ggC TgT ACA AAC CTT y ONSi *reverse*: CAT Tgg AAg TgA AgC gTT TCg. Se utilizaron los cebadores para la enzima beta-actina como testigos *forward*: AgA ggg AAA TCg TgC gTg AC, *reverse* CAA TAg TgA TgA CCT ggC CgT (**Overbergh y cols., 1999**)

#### Materiales:

- Agua libre de nucleasas (DEPC, W-4502, Sigma).
- Kit qPCR Core Kit for SYBR Green (RT-SN73-05, Eurogentec).
- Termociclador Bio-Rad (170-8780, Bio-Rad).
- Tampón 10X (M-1906, Promega).
- Cl<sub>2</sub>Mg (25mM).
- Dig-dUTP 1 mM (1 093 088, Boehringer Mannheim)
- *Taq* DNAPolimerasa (M1665, Promega).

#### Procedimiento

- Preparar la mezcla maestra de PCR, mezclando 2,5 µl de tampón 10x, 1 µl de Cl<sub>2</sub>Mg (25mM), 0,0625 µl de Dig-dUTP 1 mM, 0,125 µl de *Taq* DNAPolimerasa. Completar hasta 14 µl con agua DEPC en un vial por cada una de las muestras.
- Añadir 0,5 µl de cada uno de los cebadores por cada 14 µl de mezcla maestra de PCR.
- Agitar 2-3 segundos y dar un pulso de centrifuga para que no queden gotas por las paredes.
- Mezclar en un tubo vial de 0,5 ml: 10 µl de muestra 1:4,15 µl de mezcla maestra de PCR más cebadores.
- Colocar la muestra en el termociclador a 4°C. Utilizar el siguiente programa: 94°C durante los primeros 4,5 minutos después 16 ciclos (beta-actina) y 25 ciclos para la (ONSi) de 1 minuto a 94°C para desnaturalizar, 1,5 minutos a 58 para hibridación de los cebadores y 1,5 minutos para extensión de la doble cadena a 72°C durante 7 minutos. Al final se puso a 72°C durante 7 minutos y a 4°C para concluir la reacción.

### 3.8.6.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En la RT-PCR también se utilizaron los cebadores de **Hattori y Gross (1993)** y **Hattori y cols., 1995**. Para revelar la reacción el producto de la PCR se separó en un gel de acrilamida al 1,5% con bromuro de etidio.

Materiales:

- Buffer 10X (Promega M1906).
- $\text{Cl}_2\text{Mg}$  (25mM).
- Dig-dUTP 1 mM (Boehringer Mannheim, 1 093 088).
- *Taq* DNapolimerasa (Promega, M1665).
- Agua DEPC
- Cebadores: ONSi 20 mM . GA3PDH 20 mM.
- Termociclador
- ADN complementario

Procedimiento

- Para cada reacción poner en un recipiente 2,5  $\mu\text{l}$  de buffer, 1  $\mu\text{l}$  de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  25mM, 0,0625  $\mu\text{l}$  de Dig-dUTP 1 mM, 0,125  $\mu\text{l}$  de *Taq* polimerasa. Completar hasta 14  $\mu\text{l}$  con agua DEPC. Añadir para cada reacción 0,5  $\mu\text{l}$  de la solución donde se encuentran cada uno de los cebadores. Agitar 2-3 segundos y dar un pulso de centrifuga para que la solución se reúna.
- Poner en un vial para termociclador 10  $\mu\text{l}$  de muestra problema en dilución 1 y 15  $\mu\text{l}$  de la mezcla del punto anterior.
- Poner en el termociclador y programar 5 minutos a 94°C 4,5 minutos inicialmente y seguidamente programar 16 ciclos para ONSi y 25 ciclos para GA3PDH de 1 minuto a 94°C para separar las cadenas, 1,5 minutos para permitir la hibridación de los cebadores a 58°C y 1,5 minutos para dejar que se complete la síntesis a 72°C. Al final de los ciclos programar a 4°C.

### 3.8.6.3 Electroforesis de ADN en gel de agarosa con bromuro de etidio.

Para visualizar los productos obtenidos mediante PCR es necesario observarlos en un gel de agarosa con bromuro de etidio, confirmando su tamaño y comparandolos con un marcador. El bromuro de etidio es mutagénico y carcinogénico por lo que hay que evitar inhalar sus vapores y ha de ser manipulado con guantes.

Materiales:

- Solución reguladora TBE.
- Agarosa (A9539, Sigma).
- Horno microondas.

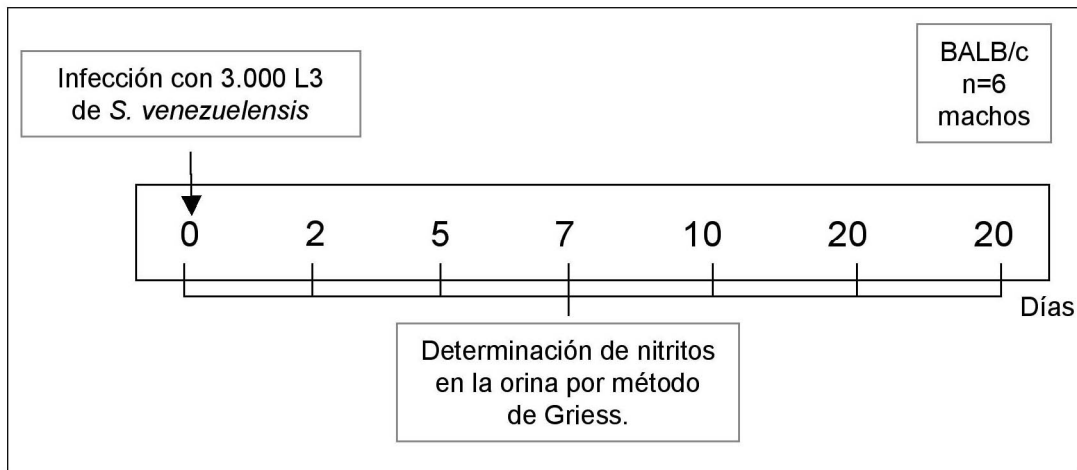
- Bromuro de etidio (161-0433, BioRad)
- Tampón de carga.
- Patrón de pesos moleculares (Weight Marker IX, Roche).
- Transiluminador UVP, BioDos-It System.

Procedimiento:

- Tomar 60 ml de solución reguladora TBE y agregar 0,6 g de agarosa y calentar en un horno microondas unos dos minutos.
- Atemperar a 50°C, añadir 0,5 µl de bromuro de etidio y agitar hasta que se disuelva.
- Verter en la bandeja y poner los moldes para formar los pocillos.
- En un vial colocar 10 µl de la muestra problema y añadir 4 µl de tampón de carga.
- En otro vial poner 2,5 µl de marcador molecular y 2,5 µl de buffer de carga.
- Colocar en cada carril en el gel de agarosa de modo que los pocillos queden en el polo negativo de la cubeta y el ADN pueda migrar hacia el polo positivo.
- Dejar correr las muestras a un voltaje entre 40 y 120 V.
- Visualizar el resultado de la electroforesis en un transiluminador de luz ultravioleta y hacer una fotografía.

### 3.9 Producción de óxido nítrico en ratones BALB/c infectados con *S. venezuelensis*.

Se utilizaron 6 ratones BALB/c machos entre 22 a 28 g, divididos en dos grupos de 3 animales: Grupo 1, no infectado; Grupo 2 infectado con 3.000 L3 de *S. venezuelensis*. Se cuantificaron huevos en heces a lo largo del experimento. Se recogió orina cada 24 horas hasta el día 20 de la infección la cual fue conservada a -20°C hasta la determinación de nitritos por triplicado mediante el método de Griess. Los animales fueron colocaron en jaulas metabólicas individuales. Para evitar la contaminación bacteriana de la muestra de orina se adicionó azida sódica (**Figura 3.2**).



**Figura 3.2.** Diseño experimental para determinar la producción de óxido nítrico en ratones BALB/c sanos e infectados con L3 de *Strongyloides venezuelensis*.

### 3.10 Efecto de donadores de óxido nítrico *in vitro* sobre larvas 3 y hembras partenogénicas de *S. venezuelensis*.

Se utilizaron larvas 3 y hembras partenogénicas de *S. venezuelensis* que fueron expuestas a concentraciones de 0,1  $\mu$ g a 1 mg/pocillo de tres donadores; uno de vida media de 2 horas [S-(6-Nitro-oxi-hexahydro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)thioacetate] (LA419), otro de vida media de 18 horas Diethylenetriamine. (DETA) y un tercero de vida media de 56,6 horas 3,3-bis(aminoethyl)-1-hydroxy-2-oxo-1-triazene (AEHOT) en los medios correspondientes: agua destilada para larvas y medio de cultivo Dulbecco para las hembras. Se determinó la viabilidad observando la motilidad de las formas parasitarias y la medida de la actividad fosfatasa alcalina en el medio de cultivo. La viabilidad de las dos fases del nematodo se estudió en doce puntos desde los 5 minutos después de ponerlos en cultivo a los 5 días. Se agregó más donadores de cada tipo al cumplirse el tiempo de la vida media en cada caso (Espinoza y cols., 2002).

Materiales:

- Larvas 3 descontaminadas y hembras partenogénicas de *S. venezuelensis*.
- Medio Dulbecco.
- LA419 [S-(6-Nitro-oxi-hexahydro-furo [3,2-b] furan-3-1-il) thioacetate]

- DETA: (Diethylenetriamine).
- AEHOT: 3,3-bis (aminoethyl)-1-hydroxy-2-oxo-1-triazene
- Placas de 96 pocillos con fondo plano.

Procedimiento:

- Colocar 100 L3 de *S. venezuelensis* en 400 µl de agua destilada o bien 10 hembras partenogenéticas en 400µl de medio de cultivo Dulbecco.
- Agregar los donadores indicados en diluciones crecientes: 0,5; 1,0; 2,5; 5; 10; 20; 40; 80; 200; 500 µg; 1 y 2 mg/pocillo por triplicado.
- Determinar la viabilidad expresada como porcentaje de formas parasitarias móviles del total y la medida de actividad fosfatasa alcalina en el medio de cultivo a los 5; 15; 30 minutos 1; 2; 4; 6; 12; 24; 48; 72 horas y en el 5 día.

### 3.11 Valoración de la viabilidad de larvas y hembras partenogenéticas de *S. venezuelensis*.

La valoración del grado de viabilidad de las larvas L3 y las hembras partenogenéticas de *S. venezuelensis* ha sido habitualmente determinada por la presencia o no de movilidad del parásito *in vitro*. También la medida de la actividad de enzimas como la fosfatasa alcalina en el sobrenadante del medio de mantenimiento del parásito es un método que ha sido utilizado en otros parásitos y que hemos implementado para *S. venezuelensis*.

#### 3.11.1 Determinación y cuantificación de la movilidad.

Se utilizó uno de los indicadores más comunes para valorar la viabilidad de los parásitos que es cuantificar la presencia de movimiento a través del microscopio óptico o invertido en condiciones de iluminación y temperatura adecuadas a la especie (**Kotze y cols., 2004**).

Materiales:

- Larvas L3 y hembras partenogenéticas descontaminadas.
- Microscopio.
- Placas para cultivos.

Procedimiento:

- Poner el recipiente (placa de pocillos, frasco de cultivo o portaobjetos) con las larvas o hembras a la luz natural por 2 minutos para estimular su movilidad.
- Observar al microscopio óptico invertido a 100x y contar 100 parásitos, cuantificando el número de larvas o hembras partenogenéticas con movimiento por triplicado.

### 3.11.2 Cuantificación de la actividad fosfatasa alcalina en el medio de mantenimiento del parásito.

Se ha observado que las células muertas de los parásitos sin viabilidad entran en degradación dejando salir al medio diversas enzimas. La fosfatasa alcalina es una de las más fáciles de detectar con procedimientos sencillos en el medio de mantenimiento de los parásitos (Stettler y cols., 2001). Se empleó un kit Roche/hitachi 747 de determinación de actividad fosfatasa alcalina en fluidos del hombre por lo que utilizamos suero humano como control de la prueba a la hora de realizar las determinaciones.

Materiales:

- Larvas L3 y hembras partenogenéticas descontaminadas.
- Kit Roche/hitachi 747: Solución R1: 2-amino-2-metil-1-propanol: 1,12 M, pH 10,44 (30°C); acetato de magnesio: 2,49 M; sulfato de cinc 0,50 mM; ácido N-(2-hidroxietil)-etilendiaminotriacético 2,49 M. Solución R2: P-nitrofenilfosfato: 99,5 mM, pH 8,50 (25°C).
- Suero humano.
- Sobrenadante de cultivos de L3 o de hembras partenogenéticas expuestos al fármaco.
- Placas de cultivo.

Procedimiento:

- Tomar 30  $\mu$ l de medio de mantenimiento del parásito y colocarlo por triplicado en la placa de cultivo.
- Añadir 170  $\mu$ l a cada pocillo conteniendo R1 y R1 en proporción 5:1.
- Mantener 15 minutos a 37°C.
- Medir la absorbancia a 550 nm con un filtro de control de 620 nm.



### 3.12 Tinción TUNEL para estudio de apoptosis en larvas 3 de *S. venezuelensis*.

La técnica de tinción TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) permite observar la fragmentación del ADN nuclear en células apoptóticas por la incorporación de 12-dUTP-fluoresceína a los extremos 3'-OH del ADN fragmentado mediante la enzima desoxinucleotidil transferasa Terminal (rTdT). La 12-dUTP-fluoresceína marca el ADN, pudiéndose de esta forma visualizarse directamente mediante microscopía de fluorescencia. Por otro lado las células se tiñen también con yoduro de propidio, que marca de color rojo el ADN tanto de células apoptóticas como no apoptóticas. La fluorescencia verde debida a la 12-dUTP-fluoresceína sólo se incorporará dentro del núcleo de las células apoptóticas, de forma que el núcleo de las células en apoptosis muestra fluorescencia verde amarillento por la localización de ambos colores

#### Material

- Larvas 3 fijadas en paraformaldehído de acuerdo al punto 3.7.1.
- Kit de TUNEL Fluorescein Apoptosis Detection System (Promega, Madison)
- Mezcla de reacción de TUNEL: Tampón de equilibrio 45 µl/muestra, mezcla de nucleótidos 5 µl/muestra y desoxinucleotidil transferasa terminal recombinante 1 µl/muestra.
- Solución del kit de TUNEL 20 X SSC
- Microscopio confocal (LSM 310 Laser Scan, Zeiss).

#### Procedimiento:

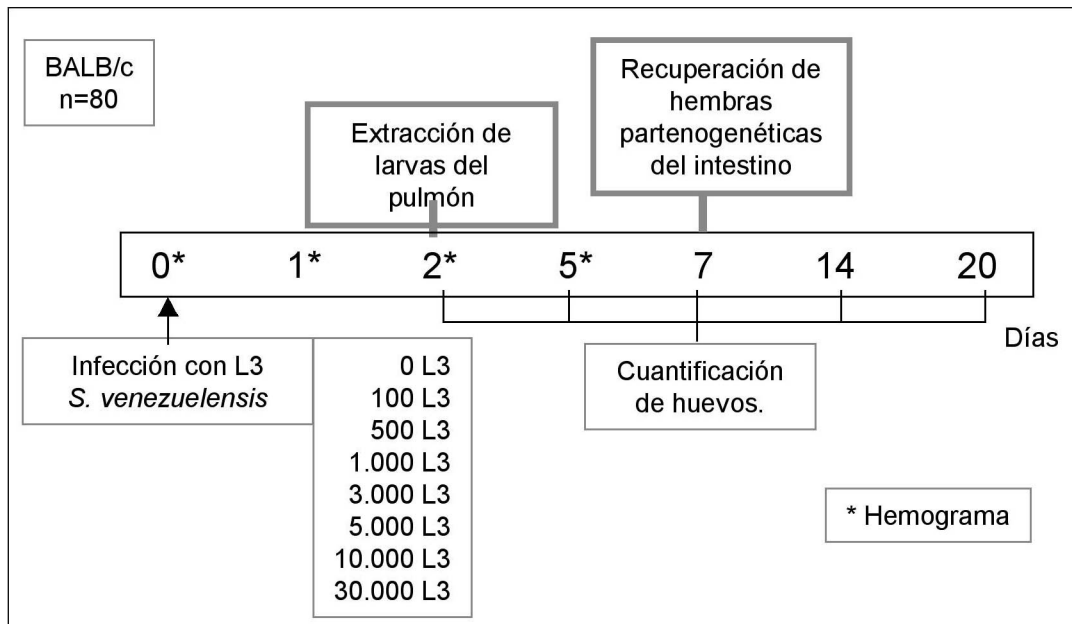
- Incubar las muestras con 100 µl del tampón de equilibrio del kit durante 10 minutos a temperatura ambiente y retirar el tampón.
- Tomar 50 µl de la mezcla de reacción de TUNEL
- Colocar las larvas que están en los portas de polisina. Cubrirlas con las láminas de plástico para asegurar la distribución uniforme de la mezcla de reacción e incubar a 37°C, 60 minutos en una cámara húmeda protegida de la luz.
- Una vez terminada la reacción, diluir la solución del kit de TUNEL 20x SSC a 1:10 con agua desionizada. Retirar la lámina de plástico de protección y sumergir la muestra en una jarra de Coplin con 40-60 ml de 2x SSC durante 15 minutos a temperatura ambiente protegidas de la luz.

- Lavar la muestra 3 veces en PBS durante 5 minutos cada vez para eliminar la 12-dUTP-fluoresceína no incorporada.
- Teñir las muestras utilizando con una solución de yoduro de propidio en PBS a una concentración final de 1 µg/ml durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar la muestra 3 veces en agua desionizada durante 5 minutos a temperatura ambiente y secar el exceso de agua con papel de filtro.
- Por último y para conservar la fluorescencia, añadir una gota de la solución *anti-fade* al área que contiene las células y proteger las muestras con un cubreobjeto.
- Observar las muestras con microscopio confocal con luz de 520 nm de longitud de onda para ver la fluorescencia verde de la fluoresceína y luz de 620 nm para la fluorescencia roja del yoduro de propidio.

### **3.13 Establecimiento de un modelo de infección de *S. venezuelensis* en ratones BALB/c.**

Se emplearon un total de 80 ratones BALB/c de 6 semanas, con pesos entre 18-20 g. Los ratones fueron divididos en 8 grupos de 10 ratones. Uno de los grupos se mantuvo sin infección y los 7 grupos restantes fueron infectados subcutáneamente con dosis de 100, 500, 1.000, 3.000, 5.000, 10.000 y 30.000 L3 respectivamente. Para el seguimiento de las infecciones se determinó diariamente el número de huevos en heces, Se extrajo de cada animal 1,5 ml de sangre del plexo retro-ocular, 0,5 ml se depositaron en tubos de ensayo con anticoagulante (EDTA), 1 ml fue dejado en reposo 4 horas, centrifugado a 7.000 g, durante 10 minutos a 4°C. El suero fue retirado, almacenado congelado a -20°C, hasta su procesamiento. Se estudió el hemograma; número de plaquetas, número de leucocitos totales y fórmula leucocitaria (neutrófilos, linfocitos, eosinófilos, basófilos) utilizando un citómetro (Beckman: Coulter LH 750). En el suero se determinó alanina transaminasa GPT (EC 2.6.1.2), aspartato transaminasa GOT (EC 2.6.1.1), lactato deshidrogenasa LDH (EC 1.1.1.27), amilasa (EC 3.2.1.2), creatin-quinasa CK (EC 2.7.3.2), glucosa, utilizando un auto-analizador (Beckman: Synchron CX9). Las determinaciones fueron realizadas en los días 0, 1, 2, 5 y 20 después de la infección. Un animal de cada grupo fue sacrificado a las 6 horas, 1, 3, 5, 7, 14 y 20 días post-infección y

se recogió piel, pulmón, corazón, hígado, intestino y cerebro. Posteriormente se realizaron cortes histológicos. También se recogieron larvas del pulmón y hembras del intestino (Figura 3.3).



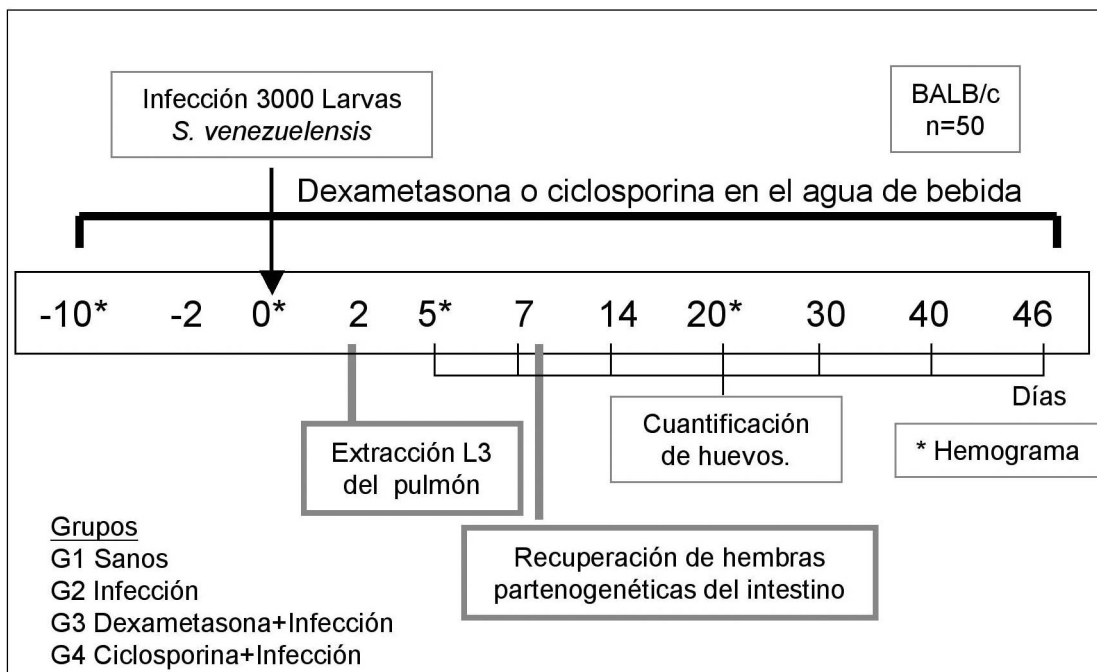
**Figura 3.3.** Diagrama del desarrollo del modelo de estrogiloidosis en ratones BALB/c infectados con *S. venezuelensis*.

### 3.14 Establecimiento de un modelo de infección con *S. venezuelensis* en ratones BALB/c tratados con dexametasona y ciclosporina.

Se utilizaron 50 ratones BALB/c agrupados en los siguientes grupos de 10 animales: Grupo 1, no tratado y no infectado; Grupo 2, no tratado e infectado; Grupo 3, tratados con dexametasona e infectados; Grupo 4, tratados con ciclosporina e infectados. La dexametasona se administró vía oral, en el agua de bebida, en una concentración de 12 µg/g peso desde los 10 días antes de infectar hasta el final del experimento (Yang y Healey, 1993). La ciclosporina también fue administrada vía oral a dosis de 50 µg/g de

peso vivo/día durante todo el experimento comenzando los 10 días previos a la infección (Lescano y cols., 2004).

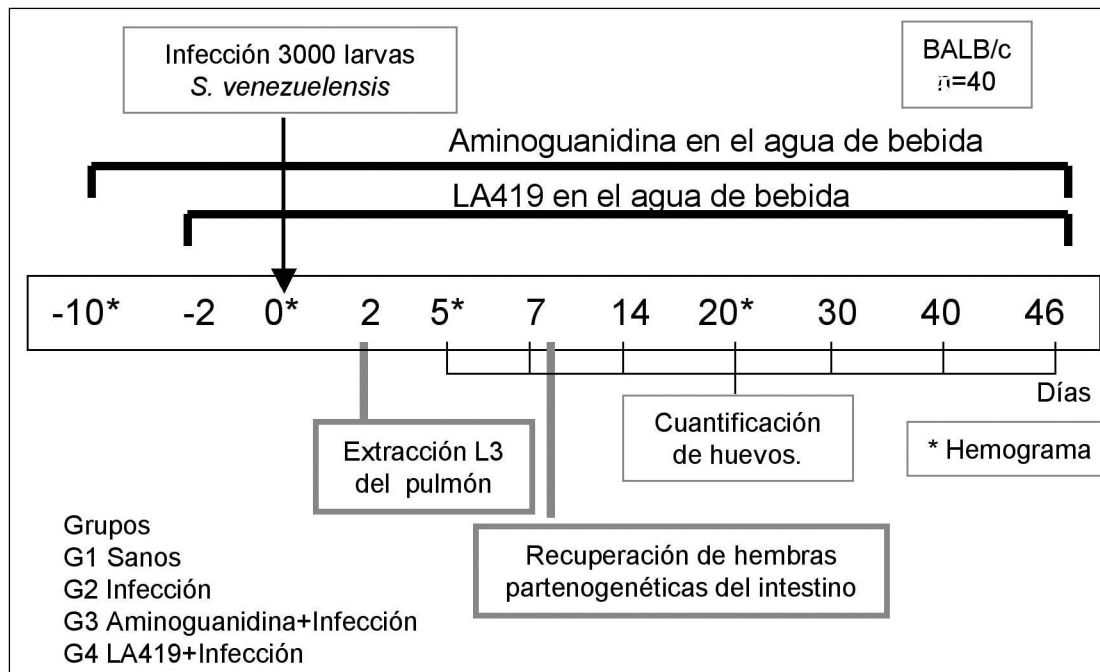
Los ratones se infectaron con 3.000 L3 de *S. venezuelensis* por inyección subcutánea diez días después de iniciado el tratamiento con dexametasona o ciclosporina. Se determinó diariamente el número de huevos en heces a partir del día 1 de infección. Se tomaron muestras de sangre diez días antes de la infección y los días 0, 5 y 20 de infección para determinar hemograma; número de leucocitos totales y fórmula leucocitaria (neutrófilos, linfocitos, eosinófilos, basófilos) y número de plaquetas, empleando la misma técnica que en el experimento anterior. Se utilizaron dos animales de cada grupo para recuento de larvas en el pulmón en el día 2 de infección y extracción de hembras partenogenéticas en el día 7 de infección del intestino (Figura 3.4).



**Figura 3.4.** Diagrama del desarrollo del experimento en ratones BALB/c infectados con *Strongyloides venezuelensis* y tratados con ciclosporina y dexametasona.

### **3.15 Efecto de inhibidores y donadores de óxido nítrico sobre ratones BALB/c infectados con *S. venezuelensis*.**

Se utilizaron un total de 40 ratones repartidos en cuatro grupos de 10 animales: Grupo 1, No tratado no infectado; Grupo 2, No tratado infectado; Grupo 3, Tratado con aminoguanidina y Grupo 4, Tratado con el donador de óxido nítrico LA419 e infectado. El tratamiento con aminoguanidina consistió en administrar el producto durante el experimento comenzando 10 días antes de la infección, la dosis utilizada fue 125 µg/ratón/día vía oral en el agua de bebida. El donador LA419 se incluyó en el agua de bebida para alcanzar una dosis de 3,6 µg/g/día/ratón, durante el experimento y las 48 horas previas a la infección. Los ratones de los grupos 2, 3 y 4 fueron infectados con 3.000 L3 de *S. venezuelensis* por vía subcutánea. Se determinaron el número de huevos por gramo de heces durante todo el experimento desde el día 1 de la infección. Se determinaron larvas del pulmón el segundo día de infección y hembras partenogénicas el séptimo día de la infección. Los animales fueron sacrificados cuando se constató la ausencia completa de huevos en heces. Se tomaron muestras de sangre para determinar hemograma; número de leucocitos totales y fórmula leucocitaria (neutrófilos, linfocitos, eosinófilos, basófilos) y número de plaquetas (**Figura 3.5**).

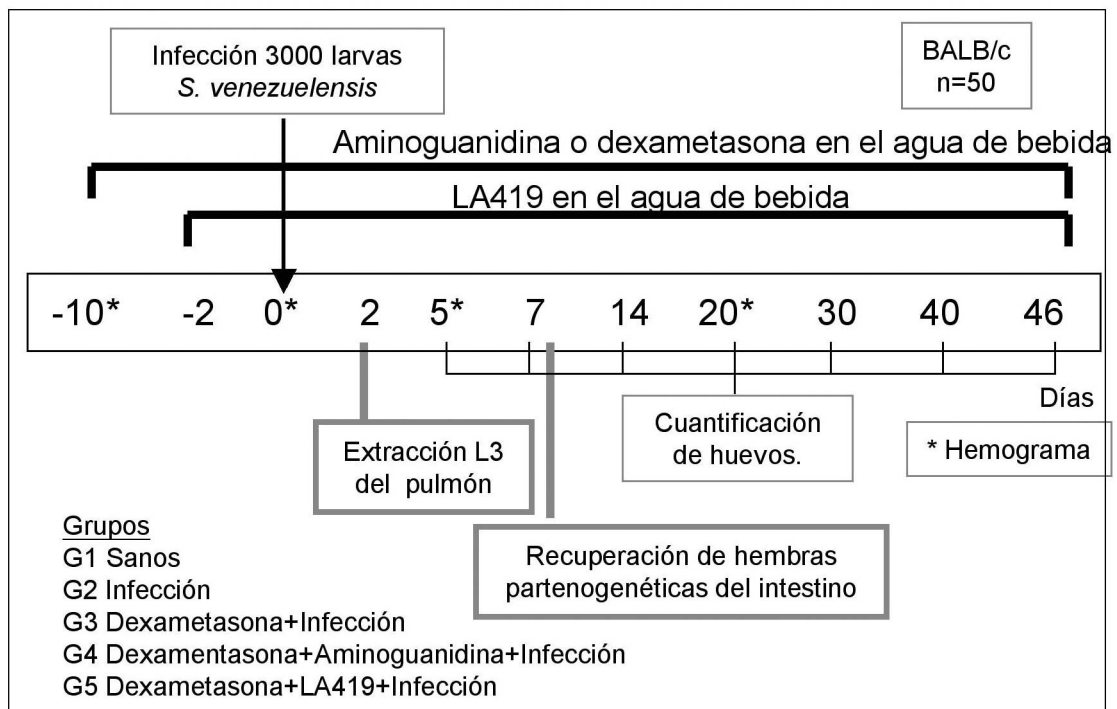


**Figura 3.5.** Diagrama del desarrollo del experimento en ratones BALB/c infectados con *Strongyloides venezuelensis* y tratados con aminoguanidina o el donador de óxido nítrico LA419.

### 3.16 Efecto de inhibidores y donadores de óxido nítrico sobre ratones BALB/c tratados con dexametasona e infectados con *S. venezuelensis*.

Se utilizaron un total de 50 ratones BALB/c: Grupo 1, no tratados y sin infección; Grupo 2, no tratados e infectados; Grupo 3, tratados con dexametasona e infectados; Grupo 4, tratados con dexametasona, aminoguanidina e infectados. Grupo 5, tratados con dexametasona, donador de óxido nítrico LA419 e infectados. El tratamiento con dexametasona se realizó a dosis de 12 µg/g P.V. (Yang y Healey, 1993) y el de aminoguanidina a una dosis de 12,5 µg/ratón/día, por vía oral en el agua de bebida durante todo el experimento, comenzando la administración 10 días previos a la infección. El donador LA419 se administró también en el agua de bebida en una dosis de 3,6 µg/g/día durante todo el experimento comenzando 48 horas antes de la infección. Todos los ratones fueron infectados con 3.000 L3 de *S. venezuelensis* por vía subcutánea excepto el Grupo 1. En todos los grupos se determinó el número de huevos en heces

durante todo el experimento. Se cuantificaron larvas en los pulmones en el segundo día de infección y hembras partenogenéticas en el intestino en el séptimo día de infección. Los animales fueron sacrificados cuando se constató la ausencia completa de huevos en heces. Se tomaron muestras de sangre para determinar hemograma; número de leucocitos totales y fórmula leucocitaria (neutrófilos, linfocitos, eosinófilos, basófilos) y número de plaquetas (**Figura 3.6**).



**Figura 3.6.** Diagrama del desarrollo del experimento en ratones BALB/c inmunosuprimidos con dexametasona, infectados con *Strongyloides venezuelensis* y tratados con aminoguanidina o el donador de óxido nítrico LA419.

### 3.17 Necropsia de ratones y ratas infectados con *S. venezuelensis*.

Se realizó necropsia de con el propósito de obtener larvas proceentes de órganos como el pulmón o tejido conjuntivo subcutáneo y larvas partenogénicas de la mucosa intestinal. También se estudiaron los daños histológicos macroscópicos y microscópicos.

#### Materiales:

- Tabla de disección
- Instrumental de disección: tijeras, bisturí, pinzas.
- Cathon No 22.
- Formaldehído 37-38% (141328, Panreac).
- Solución salina NaCl 0,085% en agua destilada.
- Solución fijadora (Formaldehído en solución salina 15%).
- Solución PBS.
- Pipeta Pasteur.
- Alfileres entomológicos.

#### Procedimiento:

- Sacrificar los animales con éter dietílico en una campana.
- Fijar los cadáveres a una tabla de disección, cortar la piel desde la región inguinal hasta la mandíbula y retirarla. Abrir la caja torácica y la cavidad intestinal.

#### Para obtener muestras para cortes histológicos:

- Recoger, según cada caso, muestra de piel, músculo esquelético, corazón, pulmón, estómago, hígado e intestino delgado.
- Poner en solución fijadora formaldehído 15% en solución salina directamente las muestras de piel, músculo esquelético, corazón, estómago o hígado.
- Para el pulmón canalizar la traquea con pipeta Pasteur e introducir solución fijadora hasta conseguir la expansión total del pulmón, finalmente colocar el órgano en solución fijadora.
- Para el intestino delgado: Cortar 3 cm de intestino delgado desde la unión gastrointestinal, abrirlo y extenderlo sobre una lámina de madera, sujetarla con alfileres entomológicos, finalmente colocar en solución fijadora.
- En todos los casos retirar la solución fijadora después de 40 minutos, tallar la pieza y poner una nueva.

