



Universidad Central de Venezuela

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Departamento de Biología Celular

**ESTUDIO DE MECANISMOS NEUROTÓXICOS EN LA CO-INFECCIÓN
POR VIH Y *Toxoplasma gondii* MEDIANTE UN MODELO *IN VITRO***

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

**Presentado ante la Ilustre Universidad Central
de Venezuela por el bachiller José A. Carrero Salas**

como requisito para optar al título de

Licenciado en Biología

Tutores: Dr. Miguel Alfonzo

Dr. Gilberto Payares

CARACAS, VENEZUELA

Septiembre de 2012

Dedicatoria

Este triunfo lo dedico primeramente a Dios por cuidar siempre de mí, guiarme y por estar en los momentos de felicidad y en los de dura prueba. Y porque estará todos los días hasta el fin del mundo.

A mis padres Rosa M. y José V. C., a mis hermanos, y a mis sobrinos

Amigos y colegas.

Y a todas las personas del mundo que viven con esta dura enfermedad, la provocada por la infección del virus VIH y la enfermedad oportunista producida por *Toxoplasma gondii*.

Los ojos de Dios velan por la ciencia, mas él trastorna las cosas de los prevaricadores (Proverbio; 22: 12)

Mas ¿dónde se hallará la sabiduría? ¿Dónde está el lugar de la inteligencia?, he aquí que el temor del Señor es la sabiduría, y el apartarse del mal, la inteligencia (Job; 28: 12, 28).

AGRADECIMIENTOS

- El presente trabajo es fruto de un gran esfuerzo en el que han contribuido muchas personas ayudándome y a las que quisiera expresar mi gratitud, pues no hay palabras para agradecerles su apoyo incondicional.
- Primeramente y ante todo quiero agradecer a Dios por la vida que me ha otorgado, por el regalo que me ha obsequiado y el mayor de todos dado a la humanidad, el regalo de la salvación y la vida eterna en Jesús.
- A mis padres por darme la vida y por su apoyo incondicional, por su gran amor y afecto y estar siempre en los momentos buenos y malos. Por creer que las metas si son posibles si se toma el arado y sin mirar atrás se avanza como está escrito en la bendita palabra de Dios. A ellos les tengo mucho que agradecer para llevar a cabo esta meta y por su constante apoyo y atención. A mis hermanos: Miguel y Luis por estar siempre atentos y prestarme tanto apoyo y aprecio, infinitas gracias. Agradecido también estoy de todos mis familiares. Se les quiere.
- A mis hermanos de la fe, a los cuales les debo mucho entusiasmo, oraciones, rogativas, etc., dirigidas al Creador de la vida para avanzar un eslabón.
- Mis agradecimientos especiales al Prof. Dr. Miguel Alfonzo, Catedrático de Fisiología y con profundos conocimientos en el universo del VIH, y tutor de esta Tesis de Grado. A él gracias por instruirme y transmitirme mucho de su apreciado y valorado conocimiento. Aunque en muchos momentos se generaron tensiones difíciles y muy duras, todo sirvió para edificación pero más aún le agradezco todas las correcciones tanto personales como en todos los trabajos escritos y especialmente en este. De él nacieron las ideas para emprender este camino, consecuencia de un altísimo número de trabajos de investigación

realizados durante toda su vida y que, lejos de cerrar un capítulo, han dejado nuevas líneas abiertas. Es una fuente inacabable de pensamiento que hace posible el progreso de la ciencia, arrastrando consigo a un numerosísimo grupo de personas que se encarga de formar diariamente y que acaba transformando en grandes profesionales. Un millón de gracias.

- A mi ilustre Universidad Central de Venezuela por abrirme las puertas a la superación y a la accesibilidad al conocimiento, mucho más valioso que el oro; gracias a esta casa de estudios alcancé esta meta, “la casa que vence las sombras”.
- A mis profesores por su dedicación en la formación de nuevos profesionales de la República. Especialmente a mí jurado la profesora Elizabeth Merentes y Cristina Sanoja por sus recomendaciones y consejos y su evaluación profesional, al profesor Gilberto Payares por sus valiosos consejos y correcciones, y por haberme acompañado como mi tutor académico en este tiempo, un millón de gracias.
- A mi país al cual pertenezco y que nos brinda la oportunidad de superación, Venezuela
- A mis amigos de la carrera, a los que continuaron y también a los que decidieron tomar otro rumbo en sus vidas. Agradezco profundamente a mi amigo Leopoldo Ruso y a su madre, la Dra. Justa Fernández por su colaboración y ayuda incondicional, a Gina y a Ana por su atención y la colaboración prestada, por su amistad y confianza, un universo de gracias. A mi equipo del laboratorio de Inmunofisiología celular por su apoyo y colaboración, citando a Ydelis ausente ya, a Wolfgang, Eduardo pero especialmente a mi amigo y compañero de trabajo Edwin, por su ayuda en todos los ámbitos, paciencia, bondad y por la enseñanza

en las técnicas de cultivo y por todos los conocimientos que me impartió para lograr esta meta sin él el trabajo no se hubiera logrado con tanto éxito y a su familia que nos acompañó en muchos momentos.

- A la sra., y profesora Gloria Páez y su familia por ayudarme en todos los momentos y prestarme su colaboración incondicional, ya que de los momentos difíciles me sacaron y al tío Rubén por su colaboración y consejos. Sin ellos mi estadía en la cuna de Bolívar hubiese sido limitada. También agradezco a mi hermano Antonio Roa, su esposa e hijos por la estadía durante el desarrollo y culminación de la carrera, por el apoyo moral y también económico, por la confianza prestada y por que fueron mi familia y lo seguirán siendo, a todos infinitamente gracias. A Negrin por su compañía durante la escritura.
- A todos mis amigos de otras áreas y también a todas aquellas personas que a lo largo de mi vida me han colaborado, que si los menciono construiría un libro con sus valiosos nombres.
- A la sra., María Ochoa y esposo el Prof. Reyes por su apoyo incondicional. A mi hermanos pastores Lux y Sergio Avendaño y a sus hijos por colaborarme y continuar haciéndolo en estos momentos, por la confianza y colaboración, a mis otros hermanos cercanos: Laury, Richard, Emma, Deiby, Josue, Israel, Oswaldo, Yarubi, Jessica, Wilmer, Eleana, Lucmey, Domingo, José Félix, Gladysmar, Félix; Carmen, Nahida, Yaneth, Dimas, Humberto, Blanca, Walter, Ana, Paola, Coralia, Mili, Rael, Ismael, Yuma, Angele, Darcely, Nicolás, Beatriz, Angel Ríos, Antonia y otros. A todos ustedes un millón de gracias.

RESUMEN

Desde la década de los 80 se conoce que el VIH es un virus neurotrópico que afecta al SNC, donde los pacientes infectados presentan alteraciones de este sistema que son independientes de la presencia de infecciones oportunistas y, que evolutivamente llevan al desarrollo de fatiga, trastornos cognitivos y conductuales y un cuadro demencial entre el 7~15% de los pacientes en fase de SIDA, denominado HAD (HIV-associated dementia). Los mecanismos responsables de esta neurotoxicidad pueden ser directos (partículas virales, gp41, gp120) e indirectos (producción de mediadores proinflamatorios: NO, interleucinas). Por otra parte, el deterioro del sistema inmune del paciente infectado puede dar lugar a la aparición de enfermedades oportunistas como la toxoplasmosis, producida por el protozooario *T. gondii* por reactivación de quistes en el cerebro (previa infección primaria) causando necrosis, y granulomas que puede conducir a la muerte por encefalitis toxoplásmica. Es por esto que el estudio de las interacciones específicas entre el parásito, el virus y los diferentes tipos de células nerviosas que se establecen en la co-infección es esencial para la comprensión de la inmunopatología que se da en el SNC. Se han descrito diversos modelos *in vitro* para estudiar por separado el efecto que tienen la infección por VIH y la infección por *T. gondii* sobre el SNC; incluyen cultivos primarios de células nerviosas humanas, líneas de células nerviosas humanas y cultivos primarios de células nerviosas de ratón y de rata. Basado en esto, quisimos evaluar el efecto neurotóxico de la presencia simultánea del VIH o de una glicoproteína viral, la gp41 y el *Toxoplasma gondii* sobre células del sistema nervioso central, usando un modelo *in vitro* de cultivos primarios de células nerviosas de fetos de rata de la cepa Sprague Dawley que permite evaluar y hacer inferencia con cierto grado de comprensión sobre los efectos dañinos que se suscitan en el SNC con la presencia de ambos patógenos.

A estos cultivos celulares se les midió la producción de óxido nítrico (NO) (Reacción de Griess); la apoptosis y necrosis de estas células (citometría de flujo); su viabilidad (azul de Tripano) y la expresión intracelular del factor de transcripción NFκB (citometría de flujo). Los resultados obtenidos indican que la proteína gp41 y la partícula viral completa afectaron notablemente a estas células nerviosas, ocasionando una alta mortalidad (medida por el azul de Tripano), alta frecuencia de apoptosis y necrosis en relación a los controles. Aunado a esto, se pudo observar que estos dos factores (gp41, VIH) (por separado) indujeron una alta producción de NO en estos cultivos, cuya concentraciones del radical está directamente correlacionado con la apoptosis inducida. A pesar que la presencia de taquizoítos de *T. gondii* ocasionó una alta mortalidad en estas células, no fue mediada ni por apoptosis ni por la producción de NO, ya que los valores obtenidos fueron similares a los del grupo control, sugiriendo que son otros mecanismos neurotóxicos los responsables de la patología en el SNC producida por este protozooario. Finalmente, en la presencia simultánea de gp41/*T. gondii* o VIH/*T. gondii* se observó que los efectos de daño se potenciaron detectándose los mayores valores de mortalidad, de apoptosis, necrosis y NO respecto a todas las condiciones de cultivo, aunado con alta expresión del factor nuclear NFκB. Estas evidencias demuestran que

nuestro modelo de estudio de los mecanismos neurotóxicos de la presencia simultánea del VIH/*T. gondii* nos permite dar una explicación aproximada a lo que se puede estar desarrollando en el SNC en pacientes co-infectados con VIH/*T. gondii*. Estas evidencias nos sugiere que hay una participación no sólo del virus y sus proteínas sobre la activación de mecanismos neurotóxicos en el SNC, sino que también el parásito contribuye al daño al replicarse masivamente generando áreas necróticas y potenciando estos mecanismos neurotóxicos indirectamente. Todo esto permite que se establezcan las condiciones apropiadas para que ocurra la fase final que es la encefalitis toxoplásmica en los pacientes co-infectados. Estos resultados pueden arrojar luces para establecer mejores terapias para las diferentes alteraciones del SNC que ocurren durante la co-infección VIH/*T. gondii*.

ÍNDICE

INDICE DE FIGURAS.....	1
ABREVIACIONES.....	3
1.- INTRODUCCIÓN.....	5
2.- ANTECEDENTES.....	7
2.1.- Epidemiología actual del VIH/SIDA.....	7
2. 2.- El VIH. Características generales.....	14
2.2.1.- El virus.....	14
2.3.- Las fases clínicas de la infección.....	18
3.- EL VIH Y EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC).....	19
3.1.- El parénquima cerebral y la barrera hematoencefálica.....	19
3.2.- El proceso de infección del VIH en el SNC.....	21
3.3.- Los mecanismos neurotóxicos producidos por el VIH.....	25
3.4.- El cuadro clínico de la infección por VIH en el SNC.....	29
4.- LA TOXOPLASMOSIS.....	30
4.1.- <i>Toxoplasma gondii</i> . Características generales.....	30
4.1.1.- El protozoario.....	31
4.1.2.- Epidemiología actual de la toxoplasmosis.....	31
4.1.2.1.- Epidemiología en Venezuela.....	33
4.1.3.- Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i>	34
4.1.4.- Las fases clínicas de la infección.....	35
4.2.- Respuesta inmunológica contra <i>Toxoplasma gondii</i>	36
4.3.- La Inmunopatología de la Toxoplasmosis.....	38
5.- LA CO-INFECCIÓN VIH/ <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	39
5.1.- Epidemiología de la co-infección VIH/ <i>Toxoplasma gondii</i>	39
5.2.- Aspectos neurotóxicos. Mecanismos proinflamatorios en el SNC.....	40
5.3.- Papel del sistema inmunológico en la co-infección.....	42

6.- EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NUCLEAR KB (NFκB).....	42
6.1.- Inhibidores del NFκB.....	45
6.2.- El NFκB en el SNC.....	45
6.2.1.- Activadores de la vía NFκB en el SNC.....	46
7.- EL ÓXIDO NÍTRICO (NO).....	48
7.1.- Producción del Óxido Nítrico.....	49
7.2.- Efecto Citotóxico del Óxido Nítrico.....	51
7.3.- Determinación del Óxido Nítrico en Modelos Biológicos.....	52
8.- EL CULTIVO DE CÉLULAS NERVIOSAS.....	53
9.- OBJETIVOS.....	55
10.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
11.- RESULTADOS.....	64
12.- DISCUSIÓN.....	90
13.- CONCLUSIONES.....	107
14.- BIBLIOGRAFÍA.....	109

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Panorama general de infección por VIH.....	8
Figura 2.- Número de personas que viven con el VIH y descubrimientos científicos, desde 1981 a 2011.....	13
Figura 3.- Estructura del Virus de Inmunodeficiencia Humana.....	16
Figura 4.- Cuadro clínico y perfil serológico de la infección por VIH que ilustran tres etapas del proceso de infección.....	19
Figura 5.- La localización de los diferentes tipos de células en el cerebro.....	21
Figura 6.- La neuro-invasión del VIH y formación de células gigantes multinucleadas.....	24
Figura 7.- Mecanismos de neurodegeneración y neuroprotección en SIDA.....	28
Figura 8.- Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i>	35
Figura 9.- Desarrollo de la respuesta inmune contra la infección por <i>T. gondii</i>	37
Figura 10.- Inhibición de las vías de señalización en células inmune.....	39
Figura 11.- Factor de transcripción κ B.....	44
Figura 12.- Producción de Óxido Nítrico (NO).....	50
Figura 13.- Viabilidad de células nerviosas cultivadas con gp41 / <i>T. gondii</i>	65
Figura 14.- Viabilidad de células nerviosas cultivadas con VIH / <i>T. gondii</i> ..	66
Figura 15.- Mortalidad de células nerviosas cultivadas con gp41/ <i>T. gondii</i>	67
Figura 16.- Mortalidad en células nerviosas cultivadas con VIH / <i>T. gondii</i>	69
Figura 17.- Citograma de apoptosis de células nerviosas cultivadas con gp41.....	71
Figura 18.- Citograma de apoptosis de células nerviosas tratadas con gp41/ <i>T. gondii</i> ..	72
Figura 19.- Apoptosis de células nerviosas cultivadas con gp41/ <i>T. gondii</i>	73
Figura 20.- Citograma de apoptosis de células nerviosas tratadas con VIH/ <i>T. gondii</i> ...	74
Figura 21.- Apoptosis de células nerviosas cultivadas con VIH/ <i>T. gondii</i>	76

Figura 22.- Necrosis en células nerviosas cultivadas con gp41/ <i>T. gondii</i>	77
Figura 23.- Necrosis en células nerviosas cultivadas con VIH / <i>T. gondii</i>	78
Figura 24.- Producción de Óxido Nítrico en celulas nerviosas tratadas con gp41/ <i>T. gondii</i>	80
Figura 25.- Producción de Óxido Nítrico en células nerviosas cultivadas con VIH / <i>T. gondii</i>	81
Figura 26.- Correlación de Óxido Nítrico versus Apoptosis en células nerviosas cultivadas con gp41/ <i>T. gondii</i>	82
Figura 27.- Correlación de Óxido Nítrico versus Apoptosis en células nerviosas cultivadas con VIH / <i>T. gondii</i>	83
Figura 28.- Citograma de la expresión del Factor Nuclear de transcripción κ B en Astrocitos de fetos de rata correspondiente al control del ensayo de incubación de células nerviosas con VIH / <i>T. gondii</i>	84
Figura 29.- Citograma de la expresión del Factor Nuclear de transcripción κ B en Astrocitos de fetos de rata incubados con VIH / <i>T. gondii</i>	86
Figura 30.- Expresión del Factor Nuclear κ B en Astrocitos de fetos de rata cultivados cin VIH / <i>T. gondii</i>	87
Figura 31.- Producción de Óxido Nítrico en células nerviosas de feto de rata y en células mononucleares de sangre periférica.....	89

ABREVIACIONES

APC: células presentadoras de antígeno

BHE: Barrera Hematoencefálica..