#### Para obtener larvas del pulmón:

- Abrir la caja torácica, lavar con 10 ml de solución salina y picar con unas tijeras el pulmón.
- Colocar el líquido de lavado y el pulmón picado en una copa de sedimentación con PBS a 38°C en un baño termostatado durante 40 minutos.
- Recuperar del fondo cónico de las copas las hembras.



Para obtener hembras partenogénicas del intestino:

- Recoger el intestino delgado, cortar longitudinalmente y colocarlo envuelto en 6 capas de gasa en copas de sedimentación con PBS a 38°C en un baño termostático durante 4 horas.
- Recuperar del fondo cónico de las copas las hembras. Lavar con penicilina 100 UI/ml, estreptomycin 0,1 mg/ml y fluconazol 0,8 mg/ml tres veces durante 5 minutos cada una.

### 3.18 Corte histológico teñido con hematoxilina y eosina.

Cuando las piezas están ya fijadas se incluyen en parafina para permitir el corte con el microtomo. A continuación se monta el corte en un portaobjetos, se eliminan los restos de parafina y se hidrata para proceder a hacer la tinción. Con la técnica de tinción de hematoxilina eosina, la cromatina nuclear y los compuestos basófilos aparecen en azul por la hematoxilina y el citoplasma, colágeno y compuestos acidófilos se tiñen de anaranjado o rojo por la eosina. Finalmente se procede a deshidratar la muestra incluirla en bálsamo de Canadá para hacer un montaje duradero.

Materiales:

- Piezas histológicas fijadas en formol y cortadas en cubos.
- Parafina Paraplast plus 56°C.
- Microtomo (Nimot. Microm HM 310)
- Estufa de 70°C
- Hematoxilina de Carazzi: (HT1079, Sigma) 0,5g, IO<sub>3</sub>K 0,1g, sulfato aluminico potásico 25 g
- Eosina (HT110216, Sigma) 1g, agua 1.000 ml.
- Alcohol etílico al 80, 90, 95 y 100%
- Xileno (A5597, Sigma)
- Bálsamo de Canadá (60610, BioChemika)

Procedimiento:

- Deshidratar la pieza en alcohol 70% toda la noche, posteriormente introducir la pieza en concentraciones crecientes de 80-90-95% de alcohol etílico y en alcohol etílico absoluto. Después colocarla en alcohol tolueno 5% 2 horas y finalmente tolueno puro 3-4 horas.
- Introducir la pieza a 70°C, durante 12 horas, sacarla y dejar que solidifique a temperatura ambiente.

- 
- Una vez que el bloque se ha endurecido, colocar en el microtomo y hacer cortes de 4  $\mu\text{m}$  de grosor.
  - Colocar los cortes obtenidos en agua a 37°C, extender sobre un lámina portaobjetos e introducir inclinados en una estufa a 60°C para que se deslice la parafina sobrante.
  - Introducir el corte montado en xileno cinco minutos tres veces, para completar la eliminación de la parafina.
  - Para poder teñir el corte hay que hidratar la pieza por lo que se la introduce alcohol en concentraciones decrecientes: alcohol absoluto 90-80-70% y finalmente se la introduce en agua destilada.
  - Cubrir con la solución de hematoxilina 5 minutos.
  - Lavar varias veces con agua durante un mínimo de 15 minutos.
  - Cubrir con eosina durante 5 minutos
  - Lavar con agua rápidamente.
  - Deshidratar con alcoholes en concentración creciente; 70-80-90 y 100%.
  - Introducir en carbo-xilol por 5 minutos por tres veces para aclarar.
  - Cubrir la muestra con bálsamo de Canadá, poner el cubre-objetos y observar al microscopio óptico.

### 3.19 Análisis Estadísticos.

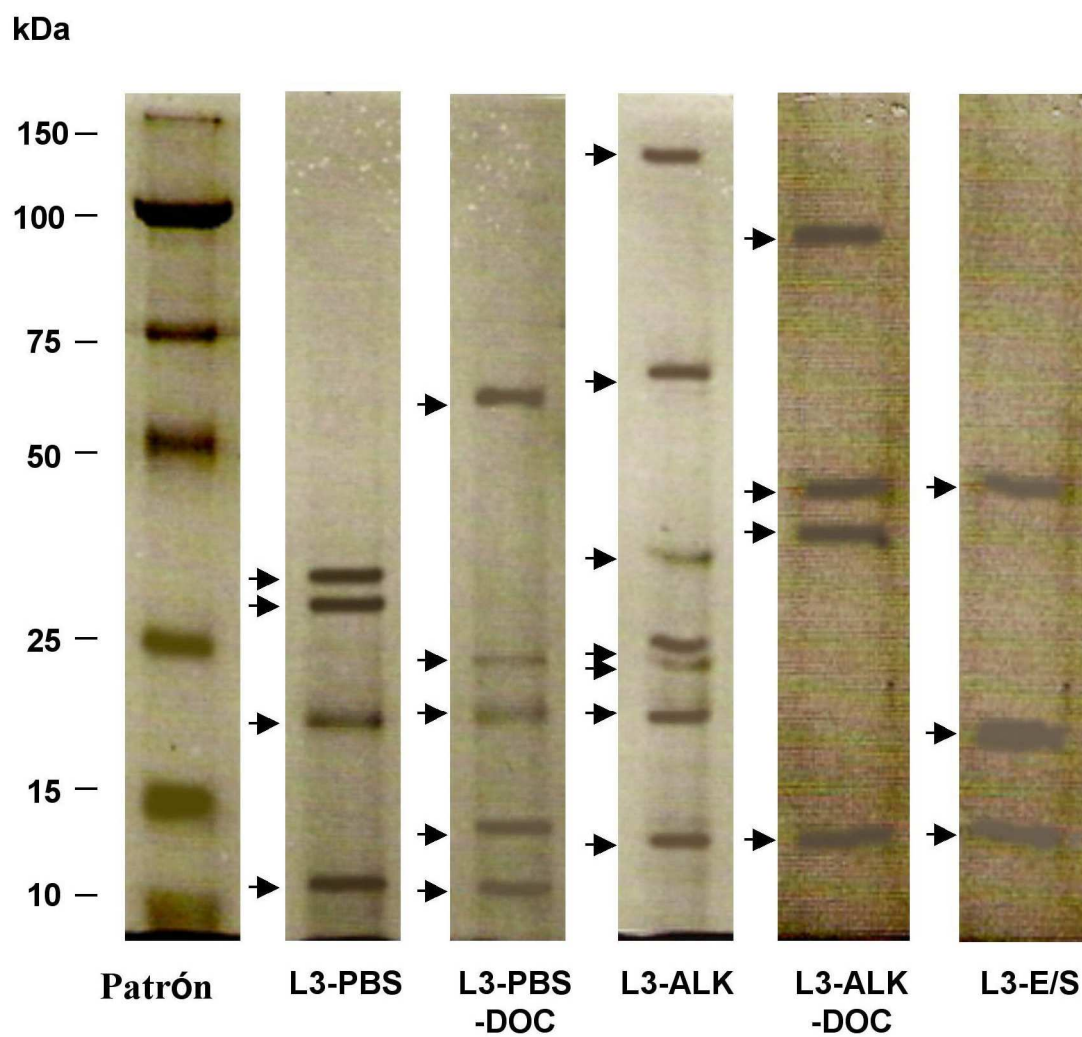
Los datos se expresaron como medias y error estándar de la media. Para el análisis inferencial se estudió inicialmente la normalidad y homoscedasticidad de las muestras. En aquellos casos en los que las muestras tenían distribución normal y sus varianzas fueron similares, se emplearon en el análisis pruebas paramétricas t de Student para comparar dos grupos o análisis de varianza (ANOVA) para comparar varios grupos. Cuando se obtienen diferencias entre grupos mediante ANOVA se aplicó la prueba post-ANOVA Fisher PLSD. Para los casos en los que la distribución no era normal se realizaron pruebas no paramétricas (Wilcoxon y Friedman). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$ . Los datos fueron procesados con el paquete estadístico SPSS 11.5 para Windows.

## **4. Resultados**

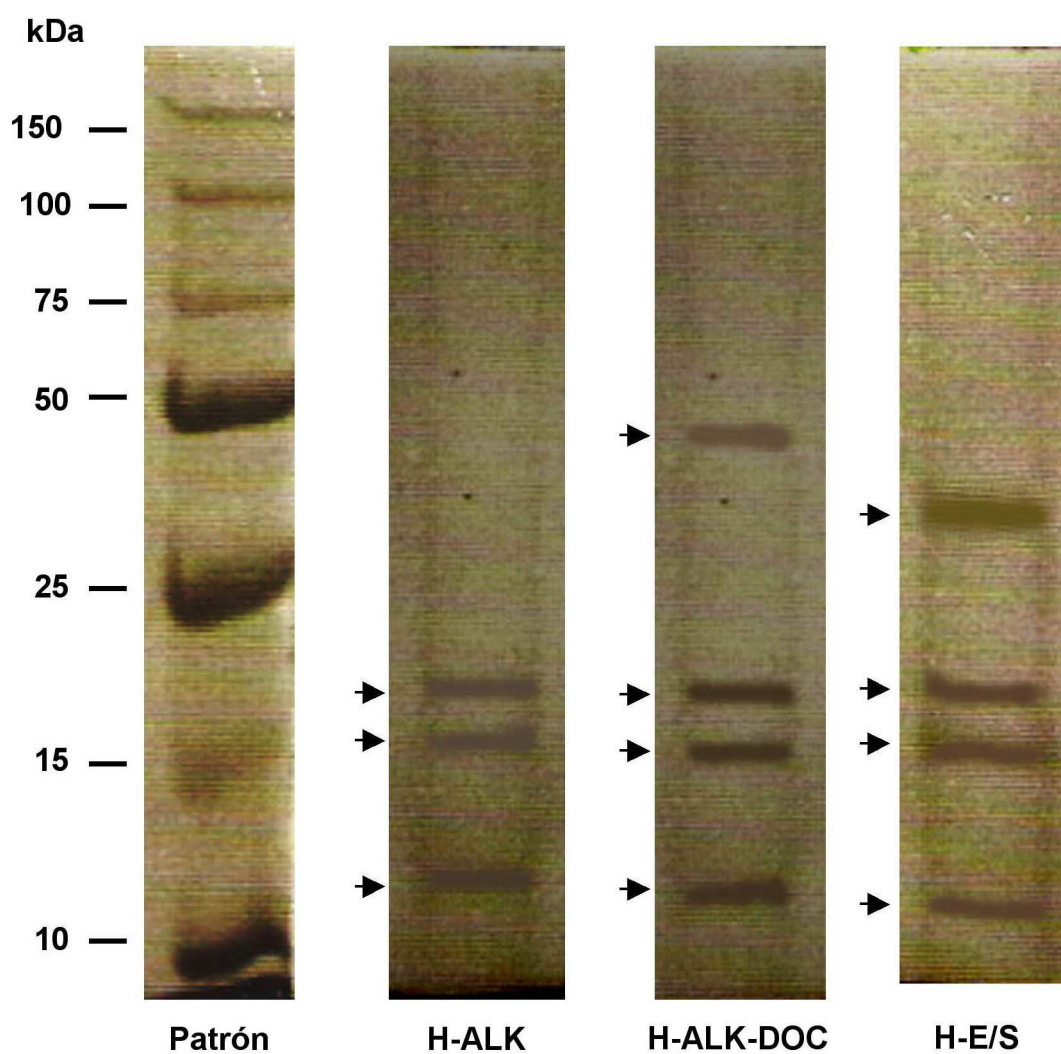
#### 4.1 Antígenos de larva 3 y hembra partenogenética de *S. venezuelensis*.

Se obtuvieron cuatro antígenos somáticos y un antígeno formado por productos de excreción-secreción (L3-ES) a partir de larvas L3 de *S. venezuelensis*, a los que se les realizó una electroforesis (Figura 4.1). El antígeno soluble en PBS (L3-PBS) presentó cuatro bandas de proteínas de 10, 20, 28 y 30 kDa. El antígeno soluble en PBS con ácido desoxicólico (L3-PBS-DOC) mostró dos bandas de 10 y 20 kDa como en el antígeno L3-PBS y otras tres más de 14, 23 y 60 kDa. En el antígeno obtenido en medio alcalino (L3-ALK) se apreciaron 7 bandas: una banda de 20 kDa como en los dos antígenos anteriores, dos bandas de 14 y 23 kDa que coinciden con el antígeno L3-PBS-DOC y cuatro bandas de 24, 36, 70 y 130 kDa. El antígeno soluble en medio alcalino con ácido desoxicólico (L3-ALK-DOC) mostró cuatro bandas. Una banda de 14 kDa, igual que el antígeno L3-PBS-DOC y L3-ALK. Las otras bandas se situaron a 43, 45 y 95 kDa. Por último el antígeno L3-ES mostró tres bandas: una de 14 kDa, como en los antígenos L3-PBS-DOC, L3-ALK y L3-ALK-DOC, otra de 20 kDa como en los antígenos L3-PBS, L3-PBS-DOC y L3-ALK, y otra de 45 kDa que también vimos en el antígeno L3-ALK-DOC.

A partir de hembras de *S. venezuelensis* se obtuvieron dos antígenos somáticos y uno de productos de excreción-secreción (H-ES). Todos fueron sometidos a electroforesis (Figura 4.2). Se visualizaron bandas de 11, 15, y 17 kDa en el antígeno soluble en medio alcalino (H-ALK). En el antígeno soluble en medio alcalino con ácido desoxicólico (H-ALK-DOC) se hallaron bandas similares al H-ALK de 11, 15, y 17 kDa y otra de 45 kDa. El antígeno H-ES mostró también las bandas de H-ALK y otra más de 30 kDa.



**Figura 4.1.** Electroforesis de antígenos a partir de larvas 3 de *Strongyloides venezuelensis* en gel de poliacrilamida 12,5% teñido con azul de Coomassie. L3-PBS, antígeno soluble en PBS; L3-PBS-DOC, antígeno soluble en PBS con ácido desoxicólico; L3-ALK, antígeno soluble en medio alcalino; L3-ALK-DOC antígeno soluble en medio alcalino con ácido desoxicólico; L3-E/S productos de excreción secreción.

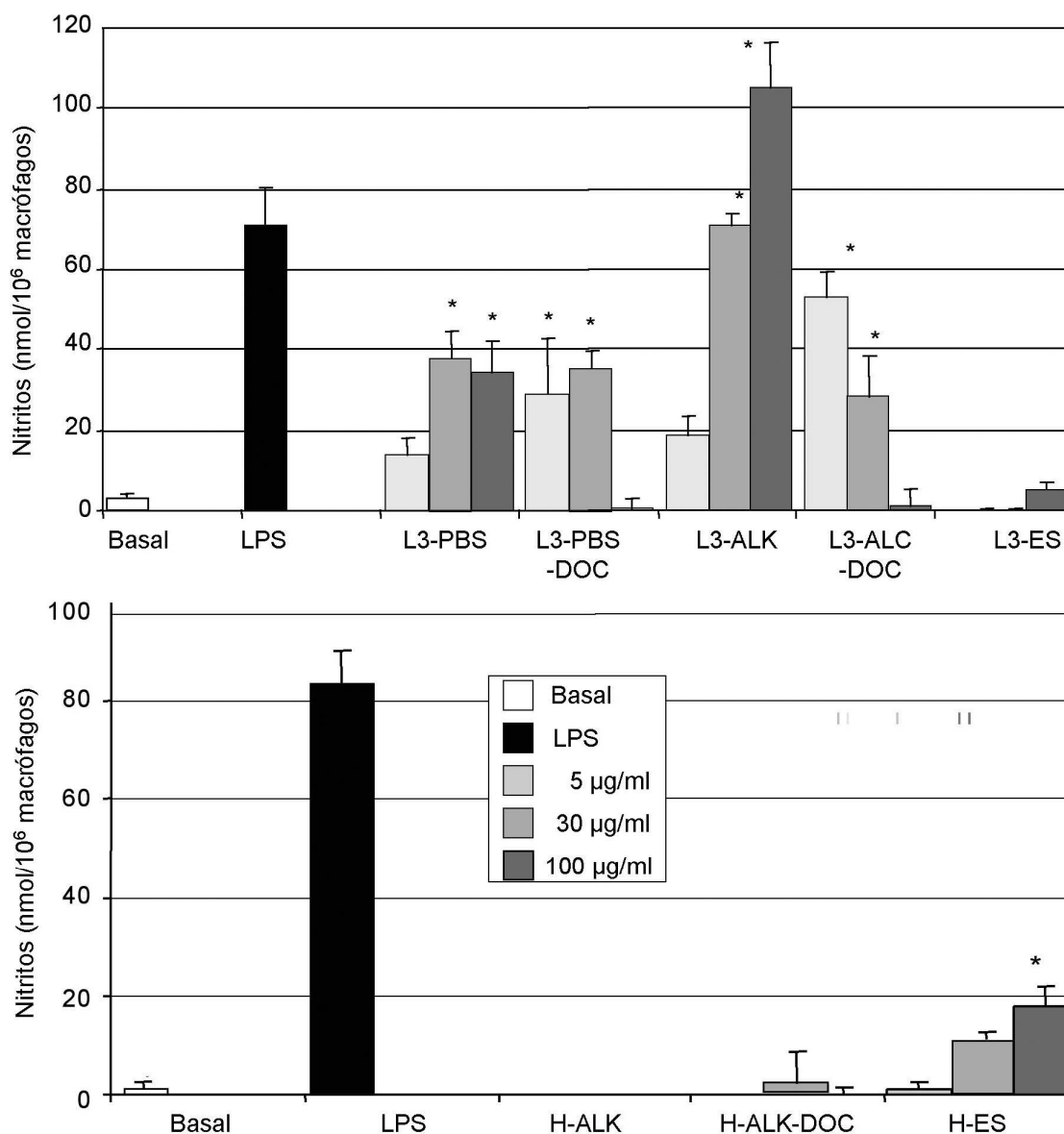


**Figura 4.2.** Electroforesis de antígenos a partir de hembras partenogenéticas de *Strongyloides venezuelensis* en gel de poliacrilamida 12,5% teñido con azul de Coomassie. H-ALK, antígeno soluble en medio alcalino; H-ALK-DOC antígeno soluble en medio alcalino con ácido desoxicólico; H-E/S productos de excreción secreción.

## 4.2 Producción de óxido nítrico por macrófagos alveolares estimulados por antígenos de *S. venezuelensis*.

Los cultivos de macrófagos expuestos a dosis crecientes de antígeno larvarios como L3-PBS mostraron aumento significativo de nitritos desde 10 a 80  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0,05$ ) en relación con los macrófagos no tratados. Más del 85% de los macrófagos fueron viables. Se observó disminución de la producción de ON con dosis de 100  $\mu\text{g/ml}$  con disminución de los macrófagos viables. Los macrófagos tratados con el antígeno L3-PBS-DOC aumentaron la producción de ON al aumentar la concentración de antígeno desde 2,5 a 30  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0,05$ ). Cuando se trató con más de 50  $\mu\text{g/ml}$  la producción baja al igual que la viabilidad de los macrófagos. El antígeno L3-ALK mostró estimulación de la producción de ON. Estos estudios serán descritos más específicamente en el punto 4.2.1. El antígeno L3-ALK-DOC al ser agregado a cultivos de macrófagos mostró aumento progresivo de producción de ON entre 1 y 20  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0,05$ ) en relación con el grupo no tratado con viabilidad celular superior al 85%. A partir de 30  $\mu\text{g/ml}$  se redujo la producción de óxido nítrico al igual que los macrófagos viables (Figura 4.3<sup>a</sup>).

Los nitritos obtenidos a partir de cultivos macrofágicos expuestos a antígenos de hembras partenogénicas de *S. venezuelensis* mostraron que el antígeno H-E/S estimuló la producción de ON y también será estudiado con más detalle en el punto 4.3.2. Al exponer macrófagos alveolares a los antígenos L3-E/S, H-ALK y H-ALK-DOC en las mismas condiciones que los otros antígenos estudiados no se observó producción de ON (Figura 4.3B). Para estudiar la contaminación con lipopolisacárico (LPS) en los antígenos en los que hay producción de óxido nítrico, los macrófagos se cultivaron con polimixina y el correspondiente antígeno y observamos que no se hallaban reducciones significativas respecto a los pocillos tratados solamente con los antígenos.



**Figura 4.3.** Producción de óxido nítrico por macrófagos alveolares de rata estimulados con **A:** antígenos de larvas L3 y **B:** hembras partenogenéticas de *Strongyloides venezuelensis*. L3-PBS, antígeno soluble en PBS de L3; L3-PBS-DOC, antígeno soluble en PBS con ácido desoxicólico de L3; L3-ALK, antígeno soluble en medio alcalino de L3; L3-ALK-DOC antígeno soluble en medio alcalino con ácido desoxicólico; L3-E/S productos de excreción secreción larvarios. H-ALK, antígeno soluble en medio alcalino de adultos; H-ALK-DOC antígeno soluble en medio alcalino con ácido desoxicólico de adultos; H-E/S antígeno obtenido de los productos de excreción secreción de adultos.



#### **4.2.1 Producción de óxido nítrico por macrófagos alveolares estimulados con antígeno soluble en medio alcalino de larva 3 de *S. venezuelensis* (L3-ALK).**

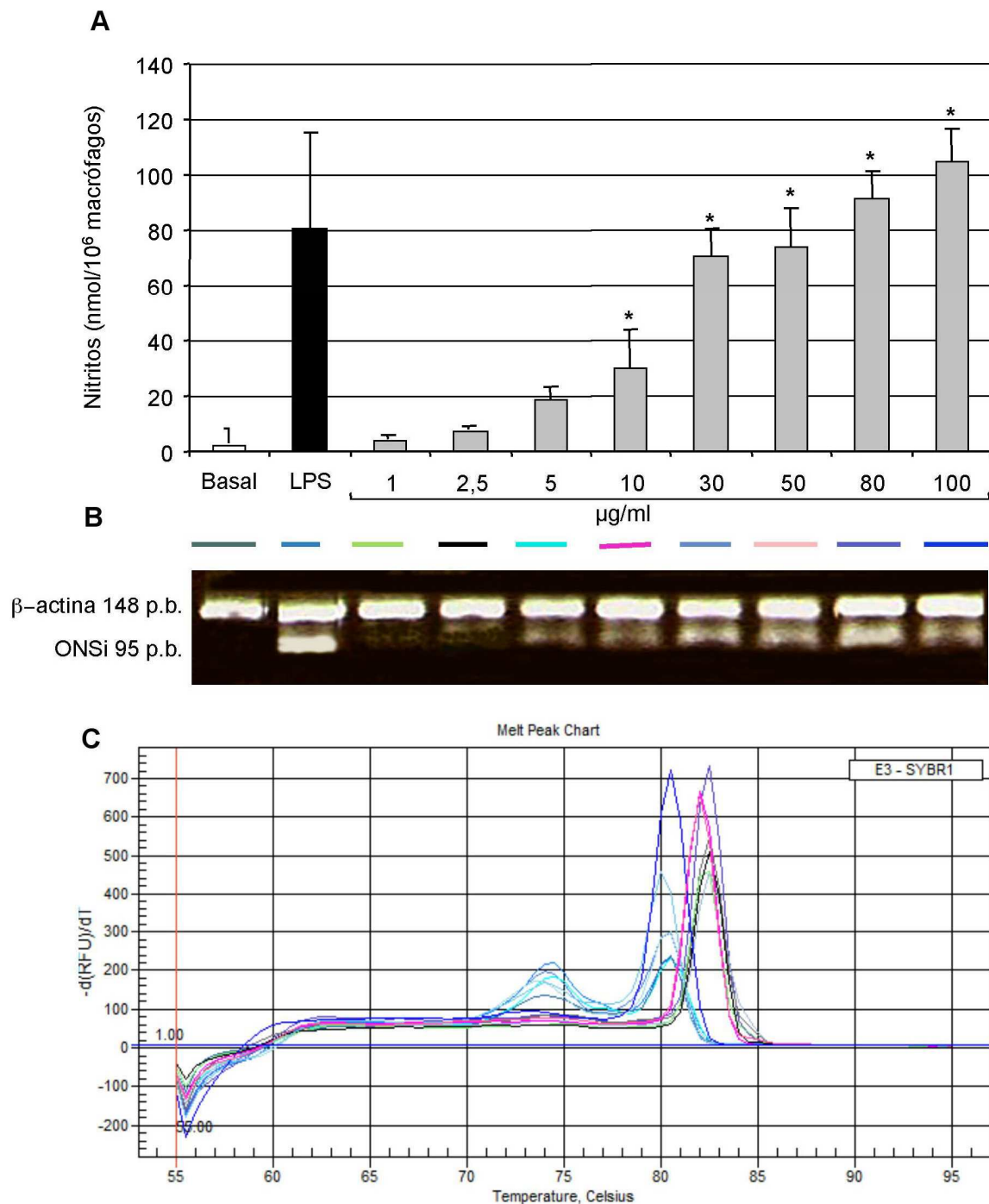
Los macrófagos estimulados por el antígeno L3-ALK produjeron más nitritos a medida que la concentración de nitritos aumenta, desde 5 a 100  $\mu\text{g/ml}$ , siendo estadísticamente significativo a partir de 10  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0,05$ ). La viabilidad macrofágica fue mayor del 85% en todos los casos (Figura 4.4A).

La expresión de ARNm de ONSi en los macrófagos alveolares de rata mediante RT-PCR y PCR cuantitativa (Figuras 4.4B y 4.4C). En RT-PCR se amplificó una banda de 95 p.b., cuya intensidad era mayor a medida que aumentaba la concentración de antígeno (Figura. 4.4B). También se observó en RT-PCR a tiempo real aumento del número de copias, proporcional al incremento de la concentración antigénica (Figura. 4.4C).

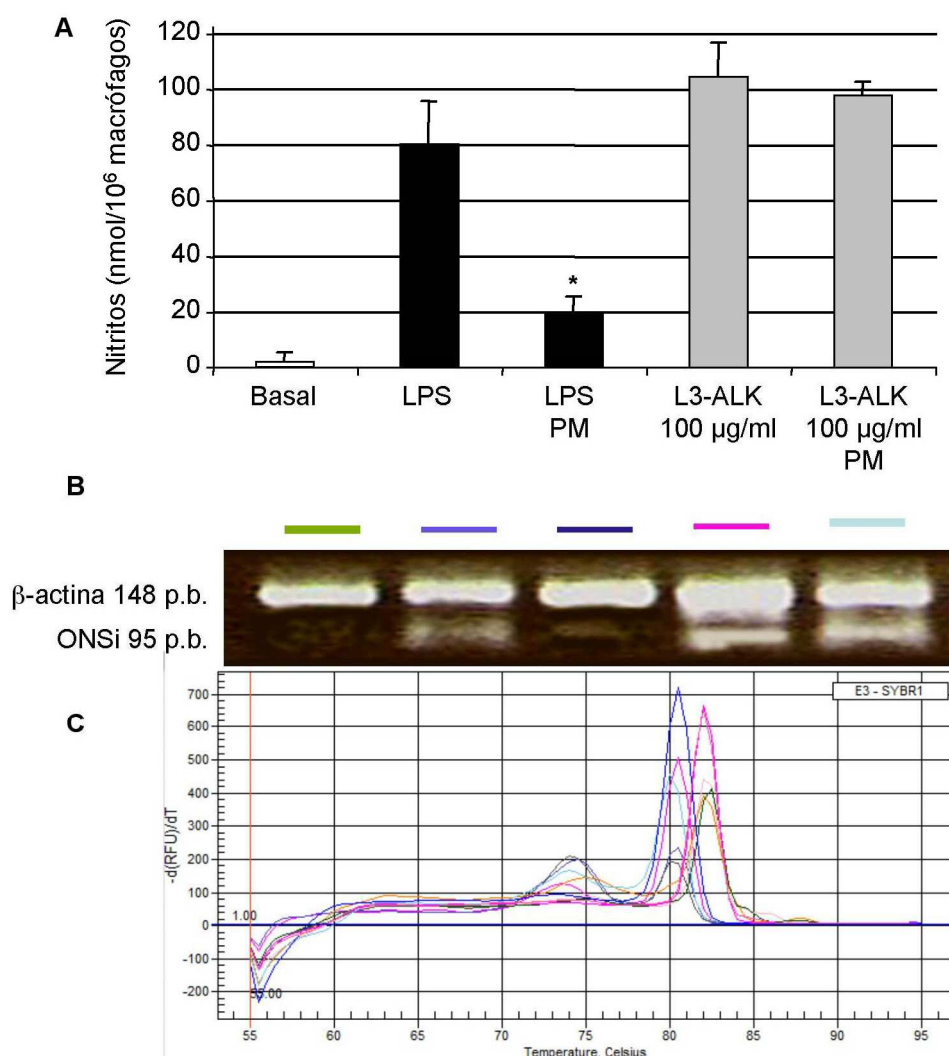
Para excluir la presencia de LPS como estimulante inespecífico, se cultivaron los macrófagos con L3-ALK más polimixina (80 $\mu\text{g/ml}$ ), observándose que la producción de nitritos era similar en los tratados sólo con antígeno y en los tratados con antígeno más polimixina (Figura 4.5.A). Al determinar la expresión de ONSi por RT-PCR convencional (Figura 4.5B) y RT-PCR a tiempo real (Figura 4.5C), se observó que mientras que se inhibía la expresión de ONSi cuando la polimixina se añade junto al LPS, no ocurría este efecto cuando la polimixina se añade junto al antígeno L3-ALK. Por tanto no se encontró contaminación con LPS. Finalmente se investigó la especificidad de la estimulación, agregando inhibidores selectivos de la producción de ON como L-NAME y L-canavanina al antígeno L3-ALK. Se detectaron diferencias significativas entre la producción de nitritos en presencia y ausencia de inhibidores ( $p < 0,05$ ) (Figura 4.6A). La viabilidad celular fue mayor de 85% en todos los casos. Estos datos fueron confirmados

---

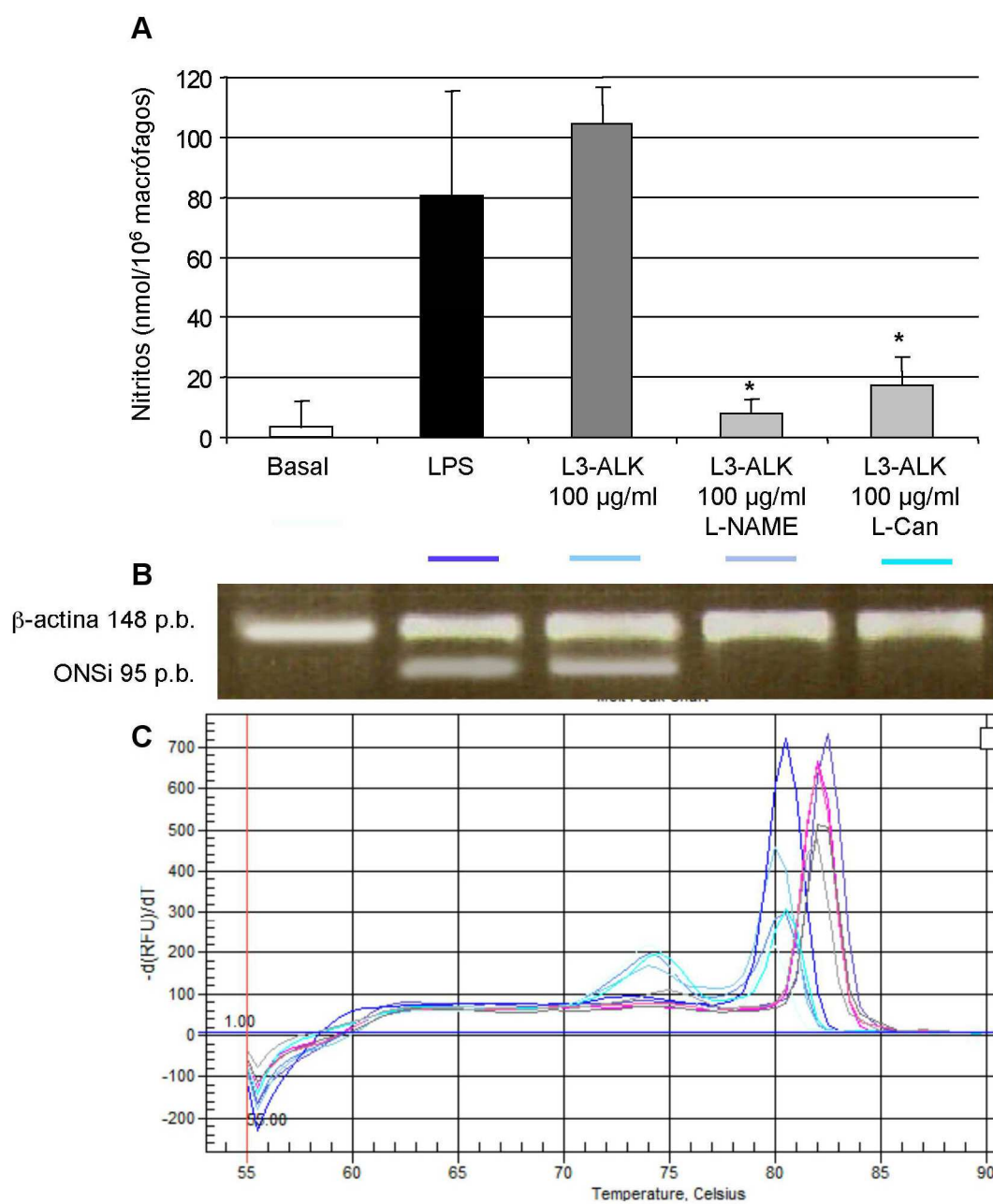
mediante RT-PCR (Figura 4.6B) y RT-PCR de tiempo real (Figura 4.6C) por la ausencia de expresión de ONSi en presencia de los inhibidores de ON. Estos resultados mostraron que la estimulación por L3-ALK de la producción de ON inflamatorio es específica.



**Figura 4.4.** Producción de óxido nítrico mediante medida de nitritos por Técnica de Griess (A), expresión de ONSi por RT-PCR convencional (B) y expresión de ONSi por PCR a tiempo real (C) en cultivos de macrófagos alveolares de ratas expuestos a dosis crecientes de antígeno L3-ALK.