C-18: Cyclophilin-18.

CAM-1: Intercellular adhesion molecule

CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad.

Env: gp160

Fas/CD95: superfamilia de receptores TNF.

HAART: Highly active anti-retroviral therapy.

IFN- γ : Interferón gamma..

IFR-1: Factor regulador del Interferón gamma-1.

IgG: Inmunoglobulina G

iNOS: inducible Nitric Oxide Sintasa.

Nef: Negative factor

NF κ B: Factor de Transcripción Nuclear kappa B.

NK: células asesinas naturales

NMDA: N-metil-D-aspartato.

NO. Nitric oxide ó Óxido Nítrico.

PBMC: Peripheral blood mononuclear cells o células mononucleares de sangre periférica (CMSP).

PHA: Phytoematoaglutinina.

QUIN: Ácido quinólico. Neurotóxina

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

SNC: Sistema Nervioso Central.

SN: Sistema Nervioso.

Tat: Transactivating regulatory protein

TE: Toxoplasmosis Encefálica.

TGF- β 1: Factor transformante del crecimiento beta-1.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α .

VIH-1: Virus de inmunodeficiencia humana tipo 1

Vpr: Viral protein R

Vpu: Viral protein U

1.- INTRODUCCIÓN

En los últimos años, todas las formas de inmunodeficiencia han quedado opacadas por una forma epidémica de inmunodeficiencia grave causada por el agente patógeno llamado virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). La enfermedad que produce este virus, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), fue descrita en Estados Unidos en 1981 en las ciudades de Los Ángeles, Nueva York y San Francisco en un grupo de individuos homosexuales. La evaluación completa de estos individuos puso de manifiesto que tenían en común una deficiencia notable de las reacciones inmunitarias celulares y un decremento sustancial de la subpoblación de células T portadora del marcador CD4 (células colaboradoras) (Kindt y col., 2007).

Luc Montagnier y su equipo del Instituto "Louis Pasteur" de París, fueron quienes descubrieron el agente causal de este síndrome (Barre y col., 1983). Este retrovirus fue denominado inicialmente LAV o HTLV3 (Gallo y col., 1983) y en 1986, el Comité Internacional de Taxonomía de virus, recomendó denominarlo como virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Coffin y col., 1986).

Se ha estimado que a nivel mundial, para el año 2007, existían aproximadamente 33 millones de personas infectadas con VIH. Diariamente, más de 6.800 personas contraen infección por el VIH y más de 5.700 personas infectadas con este virus fallecen a causa del sida. Actualmente, la pandemia del VIH aun sigue siendo uno de los desafíos más importantes, en cuanto se refiere a enfermedades infecciosas para la salud pública. Si no existe un mayor progreso en la reducción de la tasa de nuevas infecciones por el VIH, sería imposible invertir el curso de la epidemia mundial de VIH y sostener los avances

en la ampliación del tratamiento, aunque en los últimos años el acceso al tratamiento se ha extendido poco a poco (ONUSIDA, 2009).

La infección viral resulta en un profundo desorden en el sistema inmunológico que se caracteriza por la pérdida de las células TCD4⁺ de la circulación y de los tejidos linfoides durante el curso de la infección (Stein y col., 1992; Pantaleo y col., 1996). Esta disminución progresiva de las células TCD4⁺ coincide con el aumento de la carga viral, lo cual puede ser un factor contribuyente al eventual colapso del sistema inmunológico y al consecuente desarrollo de infecciones oportunistas, las cuales son la principal manifestación clínica de la infección VIH (Fauci, 1996; Gazzinelli y col., 1997). Una de estas manifestaciones oportunistas es la toxoplasmosis, causada por *Toxoplasma gondii* la cual, debido a la pérdida de linfocitos T CD4⁺ de los pacientes co-infectados, puede desarrollar una encefalitis fatal necrosante (TE, Toxoplasmosis encefálica) que conduce a la muerte de los mismos en la fase de SIDA (Grant y col., 1990; Sadler y col., 1998). La toxoplasmosis ha sido considerada dentro de las diez infecciones oportunistas más peligrosas en pacientes VIH⁺ (Luft y col., 1992). Se ha reportado una mortalidad por TE a nivel mundial hasta del 30% en enfermos inmunocomprometidos e infectados con *Toxoplasma* (Lyons y col., 1995; McFadden y col., 2001). En individuos inmunológicamente no comprometidos y crónicamente infectados con *Toxoplasma*, los bradizoítos salen del quiste tisular y se diferencian a taquizoítos, diseminándose por todo el organismo. Esta reactivación de los parásitos de un estado crónico a uno agudo, se asocia con la migración de los taquizoítos a través de la barrera hemato-encefálica hacia órganos vitales como el cerebro en donde producen cuadros de encefalitis y posteriormente muerte.

Existen numerosos estudios sobre el tema, en su mayoría enfocados sobre los efectos de la co-infección en el progreso del cuadro clínico del paciente VIH⁺, sin embargo, los trabajos referentes a los mecanismos neurotóxicos que ocurren durante la co-infección VIH/Tx en el sistema nervioso central durante la progresión de la infección viral y por parte del protozoario, son muy escasos (Camacho, 2009). Por lo tanto, quisimos evaluar el efecto neurotóxico de la presencia simultánea de VIH y *Toxoplasma gondii* sobre células del sistema nervioso central, usando un modelo *in vitro* de cultivos primarios de células nerviosas de fetos de rata de la cepa Sprague Dawley.

2.- ANTECEDENTES

2.1.- Epidemiología actual del VIH/SIDA.

Desde su descubrimiento en 1981, el SIDA ha alcanzado proporciones epidémicas por todo el planeta (Biachi, 2006; Kindt y col., 2007), y hace 30 años, los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) publicaron el primer informe oficial sobre lo que se conocería como la epidemia de VIH. En ese primer informe había pocos indicios de que la información pronosticaba la epidemia más grave de los tiempos modernos.

Las primeras señales de la enfermedad estuvieron confinadas principalmente a los países de ingresos altos, donde el número de casos nuevos aumentó exponencialmente a principios de la década de 1980. En realidad, el VIH se había estado propagando de manera desapercibida durante decenios, sobre todo en África subsahariana. Entre 1981 y 2000, el número de personas infectadas con el VIH aumentó de menos de un millón a unos 27,5 millones. El virus apareció en momentos distintos en diversas regiones, pero finalmente afectó todos los lugares del mundo. Sin embargo, pese a la magnitud de la

epidemia, la comunidad mundial no consiguió desplegar una respuesta durante los primeros dos decenios. Cuando se estableció el ONUSIDA, en 1996, el gasto total invertido en los programas de lucha contra el VIH en los países de ingresos bajos y medianos se mantenía por debajo de los US\$ 300 millones; y, en 1998, mucho después de que quedó claro que esos países representaban el 95% o más de la carga mundial del VIH, el gasto total en los entornos con pocos recursos aún era inferior a los US\$ 500 millones.

Aunque quizá la década de 1980 haya sido el período en que más se requirió una respuesta eficaz, antes de que las cifras alcanzaran las proporciones de una crisis, las consecuencias últimas de la falta de medidas gubernamentales se hicieron más evidentes en la década de 1990, sobre todo en África meridional. Mientras que en 1990 menos del 1% de los adultos sudafricanos vivían con el VIH, 10 años después el porcentaje había aumentado a 16,1%. (Onusida., 2011).

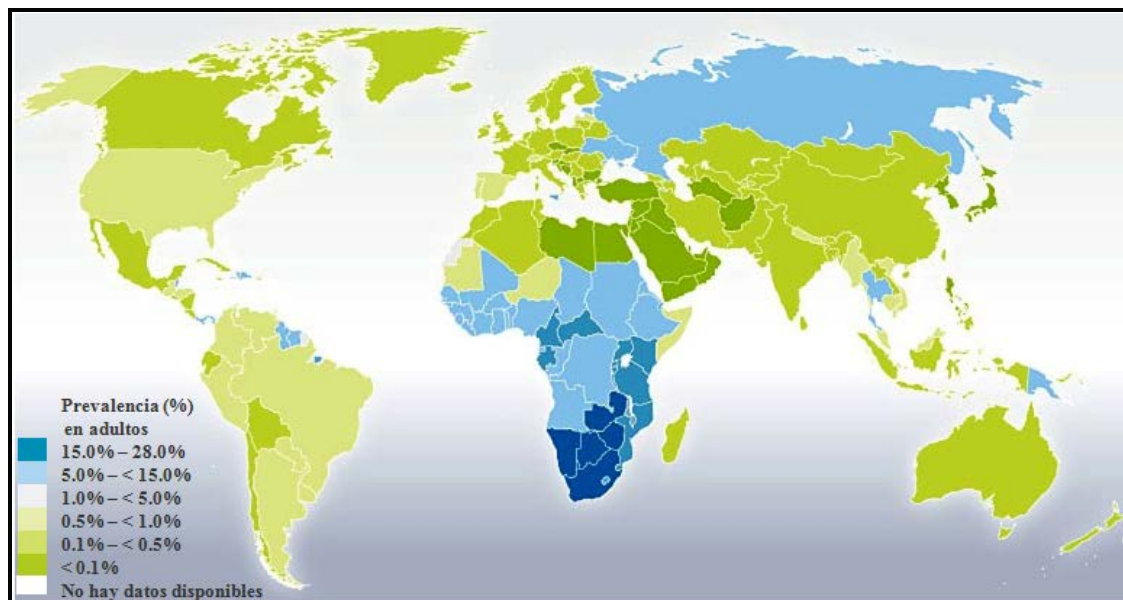


Figura 1.- Panorama general de infección por el VIH. 40.3 millones de personas que viven con el VIH) (Castro, 2012).

En 2008, el número de personas que viven con el VIH en todo el mundo es aproximadamente 33,4 millones. El número total fue más de un 20% superior que la cifra publicada en el año 2000 y la prevalencia de la infección, en líneas generales, fue tres veces superior a la de 1990. Sin embargo, la tasa de crecimiento se ha mantenido relativamente constante en la población de personas que vive con el VIH. Además, en ese año 2008, la cifra estimada de nuevas infecciones por el VIH fue de 2,7 millones, con un número de defunciones en el mundo por enfermedades relacionadas con el sida de aproximadamente 2 millones, el cual representa el 30% menos que el punto máximo de la epidemia registrado 12 años antes. Esto posiblemente se deba al aumento de la población que recibe tratamiento antirretroviral. Efectivamente, hasta diciembre de 2008, aproximadamente 4 millones de personas en países de ingresos medios y bajos recibían tratamiento; un aumento diez veces mayor en cinco años (ONUSIDA, 2009). Además, los conocimientos científicos sobre el VIH aumentaron a un ritmo constante entre los años 1981 y 2000. El virus se identificó en 1983 y la primera prueba serológica estuvo disponible en 1985. En la década de 1990, los estudios demostraron la posibilidad de disminuir considerablemente el riesgo de transmisión vertical en los países de ingresos bajos y medianos.

Después de obtenerse resultados limitados con los primeros compuestos antirretrovíricos, en 1996 se consiguió la aprobación reglamentaria de una nueva clase de medicamentos antirretrovíricos, los inhibidores de proteasas, que marcaron el comienzo de la era de la terapia antirretrovírica altamente eficaz. La terapia antirretrovírica combinada resultó ser un avance muy importante y disminuyó rápidamente en dos terceras partes o más el porcentaje de fallecimientos por sida en

muchos países de ingresos altos; debido a su elevado costo, su disponibilidad estuvo muy limitada en los países de ingresos bajos y medianos entre 1996 y 2000. Una excepción importante fue Brasil, que en 1996 se convirtió en el primer país de ingresos medianos en adoptar una política nacional de terapia antirretrovírica gratuita. Además del tratamiento de la infección por el VIH en sí misma, en las décadas de 1980 y 1990 también se alcanzaron logros considerables en cuanto al desarrollo de tratamientos y pautas preventivas para numerosas enfermedades oportunistas relacionadas con la infección por el VIH, lo que permitió ayudar a prevenir o retrasar la enfermedad y la muerte y mejorar la calidad de vida de las personas que viven con el VIH. Sin embargo, un rasgo característico de los primeros dos decenios de la epidemia fue la incapacidad general de los dirigentes para aplicar los conocimientos científicos (ONUSIDA, 2011)

Debido a la falta de intervención, las tasas de infección por el VIH y las muertes relacionadas con el sida siguieron aumentando. Hubo un aumento considerable de la inversión en la respuesta al VIH en los países de ingresos bajos y medianos entre 2001 y 2009, con un aumento del gasto total de casi 10 veces, esto es, de US\$ 1.600 millones a US\$ 15.900 millones. Quizá el logro más notable en el ámbito de la respuesta al VIH haya sido la extraordinaria ampliación del acceso al tratamiento (ONUSIDA, 2011).