**Figura 4.5.** Producción de óxido nítrico mediante medida de nitritos por Técnica de Griess (A), expresión de ONSi por RT-PCR convencional (B) y expresión de ONSi por PCR a tiempo real (C) en cultivos de macrófagos alveolares de ratas estimulados por el antígeno L3-ALK con o sin polimixina.



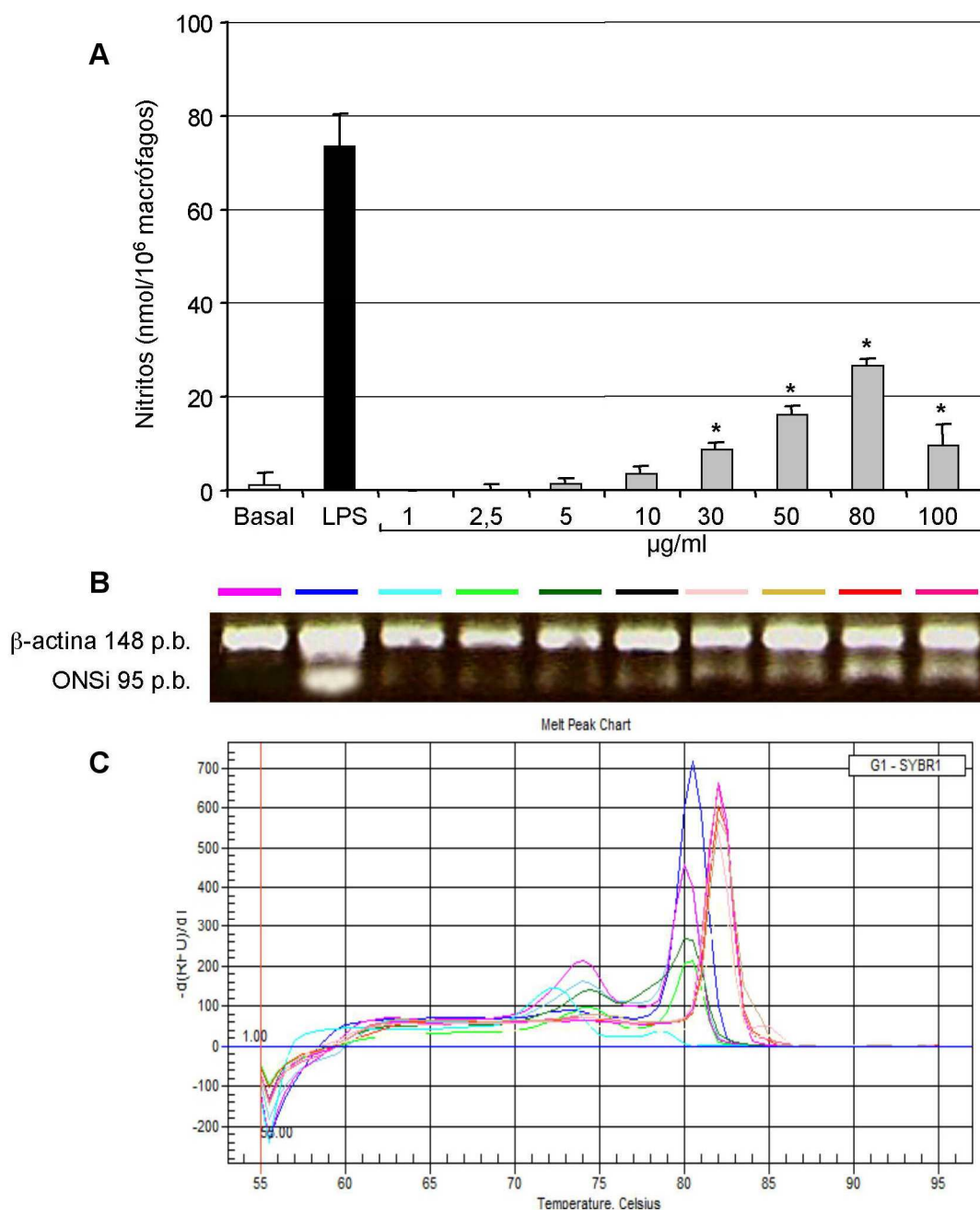
**Figura 4.6.** Producción de óxido nítrico mediante medida de nitritos por Técnica de Griess (A), expresión de ONSi por RT-PCR convencional (B) y expresión de ONSi por PCR a tiempo real (C) en cultivos de macrófagos alveolares de ratas estimulados con antígeno L3-ALK, tratados y no tratados con L-NAME y L canavanina .

#### **4.2.2 Producción de óxido nítrico por macrófagos alveolares estimulados con antígeno excretor/secretor de hembras de *S. venezuelensis* (H-ES).**

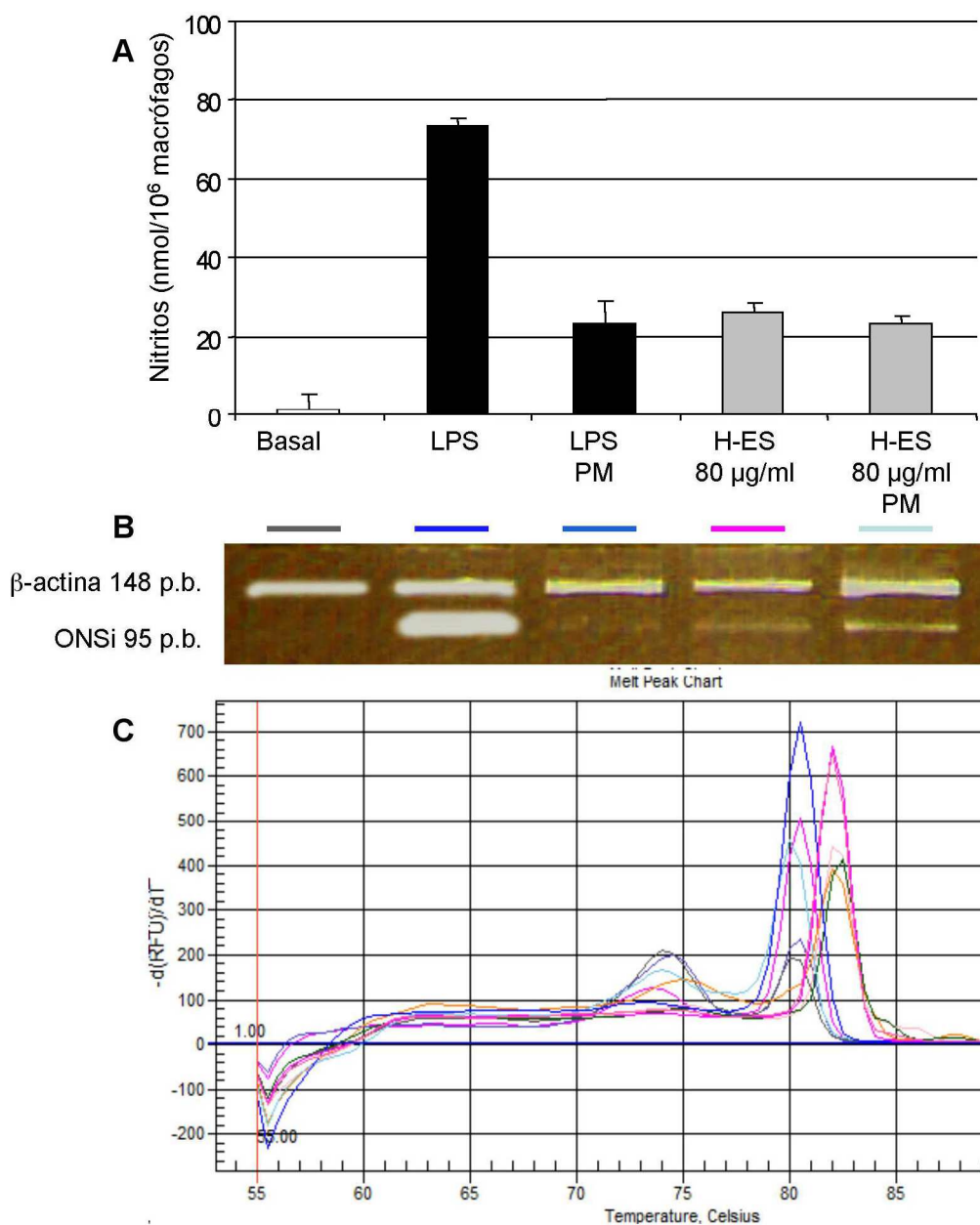
Los macrófagos tratados con el antígeno H-ES produjeron nitritos a medida que la dosis aumentaba de 2,5 a 80  $\mu\text{g/ml}$ , evaluados mediante la técnica de Griess. Con 30 y 100  $\mu\text{g/ml}$  las diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). En todos los casos el 85% de los macrófagos eran viables. Con la dosis mayor (100  $\mu\text{g/ml}$ ), se observó disminución de la producción de nitritos, con disminución de la viabilidad macrofágica (62,84%) (Figura 4.7A). La expresión de ARNm de ONSi mediante RT-PCR mostró que la banda específica de 95 p.b. se intensificaba al aumentar la concentración (Figura 4.7B) y en la PCR a tiempo real, aumentaba el número de copias, proporcionalmente al incremento de la concentración de antígeno (Figura 4.7C).

Para excluir la estimulación inespecífica de la producción de ON por LPS, se cultivaron los macrófagos con H-ES a 80  $\mu\text{g/ml}$  y polimixina a 80  $\mu\text{g/ml}$  y se observó, que la producción de nitritos era similar en los cultivos de H-ES con o sin polimixina. (Figura 4.8A). Al determinar la expresión de la ONSi por RT-PCR convencional (Figura 4.8B) y PCR a tiempo real (Figura 4.8C) se observó que mientras que en los cultivos con LPS se reducía la expresión de la ONSi, en los cultivos con H-ES se mantenía.

Finalmente se investigó la especificidad de la estimulación, agregando los inhibidores selectivos de la producción de ON, L-NAME y L-canavanina. Se observó que la producción era inhibida con ambos productos ( $p < 0,05$ ) y la viabilidad celular era mayor del 85%. Estos datos fueron confirmados mediante RT-PCR convencional (Figura 4.9B) y PCR a tiempo real (Figura 4.9C), encontrándose la ausencia de expresión de la ONSi en cultivos con inhibidores y antígeno H-ES.

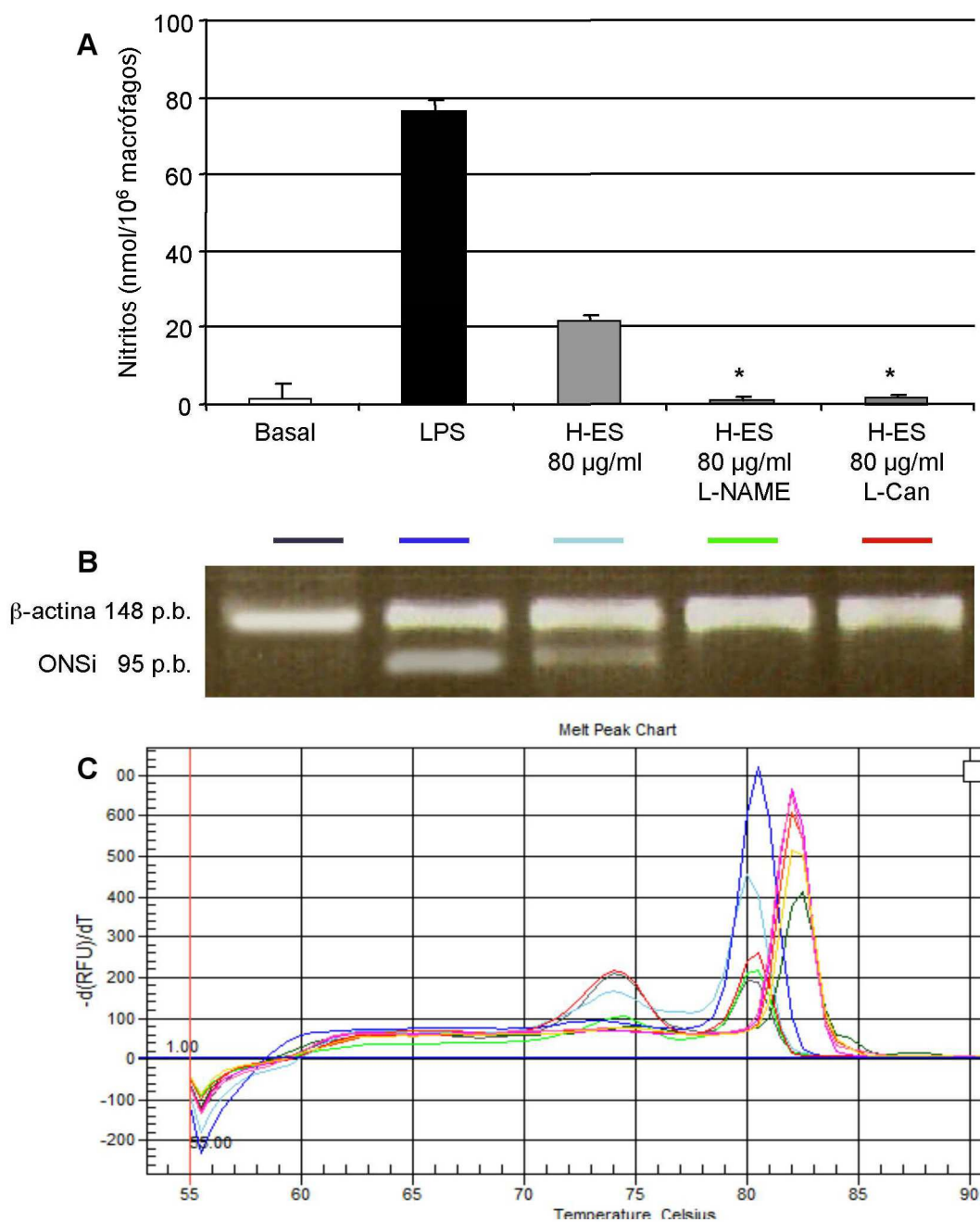


**Figura 4.7.** Producción de óxido nítrico mediante medida de nitritos por Técnica de Griess (A), expresión de ONSi por RT-PCR convencional (B) y expresión de ONSi por PCR a tiempo real (C) en cultivos de macrófagos alveolares de ratas expuestas a dosis crecientes de antígeno H-E/S.



**Figura 4.8.** Producción de óxido nítrico mediante medida de nitritos por Técnica de Griess (A), expresión de ONSi por RT-PCR convencional (B) y expresión de ONSi por PCR a tiempo real (C) en cultivos de macrófagos alveolares de ratas estimulados por el antígeno H-E/S con o sin polimixina.

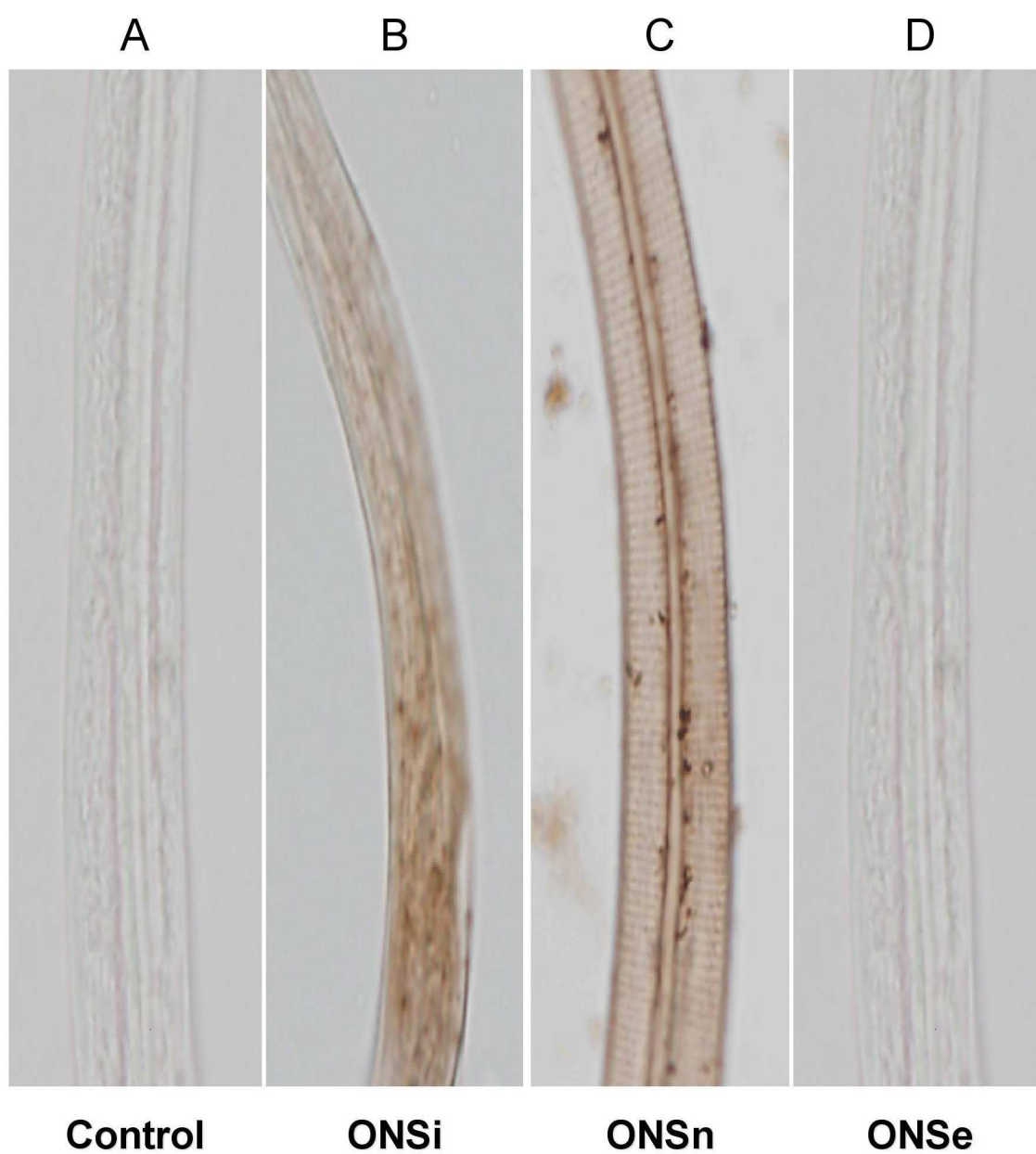




**Figura 4.9.** Producción de óxido nítrico mediante medida de nitritos por Técnica de Griess (A), expresión de ONSi por RT-PCR convencional (B) y expresión de ONSi por PCR a tiempo real (C) en cultivos de macrófagos alveolares de ratas estimulados con antígeno H-ES, tratados y no tratados con L-NAME y L canavanina .

### **4.3 Detección mediante inmunohistoquímica de diferentes isoformas de óxido nítrico sintasas (ONS) en *S. venezuelensis***

En la figura 4.10 se muestra la detección inmunohistoquímica de ONS inducible, ONS neuronal y ONS endotelial sobre L3 de *S. venezuelensis*. Se observa expresión tanto de ONS inducible (Figura 4.10B) como ONS neuronal (Figura 4.10C) en el parénquima y en estructuras del sistema nervioso de L3 de *S. venezuelensis*. Por el contrario, no se encontró detección de ONS endotelial (Figura 4.10D). Asimismo, se aprecia una falta total de expresión en las larvas que no se incubaron con ninguna de las isoformas de la enzima (Figura 4.10A).



**Figura 4.10.** Detección mediante inmunohistoquímica de ONS inducible (B), ONS neuronal (C) y ONS endotelial (D) en Larvas 3 de *Strongyloides venezuelensis*. Se utiliza como control negativo L3 sin incubar con ninguna de las isoformas de ONS (A).

#### **4.4 Efecto *in vitro* de donadores de óxido nítrico sobre larvas 3 de *S. venezuelensis*.**

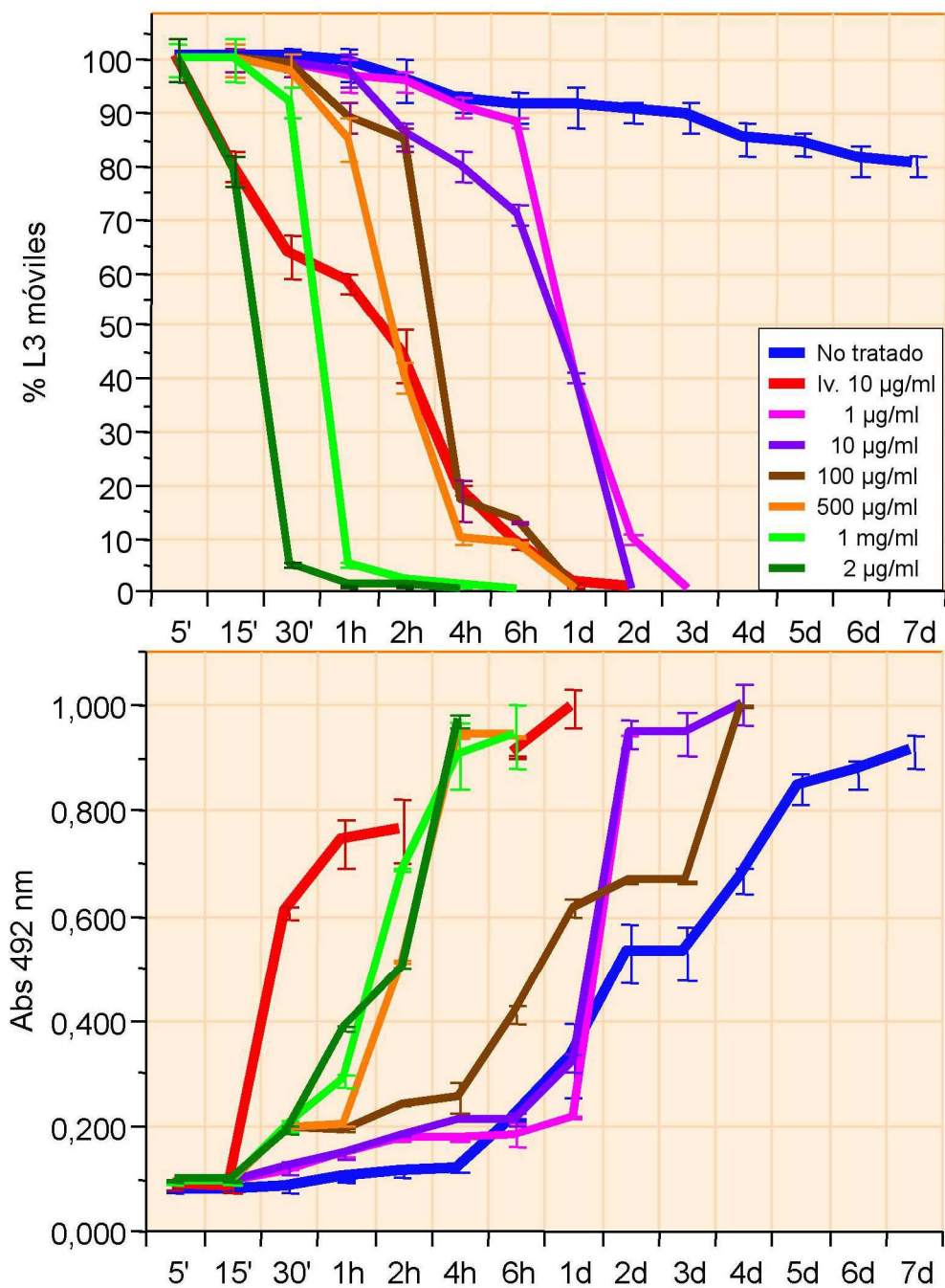
Para evaluar los efectos de la producción de ON sobre L3 de *S. venezuelensis*, utilizamos tres donadores de ON con diferentes tiempos de acción. LA419 es un donador de ON de vida media corta de 4 horas. La vida media de DETA es de 24 horas y la de AEOHAT de 72 horas. Los resultados obtenidos se evalúan, por un lado mediante el estudio de la viabilidad a partir del porcentaje de parásitos móviles, y por otro analizando la liberación de la enzima fosfatasa alcalina.

Se mantuvo en cada experimento un cultivo sin tratamiento como testigo no tratado que en todos los casos conservó el 80% de las L3 móviles a lo largo de todo el experimento y otro cultivo tratado con ivermectina 10 µg/ml como testigo de tratamiento eficaz en el que había disminución significativa en su movilidad ( $p < 0,05$ ) desde los 15 minutos del tratamiento y llegaba al 100% en el día 2 del tratamiento. La cuantificación de la actividad fosfatasa alcalina mostró en el grupo no a expuesto ningún fármaco aumento estadísticamente significativo desde las 6 horas del tratamiento hasta el cuarto día del experimento ( $p < 0,05$ ). La actividad enzimática en el grupo tratado con 10 µg/ml de ivermectina aumentó desde los 30 minutos del tratamiento alcanzando su nivel más alto al primer día post-tratamiento ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4.1 Efecto *in vitro* de LA419 sobre larvas 3 de *S. venezuelensis*.

Las larvas L3 de *S. venezuelensis* no tratadas mantuvieron movilidad mayor del 80% durante todo el experimento. Las larvas tratadas con ivermectina dejaron de tener movilidad significativa a los dos días de exposición ( $p < 0,05$ ). Las L3 tratadas con 1 y 10  $\mu\text{g/ml}$  del LA419 presentaron mortalidad del 50% a las 24 horas y del 100% al tercer día, comenzando a los 30 minutos de exposición ( $p < 0,05$ ). Con dosis de 100 y 500  $\mu\text{g/ml}$ , la mortalidad fue del 50% a las 2 y 4 horas respectivamente, siendo del 100% en el día 1 y 2 del experimento ( $p < 0,05$ ). Cuando se emplearon dosis de 1 y 2  $\text{mg/ml}$ , la mortalidad fue de 50% antes de una hora de la exposición, siendo del 100% a las 4 y 6 horas respectivamente ( $p < 0,05$ ). Este efecto fue dosis dependiente, observándose mayor mortalidad y en menos tiempo de exposición con las mayores dosis utilizadas (2 $\text{mg/ml}$ ). Los resultados se muestran en la (Figura 4.11A).

La actividad fosfatasa alcalina fue máxima el día 4 del experimento en los cultivos sin tratamiento mientras que las L3 tratadas con ivermectina alcanzaban su máximo a las 24 horas del tratamiento. La actividad fosfatasa alcalina de los grupos tratados con el donador LA419 a dosis de 1, 10 y 100  $\mu\text{g/ml}$  aumentó significativamente después de 1 hora de tratamiento ( $p < 0,05$ ), alcanzando su nivel más alto al tercer día del tratamiento. Con dosis superiores (0,5, 1 y 2  $\text{mg/ml}$ ) se comprobó aumentos significativos mas tempranos, a los 30 minutos postratamiento ( $p < 0,05$ ), haciéndose máximos a las 4 horas de exposición. Estos resultados se muestran en la (Figura. 4.11.B).

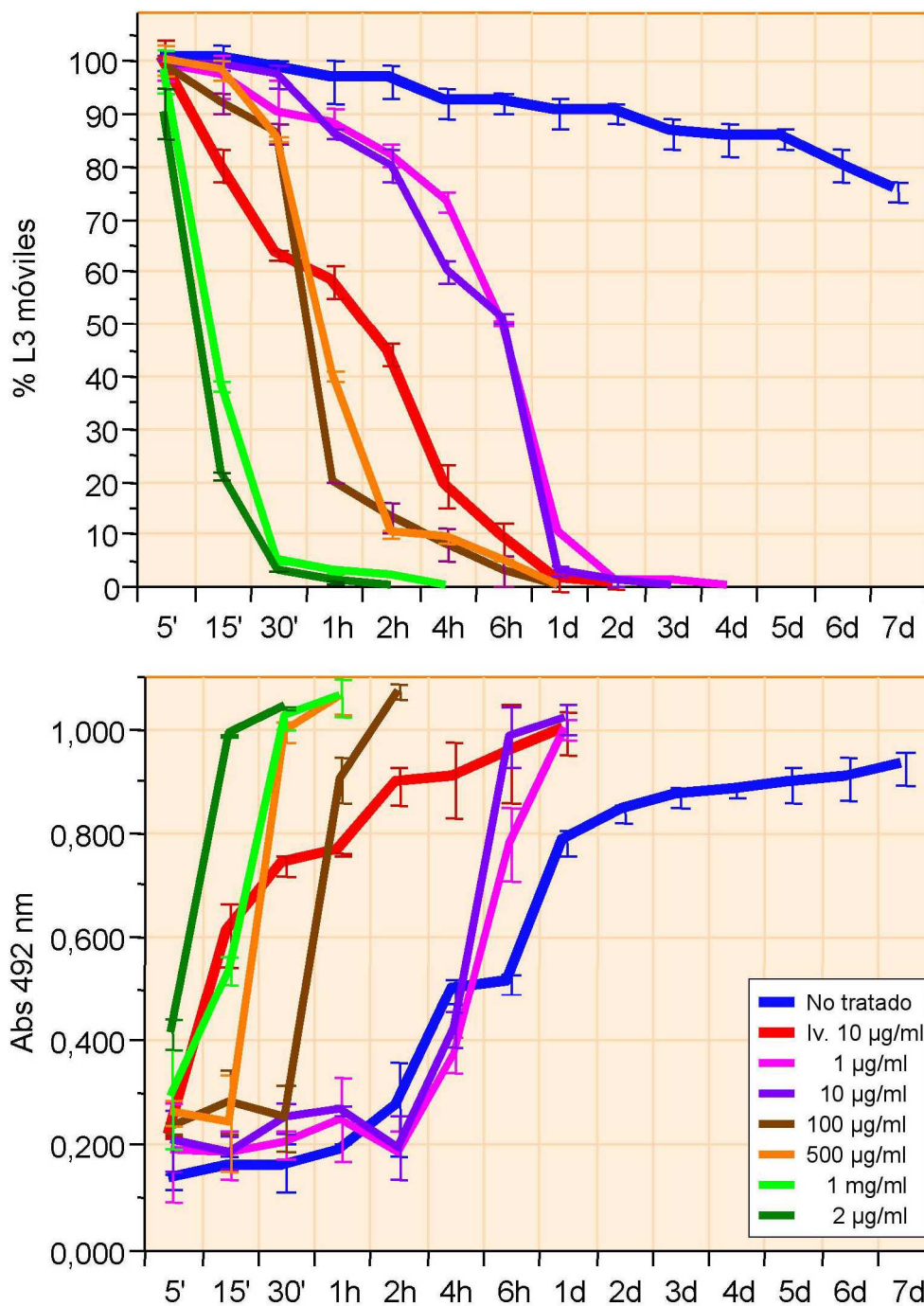


**Figura 4.11. A:** Porcentaje de L3 de *S. venezuelensis* móviles y **B:** actividad fosfatasa alcalina (absorbancia a 492 nm) de L3 de *S. venezuelensis* tratadas con concentraciones de 1µg/ml-2mg/ml del donador de óxido nítrico LA419.

#### 4.4.2 Efecto *in vitro* de DETA sobre larvas 3 de *S. venezuelensis*.

Las larvas L3 de *S. venezuelensis* no tratadas mantuvieron movilidad mayor del 80% durante todo el experimento. Las larvas tratadas con ivermectina dejaron de tener movilidad significativa a los dos días de exposición ( $p < 0,05$ ). Las larvas tratadas con 1 y 10  $\mu\text{g/ml}$  de DETA presentaron una mortalidad del 50% a las 6 horas y del 100% al tercer y cuarto día, presentando diferencias significativas a los 30 minutos de exposición al fármaco ( $p < 0,05$ ), en relación con el grupo control negativo. Con dosis de 100 y 500  $\mu\text{g/ml}$ , la mortalidad fue del 50% a la hora y del 100% en el día 1 del experimento ( $p < 0,05$ ). El efecto citostático fue dosis dependiente, observándose mayor mortalidad y en menos tiempo de exposición con las mayores dosis utilizadas (1 y 2  $\text{mg/ml}$ ), en los que la mortalidad fue significativa a partir de los 5 minutos de exposición ( $p < 0,05$ ). Los resultados se observan en la (Figura 4.12A).

La actividad fosfatasa alcalina fue máxima el día 4 del experimento en los cultivos sin tratamiento, mientras que las L3 tratadas con ivermectina alcanzaban su máximo a las 24 horas del tratamiento. La actividad fosfatasa alcalina de los grupos tratados con el donador DETA a dosis de 1 y 10  $\mu\text{g/ml}$  aumentó significativamente después de 4 horas de tratamiento ( $p < 0,05$ ), en relación con el control negativo, alcanzando su nivel más alto a las 24 horas de iniciado el experimento. El grupo expuesto a 100  $\mu\text{g/ml}$ , presentó aumento de la actividad enzimática a partir de la primera hora de exposición ( $p < 0,05$ ), haciéndose máxima a las 2 horas. Con dosis superiores (0,5, 1 y 2  $\text{mg/ml}$ ) se comprobó aumentos significativos desde los 5 minutos postratamiento ( $p < 0,05$ ), haciéndose máximos a los 30 minutos y una hora de exposición (Figura 4.12B).