A nivel mundial, el número de pacientes con SIDA se distribuye con mas uniformidad entre varones y mujeres, y en África subsahariana, región con la incidencia más elevada de SIDA, más de la mitad (alrededor de 57%) de las personas afectadas son mujeres (Kindt y col. 2007) Se estima que en África subsahariana vivían 25.8 millones de personas con SIDA a finales del 2005, y que había otros 7.4 millones en el sur sudeste de Asia. En todo el mundo hay

unos 40.3 millones de personas con SIDA, entre ellas más de 2.3 millones de niños menores de 15 años de edad. Además, millones de niños han quedado huérfanos al morir sus padres a causa de este padecimiento (ONUSIDA, 2008)

En diciembre de 2010, unos 6,6 millones de personas de los países de ingresos bajos y medianos estaban recibiendo tratamiento antirretrovírico, lo que representó un aumento de 1,4 millones con respecto al año anterior. Entre 2001 y 2010, el número de personas que recibieron tratamiento antirretrovírico aumentó casi 22 veces. En África subsahariana, por ejemplo, el número de personas que recibieron tratamiento antirretrovírico en 2010 aumentó un 31%, y en Oriente Medio y África del Norte, un 21%. La ampliación del acceso al tratamiento ha permitido sustituir la desesperación por la esperanza. Desde su aparición, en 1996, la terapia antirretrovírica altamente activa ha ahorrado unos 14,4 millones de años de vida en todo el mundo hasta diciembre de 2009. Aunque el 54% de los años de vida ahorrados entre 1995 y 2009 correspondieron a Europa Occidental y América del Norte, donde la terapia antirretrovírica ha estado disponible durante mucho tiempo, en África subsahariana se han ahorrado 3,7 millones de años de vida. El ritmo de la reducción de la morbilidad y mortalidad en África subsahariana se ha acelerado desde 2005, a raíz de la ampliación radical del programa. En diciembre de 2010, unos nueve millones de personas reunían los requisitos para recibir tratamiento antirretrovírico, pero no lo recibieron. Si bien unos 420.000 a 460.000 niños estaban recibiendo tratamiento antirretrovírico a finales de 2010, la cobertura del tratamiento para los niños es considerablemente más baja que la cobertura para las personas de todas las edades (28% en comparación con 36% en 2009). En 2009, casi una de cada cinco personas (18%) que comenzaban la terapia antirretrovírica en un país de bajo o mediano ingreso ya no la estaba cumpliendo 12

meses después. Conforme la resistencia a los medicamentos aumenta, el número de pacientes que requerirán medicamentos de segunda y tercera generaciones será mayor. Si bien la terapia antirretrovírica es la piedra angular del tratamiento y la atención, los resultados de salud pueden optimizarse por medio de servicios holísticos centrados en las necesidades de cada individuo; por ejemplo, los alimentos nutritivos son fundamentales para las personas que viven con el VIH, cuya probabilidad de morir poco después de haber iniciado el tratamiento es 2 a 6 veces mayor si están desnutridos. El número de niños que contrajeron el VIH en 2009 fue alrededor de 370.000 (230.000 a 510.000) que representa un 26% menos que en 2001. El mundo posee las herramientas para garantizar una generación sin VIH en 2015, pero se requiere grandes esfuerzos.

Las estadísticas sugieren que el VIH en **América Latina** está bajo control. La prevalencia en la población general está estable en 0,4%, más de la mitad de las personas que requieren tratamiento pueden recibirlo y el acceso universal al tratamiento es una realidad en Brasil, Costa Rica y México; además, Costa Rica informó cero casos de transmisión vertical en 2009. Sin embargo, estas cifras esconden disparidades. La prevalencia del VIH en algunos países es alarmantemente alta entre los hombres que tienen relaciones sexuales con hombres (HSH; hasta 20,3%), entre los profesionales del sexo (hasta 19,3%) y entre las personas transgénero (hasta 34%). Existe voluntad política: el 95% de la respuesta al sida de la región es financiada con recursos internos. En 2006, América Latina fue una de las primeras regiones en comprometerse con el acceso universal cuando los actores interesados se reunieron en Brasil para tratar la ampliación de los programas de lucha contra el VIH. Las barreras sociales, culturales y económicas arraigadas hacen que las mujeres y niñas y los grupos de población clave se encuentren en mayor riesgo de infección (ONUSIDA, 2011).

Durante los últimos 30 años, América Latina ha mantenido bajos los índices de infección. Las consultas de 2006 y 2011 demuestran que la región está respondiendo a los más grandes desafíos de la epidemia y todo indica que está siguiendo el curso correcto.

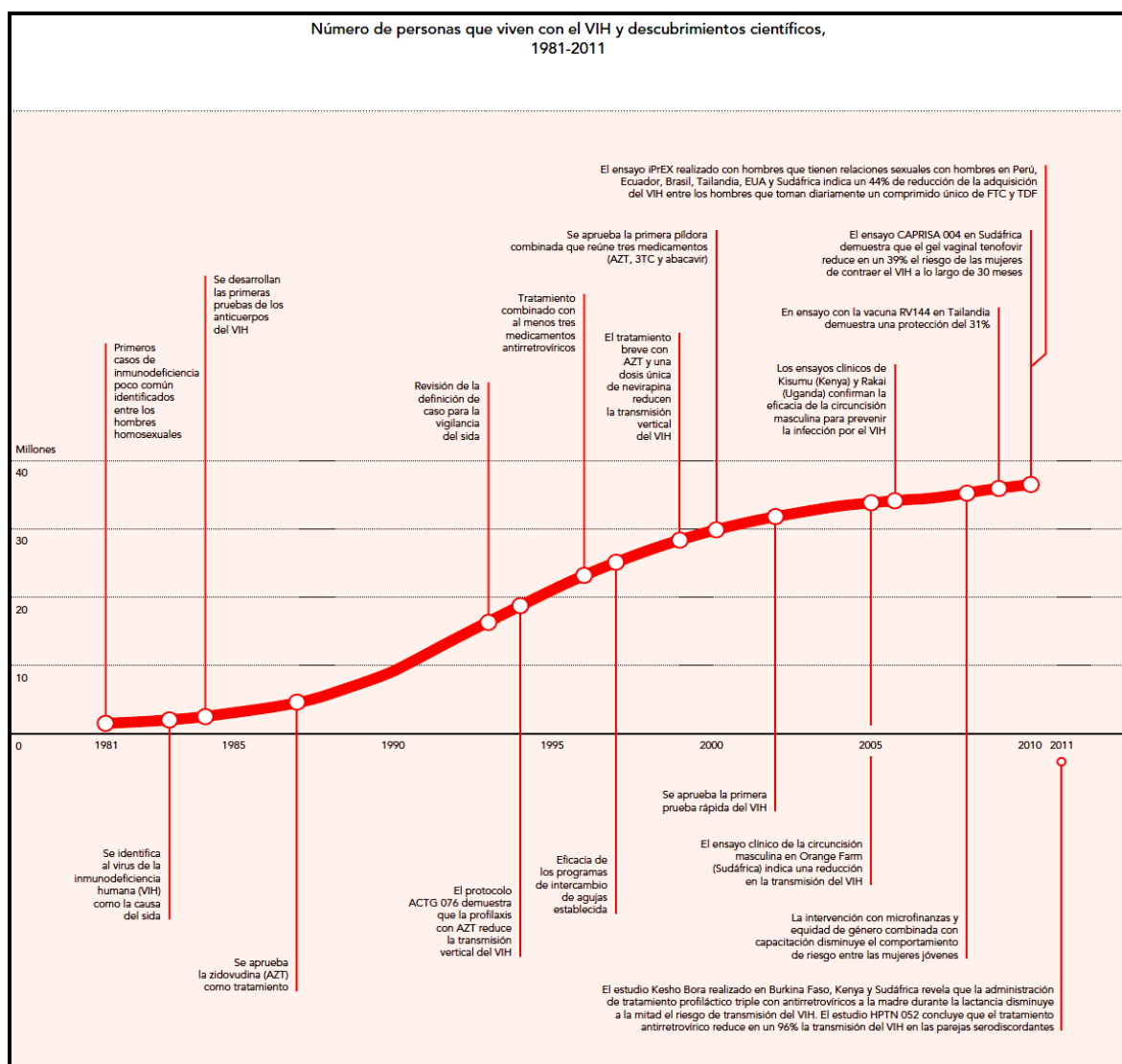


Figura 2.- Número de personas que viven con el VIH y descubrimientos científicos, desde 1981 a 2011 (ONUSIDA, 2011).

En **Venezuela** se reportó el primer caso de VIH en el año 1982 y a partir de esta fecha la cifra de personas que viven con VIH en el país ha crecido de manera sostenida. La prevalencia de VIH en adultos para el año 2004 oscila entre 0,56% y 1,05%, donde el

escenario promedio genera una prevalencia de 0,75%. Adicionado a esto, los nuevos casos oscilan entre 6.510 y 12.450 mientras que las muertes oscilan entre 5.930 y 11.410 para ese año del 2004. El número de hombres infectados es de 81.150, oscilando entre 60.480 y 113.070 varones, mientras que las mujeres infectadas representan 33.200 personas con un mínimo de 24.720 y un máximo de 46.290 mujeres. Para el año 2007 vivían 104.860 personas con VIH y sida, pero si se mantienen los supuestos, para el año 2015, se proyectaría un total de 172.420 infectados (escenario promedio). El número de pacientes embarazadas que viven con VIH y sida atendidas en el periodo de 1999 hasta abril 2008 es de 1.610. Es importante destacar que existe una pauta nacional y política de Estado, a toda embarazada seropositiva se le dota gratuitamente de fórmulas lácteas para la nutrición del recién nacido, equipos de bioseguridad para la atención del parto y terapia antirretroviral profiláctica. Actualmente existen 30 mil personas que reciben la terapia múltiple antirretroviral, acompañada de seguimiento clínico, inmunológico, virológico y de resistencia (ONUSIDA/ Venezuela, 2009).

2.2.- El VIH. Características generales

2.2.1.- El virus

El VIH presenta dos tipos: el VIH tipo 1 (VIH-1) y el VIH tipo 2 (VIH-2), ambos son transmitidos por contacto sexual, a través de la sangre y de madre a hijo. Los dos tipos pueden producir una sintomatología similar en el humano, así como son similares morfológicamente y comparten el mismo linfotropismo celular CD4+; es decir, preferencialmente infectan a las células TCD4+, que expresan sobre su superficie al receptor del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (CMH II) (Grant y col., 1997; Grant y col., 1998). Comparten, además la misma citopatogenicidad y poseen proteínas estructurales y replicativas, incluyendo la transcriptasa reversa. Por estudios

genéticos se ha demostrado que el VIH-2 presenta diferencias en su genoma que lo distinguen del VIH-1, y que lo hacen menos susceptible a los dideoxineucleosidos; como el AZT (azidotimidina o zidovudina) que es un potente inhibidor de la replicación viral y es usado como medicamento contra el SIDA. El VIH-2, sin embargo, se encuentra solo en África Occidental y en la India el VIH-1 es el virus que está más extendido a nivel mundial y es el principal causante del SIDA (LaBonte y col., 2003).

Tabla 1.- Se muestra de manera resumida la epidemiología del VIH en todo el mundo donde se incluye el número de adultos y niños que presentan VIH actualmente, las nuevas infecciones por VIH, prevalencia en adultos, y defunciones por SIDA (ONUSIDA. 2009).

	Adultos y niños que viven con el VIH	Nuevas infecciones por el VIH en adultos y niños	Prevalencia del VIH en adultos (15-49) [%]	Defunciones de adultos y niños por causa del sida
África subsahariana	22,4 millones [20,8 – 24,1 millones]	1,9 millones [1,6 – 2,2 millones]	5,2 [4,9 – 5,4]	1,4 millones [1,1 – 1,7 millones]
África del Norte y Oriente Medio	310 000 [250 000 – 380 000]	35 000 [24 000 – 46 000]	0,2 [<0,2 – 0,3]	20 000 [15 000 – 25 000]
Asia meridional y sudoriental	3,8 millones [3,4 – 4,3 millones]	280 000 [240 000 – 320 000]	0,3 [0,2 – 0,3]	270 000 [220 000 – 310 000]
Asia oriental	850 000 [700 000 – 1,0 millones]	75 000 [58 000 – 88 000]	<0,1 [<0,1]	59 000 [46 000 – 71 000]
América Latina	2,0 millones [1,8 – 2,2 millones]	170 000 [150 000 – 200 000]	0,6 [0,5 – 0,6]	77 000 [66 000 – 89 000]
Caribe	240 000 [220 000 – 260 000]	20 000 [16 000 – 24 000]	1,0 [0,9 – 1,1]	12 000 [9300 – 14 000]
Europa oriental y Asia central	1,5 millones [1,4 – 1,7 millones]	110 000 [100 000 – 130 000]	0,7 [0,6 – 0,8]	87 000 [72 000 – 110 000]
Europa occidental y central	850 000 [710 000 – 970 000]	30 000 [23 000 – 35 000]	0,3 [0,2 – 0,3]	13 000 [10 000 – 15 000]
América del Norte	1,4 millones [1,2 – 1,6 millones]	55 000 [36 000 – 61 000]	0,6 [0,5 – 0,7]	23 000 [9100 – 55 000]
Oceanía	59 000 [51 000 – 68 000]	3900 [2900 – 5100]	0,3 [<0,3 – 0,4]	2000 [1100 – 3100]
TOTAL	33,4 millones [31,1 – 35,8 millones]	2,7 millones [2,4 – 3,0 millones]	0,8 [<0,8 – 0,8]	2,0 millones [1,7 – 2,4 millones]

Diciembre de 2009 Sp. Los intervalos de las estimaciones presentadas en este cuadro, que están basadas en la mejor información disponible, definen los márgenes dentro de los cuales se encuentran los datos reales.

El virión contiene dos copias de ARN genómico, cada una de aproximadamente 9.2 kilobases (kb) de longitud, encerradas dentro de un “core” de proteínas virales, y rodeadas de una doble capa de fosfolípidos derivados de la membrana celular del hospedador (ver **figura 3**) (Abbas y col., 1999; Alcaro y col., 2003). Además el

virión, utiliza la enzima transcriptasa reversa para llevar a cabo la transferencia de información, una endonucleasa de ADN (integrasa) y una proteasa (Frankel y col., 1998). El genoma del VIH comparte la estructura básica de todos los retrovirus conocidos, con las secuencias llamadas *gag*, que codifica proteínas estructurales; las secuencias *env* que codifican glicoproteínas de la envoltura; y las secuencias *pol* que codifican la transcriptasa inversa, la endonucleasa y la proteasa viral. Además de estos genes típicos de los retrovirus, el VIH tiene al menos otros seis genes, el *vpr*, el *vif*, el *tat*, el *rev*, el *nef* y el *vpu*, cuyos productos regulan la reproducción del virus de diferentes formas (Abbas y col., 1995).