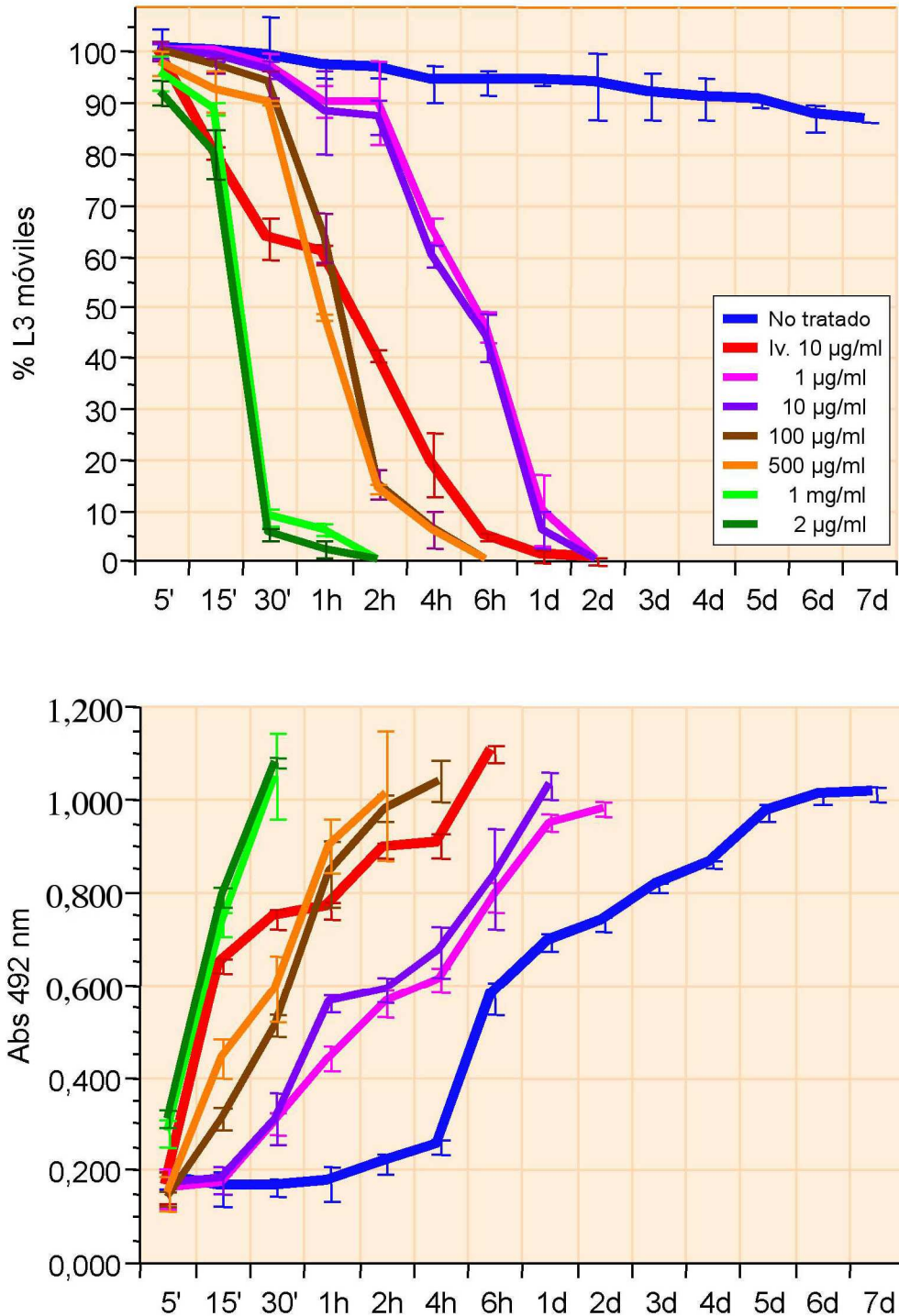
**Figura 4.12. A:** Porcentaje de L3 de *S. venezuelensis* móviles y **B:** actividad fosfatasa alcalina (absorbancia a 492 nm) de L3 de *S. venezuelensis* tratadas con concentraciones de 1µg/ml-2mg/ml) del donador de óxido nítrico DETA.



#### 4.4.3 Efecto *in vitro* de AEHOT sobre larvas 3 de *S. venezuelensis*.

Las larvas L3 de *S. venezuelensis* no tratadas mantuvieron movilidad mayor del 80% durante todo el experimento. Las larvas tratadas con ivermectina dejaron de tener movilidad significativa a los dos días de exposición ( $p < 0,05$ ). Las L3 tratadas con 1 y 10  $\mu\text{g/ml}$  de AEHOT presentaron una mortalidad del 50% a las 6 horas y del 100% al segundo día de exposición, iniciando la mortalidad 1 hora después de colocado el fármaco ( $p < 0,05$ ). Con dosis de 100 y 500  $\mu\text{g/ml}$  la mortalidad fue del 50% a la primera hora y del 100% a las 6 horas de exposición. En las larvas tratadas con 1 y 2  $\text{mg/ml}$ , la mortalidad fue de 50% antes de una hora de exposición siendo del 100% a las 2 horas de iniciado el experimento. El efecto citostático fue dosis dependiente observándose mayor mortalidad y en menos tiempo de exposición con las mayores dosis utilizadas (2 $\text{mg/ml}$ ). Los resultados se muestran en la (Figura 4.13A).

La actividad fosfatasa alcalina fue máxima el día 4 del experimento en los cultivos sin tratamiento mientras que las L3 tratadas con ivermectina alcanzaban su máximo a las 24 horas del tratamiento. Las larvas tratadas con 1 y 10  $\mu\text{g/ml}$  de AEHOT aumentaron los valores enzimáticos significativamente después de 30 minutos de tratamiento ( $p < 0,05$ ), alcanzando su nivel más alto los días 1 y 2 del experimento, respectivamente. Con dosis de 100 y 500  $\mu\text{g/ml}$  de AEHOT, se comprobó aumento significativo a partir de los 15 minutos de exposición ( $p < 0,05$ ), en relación al grupo control negativo. En estos grupos los valores fueron máximos a las 2 y 4 horas de exposición, respectivamente. Las larvas expuestas a 1 y 2  $\text{mg}$  de AEHOT aumentaron la actividad fosfatasa alcalina a partir de 5 minutos de exposición ( $p < 0,05$ ), alcanzando el máximo a los 30 minutos del tratamiento. Estos resultados se muestran en la (Figura 4.13B).



**Figura 4.13. A:** Porcentaje de L3 de *S. venezuelensis* móviles y **B:** actividad fosfatasa alcalina (absorbancia a 492 nm) de L3 de *S. venezuelensis* tratadas con concentraciones de 1µg/ml-2mg/ml del donador de óxido nítrico AEHOT.

#### **4.5 Efecto *in vitro* de donadores de óxido nítrico sobre hembras partenogenéticas de *S. venezuelensis*.**

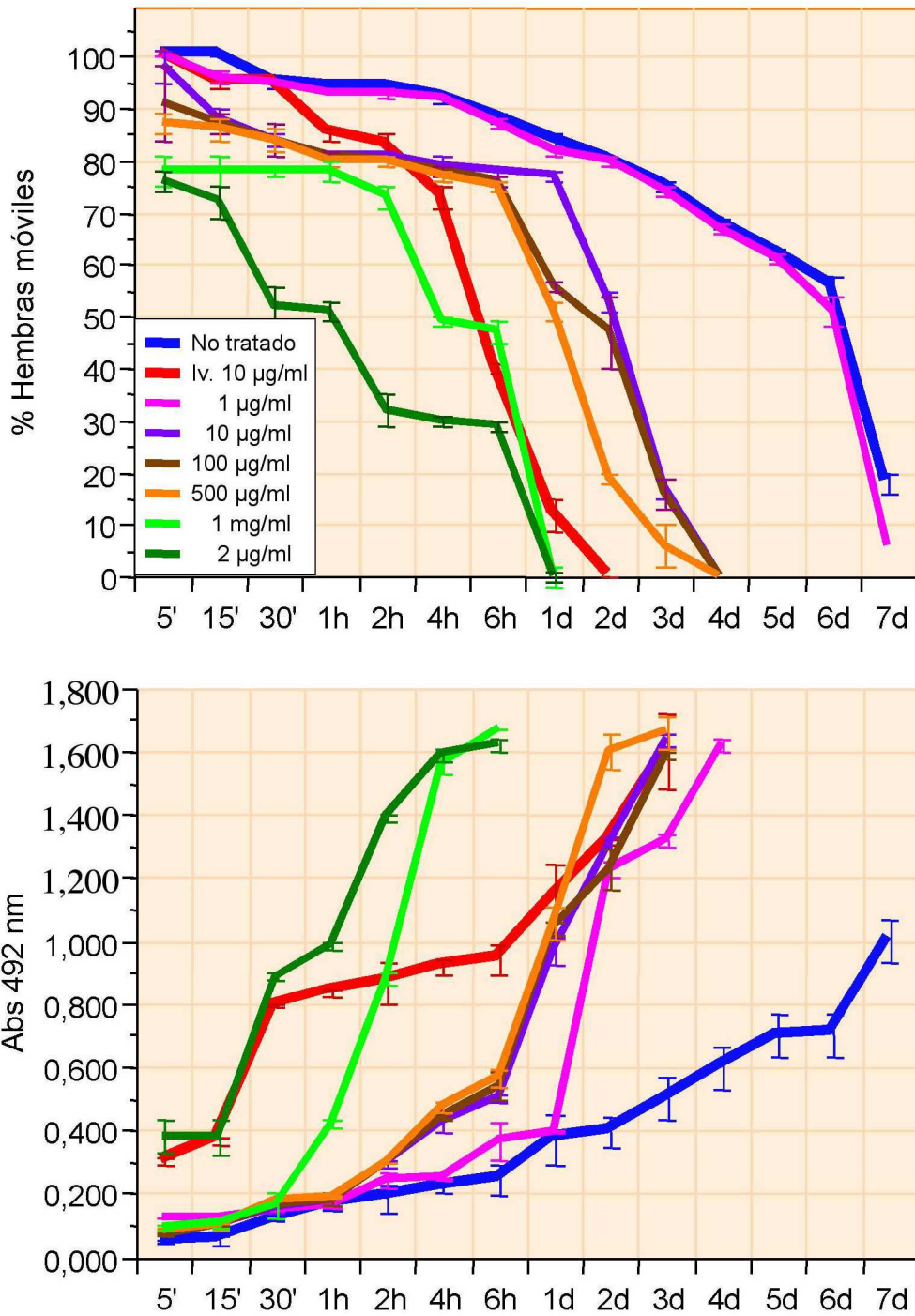
Para evaluar los efectos de la producción de ON sobre hembras partenogenéticas de *S. venezuelensis*, también utilizamos los tres donadores usados con las larvas de tercer estadio: LA419, de vida media 4 horas; DETA, de 24 horas y la AEOHAT de 72 horas. La viabilidad, también se evaluó a partir del porcentaje de parásitos móviles y la actividad fosfatas alcalina liberada al medio de cultivo.

En cada experimento se mantuvo un cultivo sin tratamiento en el que la movilidad se mantuvo por encima del 70% hasta el día 4 después de comenzar el experimento y otro cultivo con hembras tratadas con 10  $\mu\text{g/ml}$  de ivermectina como testigo de tratamiento eficaz en el que comenzaba a reducir la movilidad significativamente desde los 15 minutos hasta que desaparecía el día 2 del experimento ( $p < 0,05$ ). La cuantificación de la actividad fosfatasa alcalina en el sobrenadante del medio de cultivo mostró en las hembras no expuestas al fármaco aumento significativo ( $p < 0,05$ ) a las 6 horas del inicio del tratamiento, aumentando paulatinamente hasta el día 7 de tratamiento en el que presenta sus valores máximos. La actividad enzimática en el grupo tratado con 10  $\mu\text{g/ml}$  de ivermectina aumentó significativamente desde los 5 minutos del inicio del tratamiento ( $p < 0,05$ ) alcanzando su nivel más alto en el día 3 de tratamiento.

#### 4.5.1 Efecto *in vitro* de LA419 sobre hembras de *S. venezuelensis*.

Las hembras mantenidas en Dulbecco glucosado y sin tratamiento mantuvieron movilidad por encima del 70% hasta el día 4 del experimento y las tratadas con 10  $\mu\text{g/ml}$  de ivermectina perdieron su movilidad completamente el día 2 del tratamiento. Los parásitos tratados con 1  $\mu\text{g/ml}$  de LA419 presentaron una mortalidad no significativa y similar al grupo no tratado. Las hembras tratadas con 10, 100 y 500  $\mu\text{g/ml}$  de LA419 disminuyeron la motilidad desde los 5 minutos de exposición ( $p < 0,05$ ) en relación al grupo no tratado. La mortalidad fue del 50% entre los días 1 y 2 y del 100% en el día 4 de exposición al fármaco. Los grupos tratados con 1 y 2  $\text{mg/ml}$  de LA419 presentaron mortalidad significativa a los 5 minutos del tratamiento ( $p < 0,05$ ), siendo de 50% a las 4 y 1 hora y del 100% a las 24 horas del inicio del experimento (Figura 4.14A)

La actividad fosfatasa alcalina en el sobrenadante del medio de cultivo mostró aumento paulatino hasta el día 7 de tratamiento, mientras que en el grupo tratado con 10  $\mu\text{g/ml}$  de ivermectina alcanzó su nivel más alto el día 3 de tratamiento. Las hembras tratadas con 1  $\mu\text{g/ml}$  de LA419 aumentaron su actividad enzimática significativamente después de la primera hora de tratamiento ( $p < 0,05$ ), alcanzando su nivel más alto el día 4 del experimento. Con dosis de 10, 100 y 500  $\mu\text{g/ml}$  de LA419 se comprobó aumentos significativos de la enzima, a partir de la primera hora de exposición ( $p < 0,05$ ), en relación al grupo no tratado. En estos grupos los valores fueron máximos en el día 3 de tratamiento. Las hembras expuestas a 1 y 2  $\text{mg}$  aumentaron la actividad fosfatasa alcalina a los 30 y 5 minutos de exposición ( $p < 0,05$ ) respectivamente, hasta alcanzar el máximo a las 6 horas de tratamiento (Figura 4.14B).



**Figura 4.14. A:** Porcentaje de hembras partenogénicas de *S. venezuelensis* móviles y **B:** actividad fosfatasa alcalina (absorbancia a 492 nm) de hembras de *S. venezuelensis* tratadas con concentraciones de 1µg/ml-2mg/ml del donador de óxido nítrico LA419.

#### 4.5.2 Efecto *in vitro* de DETA sobre hembras de *S. venezuelensis*.

Las hembras mantenidas en Dulbecco glucosado y sin tratamiento mantuvieron movilidad por encima del 70% hasta el día 4 del experimento y la tratadas con 10  $\mu\text{g/ml}$  de ivermectina perdieron su movilidad completamente el día 2 del tratamiento. La mortalidad comenzó a los 15 minutos de iniciado el tratamiento. Los parásitos tratados con 1, 10 y 100  $\mu\text{g/ml}$  de DETA presentaron mortalidad superior al 50% a las 4 horas de tratamiento y del 100% en el día 7 de exposición al fármaco en los grupos tratados con 1 y 10  $\mu\text{g/ml}$  y en el día 6 en las hembras tratadas con 100  $\mu\text{g/ml}$ . Los parásitos tratados con 500  $\mu\text{g/ml}$  de DETA presentaron una mortalidad del 52% a las 4 horas y del 100% en el día 5 de exposición. El grupo tratado con 1 mg/ml de DETA presentó una mortalidad del 86% a los 30 minutos del tratamiento ( $p < 0,05$ ) y del 100% a los 2 días del experimento. Con dosis superiores de 2 mg/ml, se comprobó aumento significativo de la mortalidad mas temprano, 86% a los 5 minutos postratamiento ( $p < 0,05$ ) y 100% en el día 1 de exposición (Figura 4.15A).

La actividad fosfatasa alcalina en el sobrenadante del medio de cultivo mostró, aumento paulatino hasta el día 7 de tratamiento mientras que en el grupo tratado con 10  $\mu\text{g/ml}$  de ivermectina alcanzó su nivel más alto el día 3 del tratamiento. En las hembras tratadas con 1, 10 y 100  $\mu\text{g/ml}$  de este donador, la actividad enzimática aumentó desde las 24 horas hasta el día 4 del tratamiento, en que fue máxima. Cuando se trató con 500  $\mu\text{g/ml}$  y 1 mg/ml de DETA, la actividad aumentó desde los 15 minutos, ( $p < 0,05$ ) a los 30 minutos. Los valores máximos se alcanzaron en el grupo tratado con 500  $\mu\text{g/ml}$  de DETA en el día 1, con 1 mg/ml a las 4 horas y con 2 mg/ml a las 2 horas de exposición ( $p < 0,05$ ) (Figura 4.15.B).

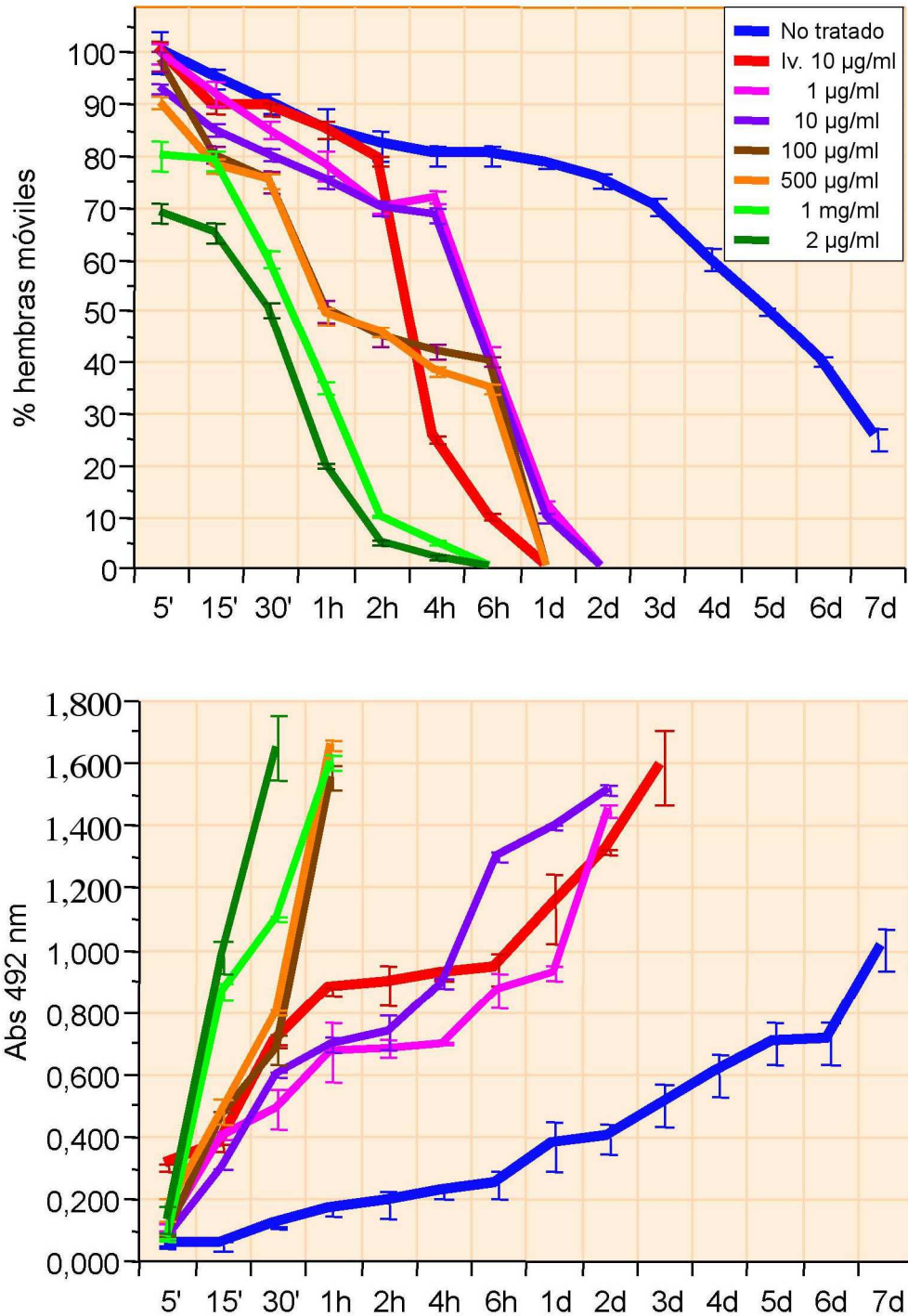


#### 4.5.3 Efecto *in vitro* de AEHOT sobre hembras de *S. venezuelensis*.

Las hembras mantenidas en Dulbecco glucosado y sin tratamiento mantuvieron movilidad por encima del 70% hasta el día 4 del experimento y la tratadas con 10  $\mu\text{g/ml}$  de ivermectina perdieron su movilidad completamente el día 2 del tratamiento. Los parásitos tratados con 1 y 10  $\mu\text{g/ml}$  de AEHOT, presentaron mortalidad del 60% a las 6 horas de tratamiento y del 100% en el día 2 de exposición al fármaco. Los parásitos tratados con 100 y 500  $\mu\text{g/ml}$  de AEHOT presentaron mortalidad del 50% en la primera hora de exposición y del 100% en el día 1 después del tratamiento. En los grupos tratados con 1 y 2  $\text{mg/ml}$  de AEHOT se observó una mortalidad del 40 y 50% respectivamente a los 30 minutos y del 100% a las 6 horas de iniciado el experimento (Figura 4.16A).

La actividad fosfatasa alcalina en el sobrenadante del medio de cultivo mostró, aumento paulatino hasta el día 7 de tratamiento mientras que en el grupo tratado con 10  $\mu\text{g/ml}$  de ivermectina alcanzó su nivel más alto el día 3 del tratamiento. En los parásitos tratados con 1 y 10  $\mu\text{g/ml}$  de AEHOT, la actividad enzimática aumentó desde los 15 minutos de tratamiento hasta el día 2, en que fue máxima. Cuando se utilizaron dosis de 100 y 500  $\mu\text{g/ml}$  de AEHOT, la actividad aumentó desde los 15 minutos ( $p < 0,05$ ), en relación con los valores iniciales, alcanzándose los valores máximos en el primer día de exposición. En las hembras tratadas con 1 y 2  $\text{mg/ml}$  de AEHOT los valores enzimáticos se elevan significativamente a los 15 minutos ( $p < 0,05$ ), alcanzando su máximo a las 4 y 2 horas postratamiento, respectivamente (Figura 4.16B).



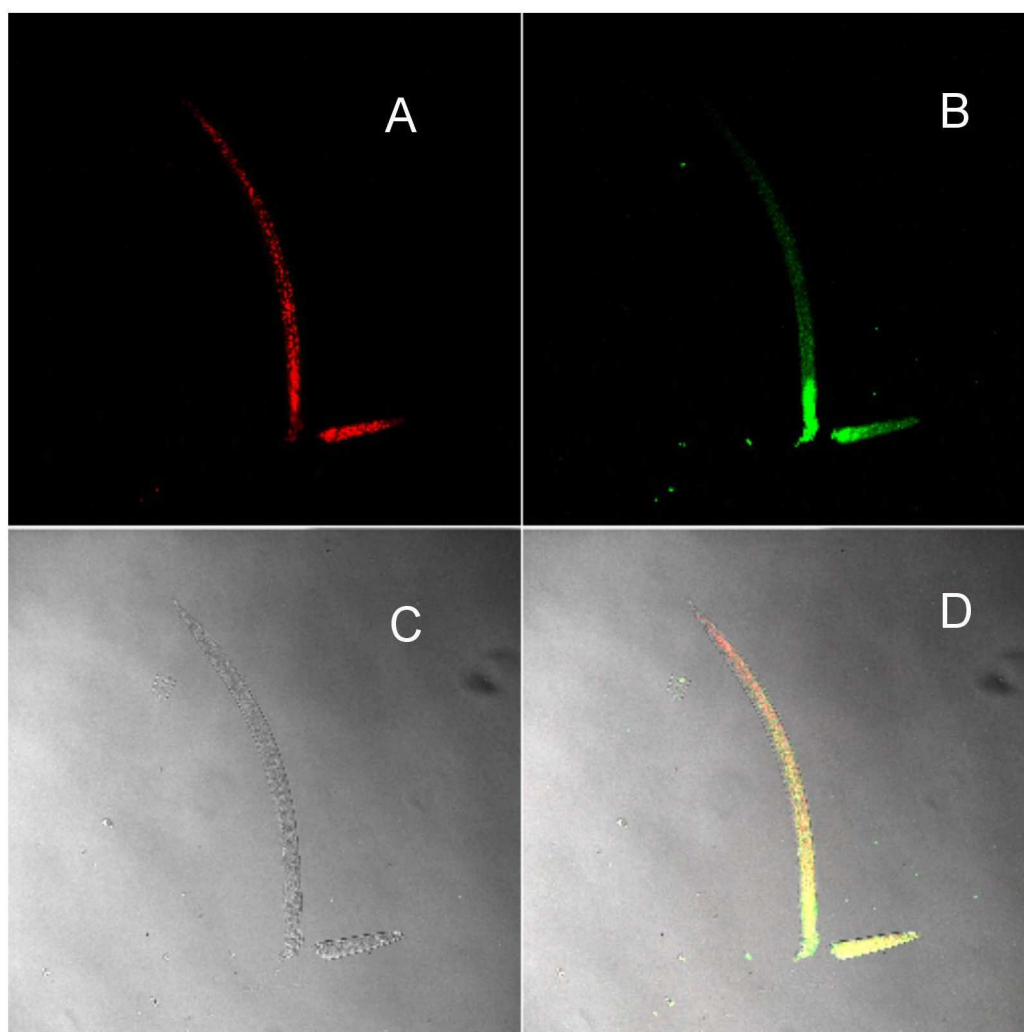


**Figura 4.16. A:** Porcentaje de hembras partenogenéticas de *S. venezuelensis* móviles y **B:** actividad fosfatasa alcalina (absorbancia a 492 nm) de hembras de *S. venezuelensis* tratadas con concentraciones de 1µg/ml-2mg/ml del donador de óxido nítrico AEHOT.

---

#### **4.6 Apoptosis en larvas de *S. venezuelensis* tratadas con el donador DETA.**

Después de conocer las dosis y el tiempo necesario para producir mortalidad en larvas de *S.venezuelensis* expuestas a diferentes donadores de óxido nítrico, se eligió el donador de vida intermedia DETA a dosis de 100 µg/ml para estudiar las posibles causas de la muerte parasitaria por lo que se investigo la presencia o no de apoptosis, para lo que se utilizó la técnica del TUNEL para observar fragmentación del ADN. Se observó en la que las L3 de *S.venezuelensis* incorporaban 12-dUTP-fluoresceína con la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal de fluorescencia verde (Figura 4.17B). Se observa en la Figura 4.17A la fluorescencia roja del yoduro de propidio en el ADN de las células del parásito y en la Figura 4.17C la superposición de ambas fluorescencias que muestra los núcleos de las células apoptóticas del parásito.



**Figura 4.17** Larvas 3 de *S. venezuelensis* tratadas con el donador de óxido nítrico DETA (100  $\mu\text{g/ml}$ ) analizadas por el método TUNEL. Fluorescencia roja del ADN de las células del parásito (A). Fluorescencia verde de los núcleos apoptóticos mediante microscopía confocal (B). Larva vista con microscopía óptica (C). Superposición de la fluorescencia roja y verde sobre la larva (D).

#### 4.7 Modelo de infección con *S. venezuelensis* en ratón BALB/c.

En todos los animales infectados con diferentes dosis de *S. venezuelensis* (100-30.000 larvas L3) se encontraron huevos en heces a partir del 5° día postinfección (p.i.) En los grupos infectados con 100 (G1), 500 (G2) y 1.000 (G3) larvas<sup>3</sup>, aumentó la eliminación de huevos hasta el día 10 p.i., en que los recuentos fueron máximos. Posteriormente la eliminación decreció hasta desaparecer en el día 16 p.i. Los grupos infectados con 3.000 (G4) y 5.000 (G5) larvas<sup>3</sup> aumentaron la eliminación de huevos hasta el 7° día p.i. en que los recuentos fueron máximos [1.900±41 huevos /g. de heces (h.p.g.) en el grupo G4 y 2.118±97 h.p.g. en el grupo G5]. En este punto existen diferencias significativas entre estos grupos y los grupos G1, G2 y G3 con un recuento de huevos que osciló entre 300±21 y 480±83 h.p.g. ( $p < 0,05$ ). Posteriormente la eliminación decreció de manera drástica hasta el 10 día postinfección, desapareciendo en el 21 día p.i. Los grupos infectados con 10.000 (G6) y 30.000 (G7) larvas<sup>3</sup> aumentaron la eliminación de huevos hasta el día 7° p.i. donde se obtuvieron los recuentos máximos, (2420±101 h.p.g. en el grupo G6 y 2430±73 en el grupo G7). En este punto existen diferencias significativas con los grupos G1, G2 y G3 ( $p < 0,05$ ) pero no con los grupos G4 y G5 ( $p = 0,081$ ). Posteriormente la eliminación decreció paulatinamente hasta desaparecer el 23 día p.i. Los resultados de estos ensayos se muestran en la (Figura 4.18). Por tanto la dosis de infección utilizada en los diferentes experimentos *in vivo* será la de 3000 L3 de *S. venezuelensis*. En ratones infectados con esta dosis se encontraron 18±3,2 larvas en los pulmones en el día 2 p.i, mostrándose morfológicamente hemorragia pulmonar macroscópica importante. En el día 7 p.i. se comprobó también la presencia de 26±10 hembras partenogenéticas en intestino.

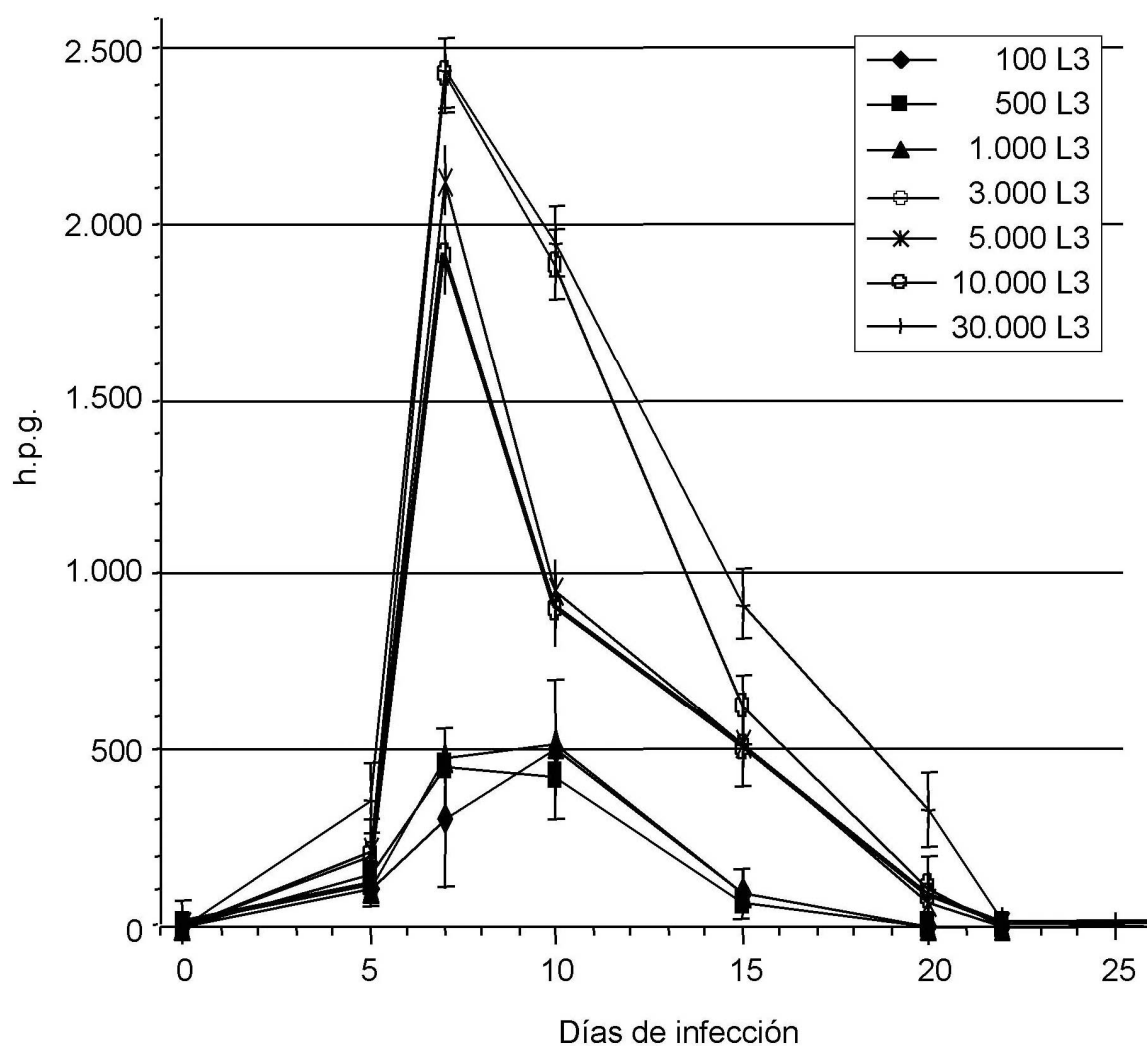
Los cortes histológicos de diferentes localizaciones anatómicas de animales infectados con 3000 L3 se muestran en la (Figura. 4.19). La histología realizada en el sitio de inoculación, mostró 4 horas mas tarde, infiltrados leves en piel y tejido celular subcutáneo formados por neutrófilos, eosinófilos y algún macrófago no muy cerca de la larva (Figura 4.19A). En los pulmones destaca la arquitectura alveolar deformada por el colapso de la luz alveolar y la presencia intra-alveolar de numerosos eritrocitos, con carácter focal. También se encontraron larvas atravesando los vasos sanguíneos para entrar en los alvéolos pulmonares (larvas intraparenquimatosas) (Figura. 4.19B). Se observó un infiltrado intraparenquimatoso, constituido principalmente por eosinófilos, leucocitos polimorfonucleares y macrófagos activados en fagocitosis (Figura. 4.19C). También se pudo comprobar la presencia de larvas libres en la luz bronquiolar, iniciando su ascenso hacia las vías aéreas superiores, en cortes larvarios longitudinales y sagitales (Figura. 4.19D-E). En el intestino se reconocieron hembras partenogénicas en túneles de la mucosa de las criptas intestinales (Figura. 4.19F). Los otros órganos examinados: corazón, hígado y cerebro, no presentan alteraciones.