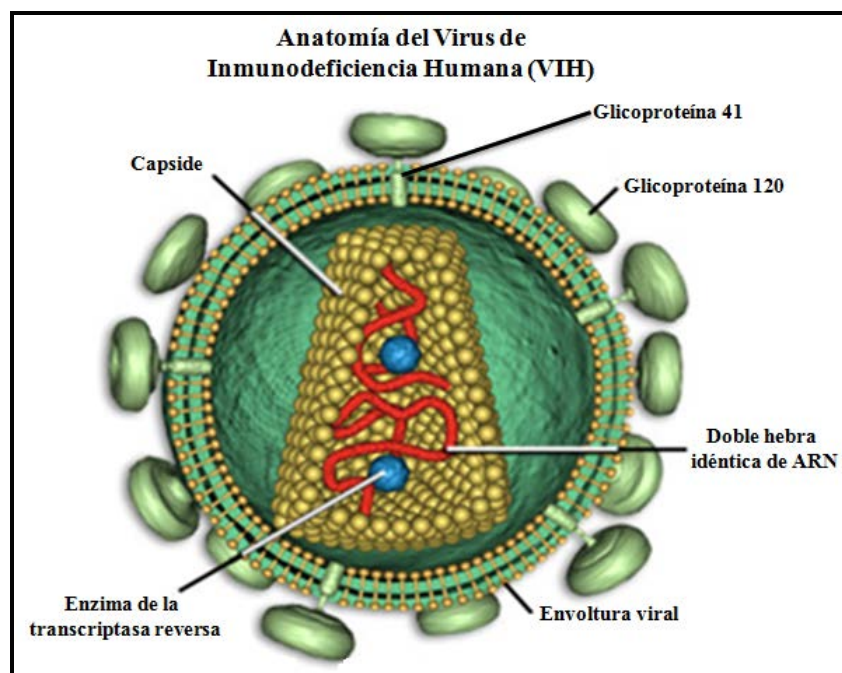


Figura 3.- Estructura del Virus de Inmunodeficiencia Humana. Se muestra las proteínas de actividad enzimática, integral y de superficie de la membrana, el material genético y la bicapa de fosfolípidos (www.blogsida.com)

La infección por el VIH se produce cuando las partículas virales de la sangre, el semen u otro líquido corporal de un individuo se une a las células de otro individuo. Dos glicoproteínas de cubierta del VIH son críticas para la infección

del VIH, la gp120 y la gp41. El primer paso de la infección del VIH es la unión de alta afinidad de la gp120 a la molécula CD4 de la superficie de una célula T o de un fagocito mononuclear (Bridget y col. 2004). Las partículas de una célula infectada pueden unirse a una célula no infectada. Por otra parte, la gp120, que se expresa en la membrana plasmática de las células infectadas antes de que se libere el virus, puede unirse al CD4 de otra célula, fusionando las membranas, con lo que el genoma del VIH puede pasar de una célula a otra directamente. Las partículas del VIH que se unen al CD4 entran en las células mediante fusión directa de la membrana viral con la membrana celular del hospedador, y este proceso lo facilitan las moléculas gp41 de la membrana viral (Valdes, 2002). En un modelo actual de infección por el VIH, la unión de la gp120 al CD4 permite a la molécula gp41 insertar su cabeza amino terminal hidrofóbica en la membrana celular adyacente, iniciando la fusión de la envoltura del virus con la célula (Bridget y col., 2004).

Desde el reconocimiento del SIDA en 1981, considerables esfuerzos por investigadores se han dedicado a identificar el mecanismo mediante por el cual el VIH-1 causa esta enfermedad, y dos hipótesis principales han sido remitidas. La primera hipótesis es que el VIH causa una disminución de los linfocitos TCD4⁺ al infectar e inducir la muerte en estas células. La segunda, está basada en las observaciones que tanto células infectadas como no infectadas son afectadas y donde el VIH perjudica indirectamente la función de estas últimas células, tal vez debido a una reacción aberrante de la infección por la respuesta inmune del hospedador (Stevenson, 2003).

2.3.- Las fases clínicas de la infección viral.

En la **figura 4** se muestra el cuadro clínico de esta infección viral. En pacientes infectados que no están bajo tratamiento antirretroviral, se ha podido identificar al menos 3 fases evolutivas distinguibles de la infección con VIH: Fase inicial, precoz o aguda, intermedia o crónica y la fase final o Sida (Alimonti y col. 2003). En la fase aguda, la entrada del VIH en el organismo, está relacionada con la virulencia de la cepa de VIH y la capacidad de respuesta del sistema inmunológico de la persona infectada. Entre las 2-6 semanas del contagio se detectan los antígenos del VIH (por ejemplo el antígeno p24), entre las 4-12 semanas aparecen los anticuerpos circulantes, donde este periodo la inmunidad celular y el antígeno p24 disminuyen y descienden las células infectadas. En la fase crónica la duración está comprendida entre 7-10 años, persistiendo en ésta la proliferación viral, aunque en un nivel bajo (Derdeyn y Hunter, 2008). Los pacientes pueden ser asintomáticos, con o sin adenopatías, los niveles de plaquetas son bajos, presentan algunos trastornos neurológicos, detectados por pruebas electrofisiológicas. Dependiendo de cada individuo, es estimado que en 10 años el 50% de los adultos y el 80% de los niños evolucionarían a estadios más avanzados, donde influyen diversos factores. Finalmente pueden llegar al SIDA, donde la replicación del VIH aumenta en esta etapa coincidiendo clínicamente con una profunda alteración del estado general del paciente. En este periodo comienzan a aparecer las graves infecciones oportunista, algunas neoplasias y alteraciones neurológicas, de modo que en el paciente se establece la fase de SIDA (Kaplan y col., 1998). Esto ocurre generalmente cuando las células TCD4⁺ decaen por debajo de las 200 células/ μ l de sangre periférica (Alfonzo y col., 2008; Camacho, 2009).

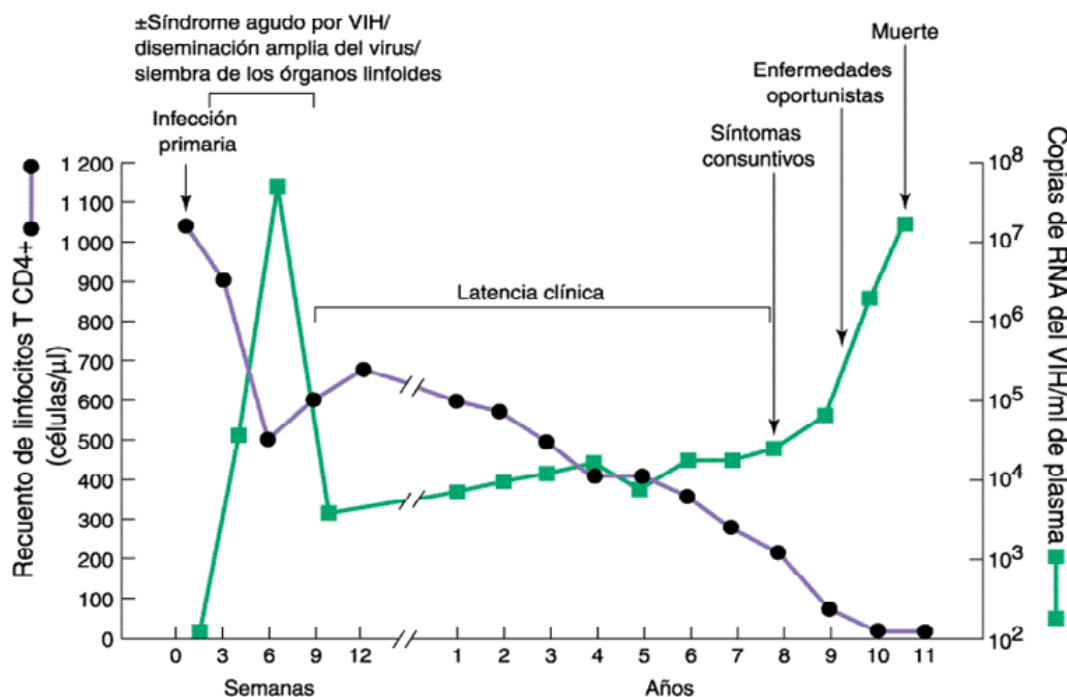


Figura 4. Cuadro clínico y perfil serológico de la infección por VIH que ilustra tres etapas del proceso de infeccioso. Poco después de la infección es perceptible ARN vírico en el suero. Sin embargo, la infección por el VIH se identifica más a menudo por la presencia de anticuerpos anti-VIH después de la seroconversión, que ocurre casi siempre en plazo de unos cuantos meses después de contraerse la infección. Por lo general no aparecen síntomas clínicos indicadores del SIDA durante al menos ocho años después de la infección, aunque este intervalo es variable. El inicio clínico del SIDA es anunciado por el descenso de células T y aumento de la carga viral (Fauci y col., 1996).

3.- EL VIH Y EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

3.1.- El parénquima cerebral y la barrera hematoencefálica.

El Sistema Nervioso Central (SNC) humano contiene alrededor de 10^{12} neuronas (1 billón). También posee de 10 a 50 veces este número de células gliales (Ganong, 1992). Estas últimas se reconocen en el SNC como astrocitos, oligodendrocitos y células de microglía. Los astrocitos proporcionan asistencia metabólicas a las neuronas, regulación del microambiente neuronal y regulación del aporte hemático, mientras que los

oligodendrocitos intervienen en la mielinización de las neuronas en el SNC (Conti, 2010).

En 1885, P. Ehrlich demuestra por primera vez la existencia de la **Barrera Hematoencéfálica (BEH)**, la cual limita la comunicación directa entre el SNC y el resto del organismo (González y col., 2005). La BHE es una red compleja de uniones estrechas de las células endoteliales, cuya función principal es regular el paso de sustancias presente en la sangre (Huber y col., 2001), por consiguiente esta barrera funciona bajo el reconocimiento de transportadores específicos que controlan un sistema de transporte asimétrico a lo largo de la microvasculatura que estructura la BHE, y también bajo la regulación de astrocitos situados alrededor de este tejido (Guyton, 1989; Courad, 1999). Las células endoteliales de los capilares cerebrales expresan uniones cerradas y adherentes. Las primeras están constituidas por tres proteínas integrales de membrana: clausina, ocludina y JAM (molécula de adhesión conectiva) y varias proteínas citoplasmáticas (ZO-1, ZO-2, ZO-3, cingulina y otras) que interactúan con la actina, la principal proteína citoesquelética para la conservación de la integridad estructural del endotelio. La segunda está constituida por caderina. La propiedad de los capilares de delimitar el flujo paracelular es debido a las uniones cerradas que existe entre las células endoteliales (Guyton, 1997; Pascual y col., 2004; Conti, 2010).

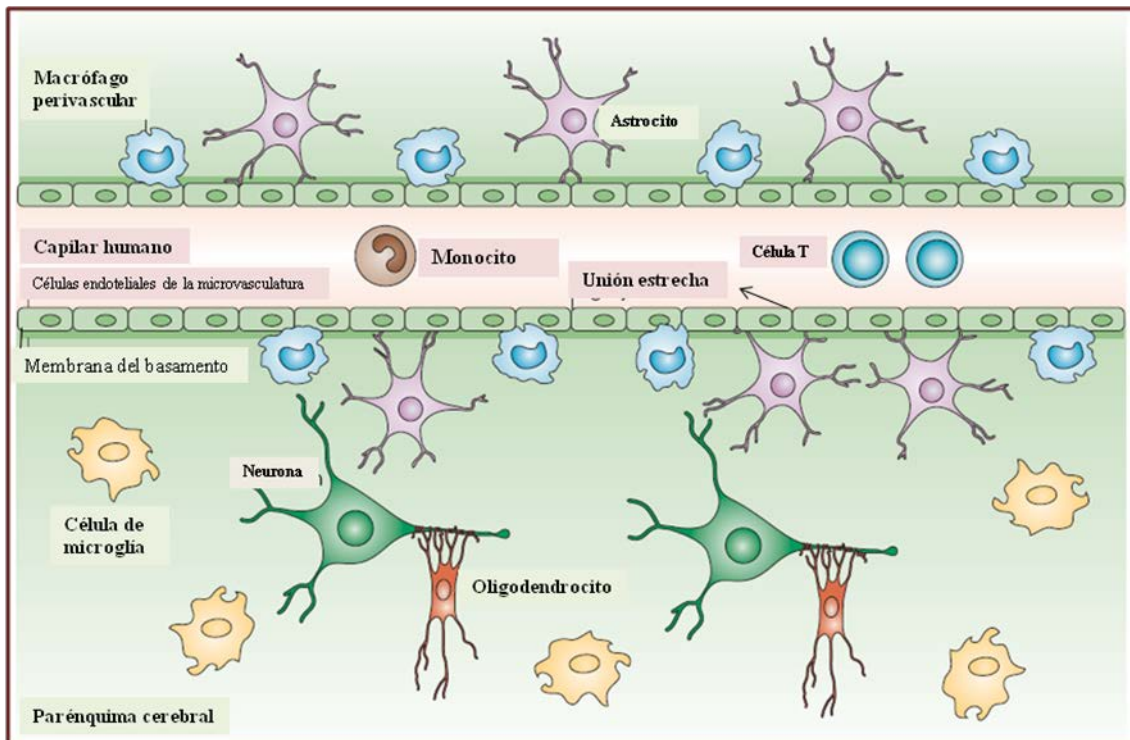


Figura 5. La localización de las diferentes tipos de células en el cerebro. El parénquima cerebral está separado del resto del cuerpo por la barrera hematoencefálica, que es permeable a ciertas sustancias e impermeable a otras, formada por una capa de células continua enlazada por uniones estrechas. Provee protección anatómica y fisiológica al SNC y regula el tráfico de sustancias (drogas, agua, proteínas, etc) y células de la sangre al cerebro. Están presentes los macrófagos: contribuyen en la respuesta inmune provenientes de monocitos. Astrocitos: son cruciales en la permeabilidad de la BEH y tiene un gran rol en homeostasis, metabolismo y soporte de las neuronas. Oligodendrocitos: encargados de la mielinización de los axones en las neuronas y de soporte. Neuronas: células encargadas de la transmisión nerviosa y unidad fundamental del SN (González y col., 2005).

3.2.- El proceso de infección del VIH en el SNC

El líquido céfalo-raquídeo, la barrera sanguínea del epitelio del plexo coroidal, y la BEH limitan la comunicación directa entre el SNC y el resto del organismo (Guyton, 1997; González y col., 2005) por lo que alteraciones de la estructura del epitelio en esta membrana puede favorecer la entrada del virus al SNC. Por consiguiente, se sabe que la BEH funciona bajo el reconocimiento de enzimas específicas que tiene como trabajo el control del transporte asimétrico a todo lo largo de la estructura de la BEH, y actúa

también bajo el control de los astrocitos que se encuentra situado alrededor de este tejido (Guyton, 1989; Ganong, 1992; Courad, 1999).

Se ha sugerido que el virus ingresa al SNC a través de monocitos y macrófagos de sangre periférica, hipótesis que es apoyada por el hallazgo frecuente de calcificaciones de los ganglios de la base (Valdes, 2002). Otra posibilidad es la invasión directa como virus libre a través del plexo coroidal o a través de las células endoteliales. Los mecanismos a través de los cuales la infección por VIH produce daño en el sistema nervioso (SN) no están completamente aclarados. Estudios realizados en cerebros de niños fallecidos por infección del VIH demuestran que el virus infecta principalmente macrófagos y microglía, ubicados en ganglios basales, núcleo subtalámico, sustancia negra, núcleo dentado y sustancia blanca (Sharer, 1992). Estas células expresan receptores CD4+ y citocinas (CCR5 y CXCR4) que permiten que el virus ingrese a ellas (Moroni y col., 2003). Por otra parte, el principal hallazgo neuropatológico asociado a la encefalitis VIH corresponde a la formación de células gigantes multinucleadas que serían producto de la fusión de macrófagos y microglías infectadas y no infectadas. En el caso de los astrocitos incorporan el virus a través de receptores CCR5 y CXCR4; actúan como reservorio viral, diseminando el virus a macrófagos y microglía (Martín y col., 2002).

A partir del momento en el que el virus atraviesa la BEH, comienza a propagarse y a proliferar activamente, a través de los macrófagos, quienes pueden desplazarse por el sistema ventricular, los canales de la materia gris, y a través del cuerpo calloso (Persidsky y col., 2003). Los macrófagos no son el tipo celular infectados principalmente por el VIH en el SNC. Cuando esto sucede, la función normal de estas células se ve alterada notablemente (Hesselgesser y col., 1999) y debido a que el SNC

actúa como un sistema altamente integrado de elementos, el funcionamiento irregular de los macrófagos tiene importantes consecuencias en el resto de las células del cerebro.

Estudios recientes han mostrado durante la infección por VIH, alteraciones de la estructura de la microvasculatura, adelgazamiento de la lámina basal y filtrado de proteínas séricas, implicadas en la disrupción de las láminas estrechas de la BEH (Guillemin y col., 2004). Uno de los factores más relevantes parece ser la proteína Rho, de las familias de las G-proteínas, la cual activa rutas de señalización que regulan la organización del citoesqueleto, que podría comprometer las uniones estrechas, y propiciar el tráfico de monocitos al SNC (Price y col., 1988; Persidsky y col., 2003)

A pesar de lo anterior, los monocitos y macrófagos no atraviesan fácilmente la BHE, a menos que expresen moléculas de adhesión de macrófagos, presentes en el endotelio que los active (Stins y col., 2003). Un importante elemento atrayente es la proteína-1 quimio-atrayente de monocitos, producida por los astrocitos que rodean la BHE, favoreciendo la trasmigración de células infectadas (Gelbard y col., 1995; Gonzalez y col., 2005). Otro compuesto involucrado en esto es el Ácido Quinólico (QUIN), una neurotoxina derivada del catabolismo del triptófano en el cerebro. El QUIN es producido mayormente por monocitos, y puede causar la ruptura abrupta de la BEH, también se ha encontrado que en inflamación del encéfalo, hay una sobreproducción de QUIN, principalmente por macrófagos, lo cual induce la liberación de proteína-1 quimio-atrayente de monocitos por astrocitos (Gendelman y col., 1994; Guillemin y col., 2004), favoreciendo así la ruptura de la BEH y la entrada de monocitos infectados al SNC. La molécula de adhesión intercelular-1 (Intercellular adhesion molecule-1/CAM-1), la cual es expresada en el endotelio, en bajas concentraciones en condiciones normales del cerebro (Lesueur, 1996; Stin y col., 2003), y en condiciones

más altas en caso de encefalitis virales, como la asociada con VIH y puede inducir protuberancia en la BHE al unirse y activar proteína tirosina cinasa p60 (Liu y col., 2003)

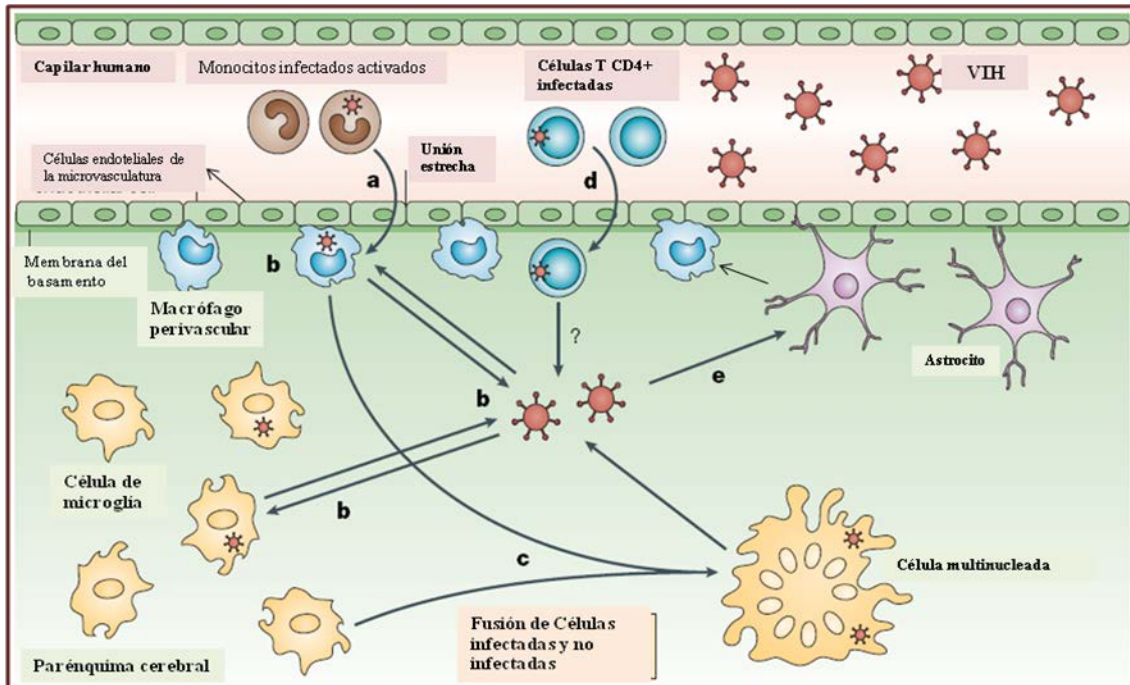


Figura 6. La neuro-invasión del VIH y formación de células gigantes multinucleadas. a) El VIH ingresa al cerebro, a través de monocitos infectados que atraviesa la BEH. Los monocitos se transforman a macrófagos perivascular. b) La microglía se infecta y contribuye a la producción del virus. Además, la activación de la microglía puede conducir a un rol en los mecanismos de la neuropatogénesis. c) las glicoproteínas del virus son expresadas en la superficie de las células infectadas mediando así la fusión con células que expresan el CD4 y correceptores. La fusión incluye macrófagos y microglía. Y el resultado es la formación de las células gigantes multinucleadas que producen virus. d) El virus puede ingresar también en células TCD4 infectadas luego de reclutados, que contribuyen en la replicación. e) Afecta a los astrocitos por varios mecanismos produciendo citocinas y quimiocinas que contribuye a neuropatogénesis (González y col., 2005).

Los factores vasoactivos secretados por el endotelio, también están involucrados en el aumento de la permeabilidad de la BHE, como el óxido nítrico (NO) (Boven y col., 1999), cuya producción por la microvasculatura puede ser estimulada por el factor de

necrosis tumoral. Esta liberación de NO contribuye a la permeabilidad de la BEH, así como a la adhesión y proliferación de leucocitos (Courad y col., 1999; Combs y col., 2001). El péptido vasoconstrictor endotelina-1 (ET-1) también participa activamente en la infección del VIH en el SNC, este induce la proliferación de astrocitos, y puede contribuir a la proliferación de células gliales y a las implicaciones en la actividad de procesos inflamatorios (Courad y col., 1999; Dawson, 1999). La L-Cisteína liberada en macrófagos tiene la capacidad de activar en exceso los receptores de NMDA (N-metil-D-aspartato), aumentando a niveles tóxicos el calcio intracelular, la cual se ha encontrado que esta molécula, la L-Cisteína, se activa en respuesta a la gp120 (Garden y col., 2002). También en este proceso de infección del virus, se activa la interleucina 1 β , proveniente de macrófagos (Xion y col., 2000).

3.3.- Los mecanismos neurotóxicos producidos por el VIH

El sistema nervioso central constituye uno de los principales escenarios anatómicos para la persistencia de la infección por VIH. Estudios de anatomía patológica han demostrado la presencia de partículas virales principalmente a nivel de astroglia, microglia, oligodendrocitos y en menor proporción la población neuronal. (Vitkovic y col., 1998; von Bernardi y col., 2004). El VIH infecta a macrófagos perivasculares y células de la microglía en el cerebro, causando alteraciones en las funciones neurológicas por mecanismos directos (mediados por proteínas virales) e indirectos (mediados por mecanismos inflamatorios) (Weisselingsh y col., 1993; Weissenhorn y col., 1997)

Se ha descrito que la exposición de neuronas al líquido extracelular de macrófagos y astrocitos infectados que contienen altas concentraciones de proteínas virales, citocinas y productos celulares tóxicos, producen excesiva activación de receptores de glutamato,

particularmente los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) con un incremento del flujo de calcio a la célula y la consiguiente muerte neuronal (Epstein y col., 1993; Campisi, 2003). Según el trabajo de Gelbard y col. (1995) se han identificado tres factores virales responsables de estos procesos:

1. La glicoproteína de la envoltura viral, o gp120, que promueve el estrés oxidativo e induce apoptosis neuronal.

2. La proteína reguladora no estructural del virus VIH, Tat, neurotóxica en cultivos de neuronas fetales humanas mediante activación de receptores de glutamato (kainato) y productora de estrés oxidativo por disminución de la actividad de la enzima manganeso superóxido dismutasa.

3. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y ácido araquidónico. Los macrófagos infectados con VIH y activados por astrocitos producen citocinas altamente neurotóxicas como son el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), IL 1 β , IL1 α , IL6, factor activador plaquetario, leucotrienos (LTB4 y LTD4), lipoxina A y ácido araquidónico, que según diversos estudios alcanzan mayores concentraciones en cerebro y LCR de los pacientes con encefalopatía

Se ha demostrado que la gp120 viral puede interaccionar con receptores de quimiocinas o de NMDA neuronales y tener un efecto apoptótico (*excitotóxico*). La activación inmunitaria y la producción de mediadores de inflamación (quimiocinas, IL-1 β , IL-6, TNF- α , óxido nítrico, metabolitos del ácido araquidónico) juegan un resaltante papel neurotóxico *in vivo*, provocando cambios en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, migración de células mononucleares, astrocitosis, daño sinaptodendrítico neuronal y apoptosis de neuronas y astrocitos (Granger, 1982;

Gorocica y col., 1999; Alfonzo y col., 2008). No obstante, aún no se ha definido el por qué existe una mayor afinidad entre el VIH y los macrófagos existentes en el LCR en comparación con los existentes en la sangre. Por otra parte, el fenómeno por el cual existe un daño continuo en la integridad del sistema nervioso, a pesar de lograrse un completo control de la replicación viral en suero, es llamado compartimentalización el cual se define como la afinidad selectiva del VIH por los macrófagos circulantes en LCR. La molécula **Tat** del VIH se une a las neuronas a través del receptor CD91, cuyo enlace está relacionado con la producción de NO, interfiriendo así con la integridad de la barrera hematoencefálica. De este modo, se produce un efecto neurotóxico que a la vez inicia una cascada inflamatoria mediada por neurotransmisores excitatorios (Hill y col., 1993; He y col., 1995; Hesselgesser y col., 1998; Caffrey y col., 2000; Polo y col., 2006)

Las características patológicas más importantes asociadas con la demencia por el VIH incluyen un incremento en el número de microglia, presencia de ARNm del TNF- α en astrocitos y microglia, evidencia de toxicidad, disminución de la densidad sináptica y dendrítica y baja selectividad neuronal (Lipton, 1995; Kaul y col., 1999; Kaul y col., 2001).

La sintasa de oxido nítrico inducible (iNOS) es la enzima directamente implicada en la producción del NO, como agente de toxicidad celular. La reacción entre el NO y el anión superóxido, resulta en la formación del peroxinitrito, el cual es un agente oxidante de alta toxicidad que al ser liberado por los astrocitos puede inducir apoptosis de neuronas (Dawson, 1999; Kaul y col., 2005). Se produce también una alta concentración de TNF- α , induciendo la liberación de prostaglandinas, leucotrienos y ácido quinólico, sustancias de alta inflamación del tejido nervioso. Los astrocitos

3.4. - El cuadro clínico de la infección por VIH en el SNC

Las complicaciones del sistema nervioso son comunes en los pacientes infectados por el VIH y ocurren como resultado de la inmunosupresión concomitante (infecciones oportunistas, tumores), al igual que como primera manifestación de la infección por el VIH o como un efecto adverso de la terapia (restauración inmunológica y toxicidad). Estas complicaciones contribuyen en gran medida en la morbilidad y la mortalidad de los pacientes (Masliah y col., 1996; Lizarazo, 2006).

Los diferentes efectos asociados a la entrada del VIH al SNC puede ir desde trastornos leves de memoria y atención, hasta el Síndrome de Demencia-SIDA (SDS) que se caracteriza por un deterioro pronunciado de las funciones cognitivas, cambios de personalidad y déficit de la función motora (López y col., 1999; García y col., 2009).

Los trastornos del sistema nervioso central relacionados con el SIDA pueden estar causados directamente por el virus del VIH, por ciertos cánceres e infecciones oportunistas (enfermedades causadas por bacterias, hongos y otros virus que de otra manera no afectarían a las personas con sistemas inmunitarios sanos), o por efectos tóxicos de los medicamentos usados para tratar los síntomas. Otros trastornos neuro-SIDA de origen desconocido pueden estar influenciados pero no están causados directamente por el virus (Stein y col., 1987; Bagetta y col., 1998; Valdes, 2002).

El complejo de demencia del SIDA, o encefalopatía asociada con VIH, se produce principalmente en personas con infección por VIH más avanzada. Los síntomas son encefalitis (inflamación del cerebro), cambios en la conducta, y una declinación gradual en la función cognitiva, incluyendo problemas de concentración, memoria y atención. Las personas con el complejo también muestran un retraso progresivo en la función

motora y pérdida de la dexteridad y la coordinación. Si se deja sin tratar, el complejo puede ser fatal (Lipton y col., 1998; NINDS, 2010).