Los datos de laboratorio mostraron que el número de leucocitos (Figura 4.20A) en el grupo no infectado fluctúa entre 5,8 y 7,1 x 10<sup>3</sup>/μl, mientras que en el grupo tratado con 3.000 L3 los valores oscilaron entre 4,6 y 11,9 10<sup>3</sup>/μl. Se observó aumento a partir del día 1 p.i. siendo más evidente en los días 4 y 5 p.i. con 11,9 y 11,7 10<sup>3</sup>/μl respectivamente (p<0,05), disminuyendo a partir del DIA 6 p.i hasta llegar en el día 20 a valores de 6,9 10<sup>3</sup>/μl. En el grupo testigo se encuentran datos de neutrófilos (Figura 4.20B) entre 2,5 a 6,9 10<sup>3</sup>/μl. En el grupo tratado con 3.000 L3 los valores aumentan a partir del día 1 p.i hasta ser estadísticamente significativos en el día 3 p.i. (12,3 10<sup>3</sup>/μl; p<0,05), presentando un pico máximo en el día 5 p.i (21,1 10<sup>3</sup>/μl; p<0,05) y disminuyendo hasta el día 20 p.i (5,8 10<sup>3</sup>/μl). Los ratones no infectados presentaron un número medio de eosinófilos

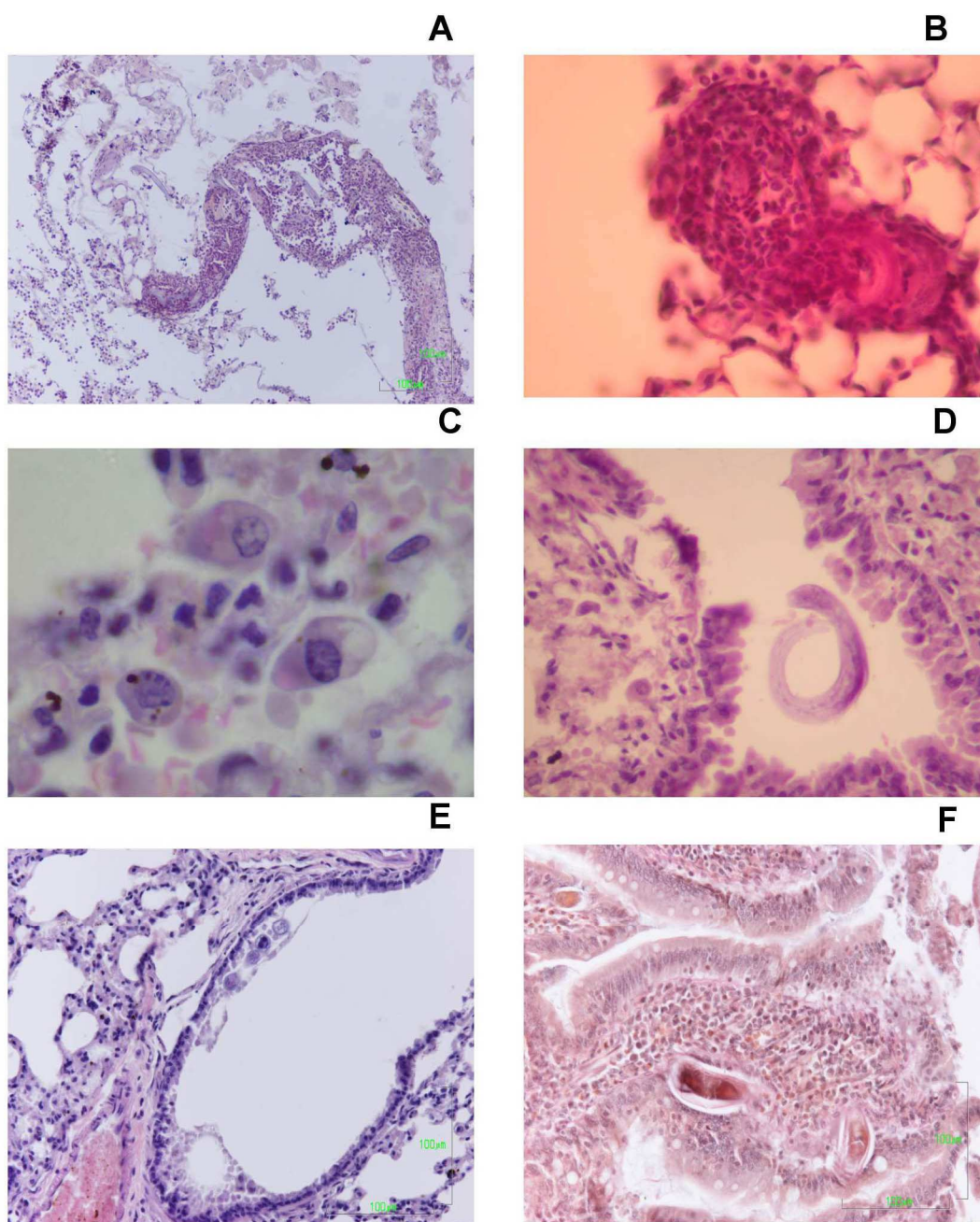
(Figura 4.20C) entre 0,15 a 0,37  $10^3/\mu\text{l}$ . En el grupo infectado con 3.000 L3 los valores iniciales tienen una media de 0,35  $10^3/\mu\text{l}$ , elevándose a partir del día 1 p.i y permaneciendo con valores ligeramente superiores al del grupo control durante todo el experimento ( $p>0,05$ ). El aumento de eosinófilos tiene un pico máximo en el día 5 p.i donde encontramos 2,8  $10^3/\mu\text{l}$ , presentando en este punto diferencias significativas respecto a su grupo control ( $p<0,05$ ). Posteriormente disminuyen, alcanzando valores similares en el día 20 p.i a su grupo control (0,32  $10^3/\mu\text{l}$ ). Los valores de plaquetas (Figura 4.20D) en el grupo testigo fluctúan entre 780 y 896  $10^3/\mu\text{l}$ . En los ratones infectados con 3.000 L3, los valores de plaquetas son de 847  $10^3/\mu\text{l}$  el día de la infección, disminuyendo desde el DIA 1 p.i. hasta ser estadísticamente significativo en el día 4 p.i con 537  $\times 10^3/\mu\text{l}$  ( $p<0,05$ ), con un valor mínimo el día 5 p.i (461  $10^3/\mu\text{l}$ ). Posteriormente aumentan, hasta alcanzar valores de 803  $\times 10^3/\mu\text{l}$  en el DIA 20 p.i. No se encontraron diferencias entre grupos en los recuentos de linfocitos, monocitos, basófilos y eritrocitos (datos no mostrados).

La actividad en suero de la enzima amilasa (Figura 4.21A) mostró en el grupo testigo valores comprendidos entre  $886\pm 70$  y  $927\pm 60$  UI/l. En el grupo infectado con 3.000 L3 esta actividad se encuentra aumentada desde el día 1 al 3 p.i. ( $909 \pm 170$  UI/l a  $1.140 \pm 140$  UI/l;  $p < 0,05$ ). La actividad lactato deshidrogenasa (LDH) (Figura 4.21B) en suero de ratones del grupo testigo osciló entre  $692\pm 151$  a  $791\pm 80$  UI/l. En los animales infectados con 3.000 larvas se encontró aumento de la actividad ( $872\pm 145$  a  $983\pm 135$  UI/l) desde el día 3 al 20 p.i. aunque no fue estadísticamente significativo ( $p > 0,082$ ). La detección de creatina-cinasa (CK) (Figura 4.21C) en el suero de ratones no infectados presentó valores entre  $843\pm 57$  y  $1.265\pm 230$  UI/l. Los valores encontrados en los ratones infectados con 3.000 larvas mostraron aumento progresivo desde el día 1 de infección

hasta el final del experimento, que es estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) desde el día 3 p.i. ( $2010 \pm 366$  a  $2145 \pm 161$  UI/l), hasta el final de la infección.

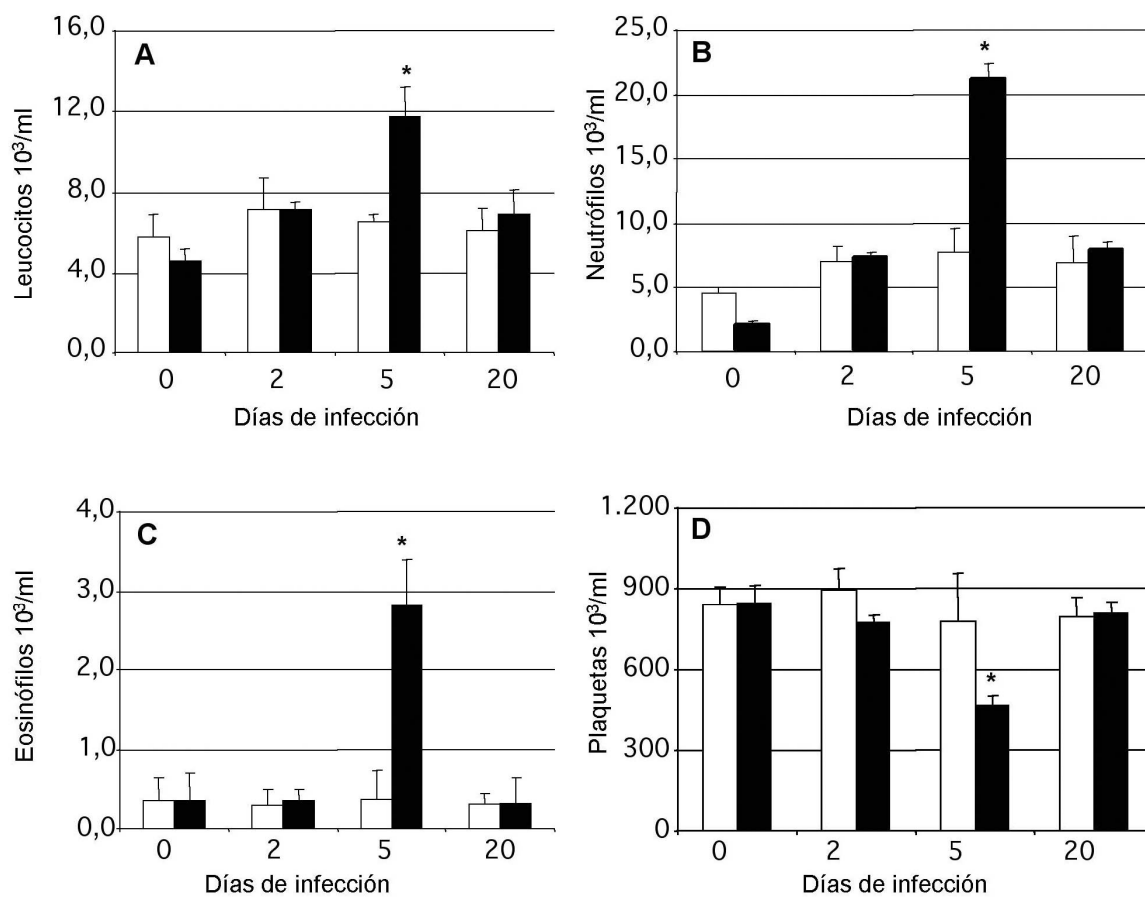


**Figura 4.18.** Número de huevos por gramo de heces (h.p.g.) a lo largo de la infección en ratones BABL/c infectados con larvas L3 infectivas en dosis crecientes de *S. venezuelensis*.

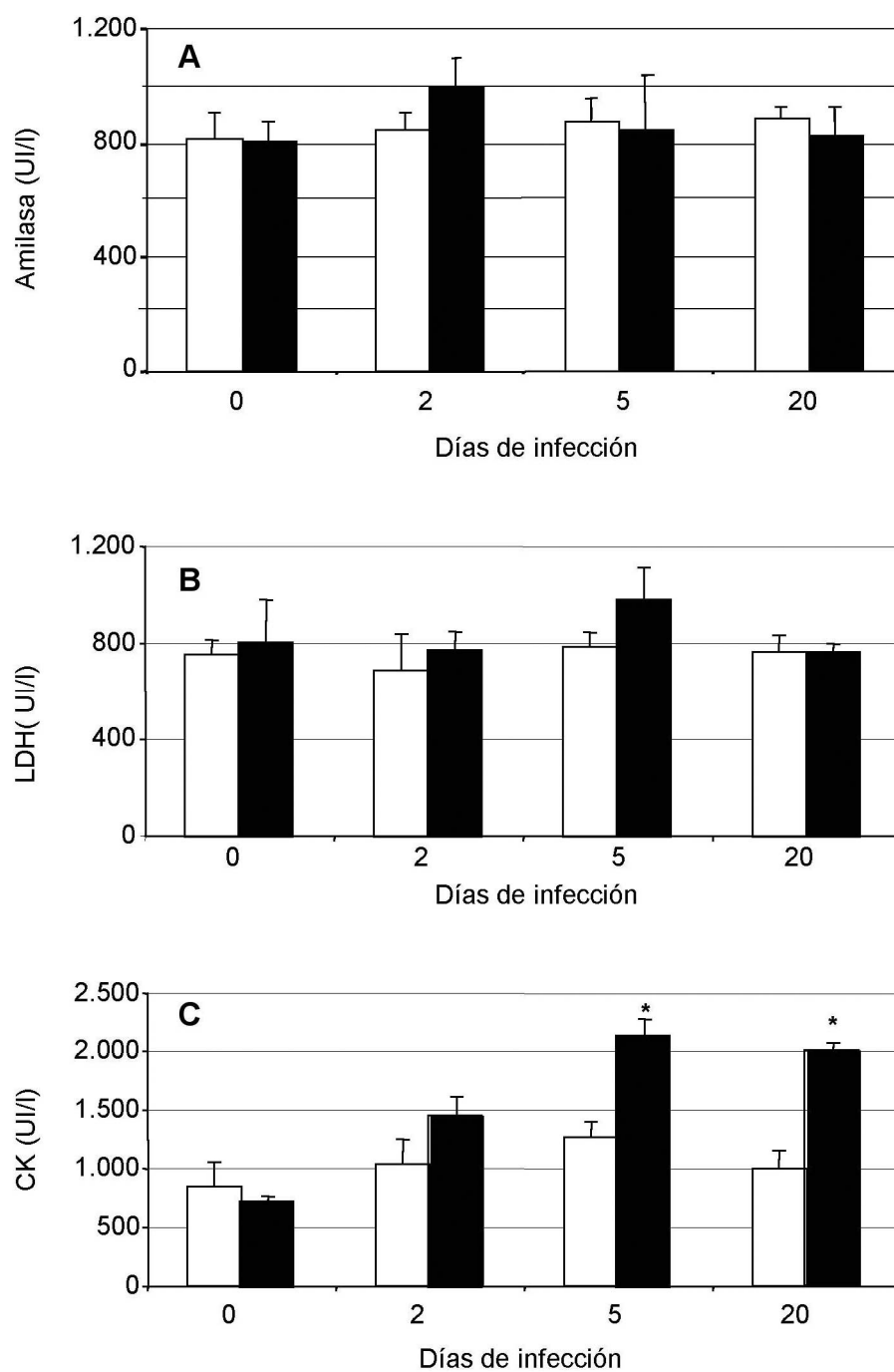


**Figura 4.19.** Cortes histológicos teñidos con hematoxilina eosina de distintos órganos de ratones BALB/c infectados con 3.000 L3 de *S. venezuelensis*: Larva en tejido conjuntivo subcutáneo (A). Larva atravesando los capilares alveolares del pulmón (B). Infiltración de los alveolos por macrófagos (C). Larvas en la luz de bronquiolos (D y E). Hembra partenogenética en la mucosa del intestino delgado (F).





**Figura 4.20** Media y desviación típica del número de leucocitos (A), neutrófilos (B), eosinófilos (C) y plaquetas en la sangre de ratones BALB/c sanos e infectados con 3.000 L3 de *S. venezuelensis* (Inf). \*  $p < 0,05$  respecto al grupo sano. G1 no infectados en blanco y G2 infectados en negro.



**Figura 4.21** Media y desviación típica de la actividad sérica de las enzimas: amilasa (A), lactato deshidrogenasa (B) y creatinina cinasa (C) de ratones BALB/c sanos e infectados con 3.000 L3 de *S. venezuelensis* (Inf). \*  $p < 0,05$  respecto al grupo sano. G1 no infectados en blanco y G2 infectados en negro.

#### 4.8 Modelo de inmunosupresión con dexametasona y ciclosporina en ratones BALB/c infectados con *S. venezuelensis*.

En el grupo de ratones infectados con 3.000 L3 de *S. venezuelensis* se observó la presencia de huevos en heces a partir del día 5 de infección con un máximo de excreción en el día 7 ( $1.901 \pm 140$  h.p.g.), disminuyendo progresivamente a partir del día 10 y llegando a 0 el día 21 de la infección. Los ratones tratados con ciclosporina e infectados con 3.000 L3 inician la eliminación de huevos a partir del día 6 de infección, alcanzando el máximo el día 7 postinfección ( $1.330 \pm 210$  h.p.g.). Posteriormente, disminuyen progresivamente, hasta desaparecer desde el día 10 al 21 de la infección. El grupo tratado con dexametasona e infectado con 3.000 L3 mostró aumento en el número de huevos en las heces desde el día 3 de la infección hasta el 10 p.i. con un pico de  $4.660 \pm 361$  h.p.g. ( $p < 0,05$  respecto a los otros grupos). Después disminuyó la eliminación hasta el día 30 p.i. con  $443 \pm 192,5$  h.p.g. Nuevamente desde el día 32 p.i aumentó hasta dar un valor máximo el día 41 de  $9.280 \pm 276$  h.p.g. ( $p < 0,05$ ). Posteriormente la eliminación se reduce hasta el día 46 p.i. en que los ratones mueren (Figura 22A).

Al determinar las larvas en el pulmón en el día 2 p.i., en el grupo infectado con 3.000 L3 de *S. venezuelensis* se recuperaron  $17,0 \pm 1,2$  larvas; en el grupo tratado con ciclosporina e infectado encontramos menor número ( $12,0 \pm 2,3$ ;  $p > 0,05$ ) y en el grupo tratado con dexametasona obtuvimos más larvas que en el grupo de infección,  $26 \pm 2,1$  ( $p < 0,05$ ). Además no se encontraron larvas en el pulmón en el día 20 p.i. ni en los grupos testigo ni en el grupo infectado y tratado con ciclosporina. Sin embargo, si se hallaron larvas ( $10,0 \pm 5,0$ ) en el grupo infectado y tratado con dexametasona ( $p < 0,05$ ) (Figura 22B).

Cuando analizamos la recuperación de hembras partenogenéticas en el intestino, observamos que en el grupo infectado con 3.000 L3 encontramos  $26,0 \pm 10,0$  hembras en

el día 7 p.i.; en el grupo infectado y tratado con ciclosporina encontramos un número mayor de hembras ( $55,0 \pm 4,3$ ;  $p < 0,05$ ), estas hembras se aprecian al microscopio con su aparato genital libre o con un número menor de huevos de *S.venezuelensis* (máximo 2 en cada parásito). En el grupo infectado y tratado con dexametasona se encontró un número aún mayor ( $97,0 \pm 21,0$ ;  $p < 0,05$ ), además se apreció en sus úteros un número mayor de huevos en comparación con las hembras del grupo control (9-12 huevos). En el día 20 p.i. solamente se recuperaron hembras en el grupo infectado y tratado con dexametasona ( $10,0 \pm 3,8$ ) ( $p < 0,05$  en relación con el grupo solo con infección) (Figura 22C).

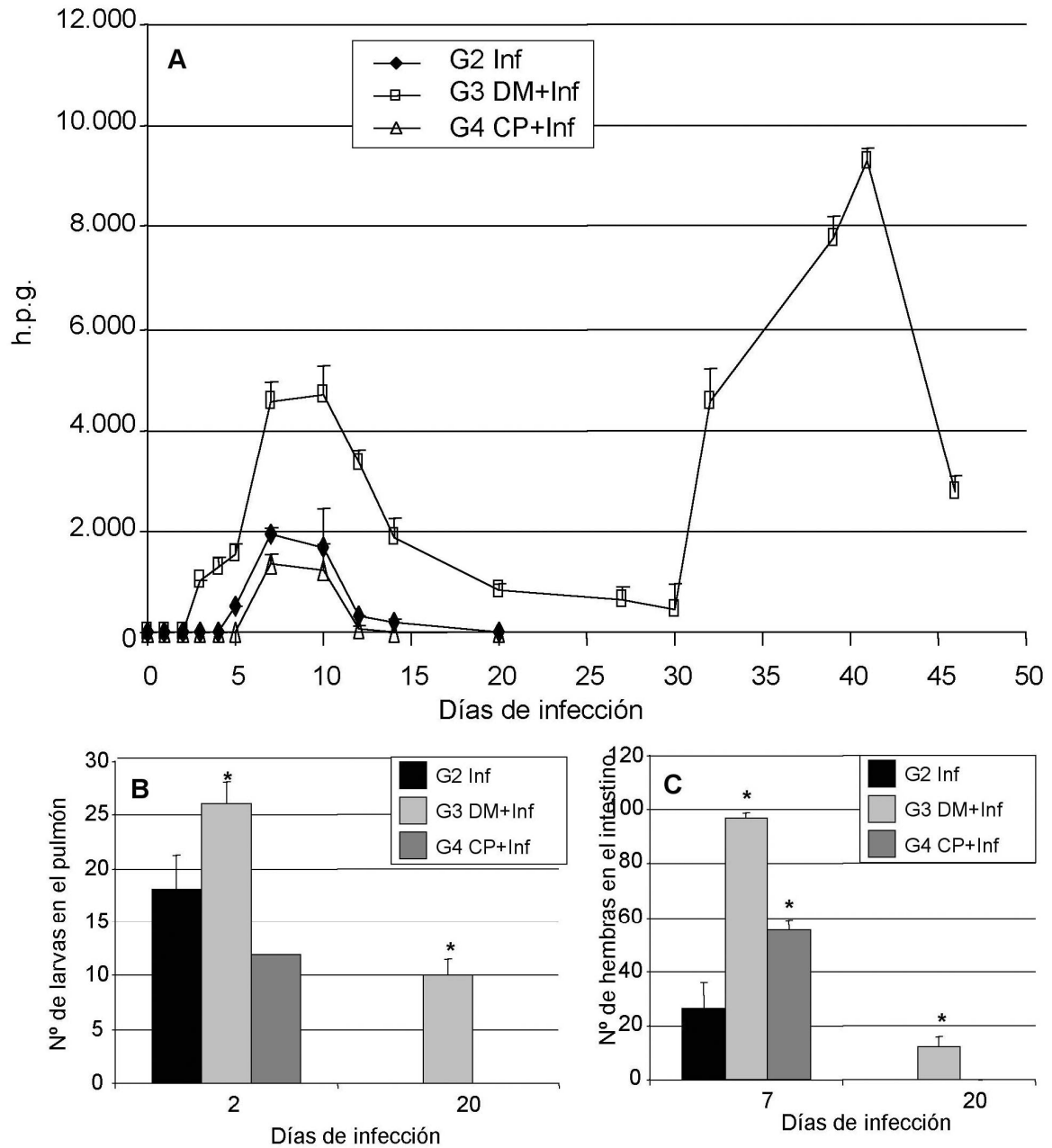
Los recuentos de leucocitos en sangre en el grupo testigo sano oscilan entre 5.260 y 6.120/ $\mu$ l. Los ratones infectados con 3.000 L3 muestran menor cantidad desde el día 5 al día 20 p.i. En los grupos tratados con dexametasona y ciclosporina e infectados, en el día 10 de tratamiento (0 de infección) muestran menores valores de leucocitos (2.440 y 3.170 leucocitos/ $\mu$ l,  $p < 0,05$  en relación con el grupo testigo). En el día 5 p.i. se aprecia un menor recuento leucocitario en el grupo tratado con dexametasona (4,05 leucocitos/ $\mu$ l,  $p < 0,05$ ). Después los recuentos aumentan hasta ser iguales a los recogidos en el grupo solo con infección (Figura 23A).

Se encontraron en el grupo testigo sano valores entre 30 a 260 de neutrófilos/ $\mu$ l durante el experimento. En el grupo infectado con 3000 larvas se observó un número menor de neutrófilos en todo el experimento excepto en el día 20 p.i. En los grupos tratados con ciclosporina y dexametasona se apreció aumento de los valores en el día 10 de tratamiento (0 de infección) superiores a 480 neutrófilos/ $\mu$ l, ( $p < 0,05$ ) en relación con el grupo solo infectado. En estos dos grupos, los valores disminuyeron desde el día 5 hasta el día 20 p.i. (120 y 280 neutrófilos/ $\mu$ l  $p < 0,05$ ). Se mantuvieron valores superiores significativamente en el grupo tratado con dexametasona, en el día 5 p.i. 380 neutrófilos/ $\mu$ l) disminuyendo en el día 20 p.i. (100 neutrófilos/ $\mu$ l). (Figura 23B).

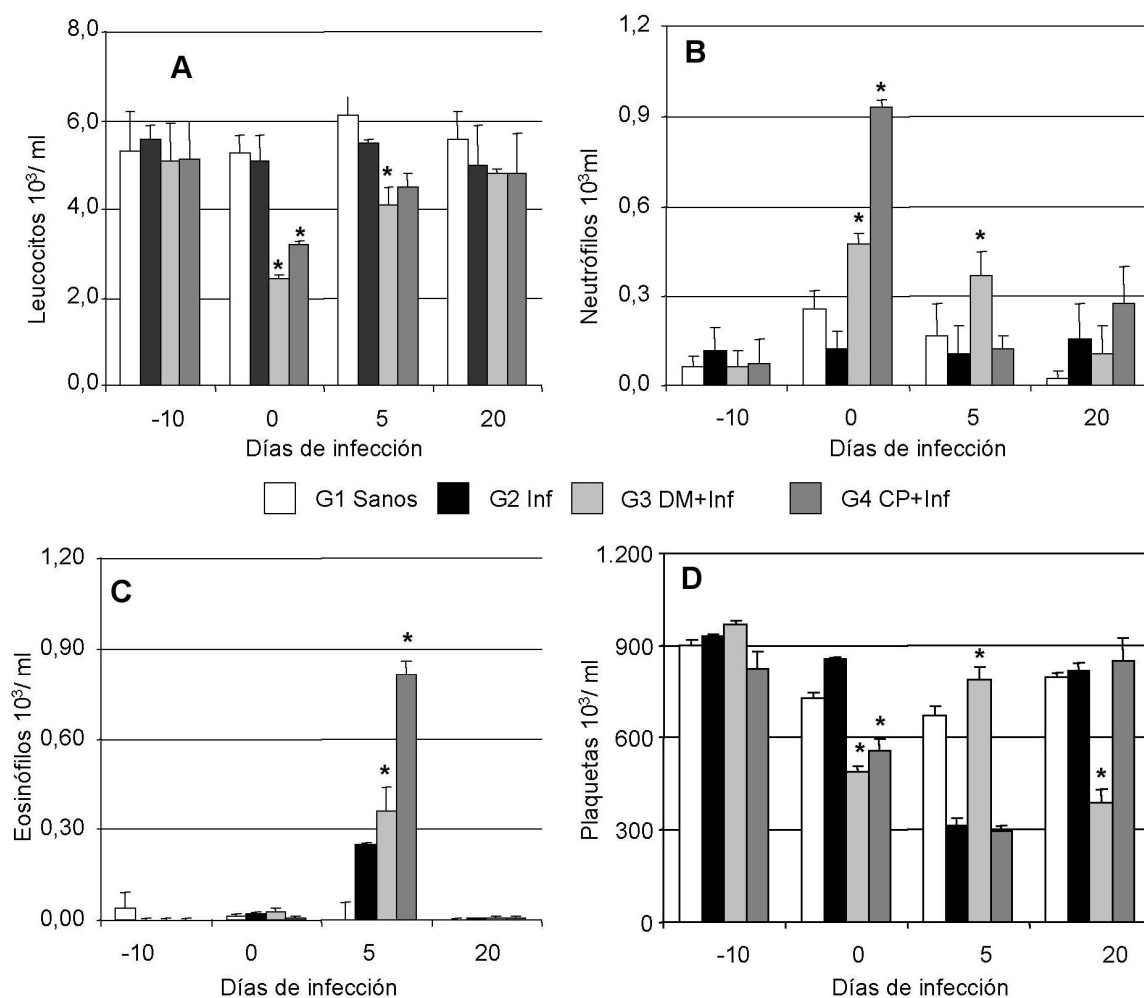
---

En la sangre de ratones no infectados se encontraron entre 10 y 40 eosinófilos/ $\mu\text{l}$  durante el experimento, los demás grupos presentaron un aumento de eosinófilos de 250, 364 y 810 eosinófilos/ $\mu\text{l}$  el día 5 p.i. respectivamente. Este aumento fue significativo ( $p < 0,05$ ). En los grupos tratados con dexametasona y ciclosporina, siendo mas evidente el aumento en los infectados y tratados con ciclosporina. Posteriormente los valores de todos los grupos disminuyen hasta el día 20 p.i en los tres grupos (Figura 23C).

El recuento de plaquetas en la sangre de ratones BALB/c no infectados varió entre 671.000 y 899.000/ $\mu\text{l}$ . Los grupos tratados con ciclosporina y dexametasoma e infectados mostraron disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de plaquetas en el momento previo a la infección en comparación con el grupo solo infectado. El día 5 p.i encontramos que el recuento plaquetario disminuye a menos de 320 000 plaquetas/ $\mu\text{l}$  en los grupos infectado y en el tratado con ciclosporina e infectado, mientras que el grupo tratado con dexametasona e infectado aumentó los valores a  $784 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$  ( $p < 0,05$  en relación al grupo infectado). Posteriormente en el grupo infectado y el grupo tratado con ciclosporina e infectado recuperaron el recuento plaquetario, siendo similar en el día 20 p.i., mientras que el grupo tratado con dexametasona disminuyó los valores (38.000 plaquetas/ $\mu\text{l}$ ,  $p < 0,05$  en relación con el grupo infectado (Figura 23D).



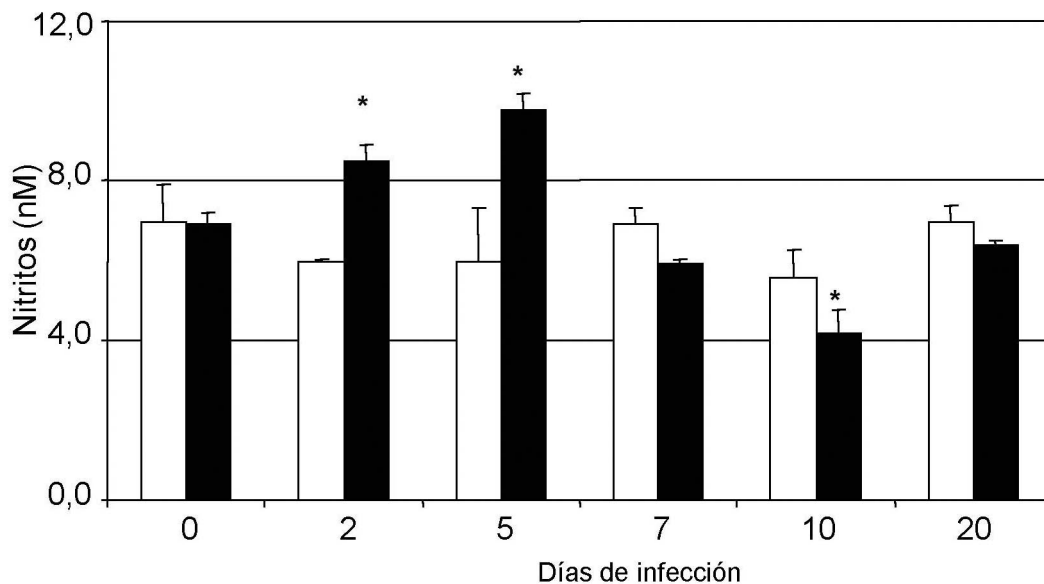
**Figura 4.22.** Número de huevos por gramo de heces (h.p.g.) (A), número de larvas en los pulmones en el día 2 y 20 post-infección (B) y número de hembras partenogenéticas en los intestinos los días 7 y 20 post-infección (C) en ratones BALB/c tratados con dexametasona (DM) y ciclosporina (CP) e infectados con 3.000 L3 de *S. venezuelensis* (Inf). \*  $p < 0,05$  respecto al grupo de infección.



**Figura 4.23** Media y desviación típica del número de leucocitos (A), neutrófilos (B), eosinófilos (C) y plaquetas en la sangre de ratones BALB/c tratados con dexametasona (DM) y ciclosporina (CP) e infectados con 3.000 L3 de *S. venezuelensis* (Inf). \*  $p < 0,05$  respecto al grupo de infección.

#### 4.9 Producción de óxido nítrico en ratones BALB/c infectados con 3000 L3 de *S. venezuelensis*.

En los ratones no infectados se produce concentraciones de nitritos en la orina que oscilan entre  $5,2\pm 0,6$  y  $7,0\pm 0,9$  nM a lo largo de todo el experimento. El grupo de ratones BALB/c infectado muestra en el día 5 de infección una concentración de  $9,8\pm 0,44$  nM, mayor que el grupo no infectado ( $p<0,05$ ). Posteriormente, la concentración de nitritos disminuye progresivamente hasta el día 10 llegando a  $4,94\pm 0,61$  nM ( $p<0,05$ ). En el día 20 se recuperan los valores de nitritos en el grupo infectado ( $6,4\pm 0,1$  nM), siendo cercanos al valor del grupo no infectado ( $6,9\pm 0,4$ ) (Figura 4.24).



**Figura 4.24.** Nitritos (nM) detectados en orina de ratones BALB/c no infectados e infectados con 3.000 L3 de *S. venezuelensis* mediante la técnica de Griess. \*  $p<0,05$  respecto al grupo de sano. G1 no infectado en blanco y G2 infectados en negro.



#### 4.10 Modelo de inmunomodulación con un donador e inhibidor de óxido nítrico en ratones BALB/c infectados con *S. venezuelensis*

Ratones BALB/c infectados con 3000 L3 de *S. venezuelensis* muestran presencia de huevos a partir del día 5 de infección ( $1.600 \pm 22$  h.p.g), con un máximo en el día 7 ( $2.900 \pm 140$  h.p.g), disminuyendo a partir del día 10 hasta su desaparición en el día 20. El grupo tratado con aminoguanidina e infectado con 3000 L3 de *S. venezuelensis*, presenta en el día 5 de infección un número de huevos menor al del grupo infectado y no tratado ( $801 \pm 85$ ) ( $p < 0,05$ ). Posteriormente aumentan hasta llegar a un máximo de eliminación en el día 10, ( $4.339 \pm 424$  h.p.g) ( $p < 0,05$ ), disminuyendo a partir del día 12 para desaparecer en el día 21 siempre con valores superiores al grupo de infección. Los ratones tratados con AL419 (donador de óxido nítrico) e infectados con 3000 L3 de *S. venezuelensis* muestran inicio y máxima excreción de huevos en heces en el día 5 ( $1.860 \pm 5$  h.p.g), ( $p > 0,05$  en relación con el grupo de infección, a partir de este día el número de huevos disminuye paulatinamente, encontrándose diferencias significativas en el día 10 ( $25 \pm 2$  h.p.g) ( $p < 0,05$  en relación con el grupo de infección) hasta el día 14 p.i. (Figura 25A).

En la Figura 25B se muestra las larvas recuperadas en el pulmón en el día 2 p.i, se encontraron  $18,0 \pm 1,2$  larvas en pulmones en los animales infectados con 3.000 L3. Por el contrario, se recuperaron un número mayor de larvas ( $24 \pm 2,4$ ) en los animales tratados con aminoguanidina e infectados ( $p < 0,05$ ). En el grupo tratado con LA419 se obtuvieron menos larvas ( $13,0 \pm 1,4$  L3;  $p < 0,05$  en relación con el grupo de infección). En el día 20 p.i. no se encontraron larvas en pulmón en ninguno de los tres grupos estudiados. La recuperación de parásitos adultos en el intestino (Figura 25C) mostró en el día 7 p.i que en el grupo de ratones solamente infectados se recuperaron  $26,0 \pm 1,8$  hembras partenogénicas, mientras que en los ratones tratados con

---

aminoguanidina fue superior ( $35,0 \pm 5,2$  hembras;  $p < 0,05$ ) y en el grupo tratado con LA419 inferior ( $21,0 \pm 1,0$  hembras;  $p < 0,05$  en relación con el grupo infectado). No se encontraron parásitos en el día 20 p.i. en los tres grupos estudiados.

Los valores de leucocitos en el grupo testigo fluctuaron entre 4.930 a 5.900/ $\mu$ l. El grupo infectado con 3.000 L3 presentó un aumento del número de leucocitos a partir del día 5 p.i con 5.740/ $\mu$ l, disminuyendo en el día 20 p.i. En el grupo tratado con AL419 se observó aumento no significativo ( $p < 0,05$  en relación con el grupo de infección) en el día 5 p.i, manteniendo recuentos superiores al grupo infectado hasta el día 20 p.i. en que disminuye. Los animales tratados con aminoguanidina mostraron disminución del número de leucocitos en el día 10 de tratamiento (0 de infección) 3.540/ $\mu$ l ( $p < 0,05$  en relación con el grupo de infección), aumentando posteriormente hasta el final de la infección (Figura 26A)

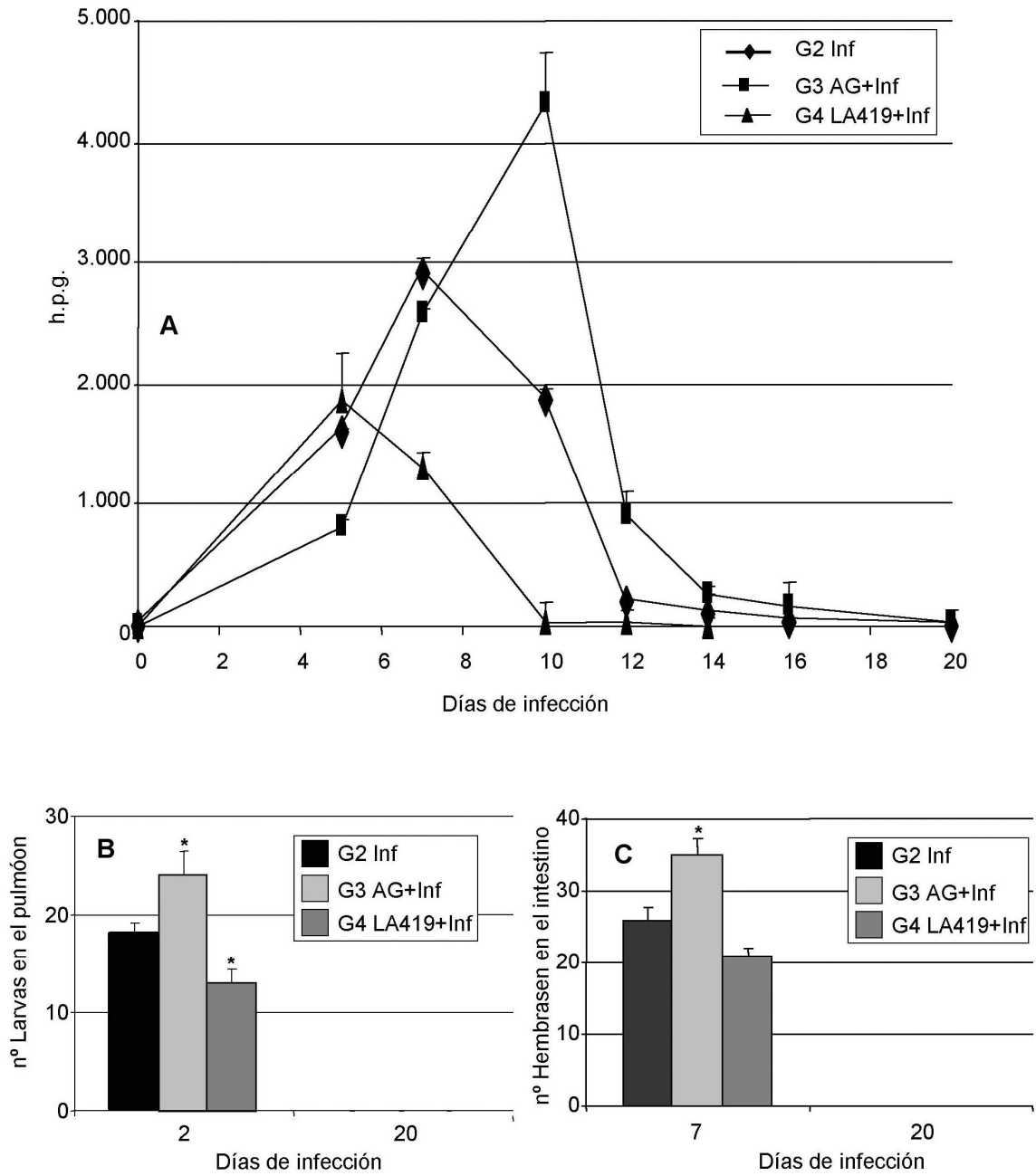
Se encontraron en el grupo testigo valores de neutrófilos que fluctuaron entre 150 y 170/ $\mu$ l. El grupo infectado con 3.000 larvas presentó un aumento significativo en el 5 p.i de 200/ $\mu$ l y disminución en el día 20 p.i. Los grupos tratados con donador e inhibidor de óxido nítrico presentaron en el día 2 y 10 de tratamiento respectivamente (día 0 de infección) disminución significativa del número de neutrófilos 50 y 90/ $\mu$ l ( $p < 0,05$  en relación al grupo de infección) y aumento significativo en el día 5 p.i. 250 y 290 / $\mu$ l ( $p < 0,05$ ), manteniéndose elevado significativamente ( $p < 0,05$ ) en el grupo tratado con aminoguanidina hasta el día 20 p.i. (Figura 26 B)

El grupo testigo presentó valores de eosinófilos que fluctúan entre 160 a 180/ $\mu$ l durante el experimento. En el grupo infectado con 3.000 L3 se elevaron a partir del día 5 p.i hasta el final del experimento. El grupo tratado con LA419 (donador de ON) presentó aumento progresivo del número de eosinófilos siendo estadísticamente significativo a

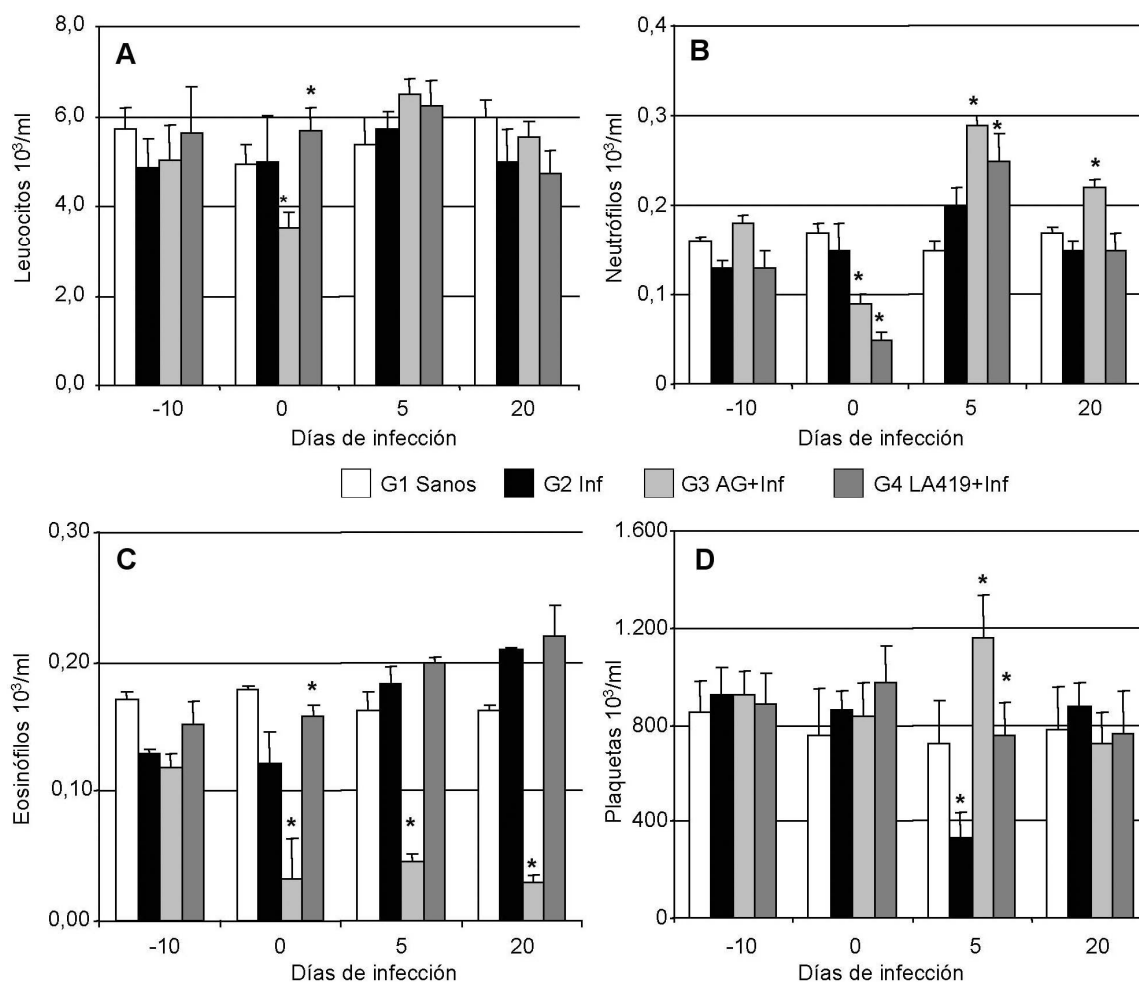
---

partir del día 5 p.i (200/ $\mu$ l.  $p < 0,05$  en relación al grupo infectado) hasta el final del experimento. El grupo tratado con aminoguanidina (inhibidor de ON) presentó disminución significativa del valor de eosinófilos a partir del 5 día p.i. (30/ $\mu$ l.  $p < 0,05$ ) permaneciendo con valores significativamente bajos hasta el final del experimento (Figura 26C).

El grupo testigo presentó valores de plaquetas que fluctuaron entre 726.000/ $\mu$ l a 849.000/ $\mu$ l durante el experimento. El grupo infectado con 3.000 L3 se observó disminución del número de plaquetas en el 5 día p.i. el primero con 333.000/ $\mu$ l ( $p < 0,05$  en relación con el grupo control) aumentando los valores hasta el día 20 p.i. En el grupo tratado con donador ON e infectado aumentó el recuento plaquetarios significativamente 755.000/ $\mu$ l ( $p < 0,05$ ), manteniéndose en estos valores hasta el final del experimento. El grupo tratado con inhibidor de ON presentó aumento significativo en el día 5 p.i. 1.158.000/ $\mu$ l ( $p < 0,05$  en relación con el grupo de infección). Posteriormente disminuyó hasta el día 20 p.i 727.000/ $\mu$ l. (Figura 26D).



**Figura 4.25.** Número de huevos por gramo de heces (h.p.g.) (A), número de larvas en los pulmones en el día 2 y 20 post-infección (B) y número de hembras partenogenéticas en el intestino los días 7 y 20 post-infección (C) en ratones BALB/c tratados con donador de óxido nítrico (LA419)s e inhibidor, aminoguanidina (AG) e infectados con 3.000 L3 de *S. venezuelensis* (Inf). \* $p < 0,05$  respecto al grupo de infección.



**Figura 4.26** Media y desviación típica del número de leucocitos (A), neutrófilos (B), eosinófilos (C) y plaquetas en la sangre de ratones BALB/c tratados con donador de óxido nítrico LA419 e inhibidor, aminoguanidina (AG) e infectados con 3.000 L3 de *S. venezuelensis* (Inf). \*  $p < 0,05$  respecto al grupo de infección.

#### **4.11 Modelo de inmunosupresión con dexametasona en ratones BALB/c infectados con *S. venezuelensis* y tratados con inhibidores y donadores de la producción de óxido nítrico**

En el grupo infectado con 3.000 L3 de *S.venezuelensis* (G1), se detectan huevos en heces a partir del día 5 p.i., ( $320\pm 23$  h.p.g.), con un máximo en el día 7 p.i. ( $1.890\pm 140$  h.p.g.), disminuyendo posteriormente hasta desaparecer el día 20 p.i. El grupo tratado con dexametasona durante 10 días y después infectado con 3.000 L3 (G2) mostró un aumento en el número de huevos en las heces desde el día 3 ( $100\pm 7,7$  h.p.g.) de la infección hasta el 7 p.i. que dio un pico de  $14.700$  h.p.g. $\pm 81,7$  ( $p < 0,05$  respecto al grupo infectado G1), disminuyendo la eliminación hasta el día 20 p.i. ( $1.510\pm 89$  h.p.g.), Nuevanamente desde el día 24 p.i aumentó hasta dar otro pico el día 39 p.i. ( $16.670\pm 77,5$  h.p.g.). Posteriormente la eliminación se reduce hasta el día 46 p.i. ( $2.900\pm 279$  h.p.g.). El grupo tratado con dexametasona y aminoguanidina desde 10 días antes de la infección con 3.000 L3 (G3) de *S venezuelensis* mostró presencia de huevos en heces desde el día 3 p.i. ( $1400\pm 20$  ( $p < 0,05$  respecto infectado y tratado con dexametasona G2), después se observó aumento hasta el día 7 p.i., donde se observó un pico de  $19.130\pm 139$  h.p.g. ( $p < 0,05$  en relación con el G2). Posteriormente hubo disminución progresiva hasta  $4.400\pm 205$  h.p.g. el día 24 p.i. para aumentar hasta un máximo de  $24.080\pm 533$  h.p.g. el día 28 p.i. ( $p < 0,05$  respecto al Grupo 2), para disminuir hasta el día 46 en que los ratones mueren ( $13.510\pm 257$  h.p.g), siempre con valores superiores al grupo tratado con dexametasona e infectado. La eliminación de huevos en el grupo tratado con el donador AL419 desde 48 h de la infección (G4), mostraron presencia de huevos desde el día 5 p.i.  $110\pm 25$  h.p.g., el número de huevos aumentan hasta dar un máximo de  $6.740\pm 430$  h.p.g. el día 7 p.i. Posteriormente disminuye paulatinamente hasta el día 24 p.i en que desaparecen. La eliminación de huevos de este grupo fue significativamente menor

( $p < 0,05$ ) que el grupo tratado con dexametasona e infectado (G2) a lo largo del experimento (Figura 27A).

Respecto a las larvas encontrados en pulmón, observamos que en el 2 día p.i se recuperaron  $18,0 \pm 3,2$  larvas en los ratones infectados, mientras que en los tratados con dexametasona e infección se encontraron  $26 \pm 2,1$  larvas. En el grupo tratado con dexametasona, aminoguanidina e infección, se recuperaron una gran cantidad de larvas ( $142,0 \pm 1,8$ ) ( $p < 0,05$  respecto al G2), mientras que solamente se obtuvieron  $15,0 \pm 3,0$  larvas en el grupo tratado con dexametasona, LA419 e infectado ( $p < 0,05$  en relación con G2). En el día 20 p.i. se encontraron larvas en pulmones en los grupos tratados con dexametasona ( $10,0 \pm 2,5$  larvas) y en el grupo tratado con dexametasona y aminoguanidina ( $20,0 \pm 6,0$  larvas) no existiendo diferencias significativas entre los dos grupos ( $p < 0,05$ ) (Figura 27B).

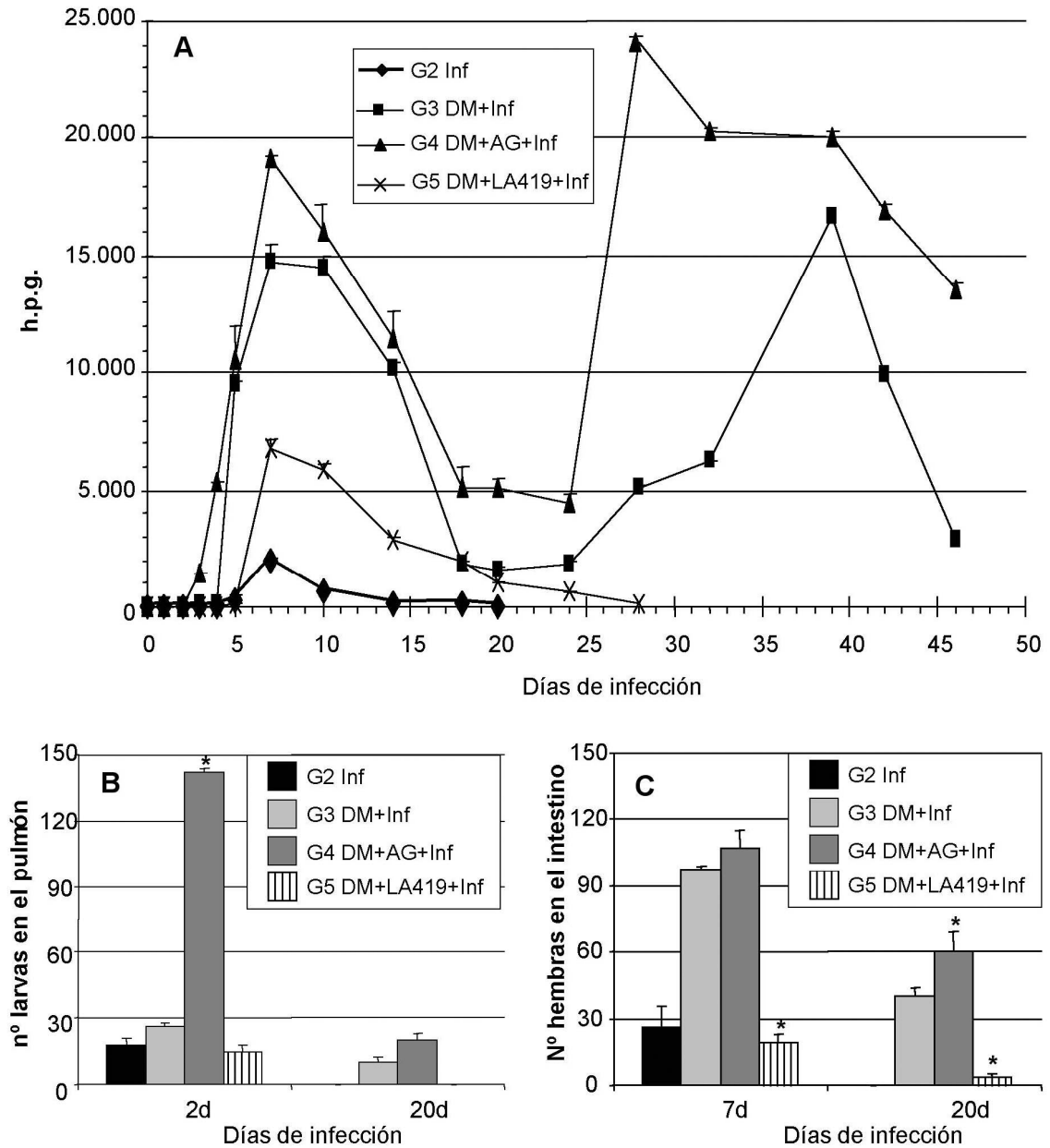
Las hembras partenogénicas encontradas fueron, en el 7 día p.i. de  $26,0 \pm 10,0$  hembras en los animales infectados y de  $97,0 \pm 2,1$  hembras en el grupo tratado con dexametasona (G2). En el grupo tratado con dexametasona y aminoguanidina (G3) se encontró el número mayor de hembras ( $107,0 \pm 6,0$  hembras;  $p < 0,05$  en relación con el G2) hallándose en el grupo tratado con dexametasona y LA419 (G4) el menor número ( $19,0 \pm 4,0$  hembras;  $p < 0,05$  este último grupo y los dos anteriores). En el día 20 p.i, se encontraron hembras en el intestino de los ratones de los tres grupos tratados con: dexametasona e infectado ( $40,0 \pm 3,8$  hembras), dexametasona y aminoguanidina ( $60,0 \pm 12,0$  hembras;  $p < 0,05$ ) y ratones tratados con dexametasona y LA419 ( $4,0 \pm 1,0$  hembras), siendo la diferencia entre este grupo y los anteriores estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) (Figura 27C).

En el hemograma los recuentos de leucocitos mostraron en el grupo testigo con valores que fluctuaron entre 6.100 a 6.300/ $\mu$ l. El grupo con infección presentó aumento en el día 5 p.i. 6.500/ $\mu$ l. con posterior disminución hasta el DIA 20 p.i. Los animales de los grupos tratados con dexametasona y con dexametasona e inhibidor o donador de ON e infectados presentaron una disminución significativa de leucocitos en el día 0 p.i. siendo el grupo tratado con LA419 e infectado el que presentó los valores mas altos ( $p < 0,05$  en relación con el grupo tratado con dexametasona e infectado). En el día 5 p.i los valores de leucocitos en relación con el grupo tratado con dexametasona e infectado disminuyen en el grupo con dexametasona y aminoguanidina y en el grupo con dexametasona y donador de ON ( $p < 0,05$ ). Todos los grupos se mantuvieron con valores similares hasta el final del experimento (Figura 28A). Los recuentos de neutrófilos en el grupo testigo fluctuaron entre 120 a 180/ $\mu$ l. El grupo infectado presentó un aumento el día 5 p.i. para disminuir en el día 20 p.i. Los grupos tratados con dexametasona y LA419 y los tratados con dexametasona y aminoguanidina presentaron un aumento significativo en el día 10 de tratamiento (0 de infección) (600 y 630 / $\mu$ l;  $p < 0,05$  en relación con el grupo tratado con dexametasona). Posteriormente estos valores disminuyen sin que haya diferencias significativas entre los grupos (Figura 28B). Los recuentos de eosinófilos en el grupo testigo fluctuaron entre 3 y 4/ $\mu$ l. El grupo infectado mostró aumento del número de eosinófilos en el día 5 p.i (29/ $\mu$ l;  $p < 0,05$ ) y disminución en el día 20 p.i. (16/ $\mu$ l;  $p < 0,05$ ). Los animales del grupo tratado con dexametasona e infectados presentaron aumento evidente en el día 10 de tratamiento (0 de infección), 40/ $\mu$ l, para disminuir del día 5 hasta el DIA 20 p.i. (15 y 10/ $\mu$ l). El grupo tratado con dexametasona+aminoguanidina y el grupo tratado con dexametasona y LA419 presentaron disminución del número de eosinófilos en el día 5 p.i. (10 y 5 / $\mu$ l respectivamente;  $p < 0,05$  en relación con el grupo

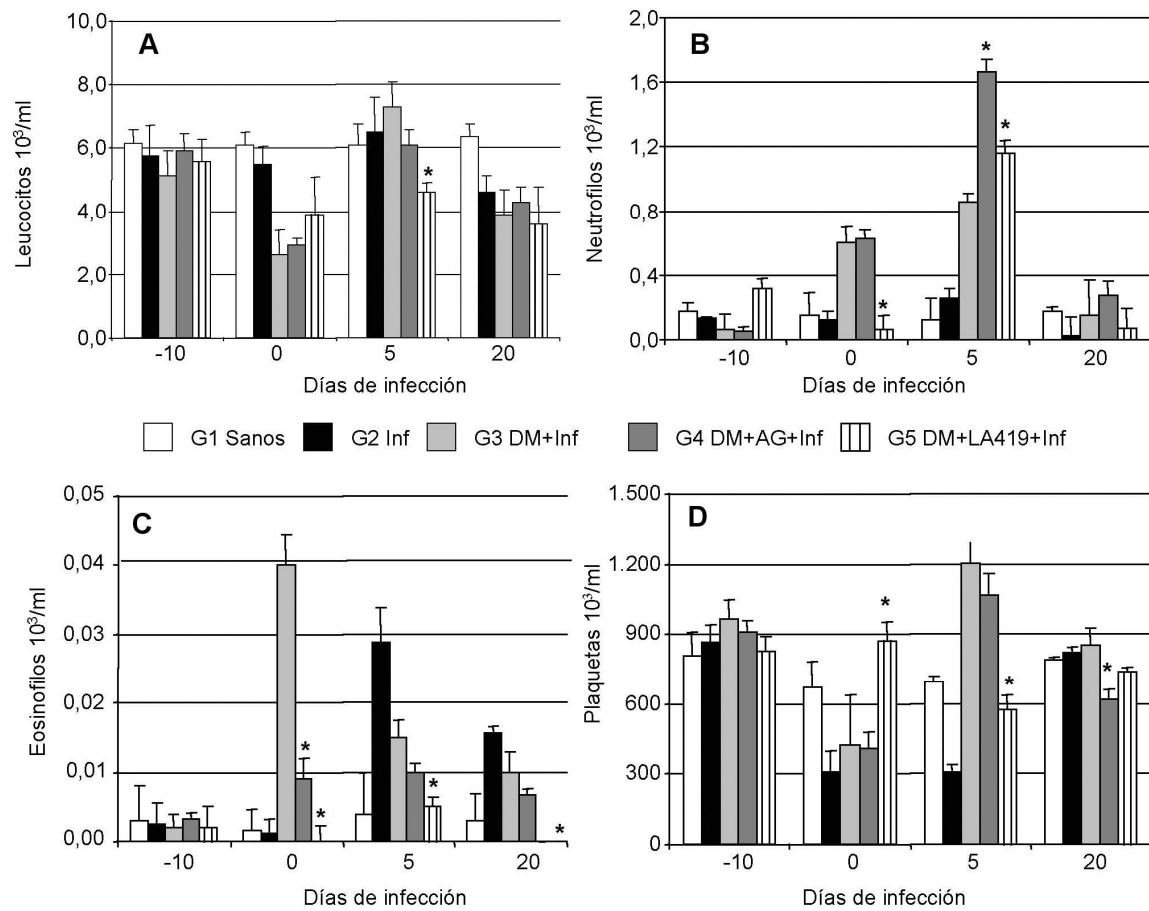


---

tratado con dexametasona). Los eosinófilos en estos grupos disminuyendo hasta el día 20 p.i, (Figura 28C). Las plaquetas en los ratones testigos fluctuaron entre 671.000/ $\mu$ l a 807.000/ $\mu$ l. Los animales infectados, tratados con dexametasona e infección y tratados con dexametasona, aminoguanidina e infección presentaron disminución significativa el día 10 de tratamiento (0 de infección) 311.000, 42.100 y 410.000/ $\mu$ l, mientras que el grupo tratado con dexametasona, LA419 e infección presentó aumento significativo ( $p < 0,05$  en relación con el grupo dexametasona e infección). En el día 5 p.i., en los grupos tratados con dexametasona, LA419 y aminoguanidina disminuyó el número de plaquetas siendo significativo en el grupo tratado con dexametasona, LA419 e infección ( $p < 0,05$  en relación con el grupo tratado con dexametasona e infección). En el día 20 p.i., se observó disminución de las plaquetas en los grupos tratados con dexametasona y moduladores de ON, siendo significativo en los ratones tratados con dexametasona, aminoguanidina e infección ( $p < 0,05$  en relación con los tratados con dexametasona e infección) (Figura 28D).



**Figura 4.27.** Número de huevos por gramo de heces (h.p.g.) (A), número de larvas en los pulmones en el día 2 y 20 post-infección (B) y número de hembras partenogenéticas en los intestinos los días 7 y 20 post-infección (C) en ratones BALB/c tratados con dexametasona (DM) y donador de óxido nítrico LA419 e inhibidor, aminoguanidina (AG) e infectados con 3.000 L3 de *S. venezuelensis* (Inf). ). \*  $p < 0,05$  respecto al grupo 3: DM+inf.



**Figura 4.28** Media y desviación típica del número de leucocitos (A), neutrófilos (B), eosinófilos (C) y plaquetas en la sangre de ratones BALB/c tratados con dexametasona (DM) y donador de óxido nítrico LA419 e inhibidor, aminoguanidina (AG) e infectados con 3.000 L3 de *S. venezuelensis* (Inf).

## **5. Discusión**

### **5.1 Producción de por larvas de *S. venezuelensis* y por macrófagos alveolares estimulados con diferentes antígenos del parásito**

Este estudio fue realizado para identificar si se detectaba en larvas de *S. venezuelensis* las diferentes enzimas capaces de producir el mediador inflamatorio, ON. Utilizamos la técnica de inmunohistoquímica para realizar el ensayo. Observamos que existe detección de dos enzimas la ONSi y la ONSn tanto en el interior como en estructuras relacionadas con el sistema nervioso del parásito. Por el contrario, no encontramos expresión de ONSe en ninguna estructura larvaria y no hemos ensayado la expresión de la enzima ONS mitocondrial (ONSmt), hallada en otros parásitos como *T. britovi* (Masetti y cols, 2004). Estos resultados indican que larvas de *S. venezuelensis* producen ON, detectados por la inducción de dos de sus enzimas. Varios estudios han mostrado la expresión de las enzimas que inducen la síntesis de ON en otros helmintos. Se ha encontrado la expresión de ONSi en el parénquima de *S. mansoni* y en el subtegumento de *S. Japonicum* (Long y cols, 2004). Asimismo se ha observado la expresión de ONSn en tejido nervioso de *S. mansoni* (Kohn y cols, 2001), *T. canis* (Fan y cols, 2004) y *B. malayi* (Pfarr y cols, 2001) y tejido neuromuscular de *A. suum* (Bascas y cols, 2001).

*Strongyloides* en un momento de su ciclo biológico llega y accede al pulmón, durante su fase larvaria migratoria. Este órgano es uno de los más importantes para el desarrollo de una respuesta inmunológica efectiva con el fin de eliminar al parásito. Uno de los componentes inmunológicos esenciales en este órgano es la activación de macrófagos alveolares con posterior producción de mediadores inflamatorios,

---

imprescindibles para la eliminación del helminto (Pérez-Arellano y cols., 1997). El ON es un mediador inflamatorio cuyas acciones fisiológicas se agrupan en tres procesos esenciales. Es una molécula básica en el control del tono vascular, en el sistema nervioso central funciona como un neurotransmisor. Por último es considerado como uno de los componentes más versátiles del sistema inmunológico, estando implicado en la patogénesis y el control de las enfermedades infecciosas y parasitarias (Espinoza y cols., 1997; Pérez-Losada y cols., 1997)

En la actualidad no tenemos datos sobre la relación entre el ON y la estrongiloidosis. En este estudio evaluamos el efecto de ocho antígenos obtenidos tanto de la fase larvaria como de la fase adulta de *S. venezuelensis* sobre la producción de ON por macrófagos alveolares. Utilizamos la técnica de Griess para cuantificar nitritos en el medio de cultivo y RT-PCR así como PCR en tiempo real para identificar y cuantificar la ONSi. Nuestros resultados muestran que los antígenos somáticos de larva 3 y los antígenos excretorios/secretorios de hembras estimulan la producción de ON por macrófagos alveolares. De los cuatro antígenos somáticos larvarios probados, el denominado L3-ALK es el que produce más nitritos y mayor expresión de ONSi, esta producción es dosis dependiente. En cuanto a los antígenos de hembra utilizados, únicamente el denominado H-ES, correspondiente a antígenos excretorios/secretorios adultos, es el que induce la producción de ON. Esta inducción es dosis dependiente hasta concentraciones máximas de 80 µg/ml de antígeno. Para estudiar la especificidad de los antígenos inductores de la expresión de ON, utilizamos en primer lugar polimixina, para comprobar que estos antígenos estaban libres de LPS bacteriano y por tanto no presentar efecto inespecífico. En segundo lugar comprobamos que los antígenos eran inhibidos por L-NAME y L-canavanina, demostrando el efecto específico de estos preparados.

---

Se han descrito diferentes efectos en la producción de ON en las diferentes clases de helmintos estudiados. Antígenos de la Clase *Cestoda*, específicamente antígenos de capa laminar, pared quística y líquido hidatídico de *Echinococcus granulosus* y *E. multilocularis* inducen la producción de ON (Andrade y cols., 2004). Antígenos de la Clase *Digenea* tienen efectos diferentes, mientras que los antígenos de excreción-secreción de *Paragonimus mexicanus* induce la producción de ON (Andrade y cols., 2005), estudios con *Fasciola hepatica* han demostrado bajos niveles de producción de ON así como aumento de la producción de arginasa I (Flynn y Mulcahy, 2007). Respecto a los estudios realizados en nematodos, hay que poner de manifiesto la similitud de los resultados obtenidos en este trabajo con los de Espinosa y cols. (2002). En este estudio se demuestra que tanto los antígenos somáticos de larva como los de excreción-secreción de vermes adultos son los inductores de la producción de ON en *Toxocara canis*. Se obtuvieron resultados similares con antígenos procedentes de *Ascaris suum* (Andrade y cols., 2005).