Se ha encontrado en la sustancia blanca gliosis, disminución del volumen y aumento de la palidez (Laubenberger y col., 1996). Se ha visto que en la mayoría de los daños en el encéfalo se han reportado en los ganglios basales (López y col., 1999), y a las fibras aferentes que se proyectan hacia la corteza frontal, conllevando a una desconexión frontal-subcortical, que se evidencia en problemas motores (Willey y col., 1991; Wyss y col., 2002), así como enlentecimientos de los procesos de información mental.

El acceso de los medicamentos antirretrovirales al sistema nervioso, al igual que el mantenimiento de su concentración en el LCR, constituye un punto crítico en el control de la replicación del virus representando hoy en día el principal abordaje terapéutico de las complicaciones neurológicas asociadas al VIH (Vodovotz, 1997; Vitkovic y col., 1998).

4. - LA TOXOPLASMOSIS

4.1.- *Toxoplasma gondii*. Características generales

El *Toxoplasma gondii* es un protozooario obligatorio intracelular del orden Coccidia (Nash y col., 1998). Es el agente etiológico de la toxoplasmosis en el hombre (hospedador intermediario), el cual se adquiere al ingerir directa o indirectamente los ooquistes (eliminados en las heces de gatos) o carne que contenga quistes viables del parásito. Sólo en el intestino de los felinos se cumple el ciclo sexuado que conducen a la producción de ooquistes. El ciclo asexuado tiene lugar en los tejidos extraintestinales de los felinos y de los demás hospedadores (Dubey y col., 1988; Vidal, 1990; Dzierszinky

y col., 2004). La infección aguda es normalmente controlada por el sistema inmunológico del hospedador, sin embargo, la transmisión del taquizoíto al feto en desarrollo puede ser devastadora, siendo el *T. gondii* una de las principales causas de defectos neurológicos congénitos en humanos. En adultos sanos, un pequeño porcentaje de taquizoítos se diferencian, ejerciendo una mínima replicación de bradizoítos en el cerebro, músculos y otros órganos, donde estos pueden permanecer viables como infección crónica durante la vida del hospedador (Atias, 1994; Dzierszinski y col., 2004; Filisetti y col., 2004).

4.1.1.- El protozoario

El *Toxoplasma gondii* es un protozoo intracelular obligado, que se puede localizar en diferentes órganos. Su nombre se debe a su forma arqueada y proviene del griego *toxon* que significa arco y *plasma* que significa forma. Su hospedadero definitivo son los felinos domésticos y silvestres (Acha y col., 1994; Casanova, 2002).

4.1.2.- Epidemiología actual de la toxoplasmosis

La toxoplasmosis tiene una amplia distribución mundial, siendo más frecuente en las zonas húmedas, de temperatura intermedia y cálida, por lo que su prevalencia es mayor en los países tropicales y subtropicales del continente americano (Beaver y col., 1986; Frenkel, 1986; Soto, 1993). Debido a esta distribución, son evidentes los diferentes enfoques que ésta recibe en diversos países, por ser una enfermedad que está asociada con costumbres higiénicas, nivel socioeconómico bajo, infraestructura sanitaria de la comunidad, convivencia con reservorios y hospederos definitivos (Chávez, 1998). Numerosas encuestas epidemiológicas realizadas en todo el mundo han puesto de manifiesto la prevalencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii*; se considera un rango

de infección de 40% a 50% en individuos adultos entre los 30 y los 40 años de edad (Pinon, 2003).

La prevalencia en humanos de infecciones subclínicas es mayor en América Latina que en Estados Unidos y Europa. En América Central se describen prevalencias de 50 al 60 por ciento (Chávez, 1998). En estudios realizados en Panamá, Costa Rica, Cuba y América del Sur en países como: Chile, Brasil, Perú, Ecuador, Colombia, Venezuela entre otros, ha arrojado una prevalencia global en toda América de un 33,90% (Beaver y col., 1986; Fernández y col., 1986; Martínez y col., 1989; Soto, 1993).

La prevalencia en animales es a nivel mundial, afectando a ovejas, cerdos, caballos, perros, vacas, gallinas, gatos, ratas, ratones, entre otros. En Inglaterra, Stripen determinó una prevalencia de *Toxoplasma* en ratas del 35% (Salud Publica., 1992) y un 29% de la población es seropositiva. En Francia donde el consumo de carne es cruda o parcialmente cocida, el 80% de la población es seropositiva (Becerril, 2011). Numerosas encuestas epidemiológicas realizadas en todo el mundo han puesto de manifiesto la prevalencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii*, con tasas que varían entre los diversos grupos de población; así, se reportan las siguientes cifras globales de prevalencia: Oceanía 41,73%, Europa 31,76%, Asia 22,60%, África 19,07% (Trujillo y col., 1999), por lo que se ha descrito entonces que aproximadamente una tercera parte de la población mundial se encuentra infectada, sin embargo la incidencia varía 10- y 90% según el país. Parece ser que esta variación se debe a las costumbres alimentarias (Becerril, 2011). También se reportan las siguientes cifras de prevalencias: España 42,8%, México 31,1% -45.7%, (Trujillo y col., 1999; Rodríguez y col., 1999a; Rodríguez y col., 1999b) Honduras 58% (Zuñiga y col., 1999), Panamá 0% - 42,5%

(Etheredge y col., 1995), Cuba 55,9% - 71,0% (Martínez y col., 1989), Chile 32,7% (Schenone y col., 1986) Arabia Saudita 21% (Art y col., 1994).

Su prevalencia puede llegar a ser el doble en poblaciones rurales respecto a las urbanas y muy diferente en poblaciones de distinta raza, dentro de una misma comunidad. Se ha estimado que la incidencia de la toxoplasmosis congénita es de 0.25 a 10 casos por cada 1000 nacimientos dependiendo del país; se ha constatado por ejemplo, que 3000 niños con toxoplasmosis congénita nacen cada año en EUA (Becerril, 2011).

4.1.2.1.- Epidemiología de la toxoplasmosis en Venezuela

En Venezuela hay estudios que describen la situación de algunas poblaciones, sin embargo aún existen subregistros de la enfermedad en la población general (Triolo y col., 2006). Se estima que un 60% de la población adulta aparentemente sana presenta anticuerpos contra el toxoplasma. La prevalencia de serorreactividad asciende según los grupos etéreos. En la población de jóvenes entre 16 y 25 años de edad alcanza ya un 50%. La mayoría de las primo-infecciones ocurre en jóvenes menores de 15 años de edad (De la Rosa y col., 1999). Los datos con que se cuenta son fraccionados y la mayoría de los estudios se han basado en muestras de hospitales no representativas de la población (Díaz y col., 2003; Castillo, 2004).

En 1950, Gavaller reportó el primer caso humano de Toxoplasmosis mediante el diagnóstico parasitológico en material de necropsia de un recién nacido prematuro. En 1952, Oropeza y col. (1952) publicó el primer caso diagnosticado serológicamente en vida (Gavaller, 1950). Maekelt y col. (1965), pioneros en el estudio de la Toxoplasmosis en Venezuela, realizaron durante los años 1964 y 1965 importantes encuestas

epidemiológicas en la ciudad de Caracas, reportando un 47% de prevalencia. Previos estudios realizados por Figallo y Maekelt (1962) en la ciudad de Caracas, arrojaron un porcentaje de seropositividad de 61% en gestantes aparentemente sanos (Figallo y col., 1962; Maekelt y col., 1965a; Maekelt y col., 1965b). Bonfante y col. (1984), obtuvieron una prevalencia en más de 14 estados del país de 53,5% y concluyeron que la infección se adquiere desde la infancia y que su incidencia aumenta progresivamente con la edad.

4.1.3.- Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*.

En la **figura 8** se grafica el ciclo de vida de este protozoo. Los ooquistes provenientes de las heces de gatos contaminan los alimentos y el agua. Cuando las personas o animales adquieren alimentos con ooquistes, se transforman en taquizoítos dentro del hospedador intermediario y comienzan a invadir células nucleadas, proliferan y las lisan, luego invaden nuevas células extendiéndose la infección en los tejidos. Si el individuo presenta un sistema inmunitario competente, los taquizoítos se transforman a quistes en los tejidos bajo la forma de bradizoítos y puede persistir la infección crónica toda la vida en el hospedador. En individuos inmunocomprometidos, el quiste se rompe y se desarrolla la infección aguda. El parásito atraviesa la placenta y puede ocasionar daños graves al feto. Si el felino se alimenta de carne con quiste o de roedores puede dar inicio al ciclo del parásito en su intestino desarrollándose ooquistes (Denkers y col., 1998; Xuenan, 2004).

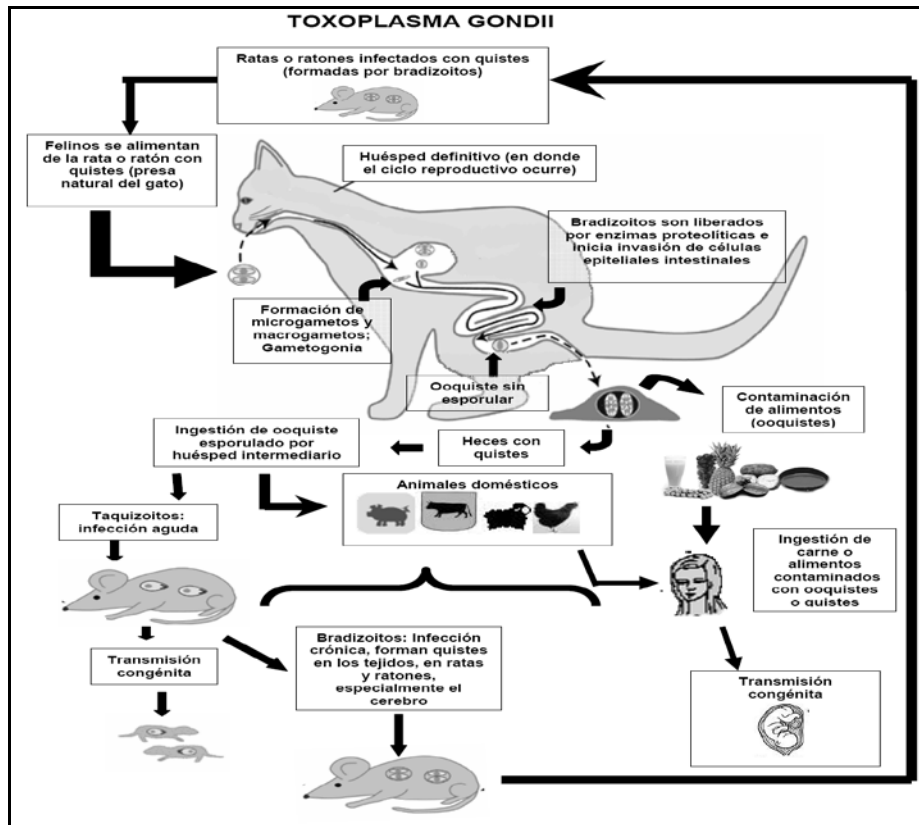


Figura 8. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* (Xuenan, 2004).

4.1.4.- Las fases clínicas de la infección por toxoplasmosis

Primaria o Postnatal Adquirida: *T. gondii* probablemente es uno de los parásitos mejor adaptados, capaz de vivir por largos períodos de tiempo en un hospedador. Para una persona inmunocompetente, raramente ocasiona enfermedad, mientras que para una persona inmunocomprometida, generalmente presenta manifestaciones tales como: debilidad, fatiga, cefalea, mialgia, artralgia y presentar leves cuadros de fiebre. Estas manifestaciones pueden durar de una a varias semanas y luego desaparecer. La toxoplasmosis por tener manifestaciones clínicas parecidas a otras enfermedades, generalmente no es diagnosticada como tal. Se le atribuyen más, cuando dichas manifestaciones están acompañadas de linfadenopatía. Los síntomas más frecuentes

son: fiebre, linfadenopatía, cefalea, mialgia, anorexia, artralgia, confusión, náusea, dolor ocular, dolor abdominal (Beaver y col., 1986; Acha, 1994; Bhopale, 2003).

Secundaria o Congénita: cuando una mujer embarazada es infectada con *T. gondii*, se puede transmitir el parásito vía transplacentaria al feto. Cuando una mujer es infectada en el primer tercio del embarazo, los riesgos para la vida del feto son mayores (aborto y muerte fetal), que cuando las mujeres se infectan en los últimos dos tercios del embarazo. Las manifestaciones clínicas más comunes son: retinocoroiditis, encefalomiелitis, anemia, convulsiones, calcificación intracraneal, hidrocefalia, fiebre, esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatía, en muchas ocasiones la infección prenatal se presenta subclínica al nacimiento (Dubey, 1988).

4.2. - Respuesta inmunológica contra *Toxoplasma gondii*.

Durante la fase aguda de la infección, la forma taquizoíto del parásito se replica intracelularmente, ocasionando lisis de la células hospedadoras y al liberarse invade nuevas células. Con la activación de la respuesta inmunológica específica los taquizoítos son eliminados en su totalidad. Algunos parásitos se enquistan bajo la forma de bradizoítos conduciendo a la infección crónica en el hospedador. Estos quistes se pueden encontrar en el SNC del hospedador, donde estos causan inicialmente una débil inflamación. Sin embargo, la transmisión del taquizoíto al feto en desarrollo puede ser devastadora, donde la infección por *T. gondii* es una de las principales causas de los defectos neurológicos congénitos de los seres humanos (Dzierszinski y col., 2004).

Los macrófagos, los linfocitos T, las células asesinas naturales (NK), secretores de citocinas, especialmente IFN- γ , son los elementos principales implicados en la inmunidad celular, donde la infección con *T. gondii* desencadena ambos sistemas

inmunitarios, el innato y el adaptativo, lo que conduce a la resistencia y a una protección de la infección a largo plazo (Maubon y col., 2008). Los taquizoítos estimulan los macrófagos para producir interluquina-12, a su vez esta activa las células NK y los linfocitos T, para la producción de IFN- γ (Bhopale, 2003). La citocina IL-12 es esencial para desencadenar la respuesta del sistema inmune del IFN- γ contra la infección con *T. gondii*. El IFN- γ y el TNF- α tumoral actúan sinérgicamente para mediar en la eliminación de taquizoítos por parte de los macrófagos. La combinación de estas dos citocinas mejoran los resultados en la producción de radicales libres y óxido nítrico, tanto que pueden eliminar los parásitos. Las células dendríticas pueden activar el sistema inmunológico por reconocimiento de moléculas derivados del parásito (Ciclofelina-18) produciendo IL-12 (Bhopale, 2003; Alberti, 2005; Rozenfeld y col., 2005).