Desconocemos si la producción de ON es diferente en las distintas especies de *Strongyloides*. Estudios en el género *Trichinella* demostraron diferencias entre las especies quísticas y no quísticas del parásito (Andrade y cols., 2007). Estas diferencias podrían ser atribuidas a la formación completa o incompleta de las células nodrizas en la triquinelosis. Serán necesarios estudios posteriores para dilucidar si *S. venezuelensis*, *S. stercoralis* o *S. ratti* tienen el mismo efecto.

Teniendo en cuenta la electroforesis de los diferentes antígenos utilizados en este experimento podríamos sospechar que algunos antígenos y sus diferentes grupos proteicos estarían relacionados con la producción del ON. Esta correlación es más clara en el antígeno H-ES de hembras que en somáticos de larvas. Serán necesarios trabajos adicionales para identificar las moléculas implicadas

## **5.2 Efecto *in vitro* de donadores de ON sobre larva y adultos de *S. venezuelensis*. Estudio de su mecanismo de acción**

El ON es una molécula que puede desempeñar una función dual y contradictoria para los intereses del parásito o del hospedador. Por un lado, puede intercalarse en las moléculas de parásitos produciendo la muerte de él cumpliendo una función primordial en la defensa del organismo. Por otro, puede interferir con las células de defensa, dañándolas y por tanto facilitando al parásito su supervivencia. El objetivo de este trabajo fue investigar si el ON era capaz de actuar frente a *S. venezuelensis* mediante acción directa sobre el parásito. En los trabajos expuestos antes, se ha puesto de manifiesto que antígenos de distintas fases del ciclo biológico de *S. venezuelensis* estimulaban la producción de ON. En este trabajo utilizamos tres donadores de ON para valorar el efecto que ejercen sobre L3 y hembras de *S. venezuelensis*. Para desarrollarlo empleamos donadores de vida media de 2 horas LA-419 (S-(6-Nitro-oxi-hexahydro-furo [3,2-b] furan-3-1-il) thioacetate) (Porrás y col., 2008; Vilahur y cols., 2007), vida media de 18 horas DETA (Dietilenotriamina) (Cahuana y cols., 2008) y vida media de 56,6 horas AEHOT (aminoetil-1-hidroxi-2-oxo-1-triazeno) (Chu y cols., 2008). Para el estudio dispusimos de dos métodos complementarios; la valoración de la motilidad larvaria, (Boonmars y cols., 2005) y la actividad de fosfatasa alcalina en el medio de cultivo como indicador de muerte celular, técnica puesta a punto en este trabajo para la valoración de muerte parasitaria en larvas y adultos de nematodos (Stettler y cols., 2001). Los resultados mostraron que con los tres donadores utilizados se observaba un efecto de muerte tanto en L3 como en hembras de *S. venezuelensis*. Este efecto se obtenía de forma dosis-dependiente, incluso con las dosis más bajas utilizadas. Además, se incrementa la mortalidad en el tiempo cuando se utilizan donadores de vida media mas larga, debido probablemente a la concentración más constante de ON a lo largo del tiempo. También



---

observamos que mueren antes las larvas que las hembras. Este dato podría sugerir que el ON tiene una mayor acción sobre el estado larvario y de esta manera la producción de este mediador en el pulmón puede ser un punto clave para el control de la infección. Varios autores han estudiado el efecto de distintos donadores de la producción de ON en diferentes parásitos. Así, empleando SNAP, se ha podido comprobar histológicamente la lesión y muerte celular de *E. granulosus* (Steers y cols., 2001). El empleo de SIN-1 *in vitro* ejerce un efecto citostático tanto sobre microfilarias como formas adultas de *B. malayi*, siendo más resistentes los adultos (Thomas y cols., 1997). Además, en un modelo experimental de esta filariosis, demostró que el empleo de otro donador (DETA) inhibe el desarrollo de formas adultas y altera su motilidad (Rajan y cols., 1996). Por el contrario, en un modelo experimental de triquinelosis, se ha observado que diferentes donadores de ON incrementan la carga parasitaria (Hadas y cols., 2002; Wandurska-Nowark y cols., 2003). Nuestro grupo de investigación estudió los efectos de dos donadores de ON, SIN-1 y SNOG sobre larvas de *Toxocara canis*, a diferentes concentraciones y a lo largo del tiempo. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que con ninguna de las concentraciones utilizadas durante el periodo de estudio, el ON de forma aislada o en combinación con radicales libres de oxígeno ejerce un efecto citotóxico sobre las larvas de *Toxocara canis* (Espinoza y cols., 2002).

Uno de los mecanismos generales de muerte celular, junto con necrosis es la inducción de apoptosis, por lo que el siguiente objetivo fue el estudio de posibles mecanismos apoptóticos utilizados por el ON para matar las larvas de *S. venezuelensis*. Nuestros resultados indican que la muerte que se produce en larvas incubadas con donadores específicos de ON es por apoptosis. Estudios del mismo tipo han confirmado que donadores de ON producen mortalidad *in vitro* mediada por apoptosis en parásitos como amebas, *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Toxoplasma* y *Trichomonas*, (Ramos y cols.,

---

2007). Además se ha estudiado en *Toxoplasma gondii* posibles vías de inducción de apoptosis (Peng y col., 2003). En este estudio se ha indicado una relación directa de proceso con la vía del calcio. Son necesarios estudios futuros para conocer la vía implicada en la apoptosis inducida por la producción el óxido nítrico en la estrongiloidosis. Por tanto podemos concluir que la producción ON actúa como un mecanismo de defensa antiparasitaria ya que donadores de este mediador matan a larvas y hembras del parásito. Además esta acción es ejercida por mecanismos apoptóticos.

### **5.3 Modelo de infección en ratones normales y producción de ON en modelo experimental**

Establecimos un modelo de infección en ratones BALB/c. Con el fin de obtener una dosis adecuada, utilizamos un abanico amplio de inóculos de infección que oscilaron entre 100 y 30.000 larvas L3. En el presente trabajo hemos encontrado una evolución en el tiempo igual en todos los grupos estudiados, con comienzo en la eliminación parasitaria en el día 5 post-infección, un pico máximo en el día 7 y un aumento de la eliminación del parásito hasta el día 23 p.i. Basándonos en los datos parasitológicos, concluimos que la dosis más adecuada de infección era de 3.000 L3 porque nos permitía tener un número de huevos en heces y formas del parásito en el pulmón o intestino elevado donde se podía estudiar mejor aumentos o disminuciones inducidas en los experimentos.

Una vez establecida la dosis evaluamos magnitudes hematológicas, bioquímicas e histológicas. Si tomamos en conjunto los datos de laboratorios obtenidos, encontramos que los leucocitos, neutrófilos y eosinófilos se elevan en los primeros días de la infección. Llama la atención la disminución de plaquetas que se observa a partir del cuarto día de infección. Otros autores como Silveira y cols. (2002) coinciden con nuestros resultados en

---

las observaciones de aumento del número de eosinófilos en los primeros días de infección.

Respecto a la actividad de enzimas en el suero, nuestros resultados reflejan un discreto aumento estadísticamente no significativo en los días cuatro y cinco post-infección tanto de LDH como de amilasa total, con aumento estadísticamente significativo de CK. Debido a que no existen diferencias claras en la mayoría de las enzimas estudiadas, en los siguientes experimentos solo serán estudiados los datos hematológicos.

El estudio histopatológico reveló la presencia del parásito a las 6 horas post-infección en piel, tejido conjuntivo subcutáneo, conteniendo lesiones inflamatorias con predominio de neutrófilos y eosinófilos, pero sin estar en contacto con la larva. A nivel pulmonar se encontraron larvas el día 2 post-infección, se observaron células inflamatorias en contacto directo con la superficie larvaria, además de macrófagos activados y hemorragias intra-alveolares. Otros autores han descritos datos similares a los encontrados en este trabajo (Negrão-Correa y cols., 2003). En el intestino se observó la presencia de hembras partenogénicas de *S. venezuelensis* rodeadas de células inflamatorias como neutrófilos y eosinófilos localizadas en túneles de la mucosa intestinal en el día 7 p.i., similar a lo descrito por Kerlin y cols. (1995). También se identificaron células mastocíticas aumentadas durante la fase crónica de la infección al igual que en otros trabajos (Khan y cols., 1993).

En ratones normales sometidos a infección por *S. venezuelensis* el valor de nitritos encontrado en orina fue mayor en los días 2 al 5 p.i., días en los que el parásito está migrando desde la piel hasta el intestino. Fue menor a partir del día 7 hasta el 10, cuando el parásito ha llegado y se ha instalado en el intestino, recuperando los niveles iniciales el

---

día 20 p.i., cuando no hay huevos en las heces de los ratones infectados. El aumento inicial de nitritos se puede atribuir a la reacción del sistema inmunológico frente al parásito en su recorrido tisular. Cuando el parásito se ha localizado en la mucosa intestinal, los nitritos en la orina son menores, posibilitando la permanencia del parásito y el desarrollo y producción de huevos en la fase adulta. En otro nematodo, *Trichinella spiralis* se ha encontrado eliminación menor de ON en orina respecto a ratones no infectados, atribuyéndose este resultado a la supresión de la respuesta celular (Koodziej-Sobociska y cols., 2006)

#### **5.4 Efecto in vivo de donadores e inhibidores de la producción de ON en un modelo de strongiloidosis experimental**

En los apartados anteriores de la discusión hemos encontrado que antígenos procedentes de *S. venezuelensis* estimulan la producción de ON y que donadores de ON *in vitro* son capaces de matar a larvas y a las formas adultas del parásito. Con estos antecedentes y puesto a punto un modelo experimental de *S. venezuelensis* en ratones BALB/c, nos planteamos estudiar in vivo el efecto tanto de inhibidores como de donadores de la producción de ON. Nuestros resultados muestran claramente que cuando se inhibe la producción de ON mediante la administración de aminoguanidina por vía oral se incrementan las magnitudes parasicológicas medidas en el ensayo. De esta forma observamos un aumento del número de huevos en heces, así como de larvas en pulmón y de hembras en intestino frente a la medición de estas magnitudes en el grupo de infección. Por el contrario, observamos una reducción de estas magnitudes cuando administramos un donador de ON como el LA419. Los datos analíticos se correlacionan con los datos parasitológicos observados anteriormente. Aunque existen diferencias en los recuentos de leucocitos, neutrófilos y plaquetas, el dato más relevante se debe al número de eosinófilos

---

obtenidos. Por tanto, los datos estudiados en conjunto demuestran que en los animales en los que se ha inhibido la producción de ON existe una caída importante en el recuento de eosinófilos frente al grupo de infección. Dato que no aparece cuando los animales son tratados con un donador de ON.

Muchos estudios han utilizado aminoguanidina para valorar el efecto de la inhibición de la producción de ON en modelos experimentales de helmintos. Diferentes autores han demostrado que la administración de aminoguanidina disminuye el efecto nocivo de *T. canis* (Espinoza y cols., 2002; Gargili y cols., 2004; Demirei y cols., 2006). De forma similar se ha observado reducción en el número de larvas musculares en dos cepas de ratones infectados con *T. spiralis* (Kolodzief y cols., 2004; Zeromski y cols., 2005). Estos estudios tuvieron los mismos resultados tanto en ratones “bajos respondedores” (C57BL/6) como en ratones “altos respondedores” (BALB/c). Otros inhibidores del ON en modelos experimentales también han demostrado el importante papel de este para contribuir en la resistencia a la infección por *T. crassiceps*. (Alonso y cols., 2007).

La ventaja de este estudio radica en que es el primero en el que se utiliza conjuntamente tanto inhibidores como donadores *in vivo* de ON. El donador LA419 ha sido utilizado en modelos para estudio de enfermedad intestinal inflamatoria (Porras y cols., 2008) y como agente reductor de trombogénesis (Zafar y cols., 2007). A diferencia de los estudios mencionados anteriormente y junto con los expuestos en esta Tesis Doctoral, la producción de ON en la infección por *S. venezuelensis* es un factor importante en el control de la infección, estando su inhibición relacionada con el aumento de ella.

## 5.5 Modelo de inmunosupresión en ratones utilizando dexametasona y ciclosporina e infectados con *S. venezuelensis*

La estrongiloidosis es una helmintosis de distribución mundial, endémica en áreas tropicales y subtropicales, que toma mayor importancia en la población inmunocomprometida ya que en esta puede diseminarse y causar alta mortalidad (Keiser y Nutman, 2004). Una de las principales inmunodeficiencias asociadas a esta mortalidad en pacientes portadores de estrongiloidosis es la causada por la administración de corticoides (Namisato y cols., 2004). Dada la dificultad de realizar un estudio exhaustivo en humanos, es muy conveniente disponer de un modelo de estrongiloidosis experimental en animales con tratamientos inmunosupresores que simulen las condiciones humanas. En este trabajo desarrollamos un modelo experimental en ratones BALB/c, utilizando dexametasona y ciclosporina, posteriormente infectados con *S. venezuelensis*. Es conocido que uno de los efectos inmunosupresores y antiinflamatorios que ejerce la dexametasona es la inhibición de la producción de ON inhibiendo la expresión de ONSi mediante la vía del factor nuclear NF $\kappa$ B (Moncada, 1999; Hamalainen, 2008). La ciclosporina A es un macrólido modulador inmunológico que produce inhibición de linfocitos Th productores de IL-2 (Kountouras, 2004). Por otro lado otros autores han informado de los efectos antihelmínticos de este fármaco en *Echinococcus* (Colebrook y cols., 2002), *Hymenolepis* (McLauchlan y cols., 2000) y *Toxocara* (El-Ganayni y Handousa, 1992). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que en ratones tratados con dexametasona hay un aumento significativo inicial en la excreción de huevos respecto al grupo de infección, seguido de una reactivación mucho mayor que no se observa en el grupo de infección sin tratamiento con el fármaco. Hemos encontrado un número significativamente mayor tanto de larvas en el pulmón como de hembras en el intestino, respecto al grupo de infección en el que no se encontraron ni larvas en el

---

pulmón ni parásitos adultos al el 20 post-infección. Por el contrario, los ratones tratados con ciclosporina tuvieron un efecto totalmente opuesto, mostrando disminución del número de huevos respecto al grupo de ratones solamente infectados con una duración de la infección inferior a este grupo control. Además, no se observó el fenómeno de reactivación en periodos avanzados de la infección. Por otro lado, se apreció disminución de larvas en el pulmón con desaparición total en el día 20 p.i., hecho que ocurre también en el recuento de hembras en intestino. Estos resultados se contraponen a los encontrados en estudios realizados con *Toxocara canis*, en los que la ciclosporina mostró aumento de la permanencia del parásito en diferentes órganos del hospedador, aunque sin demostrar su viabilidad (Lescano y cols., 2004).

Los datos analíticos muestran que los grupos tratados con ambos fármacos tenían una disminución del número de leucocitos diez días después del tratamiento y en el comienzo de la infección. Esto traduce un estado de inmunosupresión efectivo en ambos grupos antes de la infección. Observamos dos datos analíticos de interés: por un lado, hay mayor número de eosinófilos en el grupo tratado con ciclosporina respecto a los otros dos; por otro existe un mayor número de plaquetas en el grupo de ratones tratados con dexametasona. El primer hecho junto con la reducción de la carga parasitaria indica que la ciclosporina puede comportarse como un antihelmíntico. No encontramos una explicación para relacionar el aumento del número de plaquetas encontrado en el grupo tratado con dexametasona en relación con la reactivación de la infección.

## **5.6 Efecto in vivo de donadores e inhibidores de ON en un modelo murino de estrongiloidosis experimental de inmunosupresión con dexametasona**

En el apartado correspondiente al modelo de infección en ratones normales e inmunosuprimidos de esta discusión sentamos las bases metodológicas y estudiamos las magnitudes parasitológicas, analíticas e inmunológicas de un modelo en ratones BALB/c infectados con *S. venezuelensis* e inmunosuprimidos con dexametasona. Este modelo experimental ha mostrado ser un buen reflejo de lo que ocurre en el ser humano en pacientes tratados con corticoides e infectados con el parásito. En este mismo apartado analizamos el efecto in vivo que tiene el aumento o la inhibición de la producción de ON, utilizando donadores e inhibidores de este mediador inflamatorio. Empleamos aminoguanidina como inhibidor *in vivo*, fármaco utilizado por diferentes autores en algunos modelos de infección parasitaria (Stenger y col, 1996; Espinoza y col, 2002). Respecto al empleo de donadores de ON, no hemos encontrado trabajos previos donde se evalué su actividad en parásitos. No obstante y como hemos referido en la discusión del apartado sobre efecto in vivo de donadores e inhibidores de la producción de ON en un modelo de estrongiloidosis experimental se ha empleado LA419 en enfermedad intestinal inflamatoria (Porras y cols., 2008) y en trombogénesis (Zafar, y col 2007). Los resultados obtenidos muestran que respecto a la detección del número de huevos en heces, existen dos picos bien definidos en el grupo de infección e inmunosuprimidos, mientras que el empleo de inhibidores como la aminoguanidina, aumenta la producción de huevos por encima de lo registrado en el grupo de infección e inmunosupresión. Por el contrario, se apreció disminución significativa en la detección de huevos de *S. venezuelensis* cuando se utiliza donadores de ON como LA419. Estos hallazgos se correlacionan con la detección de larvas recuperadas del pulmón al 2º días postinfección y de hembras recuperadas del intestino en los días 7 y 20 postinfección. Los datos de laboratorio indican que a partir del



---

día 5 postinfección existe disminución significativa en el número de eosinófilos en el grupo tratado con donadores de ON. Este mismo patrón se observa también en el número de plaquetas. Mientras que la reducción de eosinófilos se relaciona con la disminución de las magnitudes parasitológicas.

No se han realizado estudios en modelos inmunosuprimidos de infección con helmintos ya que es en *strongiloides* donde los procesos de inmunosupresión revisten una gran importancia fisiopatológica. Por tanto, no es posible comparar los estudios presentados con otros similares, aunque se pueden interpretar los resultados en el sentido de que cuando se administra ON en este modelo de inmunosupresión, la infección tiende a normalizarse, mientras que la inhibición del mismo exagera aquella y puede ser considerado como uno de los factores patogénicos implicados en el síndrome de hiperinfección desarrollado en esta helmintosis.

## **6. Conclusiones**

- 
1. Se ha encontrado óxido nítrico sintasa neuronal en tejido nervioso de larvas 3 de *S. venezuelensis*, óxido nítrico sintasa inducible en las estructuras internas larvarias y nitritos en orina de ratones experimentalmente infectados con *S. venezuelensis* en su fase migratoria.
  2. Los antígenos somáticos de larvas 3 y metabólicos de hembras partenogenéticas de *S. venezuelensis* estimulan la producción de óxido nítrico en macrófagos alveolares de rata de forma específica y dosis dependiente, con aumento de la transcripción de la óxido nítrico sintasa evaluada por RT-PCR y PCR a tiempo real.
  3. La producción de óxido nítrico *in vitro* actúa como un mecanismo de defensa antiparasitaria, ya que donadores de este mediador producen efecto citotóxico sobre larvas 3 y hembras del parásito. Esta acción es ejercida por mecanismos apoptóticos.
  4. El óxido nítrico desempeña un papel fundamental en la defensa de la estrogiloidosis. La ausencia de óxido nítrico aumenta el grado de infección de esta parasitosis en modelo experimental murino.
  5. La inhibición de la producción de óxido nítrico es uno de los factores responsables del síndrome de hiperinfección originado en la estrogiloidosis tras el tratamiento con corticoides.

## **7. Bibliografía**

- Abo-Shousha S, Khalil SS, Rashwan EA. Oxygen free radical and nitric oxide production in single or combined human schistosomiasis and fascioliasis. *J Egypt Soc Parasitol.* 1999; 29:149-156.
- Adlam D, Bendall JK, De Bono JP, Alp NJ, Khoo J, Nicoli T, Yokoyama M, Kawashima S, Channon KM. Relationships between nitric oxide-mediated endothelial function, eNOS coupling and blood pressure revealed by eNOS-GTP cyclohydrolase 1 double transgenic mice. *Exp Physiol.* 2007; 92:119-26.
- Ait Aissa S, Amir M, Bouteldja R, Wietzerbin J, Touil-Boukoffa C. Alteration in interferon-gamma and nitric oxide levels in human echinococcosis. *Cell Moll Biol.* 2006; 52:65-70.
- Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci.* 2004; 75:639-53.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 2001; 357:593-615.
- Alonso-Trujillo J, Rivera-Montoya I, Rodríguez-Sosa M, Terrazas LI. Nitric oxide contributes to host resistance against experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasitol Res.* 2007; 100:1341-50.
- Amanvermez R, Celik C. Effectiveness of free radicals in hydatid cysts. *J Egypt Soc Parasitol.* 2002; 32:259-269.
- Amarante AF, Oliveira-Sequeira TC. *Strongyloides venezuelensis* infection susceptibility of seven inbred strains of mice. *Arq Bras Med Zootec.* 2002; 54:273-278.
- Ammar EM, Said SA, Eissa LA. Mediation of the schistosomicida effect of praziquantel through nitric oxide. *Arzneimittelforschung* 2002; 52:844-848.
- Andrade MA, Siles-Lucas M, Espinoza E, Pérez Arellano JL, Gottstein B, Muro A. *Echinococcus multilocularis* laminated-layer components and the E14t 14-3-3 recombinant protein decrease NO production by activated rat macrophages in vitro. *Nitric Oxide.* 2004; 10:150-5.
- Andrade MA, Siles-Lucas M, Espinoza E, Pérez-Arellano JL, Gottstein B, Muro A. *Echinococcus multilocularis* laminated-layer components and the E14t 14-3-3 recombinant protein decrease NO production by activated rat macrophages in vitro. *Nitric Oxide* 2004; 10:150-155.
- Andrade MA, Siles-Lucas M, López-Abán J, Carranza C, Pérez-Arellano JL, Muro A. Antigens from *Ascaris suum* trigger *in vitro* macrophage NO production. *Parasite Immunol.* 2005; 27:235-242.
- Andrade MA, Siles-Lucas M, López-Abán J, Carranza C, Pérez-Arellano JL, Muro A. Antigens from *Ascaris suum* trigger in vitro macrophage NO production. *Parasite Immunol.* 2005; 27:235-42.
- Andrade MA, Siles-Lucas M, López-Abán J, Carranza C, Pérez-Arellano JL, Muro A. Antigens from *Ascaris suum* trigger in vitro macrophage NO production. *Parasite Immunol.* 2005; 27:235-42.

- Andrade MA, Siles-Lucas M, López-Abán J, Nogal JJ, Pérez-Arellano JL, Martínez-Fernández AR, Muro A. *Trichinella*: Differing effects of antigens from encapsulated and non-encapsulated species on *in vitro* nitric oxide production. *Vet Parasitol.* 2007; 143:86-90.
- Andrade MA, Siles-Lucas M, López-Abán J, Nogal-Ruiz JJ, Pérez-Arellano JL, Martínez-Fernández AR, Muro A. *Trichinella*: differing effects of antigens from encapsulated and non-encapsulated species on *in vitro* nitric oxide production. *Vet Parasitol.* 2007; 143:86-90.
- Andrade MA, Siles-Lucas M, López-Abán J, Pérez-Arellano JL, Vélez ID, Muro A. Lung-migrating digenean parasites: *in vitro* influence on nitric oxide production from normal rat pulmonary macrophages. *Exp Parasitol.* 2005; 109:171-175.
- Andrade MA, Siles-Lucas M, López-Abán J, Pérez-Arellano JL, Vélez ID, Muro A. Lung-migrating digenean parasites: *in vitro* influence on nitric oxide production from normal rat pulmonary macrophages. *Parasitol.* 2005; 109:171-5.
- Andrade MA, Siles-Lucas M, Pérez-Arellano JL, Pou C, Valladares B, Espinoza E, Muro A. Increased rat alveolar macrophage expression of function iNOS induced by a *Dirofilaria immitis* immunoglobulin superfamily protein. *Nitric Oxide.* 2005; 13:217-225.
- Aparicio P, Rodríguez E, Gárate T, Molina R, Soto A, Alvar J. Terapéutica antiparasitaria. *Enf Infecc Microbiol Clín.* 2003; 2:579-94
- Arzumanian V, Stankevicius E, Laukeviciene A, Kevelaitis E. Mechanisms of nitric oxide synthesis and action in cells. *Medicina (Kaunas).* 2003; 39:535-41
- Ashton FT, Zhu X, Boston R, Lok JB. *Strongyloides stercoralis*: Amphidial neuron pair ASJ triggers significant resumption of development by infective larvae under host-mimicking *in vitro* conditions. *Exp Parasitol.* 2007; 115:92-7
- Baek BK, Islam MK, Kim BS, Lim CW, Hur J, Oluoch AO, Kim CH, Kakoma I. Characterization of the protective response against a homologous challenge infection with *Strongyloides venezuelensis* in rats. *Vet Parasitol.* 2003; 113:217-27.
- Barrett J, Brophy PM. *Ascaris* haemoglobin new tricks for an old protein. *Parasitol Today.* 2000; 16:90-91.
- Barrington KJ and Finer NN. Inhaled nitric oxide for respiratory failure in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007;18:3
- Basal ZA, Cunningham JM, Holden-Dye L, O'Shea M, Walker RJ. Characterization of putative nitric oxide synthase in the neuromuscular system of the parasite nematode, *Ascaris suum*. *Parasitology.* 2001; 122:219-231.
- Basal ZA, Cunningham JM, Holden-Dye L, O'Shea M, Walker RJ. Characterization of a putative nitric oxide synthase in the neuromuscular system of the parasitic nematode, *Ascaris suum*. *Parasitology.* 2001; 122:219-31.
- Basal ZA, Montgomery A, Holden-Dye L, Williams RG, Walker RJ. Histochemical mapping of NADPH diaphorase in the nervous system of the parasitic nematode *Ascaris suum*. *Parasitology.* 1995; 110:625-637.
- Betters JL, Long JH, Howe KS, Braith RW, Soltow QA, Lira VA, Criswell DS. Nitric oxide reverses prednisolone-induced inactivation of muscle satellite cells. *Muscle Nerve.* 2008; 37:203-9.
- Boonmars T, Khunkitti W, Sithithaworn P, Fujimaki Y. *In vitro* antiparasitic activity of extracts of *Cardiospermum halicacabum* against third-stage larvae of *Strongyloides stercoralis*. *Parasitol Res.* 2005; 97:417-9.

- Bowman JW, Friedman AR, Thompson DP, Maule AG, Alexander-Bowman SJ, Geary TG. Structure-activity relationships of an inhibitory nematode de FMRF amine-related peptide, SDPNFLRF amide (PF1), on *Ascaris suum* muscle. *Int J Parasitol.* 2002; 32: 1765-1771.
- Bowman JW, Winterrowd CA, Friedman AR, Thompson DP, Klein RD, Davis JP, Maule AG, Blair KL, Geary TG. Nitric oxide mediates the inhibitory effects of SDPNFLRFamide, a nematode FMRFamide-related neuropeptide, in *Ascaris suum*. *J Neurophysiol.* 1995; 74:1880-88.
- Brindley PJ, Gam AA, Pearce EJ, Poindexter RW, Neva FA. Antigens from the surface and excretions/secretions of the filariform larva of *Strongyloides stercoralis*. *Mol Biochem Parasitol.* 1988; 28:171-80.
- Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide and mitochondrial respiration in the heart. *Cardiovasc Res.* 2007; 75:283-90.
- Brown GC. Nitric oxide and mitochondria. *Front Biosci.* 2007; 12:1024-33.
- Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maercke YM, Herman AG. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature.* 1990 24; 345:346-7.
- Busse R, and Mülsch A. Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. *FEBS Lett.* 1990; 265:133-6.
- Campisi J, Leem TH, Fleshner M. Acute stress decreases inflammation at the site of infection. A role for nitric oxide. *Physiol Behav.* 2002; 77:291-9.
- Cahuana GM, Tejedo JR, Hmadcha A, Ramírez R, Cuesta AL, Soria B, Martin F, Bedoya FJ. Nitric oxide mediates the survival action of IGF-1 and insulin in pancreatic beta cells. *Cell Signal.* 2008; 20:301-10.
- Chen Y, Boros DL. Polarization of the immune response to the single immunodominant epitope of p38, a major *Schistosoma mansoni* egg antigen, generates Th1- or Th2- type cytokines and granulomas. *Infect Immun.* 1999; 67:4570-4577.
- Chen YS, Tseng FY, Tan CT, Lin-Shiau SY, Hsu CJ. Effects of methylprednisolone on nitric oxide formation and survival of facial motor neurons after axotomy. *Brain Res.* 2008; 1197:23-31.
- Chertin B, Rolle U, Solari V, Cascio S, Puri P. The role of nitric oxide in bladder urothelial injury after bladder outlet obstruction. *BJU Int.* 2004; 94:392-9.
- Chitkara RK, Krishna G. Parasitic pulmonary eosinophilia. *Semin Respir Crit Care Med.* 2006; 27:171-84.
- Chu L, Jiang Y, Hao H, Xia Y, Xu J, Liu Z, Verfaillie CM, Zweier JL, Liu Z. Nitric oxide enhances Oct-4 expression in bone marrow stem cells and promotes endothelial differentiation. *Eur J Pharmacol.* 2008 Jun 22. [Epub ahead of print].
- Colangelo D, Guo HY, Connors KM, Silvestro L, Hoffman RM. Noncolorimetric measurement of cell activity in three-dimensional histoculture using the tetrazolium dye 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide: the pixel image analysis of formazan crystals. *Anal Biochem.* 1992; 205:8-13.
- Colebrook AL, Jenkins DD, Lightowers MW. Anti-parasitic effect of cyclosporin A on *Echinococcus granulosus* and characterization of the associated cyclophilin protein. *Parasitology.* 2002; 125:485-93.
- Connelly L, Jacobs AT, Palacios-Callender M, Moncada S, Hobbs AJ. Macrophage endothelial nitric-oxide synthase autoregulates cellular activation and pro-inflammatory protein expression. *J Biol Chem.* 2003; 278:26480-7.

- Conway DJ, Lindo JF, Robinson RD, Bundy DA and Bianco AE. *Strongyloides stercoralis*: characterization of immunodiagnostic larval antigens. *Exp Parasitol*. 1994; 79:99-105
- Coulson PS, Smythies LE, Betts C, Mabbott NA, Sternberg JM, Wei XG, Liew FY, Wilson RA. Nitric oxide produced in the lungs of mice immunized with the radiation-attenuated schistosome vaccine is not major agent causing challenge parasite elimination. *Immunology*. 1998; 93:55-63.
- Cox FE. History of human parasitology. *Clin Microbiol Rev*. 2002; 15:595-612.
- Dai WJ, Gottstein B. Nitric oxide-mediated immunosuppression following murine *Echinococcus multilocularis* infection. *Immunology*. 1999; 97:107-116.
- Dai WJ, Waldvogel A, Jungi T, Stettler M, Gottstein B. Inducible nitric oxide synthase deficiency in mice increases resistance to chronic infection with *Echinococcus multilocularis*. *Immunology* 2003; 108:238-244.
- D'Amici GM, Timperio AM, Zolla L. Coupling of Native Liquid Phase Isoelectrofocusing and Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis: A Potent Tool for Native Membrane Multiprotein Complex Separation. *J Proteome Res*. 2008; 7:1326-40.
- De Belder A, Radomski M, Hancock V, Brown A, Moncada S, Martin J. Megakaryocytes from patients with coronary atherosclerosis express the inducible nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995; 15:637-41.
- Dillard KJ, Saari SA, Anttila M. *Strongyloides stercoralis* infection in a Finnish kennel. *Acta Vet Scand*. 2007; 49:37.
- Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol*. 1988; 141:2407-12.
- Ehrén I, Adolfsson J, Wiklund NP. Nitric oxide synthase activity in the human urogenital tract. *Urol Res*. 1994; 22:287-90.
- el-Ganayni GA, Handousa AE. The effect of cyclosporin A (CSA) on murine visceral toxocariasis canis. *J Egypt Soc Parasitol*. 1992; 22:487-94.
- Espinoza E, Muro A, Martín MM, Casanueva P, Pérez-Arellano JL. *Toxocara canis* antigens stimulate the production of nitric oxide and prostaglandin E<sub>2</sub> by rat alveolar macrophages. *Parasite Immunol*. 2002; 24:311-9.
- Espinoza E, Muro A, Sánchez Martín MM, Casanueva P & Pérez Arellano JL, *Toxocara canis* antigens stimulate the production of nitric oxide and prostaglandin E<sub>2</sub> by rat alveolar macrophages. *Parasite Immunol*. 2002; 24:311-19.
- Espinoza E. Y, Pérez-Arellano J. L., Carranza C, Collía F y Muro A. In vivo inhibition of inducible nitric oxide synthase decreases lung injury induced by *Toxocara canis* in experimentally infected rats. *Parasite Immunol*. 2002; 24:511-20.
- Espinoza EY, Muro A, Sánchez-Martín MM, Casanueva P, Pérez-Arellano JL. *Toxocara canis* antigens stimulate the production of nitric oxide and prostaglandin E<sub>2</sub> by rat alveolar macrophages. *Parasite Immunol* 2002a; 24:311-319.
- Espinoza EY, Perez-Arellano JL, Carranza C, Collía F, Muro A. In vivo inhibition of inducible nitric oxide synthase decreases lung injury induced by *Toxocara canis* in experimentally infected rats. *Parasite Immunol*. 2002c; 24:511-520.
- Espinoza EY, Pérez-Arellano JL, Carranza C, Collía F, Muro A. In vivo inhibition of inducible nitric oxide synthase decreases lung injury induced by *Toxocara canis* in experimentally infected rats. *Parasite Immunol*. 2002; 24:511-20.



- Espinoza EY, Pérez-Arellano JL, Vicente B, Muro A. Cytoplasmic signalling pathways in alveolar macrophages involved in the production of nitric oxide after stimulation with excretory/secretory antigens of *Toxocara canis*. *Parasite Immunol* 2002b; 24:535-544.
- Esposito E, Cuzzocrea S. The role of nitric oxide synthases in lung inflammation. *Curr Opin Investig Drugs*. 2007; 8:899-909.
- Faccioli LH, Costa-Cruz JM. *Strongyloides venezuelensis* alkaline extract for the diagnosis of human strongyloidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003; 98:849-51.
- Fan CK, Li YH, Hung CC, Chang SF, Su KE. Enhanced inducible nitric oxide synthase expression and nitrotyrosine accumulation in experimental granulomatous hepatitis caused by *Toxocara canis* in mice. *Parasite immunol*. 2004; 273-281.
- Ferreira CM, Pereira AT, de Souza RS, Cassali GD, Souza DG, Lemos VS, Teixeira MM, Negrão-Corrêa D. Prevention of changes in airway function facilitates *Strongyloides venezuelensis* infection in rats. *Microbes Infect*. 2007; 9:813-20.
- Flynn RJ, Mulcahy G. Possible role for Toll-like receptors in interaction of *Fasciola hepatica* excretory/secretory products with bovine macrophages. *Infect Immun*. 2008; 76:678-84.
- Forlenza M, Scharsack JP, Kachamakova NM, Taverne-Thiele AJ, Rombout JH, Wiegertjes GF. Differential contribution of neutrophilic granulocytes and macrophages to nitrosative stress in a host-parasite animal model. *Mol Immunol*. 2008 *in press*
- Förstermann U, Boissel JP, Kleinert H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J*. 1998; 12:773-90.
- Förstermann, U., Pollock, J. S., Schmidt, H. H. H. W., Heller, M., and Murad, F. Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991; 88:1788-1792
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980; 288:373-6
- Furchgott RF. The 1989 Ulf von Euler lecture. Studies on endothelium-dependent vasodilation and the endothelium-derived relaxing factor. *Acta Physiol Scand*. 1990; 139:257-70.
- Garcide P, Kennedy MW, Wakelin D, Lawrence CE. Immunopathology of intestinal helminth infection. *Parasite Immunol* 2000; 22: 605-612.
- Geller DA, Billiar TR. Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer Metastasis Rev*. 1998; 17:7-23.
- Genta RM, Gatti S, Linke MJ, Cevini C, Scaglia M. Endemic strongyloidiasis in northern Italy: clinical and immunological aspects. *Q J Med*. 1988; 68:679-90.
- Genta RM. *Strongyloides stercoralis*: immunobiological considerations on an unusual worm. *Parasitol Today*. 1986; 2:241-6.
- Gray CA, Lawrence RA. Interferon-gamma and nitric oxide production are not required for the immune-mediated clearance of *Brugia malayi* microfilariae in mice. *Parasite Immunol*. 2002;24: 329-336.
- Green LC, Ruiz de Luzuriaga K, Wagner DA, Rand W, Istfan N, Young VR, Tannenbaum SR. Nitrate biosynthesis in man. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1981; 78:7764-8.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982; 126:131-8.

- Grove DI. Human Strongyloidiasis. *Adv Parasitol.* 1996; 38:251-309
- Grove DI. *Strongyloides ratti* and *S. stercoralis*: the effects of thiabendazole, mebendazole, and cambendazole in infected mice. *Am J Trop Med Hyg.* 1982; 313:469-76.
- Guix FX, Uribesalgo I, Coma M, Muñoz FJ. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog Neurobiol.* 2005; 76:126-52.
- Hada E, Derda M, Wandurska-Nowak E. Effect of exogenous nitric oxide in experimental trichinellosis. *Parasitol Res.* 2002; 88:86-8.
- Hadas E, Derda M, Wanderska-Nowak E. Effect of exogenous nitric oxide in experimental trichinellosis. *Parasitol Res.* 2002; 88:86-88.
- Hahn UK, Bender RC, Bayne CJ. Involvement of nitric oxide in killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*. *J Parasitol.* 2001; 87:778-785.
- Hattori Y y Gross SS. GTP cyclohydrolase I mRNA is induced by LPS in vascular smooth muscle: characterization, sequence and relationship to nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 195:435-41.
- Hattori Y, Szabó C, Gross S, Thiernemann C, Vane JR. Lipid A and the lipid A, analogue anti-tumour compound ONO-4007 induce nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Eur J Pharmacol.* 1995; 29:83-90.
- Herbert DBR, Nolan TJ, Schad GA, Lustigman S and Abraham D. Immunoaffinity-isolated antigens induce protective immunity against larval *Strongyloides stercoralis* in mice. *Exp Parasitol.* 2002; 100:112-20.
- Herbert DR, Lee JJ, Lee NA, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D. Role of IL-5 in innate and adaptive immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. *J Immunol.* 2000; 165: 4544-51
- Herbert DR, Nolan TJ, Schad GA, Lustigman S, Abraham D. Immunoaffinity-isolated antigens induce protective immunity against larval *Strongyloides stercoralis* in mice. *Exp Parasitol.* 2002; 100:112-20.
- Hernández F, Avendaño L. A simple modification of the Baermann method for diagnosis of strongyloidiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001; 96:805-7.
- Hirata M, Hirata K, Kage M, Zhang M, Hara T, Fukuma T. Effect of nitric oxide synthase inhibition on *Schistosoma japonicum*. *Parasite Immunol.* 2001; 23:281-285.
- Hirata T, Uchima N, Kishimoto K, Zaha O, Kinjo N, Hokama A, Sakugawa H, Kinjo F, Fujita J. Impairment of host immune response against *Strongyloides stercoralis* by human T cell lymphotropic virus type 1 infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2006; 74:246-9.
- Hoffmann KF, Cheever AW, Wynn TA. IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. *J Immunol.* 2000; 164:6406-6416.
- Hogaboam CM, Collins SM, Blennerhassett MG. Effect of oral L-NAME during *Trichinella spiralis* infection in rats. *Am J Physiol.* 1996; 271:G338-346.
- Ialenti A, Ianaro A, Moncada S, Di Rosa M. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. *Eur J Pharmacol.* 1992; 211:177-82.
- Ignarro LJ. Wei Lun Visiting Professorial Lecture: Nitric oxide in the regulation of vascular function: an historical overview. *J Card Surg.* 2002; 17:301-6.
- Iino S, Horiguchi K, Nojyo Y. Interstitial cells of Cajal are innervated by nitrergic nerves and express nitric oxide-sensitive guanylate cyclase in the guinea-pig gastrointestinal tract. *Neuroscience.* 2008 in press.

- Itzhak Y, Ali SF. Role of nitergic system in behavioral and neurotoxic effects of amphetamine analogs. *Pharmacol Ther.* 2006; 109:246-62.
- Iyengar R, Stuehr DJ, Marletta MA. Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987; 84:6369-73.
- James SL, Glaven J. Macrophage cytotoxicity against schistosomula of *Schistosoma mansoni* involves arginine dependent production of reactive nitrogen intermediates. *J Immunol* 1989; 143:4208-4212.
- James SL, Hibbs JB Jr. The role of nitrogen oxides as effector molecules of parasite killing. *Parasitol Today.* 1990; 6:303-5.
- Jenson JS, O'Connor R, Osborne J, Devaney E. Infection with *Brugia microfilariae* induces apoptosis of CD4(+) T lymphocytes: a mechanism of immune unresponsiveness in filariasis. *Eur J Immunol.* 2002; 32:858-867.
- Jungi TW, Adler H, Adler B, Thöny M, Krampe M, Peterhans E. Inducible nitric oxide synthase of macrophages. Present knowledge and evidence for species-specific regulation. *Vet Immunol Immunopathol.* 1996; 54:323-30.
- Kaiser L, Geary TG, Williams JF. *Dirofilaria immitis* and *Brugia pahangi*: filarial parasites make nitric oxide. *Exp Parasitol.* 1998; 90:131-134.
- Kanazawa T, Asahi H, Hata H, Mochida K, Kagei N, Stadecker MJ. Arginine-dependent generation of reactive nitrogen intermediates is instrumental in the in vitro killing of protozoa of *Echinococcus multilocularis* by activated macrophages. *Parasite Immunol.* 1993; 15:619-623.
- Kass LJ and Apkon M. Inhaled nitric oxide in the treatment of hypoxemic respiratory failure. *Curr Opin Pediatr.* 1998; 10:284-90.
- Keiser PB, Nutman TB. *Strongyloides stercoralis* in the immunocompromised population. *Clin Microbiol Rev.* 2004; 17: 208-17.
- Kerepesi LA, Keiser PB, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D, Nutman TB. DNA immunization with Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase (Sseat-6) induces protective immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. *Infect Immun.* 2005; 73:2298-305.
- Kerlin RL, Notan TJ, Schad GA. *Strongyloides stercoralis* Histopathology of uncomplicated and hyperinfective strongyloidiasis in the Mongolian gelbil, a roder model for human strongyloidiasis. *Inter. J Parasitol.* 1995; 25:411-20.
- Kerlin RL, Notan TJ, Schad GA. *Strongyloides stercoralis* Histopathology of uncomplicated and hyperinfective strongyloidiasis in the Mongolian gelbil, a roder model for human strongyloidiasis. *Inter. J Parasitol.* 1995; 25:411-20.
- Khan AI, Horii Y, Tiuria R, Sato Y, Nawa Y. Mucosal mast cells and the expulsive mechanisms of mice against *Strongyloides venezuelensis*. *Int J Parasitol.* 1993; 23:551-5.
- Kishimoto K, Hokama A, Hirata T, Ihama Y, Nakamoto M, Kinjo N, Kinjo F, Fujita J. Endoscopic and histopathological study on the duodenum of *Strongyloides stercoralis* hyperinfection. *World J Gastroenterol.* 2008; 14:1768-73.
- Kitoh K, Oka A, Kitagawa H, Unno T, Komori S, Sasaki Y. Relaxing and contracting activities of heartworm extract on isolated canine abdominal aorta. *J Parasitol.* 2001; 87:522-526.
- Kohn AB, Lea JM, Moroz LL, Greenberg RM. *Schistosoma mansoni*: use of a fluorescent indicator to detect nitric oxide and related species in living parasites. *Exp Parasitol* 2006; 113:130-133.

- Kohn AB, Moroz LL, Lea JM, Greenberg RM. Distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the nervous system and peripheral tissues of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*. 2001; 122:87-92.
- Kohn AB, Moroz LL, Lea JM, Greenberg RM. Distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the nervous system and peripheral tissues of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*. 2001; 122:87-92.
- Kolodziej M, Dziemian E, Machnicka B. Inhibition of nitric oxide production by aminoguanidine influences the number of *Trichinella spiralis* parasites in infected "low responders" (C57BL/6) and "high responders" (BALB/c) mice. *Parasitol Res*. 2006; 99: 194-196.
- Koodziej-Sobociska M, Dvorožnakova E, Dziemian E. *Trichinella spiralis*: macrophage activity and antibody response in chronic murine infection. *Exp Parasitol*. 2006; 112:52-62.
- Koosha S, Fesharaki M, Rokni MB. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay in the diagnosis of human strongyloidiasis. *Indian J Gastroenterol*. 2004; 23:214-6.
- Kotze AC, Clifford S, O'Grady J, Behnke JM, McCarthy JS. An in vitro larval motility assay to determine anthelmintic sensitivity for human hookworm and *Strongyloides* species. *Am J Trop Med Hyg*. 2004; 71:608-16.
- Kountouras J, Zavos C, Chatzopoulos D. Immunomodulatory benefits of cyclosporine A in inflammatory bowel disease. *J Cell Mol Med*. 2004; 8:317-28.
- Kvietikova I, Wenger, R. H., Marti, H. H., and Gassmann, M. The transcription factors ATF-1 and CREB-1 bind constitutively to the hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) DNA recognition site. *Nucleic Acids Res*. 1995; 23:4542-4550.
- La Flamme AC, Patton EA, Bauman B, Pearce EJ. IL-4 plays a crucial role in regulating oxidative damage in the liver during schistosomiasis. *J Immunol*. 2001; 166:1903-1911.
- Lawrence CE, Paterson JC, Wei XQ, Liew FY, Garside P, Kennedy MW. Nitric oxide mediates intestinal pathology but not immune expulsion during *Trichinella spiralis* infection in mice. *J Immunol*. 2000; 164:4229-4234.
- Lescano SA, Chieffi PP, Ikai DK, Ribeiro MC. Effects of cyclosporin A or betamethasone on experimental murine toxocariasis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2004; 37:22-4.
- Lescano, Susana A. Zevallos, Chieffi, Pedro Paulo, Ikai, Denise Katia et al. Efeitos da ciclosporina A e betametasona na toxocaríase murina experimental. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 2004; 37:22-24.
- Li CG, Rand MJ. Evidence for a role of nitric oxide in the neurotransmitter system mediating relaxation of the rat anococcygeus muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1989; 16:933-8.
- Li H, Poulos TL. Structure-function studies on nitric oxide synthases. *J Inorg Biochem*. 2005; 99:293-305.
- Ligas JA, Kerepesi LA, Galioto AM, Lustigman S, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D. Specificity and mechanism of immunoglobulin M (IgM)- and IgG-dependent protective immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. *Infect Immun*. 2003; 71:6835-43.
- Long XC, Bahgat M, Chlichlia K, Ruppel A, Li YL. Detection of inducible nitric oxide synthase in *Schistosoma japonicum* and *S. mansoni*. *J Helminthol*. 2004; 78:47-50.
- Long XC, Bahgat M, Chlichlia K, Ruppel A, Li YL. Detection of inducible nitric oxide synthase in *Schistosoma japonicum* and *S. mansoni*. *J Helminthol*. 2004; 78:47-50.

- Ly MN, Bethel SL, Usmani AS, Lambert DR. Cutaneous *Strongyloides stercoralis* infection: an unusual presentation. *J Am Acad Dermatol*. 2003; 49:S157-60
- Machado BH, Bonagamba LG. Microinjection of S-nitrosocysteine into the nucleus tractus solitarius of conscious rats decreases arterial pressure but L-glutamate does not. *Eur J Pharmacol*. 1992; 221:179-82.
- Machado ER, Ueta MT, de Fatima Goncalves-Pires Mdo R, Alves de Oliveira JB, Faccioli LH, Costa-Cruz JM. *Strongyloides venezuelensis* alkaline extract for the diagnosis of human strongyloidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003; 98:849-51.
- Machado ER, Ueta MT, Lourenço EV, Anibal FF, Roque-Barreira MC, Faccioli LH. Comparison of immune responses in mice infected with different strains of *Strongyloides venezuelensis*. *Parasite Immunol*. 2007; 29:549-57.
- Magnaval JF, Mansuy JM, Villeneuve L, Cassaing S. A retrospective study of autochthonous strongyloidiasis in Region Midi-Pyrenees (Southwestern France). *Eur J Epidemiol*. 2000; 16:179-82.
- Mansfield LS, Niamatali S, Bhopale V, Volk S, Smith G, Lok JB, Genta RM, Schad GA. *Strongyloides stercoralis*: maintenance of exceedingly chronic infections. *Am J Trop Med Hyg*. 1996; 55:617-24.
- Martínez A. Nitric oxide synthase in invertebrates. *Histochem J*. 1995; 27:770-776.
- Martins WA Melo AL, Nicoli JR, Roque De Carvalho MA, Almeida Lana M, Cardillo Vieira E, and Macedo Frias L. The obtaining of infective larvae of *Strongyloides venezuelensis* under axenic condition. *Microecology and Therapy*. 1999; 28:63-70
- Martins WA, Melo AL, Nicoli JR, Cara DC, Carvalho MA, Lana MA, Vieira EC, Farias LM. A method of decontaminating *Strongyloides venezuelensis* larvae for the study of strongyloidiasis in germ-free and conventional mice. *J Med Microbiol*. 2000; 49: 387-90.
- Maruyama H, Nawa Y, Ohta N. *Strongyloides venezuelensis*: binding of orally secreted adhesion substances to sulfated carbohydrates. *Exp Parasitol*. 1998; 89:16-20.
- Maruyama H, Yabu Y, Yoshida A, Nawa Y, Ohta N. A role of mast cell glycosaminoglycans for the immunological expulsion of intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*. *J Immunol*. 2000; 164:3749-54.
- Maruyama H, Nawa Y. *Strongyloides venezuelensis*: adhesion of adult worms to culture vessels by orally secreted mucosubstances. *Exp Parasitol*. 1997; 85:10-5.
- Masetti M, Locci T, Cecchetti A, Lucchesi P, Magi M, Malvaldi G, Bruschi F. Nitric oxide synthase in the nematode *Trichinella britovi*. Evidence for nitric oxide production by the parasite. *Intern J Parasitol*. 2004; 34:715-721.
- Masetti M, Locci T, Cecchetti A, Lucchesi P, Magi M, Malvaldi G, Bruschi F. Nitric oxide synthase immunoreactivity in the nematode *Trichinella britovi*. Evidence for nitric oxide production by the parasite. *Int J Parasitol*. 2004; 34:715-21.
- Masetti M, Locci T, Cecchetti A, Lucchesi P, Magi M, Malvaldi G, Bruschi F. Nitric oxide synthase immunoreactivity in the nematode *Trichinella britovi*. Evidence for nitric oxide production by the parasite. *Int J Parasitol*. 2004; 34:715-21.
- Matsuoka I, Nakahata N, Nakanishi H. Inhibitory effect of 8-bromo cyclic GMP on an extracellular Ca<sup>2+</sup>-dependent arachidonic acid liberation in collagen-stimulated rabbit platelets. *Biochem Pharmacol*. 1989; 38:1841-7.
- Mayer B, John M, and Böhme, E. Purification of a calcium/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor role of tetrahydrobiopterin. *FEBS Lett*. 1990; 277: 215-219.

- McKerrow JH, Brindley P, Brown M, Gam AA, Staunton C, Neva FA. *Strongyloides stercoralis*: identification of a protease that facilitates penetration of skin by the infective larvae. *Exp Parasitol*. 1990; 70:134-43.
- McLauchlan PE, Roberts HC, Chappell LH. Mode of action of cyclosporin A against *Hymenolepis microstoma* (Cestoda): relationship between cyclophilin binding and drug-induced damage. *Parasitology*. 2000; 121:6:661-70.
- Miki N, Kawabe Y, Kuriyama K. Activation of cerebral guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun*. 1977. 25; 75:851-6.
- Minning DM, Gow AJ, Bonaventura J, Braun R, Dewhirst M, Goldberg DE, Stamler JS. *Ascaris* haemoglobin is a nitric oxide-activated 'deoxygenase'. *Nature* 1999; 401:497-502.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991; 43:109-42.
- Mörlin B, Hammarström M. Nitric oxide increases endocervical secretion at the ovulatory phase in the female. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2005; 8:883-6.
- Mupanomunda M, Williams JF, Mackenzie CD, Kaiser L. *Dirofilaria immitis*: Heartworm infection alters pulmonary artery endothelial cell behaviour. *J Applied Physiol* 1997; 82:389-398.
- Nageswaran C, Craig PS, Devaney E. Coproantigen detection in rats experimentally infected with *Strongyloides ratti*. *Parasitology*. 1994; 108:335-42.
- Nakamura-Uchiyama F, Nagao T, Obara A, Ishiwata K, Nawa Y. Natural resistance of 129/SvJ mice to *Strongyloides venezuelensis* infection. *Parasite Immunol*. 2001; 23:659-63.
- Negrao-Correa D, Silveira MR, Borges CM, Souza DG, Teixeira MM. Changes in pulmonary function and parasite burden in rats infected with *Strongyloides venezuelensis* concomitant with induction of allergic airway inflammation. *Infect Immun*. 2003; 71:2607-14.
- Neva FA, Gam AA, Maxwell C, and Pelletier LL. Skin test antigens for immediate hypersensitivity prepared from infective larvae of *Strongyloides stercoralis*. *Am J Trop Med Hyg*. 2001; 65:567-72.
- Northern C and Grove DI. *Strongyloides stercoralis*: antigenic analysis of infective larvae and adult worms. *Int J Parasitol*. 1990; 20:381-7.
- Onah DN, Uchiyama F, Nagakui Y, Ono M, Takai T, Nawa Y. Mucosal defense against gastrointestinal nematodes: responses of mucosal mast cells and mouse mast cell protease 1 during primary *Strongyloides venezuelensis* infection in FcRgamma-knockout mice. *Infect Immun*. 2000; 68:4968-71.
- Overbergh L, Valckx D, Waer M, Mathieu C. Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine*. 1999; 11:305-312.
- Pagliari P. Differential biological effects of products of nitric oxide (NO) synthase: it is not enough to say NO. *Life Sci*. 2003; 73:2137-49.
- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987; 327:524-6.
- Palmer RM, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988. 30; 153:1251-6.
- Panaitescu D, Capraru T, Bugarin V. Study of the incidence of intestinal and systemic parasitoses in a group of children with handicaps. *Roum Arch Microbiol Immunol*. 1995; 54:65-74.

- Park KG, Hayes PD, Garlick PJ, Sewell H, Eremin O. Stimulation of lymphocyte natural cytotoxicity by L-arginine. *Lancet*. 1991; 337:645-6.
- Patton EA, La Flamme AC, Vasconcelos JAP. Central role for interleukin-4 in regulating nitric oxide-mediated inhibition of T-cell proliferation and gamma interferon production in schistosomiasis. *Infect Immun* 2002; 70:177-184.
- Peng BW, Lin J, Lin JY, Jiang MS, Zhang T. Exogenous nitric oxide induces apoptosis in *Toxoplasma gondii* tachyzoites via a calcium signal transduction pathway. *parasitology*. 2003; 126:541-50.
- Persson MG, Gustafsson LE, Wiklund NP, Moncada S, Hedqvist P. Endogenous nitric oxide as a probable modulator of pulmonary circulation and hypoxic pressor response in vivo. *Acta Physiol Scand*. 1990; 140:449-57.
- Pfaff AW, Schulz-key H, Soboslay PT, Geiger SM, Hoffmann WH. The role of nitric oxide in the innate resistance to microfilariae of *Litomosoides sigmodontis* in mice. *Parasite Immunol* 2000; 22:397-405.
- Pfarr KM, Fuhrman JA. *Brugia malayi*: Localization of nitric oxide synthase in a lymphatic filariid. *Exp Parasitol* 2000; 94: 92-98.
- Pfarr KM, Qazi S, Fuhrman J A. Nitric oxide synthase in filariae: demonstration of nitric oxide production by embryos in *Brugia malayi* and *Acanthocheilonema viteae*. *Exp Parasitol* 2001; 97:205-214.
- Pfarr KM, Qazi S, Fuhrman JA. Nitric oxide synthase in filariae: demonstration of nitric oxide production by embryos in *Brugia malayi* and *Acanthocheilonema viteae*. *Exp Parasitol*. 2001; 97:205-14.
- Pires ML, Dreyer G. The importance of *Strongyloides stercoralis* revisited. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 1993; 48:175-82.
- Porrás M, Martín MT, Terán E, Mourelle M, Vergara P. The nitric oxide donor LA-419 [S-(6-Nitro-oxi-hexahydro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)thioacetate] prevents intestinal dysmotility, bacterial translocation, and inflammation in a rat model of enteritis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008; 324:740-8.
- Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87:10043-7.
- Radomski MW, Salas E. Nitric oxide--biological mediator, modulator and factor of injury: its role in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1995; 118:S69-80.
- Rajan TV, Porte P, Yates JA, Keefer L, Shultz LD. Role of nitric oxide in host defense against an extracellular, metazoan parasite, *Brugia malayi*. *Infect Immun*. 1996; 64: 3351-3353.
- Rajan TV, Porte P, Yates JA, Keefer L, Shultz LD. Role of nitric oxide in host defense against an extracellular, metazoan parasite, *Brugia malayi*. *Infect Immun*. 1996: 64:3351-3.
- Ramos E, Olivos-García A, Nequiz M, Saavedra E, Tello E, Saralegui A, Montfort I, Pérez Tamayo R. *Entamoeba histolytica*: apoptosis induced in vitro by nitric oxide species. *Exp Parasitol*. 2007; 116:257-65.
- Rao, K.M. Molecular mechanisms regulating iNOS expression in various cell types. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews* 2000; 1:27-58.
- Reynolds JV, Daly JM, Zhang S, Evantash E, Shou J, Sigal R, Ziegler MM. Immunomodulatory mechanisms of arginine. *Surgery*. 1988; 104:142-51.

- Román-Sánchez P, Pastor-Guzmán A, Moreno-Guillén S, Igual-Adell R, Suñer-Generoso S, Tornero-Estébanez C. High prevalence of *Strongyloides stercoralis* among farm workers on the Mediterranean coast of Spain: analysis of the predictive factors of infection in developed countries. *Am J Trop Med Hyg.* 2003; 69:336-40.
- Román-Sánchez PR, Guzman AP, Guillen SM, Adell RI, Estruch AM, Gonzalo IN, Olmos CR. Endemic strongyloidiasis on the Spanish Mediterranean coast. *QJM.* 2001; 94:357-63.
- Romih R, Koroec P, Sedmak B, Jezernik K. Mitochondrial Localization of Nitric Oxide Synthase in Partially Differentiated Urothelial Cells of Urinary Bladder Lesions. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2008 in press
- Rugail E, Mattos T, Brisola AP 1954. Nova técnica para isolar larvas de nematódes das fezes: modificações do método de Baermann. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 14:5-8.
- Safer D, Brenes M, Dunipace S, Schad G. Urocanic acid is a major chemoattractant for the skin-penetrating parasitic nematode *Strongyloides stercoralis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104:1627-30.
- Salum C, Raisman-Vozari R, Michel PP, Gomes MZ, Mitkovski M, Ferrario JE, Ginestet L, Del Bel EA. Modulation of dopamine uptake by nitric oxide in cultured mesencephalic neurons. *Brain Res.* 2008; 1198:27-33.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning.* 2<sup>a</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1989.
- Sasaki Y, Yoshimoto T, Maruyama H, Tegoshi T, Ohta N, Arizono N, Nakanishi K. IL-18 with IL-2 protects against *Strongyloides venezuelensis* infection by activating mucosal mast cell-dependent type 2 innate immunity. *J Exp Med.* 2005; 202:607-16.
- Sato Y, Kobayashi J, Toma H, Shiroma Y. Efficacy of stool examination for detection of *Strongyloides* infection. *Am J Trop Med Hyg.* 1995; 53:248-250.
- Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology.* 2007; 15:252-9.
- Shiva S, Oh JY, Landar AL, Ulasova E, Venkatraman A, Bailey SM, Darley-Usmar VM. Nitroxia: the pathological consequence of dysfunction in the nitric oxide-cytochrome c oxidase signaling pathway. *Free Radic Biol Med.* 2005; 38:297-306.
- Siddiqui A.A, Berk SL. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Clin Infect Dis* 2001; 33:1040-47.
- Silveira MR, Nunes KP, Cara DC, Souza DG, Correa A Jr, Teixeira MM, Negrao-Correa D. Infection with *Strongyloides venezuelensis* induces transient airway eosinophilic inflammation, an increase in immunoglobulin E, and hyperresponsiveness in rats. *Infect Immun.* 2002; 70:6263-6272.
- Silveira MR, Nunes KP, Cara DC, Souza DG, Correa A Jr, Teixeira MM, Negrao-Correa D. Infection with *Strongyloides venezuelensis* induces transient airway eosinophilic inflammation, an increase in immunoglobulin E, and hyperresponsiveness in rats. *Infect Immun.* 2002; 70:6263-72.
- Steers NJ, Rogan MT, Heath S. In-vitro susceptibility of hydatid cysts of *Echinococcus granulosus* to nitric oxide and the effect of the laminated layer on nitric oxide production. *Parasite Immunol.* 2001; 23:411-7.
- Steers NJR, Rogan MT, Heath, DD. *In vitro* susceptibility of hydatid cysts of *Echinococcus granulosus* to nitric oxide and the effect of the laminated layer on nitric oxide production, *Parasite Immunol* 2001; 23:411-417.



- Stettler M, Siles-Lucas M, Sarciron E, Lawton P, Gottstein B, Hemphill A. *Echinococcus multilocularis* alkaline phosphatase as a marker for metacestode damage induced by in vitro drug treatment with albendazole sulfoxide and albendazole sulfone. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45:2256-62.
- Stettler M, Siles-Lucas M, Sarciron E, Lawton P, Gottstein B, Hemphill A. *Echinococcus multilocularis* alkaline phosphatase as a marker for metacestode damage induced by in vitro drug treatment with albendazole sulfoxide and albendazole sulfone. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45:2256-62.
- Sudré AP, Siqueira RC, Barreto MG, Peralta RH, Macedo HW, Peralta JM. Identification of a 26-kDa protein fraction as an important antigen for application in the immunodiagnosis of strongyloidiasis. *Parasitol Res.* 2007; 101:1117-23.
- Suputtamongkol Y, Kungpanichkul N, Silpasakorn S, Beeching NJ. Efficacy and safety of a single-dose veterinary preparation of ivermectin versus 7-day high-dose albendazole for chronic strongyloidiasis. *Int J Antimicrob Agents.* 2008; 31:46-9.
- Tanton, DD, Durning S and Chambers S. Pulmonary hyperinfection with *Strongyloides stercoralis* in an immunocompetent patient. *J. Gen. Intern. Med.* 2002; 17:72-73.
- Tarr PE, Miele PS, Peregoy KS, Smith MA, Neva FA, Lucey DR. Case report: Rectal administration of ivermectin to a patient with *Strongyloides* hyperinfection syndrome. *Am J Trop Med Hyg.* 2003; 68:453-5.
- Taylor MJ, Cross HF, Mohammed AA, Trees AJ, Bianco AE. Susceptibility of *Brugia malayi* and *Onchocerca lienalis* microfilariae to nitric oxide and hydrogen peroxide in cell-free culture and from IFN gamma-activated macrophages. *Parasitology* 1996; 112: 315-322.
- Tezuka H, Imai S, Tsukidate S, Fujita K. A *Dirofilaria immitis* polyprotein up-regulates nitric oxide production. *Infect Immun* 2002; 70:5283-5286.
- Thomas GR, McCrossan M, Selkirk ME. Cytostatic and cytotoxic effects of activated macrophages and nitric oxide donors on *Brugia malayi*. *Infect Immun* 1997; 65:2732-2739.
- Thomas GR, McCrossan M, Selkirk ME. Cytostatic and cytotoxic effects of activated macrophages and nitric oxide donors on *Brugia malayi*. *Infect Immun.* 1997;65:2732-9.
- Torrentes D, Prats N, Vergara P. Inducible nitric oxide synthase inhibitors ameliorate hypermotility observed after *Trichinella spiralis* infection in the rat. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 1035-1049.
- Touil-Boukoffa C, Bauvois B, Sanceau J, Hamrioui B, Wietzerbin J. Production of nitric oxide (NO) in human hydatidosis: relationship between nitrite production and interferon- $\gamma$  levels. *Biochimie* 1998; 80:739-744.
- Vadlamudi RS, Chi1 DS, Krishnaswamy1 G. Intestinal strongyloidiasis and hyperinfection síndrome. *Clinical and Molecular Allergy* 2006; 4:8
- Van Doorn HR, Koelewijn R, Hofwegen H, Gilis H, Wetsteyn JC, Wismans PJ, Sarfati C, Vervoort T, van Gool T. Use of enzyme-linked immunosorbent assay and dipstick assay for detection of *Strongyloides stercoralis* infection in humans. *J Clin Microbiol.* 2007; 45:438-42.
- Vighi G, Schroeder J, Gallo C, Ortolani C. 'Enterotest' and *Strongyloides stercoralis*. *Lancet.* 1989; 2:156-7.
- Vilahur G, Pena E, Padró T, Badimon L. Protein disulphide isomerase-mediated LA419-NO release provides additional antithrombotic effects to the blockade of the ADP receptor. *Thromb Haemost.* 2007; 97:650-7.
- Vincent S. R, and Hope, B. T. Neurons that say NO. *Trends Neurosci.* 1992; 15:108-113.

- 
- Viney ME. The biology and genomics of *Strongyloides*. *Med Microbiol Immunol*. 2006; 195:49-54.
- Viney y Lok. *Strongyloides* spp. *WormBook*. 2007, 23:1-1.
- Wandurska-Nowak E, Hadas E, Derda M, Wojt W. Effect of nitric oxide releasing drugs on the intensity of infection during experimental trichinellosis in mice. *Parasitol Res* 2003; 90:164-165.
- Wandurska-Nowak E, HadaśE, Derda M, Wojt W. Effect of nitric oxide releasing drugs on the intensity of infection during experimental trichinellosis in mice. *Parasitol Res*. 2003; 90:164-5.
- Warren W, Biggs PJ, el-Baz M, Ghoneim MA, Stratton MR, Venitt S. Mutations in the p53 gene in schistosomal bladder cancer: a study of 92 tumours from Egyptian patients and a comparison between mutational spectra from schistosomal and non-schistosomal urothelial tumours. *Carcinogenesis* 1995; 16:1181-1189.
- Wei CC, Wang ZQ, Tejero J, Yang YP, Hemann C, Hille R, Stuehr DJ. Catalytic reduction of a tetrahydrobiopterin radical within nitric oxide synthase. *J Biol Chem*. 2008 *in-press*
- West SD, Suliburk JW, Helmer KS, Mercer DW. Cyclooxygenase-1 suppresses lipopolysaccharide-induced changes in rat gastric inducible nitric oxide synthase. *Crit Care Med*. 2008; 36:572-9.
- Winkler S, Menyawi I, Linnau KF, Graninger W. Short report: total serum levels of the nitric oxide derivatives nitrit/nitrate during microfilarial clearance in human filarial disease. *Am J Trop Med Hyg*. 1998; 59:523-525.
- Yang S, Healey MC. The immunosuppressive effects of dexamethasone administered in drinking water to C57BL/6N mice infected with *Cryptosporidium parvum*. *J Parasitol*. 1993; 79:626-30.
- Zafar MU, Vilahur G, Choi BG, Ibanez B, Viles-Gonzalez JF, Salas E, Badimon JJ. A novel anti-ischemic nitric oxide donor (LA419) reduces thrombogenesis in healthy human subjects. *J Thromb Haemost*. 2007; 5:1195-200.