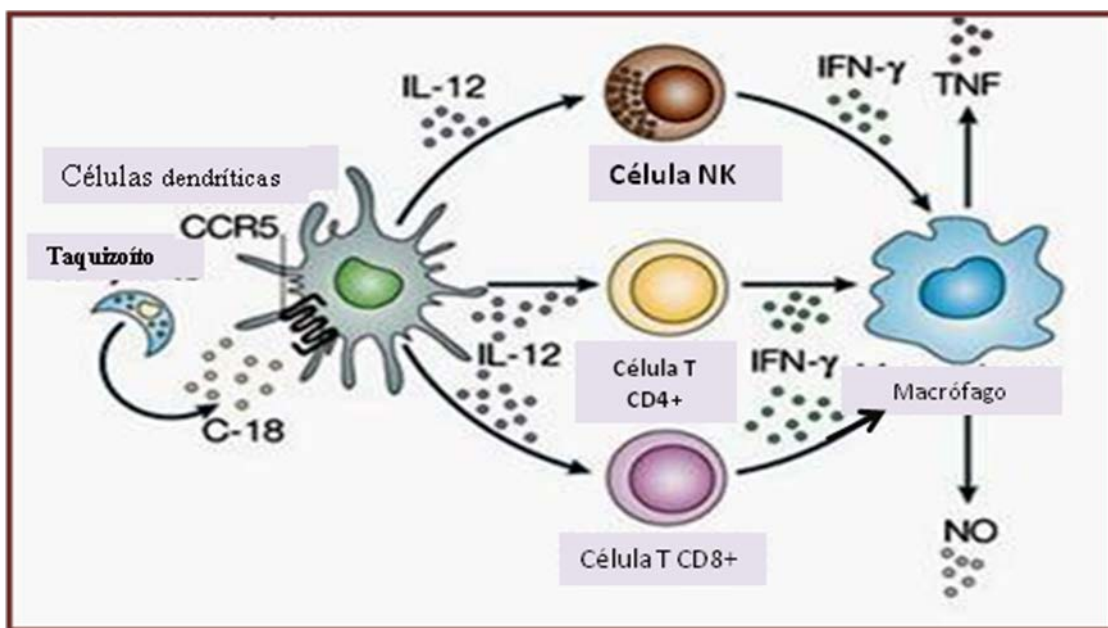


Figura 9. Desarrollo de la respuesta inmune contra la infección *Toxoplasma gondii*. Inmediatamente después de la infección, las células dendríticas del hospedador produce IL 12 en respuesta a los productos secretados por *T. gondii* como la Ciclofelina -18 (C-18) que se une a los receptores de quimiocinas (CCR5). La IL-12 induce la activación de las células inmunes y se produce así IFN- γ que activa macrófagos, ejerciendo efectos microbicida al producir NO y TNF- α (Aliberti, 2005).

4.3.- La Inmunopatología de la Toxoplasmosis

Hay que destacar la diferenciación de la Toxoplasmosis en personas inmunocompetentes y en diversos grupos de riesgo como son los casos congénitos y los afectados inmunocomprometidos. No se tienen datos precisos del periodo de incubación, pero por los brotes de infección estudiados, se supone entre 4 y 21 días, presentando mayor sintomatología en la segunda semana después de la infección (Ho-Yen, 1992). En pacientes inmunocompetentes los casos más agudos pueden producir un malestar general similar al producido en procesos gripales con febrícula, cefalea y cansancio. Menos del 20% de los individuos con adenopatías presentan algún otro tipo de manifestaciones como puede ser artralgias, mialgias, dolor faríngeo, abdominal y erupción maculopapular (Bhopale, 2003). Ocasionalmente puede existir hepatoesplenomegalia y son raras las neumonitis transitorias, el derrame pleural, pericarditis, miocarditis y meningoencefalitis. Se han presentado casos de coriorretinitis en adultos tras una infección aguda (Dzierszinski y col. 2004).

En pacientes inmunocomprometidos; la infección es aguda y presenta manifestaciones clínicas extensas y generalizadas, pudiendo aparecer fiebre, cefalea, hepatoesplenomegalia, neumonía, miocarditis y alteración del sistema nervioso central. Más frecuente que la infección aguda primaria es la reactivación de formas quísticas crónicas de *T. gondii* con liberación de trofozoítos. Los síntomas y signos de la toxoplasmosis reactiva en dichos enfermos dependen de la localización de los quistes que se rompen y la reacción inflamatoria que resulta (Ho-Yen, 1992, Castillo, 2004). La afección más común es la (TE), seguida por la pulmonar y la coriorretinitis.

Pero también los protozoarios como es el caso de *T. gondii* pueden inhibir la respuesta inmune en las células lo que le confiere mantenerse por mucho más tiempo dentro de las células y alcanzar mayor número de parásitos mediante la replicación binaria. Estas es una de las razones que le da ventajas al parásito para no ser eliminado del todo, de modo que produce una infección crónica, por enquistamiento de los taquizoítos a bradizoítos en los tejidos del hospedador (Sacks y col., 2002)

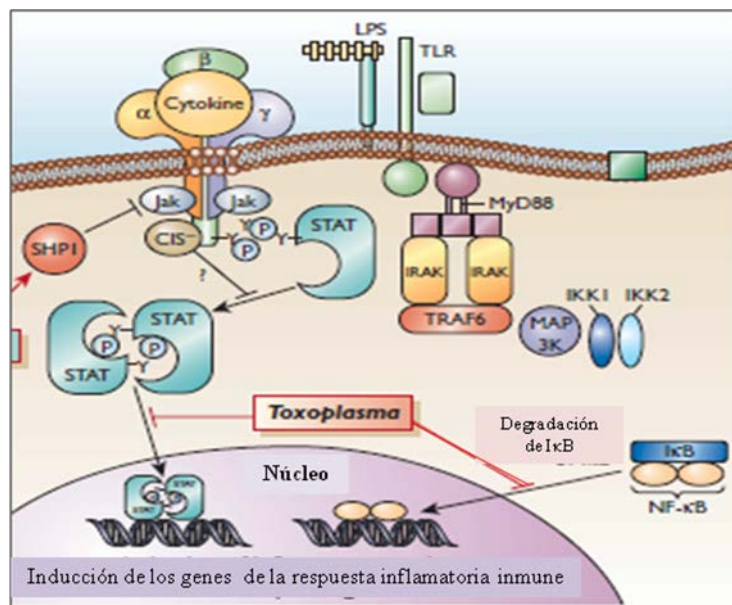


Figura 10. Inhibición de las vías de señalización en células inmune. *Toxoplasma gondii* inhibe las respuestas de las citocinas inducidas por lipopolisacaridos, TNF- α e IFN- γ a través de la inhibición de la translocación de NF κ B y posiblemente la STAT fosforilada al núcleo, lo que impide la transcripción de los genes de la respuesta inmune. Interfiriendo con la producción de NO, TNF- α e IFN- γ (Sacks y col., 2002).

5.- LA CO-INFECCIÓN VIH/ *Toxoplasma gondii*

5.1.- Epidemiología de la co-infección VIH/ *Toxoplasma gondii*

Muy pocos son los estudios sobre la prevalencia de personas co-infectadas con el VIH y el protozooario a nivel mundial, sin embargo existen estudios que nos señalan la prevalencia de esta co-infección en zonas específicas de algunos países de América

Latina (Camacho, 2009). Uno de los estudios más recientes que indican un aproximado de personas co-infectadas con el virus y el parásito, se realizó en **Colombia**, específicamente en el Hospital San Juan de Dios de Bogotá, en donde se encontró que el 63% de los pacientes con VIH poseen anticuerpos séricos anti-*Toxoplasma gondii* y a su vez la toxoplasmosis cerebral se manifestó en un 66% de pacientes infectados con el VIH. Por otra parte el tratamiento específico condujo a la mejoría 13 de 15 casos, es decir, el 86% de ellos (Gómez y col., 2001). En **México**, para el año 1998 realizaron un estudio sobre agentes oportunistas en pacientes con SIDA, presentando que el 9,7% de 93 pacientes infectados con el virus desarrollaron toxoplasmosis cerebral. Otro estudio notifica una prevalencia del 9% con toxoplasmosis encefálica en 146 pacientes con SIDA en la ciudad de México (Góngora y col., 1998). Asimismo, para el año 2005, en cierto estudio revelan que en **Brasil**, la toxoplasmosis encefálica es la lesión más común en pacientes con SIDA, y es la tercera infección oportunista más frecuente en dichos pacientes. La toxoplasmosis encefálica ha causado una alta tasa de morbilidad y mortalidad, particularmente en paciente con SIDA en Brasil (Colombo y col., 2005).

5.2.- Aspectos neurotóxicos. Mecanismos proinflamatorios en el SNC

El estudio de las interacciones específicas entre el parásito y los diferentes tipos de células neuronales (astrocitos, microglías y neuronas) también es esencial para la comprensión de la inmunopatología debido a que el sistema nervioso central es el centro esencial en la fase aguda y crónica de la infección con *T. gondii*, tanto en la infección congénita, como en la reactivación de pacientes infectados con VIH (Navia y col., 1986; Maubon y col., 2008). Cuando el hospedador infectado está en etapa crónica, adquiere un inmunocompromiso, los bradizoítos cambian a taquizoítos, causando problemas cerebrales. El cerebro es el sitio más comúnmente afectado por el parásito, las células

NK y T tienen una importancia en la regulación de la inmunidad protectora contra *T. gondii*, mediante la producción de citocinas, ya descritas en el capítulo anterior. Cuando el parásito en el hospedador se mantiene en la fase aguda, la forma que toma el patógeno es la de bradizoíto enquistado, una vez que el VIH afecta de manera sistemática destruyendo la célula T CD4 e ingresa al encéfalo atravesando la BEH mediante macrófagos infectados; ya en el cerebro el VIH infecta productivamente microglías y macrófagos, a partir de allí se inicia todo un mecanismo neurotóxico que dispara la producción de mediadores inflamatorios como NO, ácido araquidónico, interleucina, etc. La activación de las células monocíticas por infección, proteínas virales o mediadores proinflamatorios, conducen a la disfunción de neuronas y astrocitos terminando en demencia. Las proteínas virales pueden también contribuir al daño neuronal, algunos de los factores neurotóxicos estimulan excesivamente neuronas conduciendo a la excitotoxicidad con una disminución en sus funciones vitales y la producción de enfermedades neurodegenerativas (Sánchez y col., 1999; Kaul y col., 2005). Cuando las células monocíticas se ven afectadas el parásito se libera del quiste y comienza junto con el arsenal del virus a causar TE, formando abscesos necróticos en el tejido parecidos a granulomas; que de no ser tratados conducen a la muerte. El infiltrado de linfocitos y las microglías activadas en el cerebro con encefalitis debido al VIH-1 muestra una fuerte inmunorreactividad para las interleuquinas-16 en ligando naturales de CD4. La citocinas inhiben la propagación del virus y contribuyen en la respuesta inmune antiviral de los linfocitos y microglia en el SNC. Los mediadores inflamatorios tales como IFN- γ , el TNF- α y el NO muestran una potente actividad neurotóxica *in vivo* e *in vitro*, donde el NO es el mediador más nocivo a las células del sistema nervioso (Palmer y col., 1987; Krebs y col., 2000; Pascual, 2000)

5.3.- Papel del sistema inmunológico en la co-infección

Una vez que el virus ingresa al parénquima cerebral por monocitos infectados, y se replica en microglías y macrófagos perivasculares (Krebs y col., 2000; González y col., 2005) las células del sistema inmune responden contra las infecciones que se desarrollan por la co-infección VIH y *T. gondii* produciendo diferentes tipos de citocinas, entre ellas, el IFN- γ y TNF- α que inducen la producción de NO en astrocitos, microglías y que resulta tóxico en el tejido nervioso en altas concentraciones sostenidas (Kaul y col., 2001; Kaul y col., 2007); pero al disminuir las células TCD4 en la periferia se da inicio a la reactivación de la infección en el SNC por *T. gondii*. Las células fagocitan los parásitos como en el caso de macrófagos. Pero estos se replican en el interior celular y lisa a las células, de esta manera se expande la infección por todo el cerebro (Pascual y col., 2000).

La microglía actúa disparando mecanismos neurotóxicos (vías de activación de producción de NO, especies reactivas de oxígeno, generación de apoptosis, etc) para detener los efectos tanto del virus como del protozooario, pero finalmente las mismas células diseminan la infección. Todas las células juegan un papel crucial contra la co-infección por VIH/ *T. gondii*, pero la alta replicación tanto del virus como del parásito terminan dominando las mismas células, resultando nuevas células infectadas que extiende la infección por todo el tejido cerebral. Así el paciente desarrolla una TE que acompañado por la demencia ocasiona la muerte del individuo infectado (Miller y col., 1972; Gómez y col., 2001; Mocroft y col., 2003; Pascual., 2004).

6.- EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NUCLEAR κ B (NF κ B)

El factor de transcripción nuclear kappaB (NF κ B) fue descubierto en 1986 en el laboratorio de D. Baltimore. Observaron que actuaba como modulador de la

transcripción de la cadena ligera (*light chain*) de las inmunoglobulinas en los linfocitos B (Sen y Baltimore, 1986). Estudios posteriores demostraron que NFκB es un factor de transcripción nuclear dimérico de expresión ubicua implicado en la regulación de diversos procesos celulares como inflamación, adhesión, proliferación, diferenciación, apoptosis y oncogénesis. La Familia de factores de transcripción NFκB son dímeros constituidos por proteínas de la familia Rel. Los miembros de esta familia son los encargados de activar la transcripción de los genes diana de la vía. En mamíferos, el factor NFκB está constituida por 5 miembros: RelA (p65), RelB, c-Rel, NFκB1 (p50) y NF.κB2 (p52), los que pueden clasificarse en dos subfamilias:

1-. Subfamilia I: Incluye los miembros con dominio TAD (del inglés *transcription activation domain*): RelA, c-Rel y Relb, que son sintetizados en su forma madura.

2-. Subfamilia II: incluye los miembros sin dominio TAD NFκB (p50) y NFκB (p52): p50 y p52 son los maduros generados a partir de los precursores p105 y p100 (Merberg y col., 1996)

Referente a su estructura todos los miembros de la familia NFκB presentan un dominio N-terminal común llamado RHD (del inglés *Rel homology domain*). Este dominio está formado por 300 aminoácidos y es responsable de la dimerización entre los distintos miembros de la familia NFκB (Hoffman y col., 2006), de la asociación con el inhibidor IκB, de la unión con los motivos κB del ADN y, también en este dominio, es donde se encuentran las secuencias de localización nuclear llamada NLS (del inglés *Nuclear Localization Sequence*) (Baeurle y col., 1994). El dominio TAD es necesario para la regulación positiva de la expresión génica. Aunque las funciones de los dominios RHD y TAD son muy distintas, ambos dominios pueden sufrir modificaciones post-

transduccionales que pueden afectar la activación transcripcional de NFκB así como su unión con el ADN (Kaltschmidt y col., 2005).

En la mayoría de las células, las proteínas de la familia NFκB se encuentran en el citosol en forma inactiva, formando homo y heterodímeros. El heterodímero RelA/p50 la forma más abundante en las células de los mamíferos (Ghosh y col., 1998). En la mayoría de las células, las proteínas de la familia NFκB se encuentran en el citosol en forma inactiva, formando homo y heterodímeros. En respuesta a varios estímulos como inflamación, estrés oxidativo, etc., se puede inducir la translocación nuclear de NFκB. Una vez en el núcleo los dímeros NFκB se unen a los motivos κB, activa de esta manera los promotores de los genes diana regulando su transcripción mediante la unión de co-activadores o co-represores (Kaltschmidt y col., 1994; West y col., 2001; Memet, 2006).

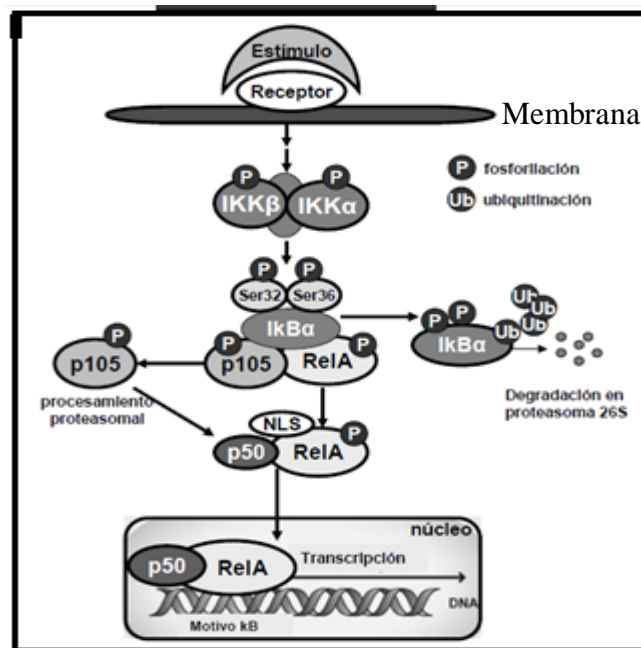


Figura 11. Factor de transcripción κB. Cuando el estímulo interactúa con los receptores de las células, TNFR, Toll, etc, se produce una respuesta que activa las enzimas IKK en el interior de la célula, fosforilando al inhibidor IκB, este se degrada al ubiquitinarse en el proteosoma. El κB que da libre en el citosol, luego es procesado, e ingresa al núcleo donde se une a la secuencia del κB en el ADN, se inicia la transcripción, produciéndose una respuesta inflamatoria o neuroprotectora dependiendo del estímulo recibido (Stefka, 2011).

6.1.- Inhibidores del NFκB (IκB)

En la mayoría de los tipos celulares los dímeros de NFκB se encuentran predominantemente retenidos en el citosol formando un complejo con proteínas inhibidoras de la familia IκB. En respuesta a diferentes estímulos los dímeros NFκB del citosol son liberados de su inhibidor y se translocan al núcleo donde regulan la transcripción de genes específicos (Perkins, 2006). En mamíferos se han descrito seis isoformas de la proteína inhibidora IκB. La unión de las proteínas IκB con los dímeros NFκB, oculta una de las dos secuencias NSL, por ello, el dímero debe primero dissociarse del inhibidor IκB para alcanzar su destino nuclear. El proceso de separación de IκB requiere su fosforilación. Una vez fosforiladas, las proteínas IκB son ubiquitinizadas y degradadas a través del proteosoma (Ghosh y col., 1998). Sin embargo, la ausencia de IκB después de su degradación en el proteosoma es transitoria ya que la activación de NFκB induce de forma rápida la transcripción de nuevo del inhibidor al unirse al κB presente en su promotor. Dentro del núcleo IκBα puede unir los dímeros NFκB disociando el factor del ADN y gracias a la presencia de las secuencias de exportación nuclear (NES) puede remover las formas activas de NFκB del núcleo al citosol, convergiéndolas en formas inactivas (Tam y col., 2000).

6.2.- El NFκB en el SNC

A principios de los años 90 varios estudios demostraron la presencia de heterodímeros RelA/p50 en los astrocitos (Sparacio y col., 1992), las células de Schwann y la microglia (Nakajima y col., 1998), así como en neuronas de varias regiones del SNC, incluyendo córtex, hipocampo y también en el cerebelo (Nabel y col., 1987; Kaltschidt y col., 1994). Estas observaciones sugerían que la vía NFκB participa en procesos fisiológicos del SNC. Además, heterodímeros RelA/p50 se encuentran en los terminales

sinápticos sugirieron una función de NFκB como transmisor de la señal retrogrado (desde la sinapsis hasta el núcleo).

6.2.1.- Activadores de la vía NFκB en el SNC

Una gama amplia de factores (IFN-γ, IL-1, IL-2, TNF-α, NO) regulan la actividad de NFκB. La activación de NFκB por cada uno de estos factores induce una respuesta fisiológica determinada. Por ejemplo, la activación de NFκB mediada por Factores Neurotróficos (NTFs: Neurotrophic Factor), neurotransmisores y calcio, promueven la supervivencia neuronal, crecimiento neuronal y regeneración axonal en varios modelos *in vivo* e *in vitro*, tanto en el SNC maduro como durante el desarrollo (Cui y col., 2000). La inhibición de la vía NFκB en neuronas corticales, neuronas hipocampales y neuronas sensoriales reduce la viabilidad neuronal demostrando también la implicación de la vía NFκB en la regulación de mielinización en células de Schwann y en oligodendrocitos.

Tabla 2. Moléculas activadoras de NFκB en el sistema nervioso. Kaltschmidt y col., 2005)

Moléculas activadoras	Tipo celular
Glutamato	Neuronas
Kainato	Neuronas
NMDA	Neuronas
TNF alfa	Neuronas, Astrocitos, Microglia, Neuroblastomas
IL-1	Neuronas y Glía
Amiloidβ	Neuronas, Astrocitos, Microglia
Estrés oxidativo	Neuronas
Peróxido de Hidrógeno	Neuronas, Oligodendrocitos

La activación de la vía NFκB regula varios procesos fisiológicos mediante el control transcripcional de diferentes genes (Gupta y col., 2010). Se ha propuesto a la vía del NFκB como la más importante en el control de la supervivencia neuronal. Esta regulación está basada en la capacidad de NFκB de controlar (activar o inhibir) la transcripción de varios genes pro- y anti-apoptóticos modulando la muerte celular (Tamatani y col., 1999). Respecto a los anti-apoptóticos los más estudiados son los miembros de la familia Bcl-2. Los promotores de Bcl-2, Bcl-xl y Bfl/A1 tienen sitios de unión con NFκB. La activación de NFκB participa también, en la regulación transcripcional de TRAF1 y TRAF2 (del inglés *TNFR-associate factor*) (DiDonato y col., 1996). Otros estudios han demostrado que la vía NFκB puede controlar la apoptosis a través de la regulación de la expresión de genes anti-apoptóticos que actúan en la mitocondria. Una de ellas es la enzima mitocondrial Mn-SOD (Sompol y col., 2006). Su función es producir NO. La implicación del NO en la apoptosis es un tema de debate. Mientras que unos autores relacionan su producción con la supervivencia, otros lo proponen como un agente pro-apoptóticos (Julius y col., 2008). NFκB juega un papel importante en la señalización sináptica y el aprendizaje (Mattsson, 2003). Los análisis de modelos experimentales con lesión cerebral, revelan que la vía NFκB puede modular la degeneración y recuperación neuronal. En este sentido, se asocia el incremento de la activación de NFκB en respuesta a la lesión con daño neuronal (Stefka, 2011). Los niveles demasiados bajos, como niveles demasiados altos de activación de la vía NFκB mantenidos durante un largo período de tiempo, causaría muerte neuronal (Mattson y col., 2001; Memet, 2006).

Otra posible explicación de los efectos opuestos de NFκB en el SNC es que la activación de la vía en respuesta a TNF-α favorece la supervivencia en neuronas,

mientras que la inducción de la vía en células gliales promueve la muerte neuronal (Mattsoon y col., 2001). Así un mismo estímulo genera respuestas opuestas al activar la vía en diferentes sitios del SNC. Tanto astrocitos como neuronas producen TNF- α y expresan sus receptores TNFR. No obstante, las células gliales expresan el receptor TNFR1 mientras las neuronas expresan TNFR2. La unión de TNF- α a ambos receptores activa la vía NF κ B, pero la activación de TNFR1 en células gliales induce la producción de NO lo que conlleva a la muerte neuronal, mientras que la activación de TNFR2 en neuronas aumenta la expresión de genes anti-apoptóticos. Estudios han demostrado la toxicidad de TNF- α en neuronas solo en presencia de la glía (Taylor y col., 2005).

7.- EL ÓXIDO NÍTRICO (NO)

El óxido nítrico, es un gas muy inestable en condiciones aeróbicas, el cual inicialmente fue considerado como un contaminante atmosférico, pero posteriormente se descubrió que era producido por numerosas células de los mamíferos y tenía diversas funciones biológicas. Actualmente, se han definido dos funciones principales de él: una relacionada con la comunicación celular y otra relacionada con la citotoxicidad (Vodovotz, 1997). Tiene un amplio espectro de acción y se ha encontrado en numerosos organismos, tales como las esponjas, los insectos, las ranas y hasta en las plantas. Su vida media y su acción biológica son muy cortas, ya que es rápidamente oxidado a nitrito (NO₂⁻) y nitrato (NO₃⁻) (Moncade y col., 1993). Los mecanismos de citotoxicidad del NO aún no están muy claros, pero participan en diversas vías que llevan a las células a procesos apoptóticos o necróticos. El NO ejerce su efecto principalmente en la membrana, el citoplasma y el núcleo de las células. La citotoxicidad del NO en los sistemas biológicos está relacionada a su capacidad de difusión celular, a su autooxidación y a la reacción con superóxido para formar peroxinitritos (ONOO⁻)

(Lancaster; 1997). El NO difunde a grandes distancias de la célula que lo produce, por lo que puede reaccionar con diversas proteínas especialmente las que contienen centros de hierro o azufre, pero la reacción del NO con el O^{2-} tiene una cinética de difusión limitada. (Vodovotz, 1997). En la autooxidación, el NO reacciona con oxígeno molecular para formar un agente electrofílico como el N_2O_3 (óxido nitroso) relacionado con la desaminación del ADN y eventos que pueden inducir mutagénesis. El $ONOO^-$ es un poderoso agente oxidante que reacciona con el ADN, las proteínas y los lípidos de membrana celular dañando y causando la muerte de la célula (Kronke y col., 1997).

7.1. - Producción de Óxido Nítrico

El NO es sintetizado a partir de L-arginina por la enzima Óxido Nítrico Sintasa (NOS). Existen por lo menos tres isoformas de la NOS que son capaces de reaccionar con formas reactivas del oxígeno y moléculas biológicas para formar una gran cantidad de productos finales, incluyendo NO_2^- , NO_3^- (nitritos y nitratos) y S-nitrosotioles (Kronke y col., 1997). Todas las isoformas de NOS catalizan la oxidación de la L-arginina, dando lugar a la formación de óxido nítrico y L-citrulina. El mecanismo de acción de la NOS no se conoce bien, pero participan varios cofactores como el FAD, FMN, NADPH, tetrahidrobiopterina en la transferencia de electrones (Moncade y col., 1993). Dos de estas isoformas de la enzima NOS son constitutivas (cNOS) en algunas células y una tercera es inducible (iNOS) después del estímulo. Las 2 óxido nítrico sintetasas constitutivas (cNOS) están relacionadas con bajos niveles de producción de NO. Una de ellas, se presenta en todas las neuronas (cnNOS), tiene un peso molecular de 160 kDa y está implicada en la regulación de la transmisión sináptica en el SNC y en la regulación del flujo de sangre al cerebro (White y col., 1992). La otra isoforma constitutiva, se presenta en las células endoteliales (eNOS), tiene un peso molecular de 133 kDa y juega

un papel importante en función del endotelio y en la homeostasis cardiovascular. Finalmente, la isoforma de la iNOS se encuentra presente en la mayoría de las células de mamíferos, principalmente en macrófagos, microglías, astrocitos, en hepatocitos y células de músculo liso (Garg y col., 1991). Esta enzima está asociada a mecanismos de defensa del hospedador tanto inflamatorios, como inmunológicos. La iNOS tiene un peso molecular de 130 kDa. Se expresa en respuesta a la acción de algunas toxinas bacterianas como los lipopolisacáridos y algunas citocinas como la IL-1, INF- γ y TNF- α y está asociada a la producción de altos niveles de NO (Green y co., 1982).

El NO sintetizado por las cNOS, tiene una vida media muy corta de segundos a minutos, en cambio el NO sintetizado por iNOS está presente por largos periodos de tiempo que van de horas a días (Mac y col., 1997).

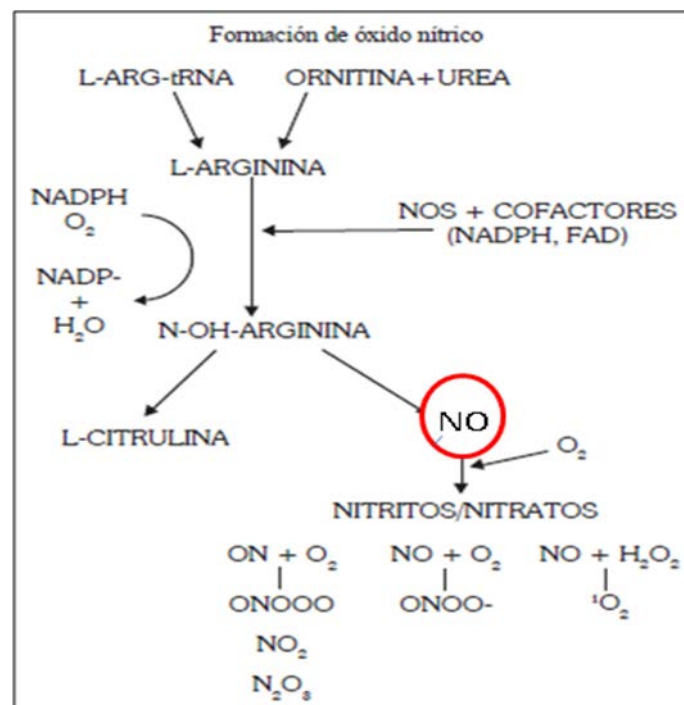


Figura 12. Producción de Óxido Nítrico (NO). El NO se produce a partir de la L-arginina por la acción de la óxido nítrico sintasa y algunos cofactores como el NADPH, FAD, FMN y tetrabiopterina. En el caso de la cNOS se requiere, además, la participación de la calmodulina y calcio para activarse (Gorocica y col., 1999)

7.2.- Efecto Citotóxico del Óxido Nítrico

La citotoxicidad del NO tiene mayor relación con los productos de la iNOS que de las eNOS. Algunas de estas especies producidas por las células inmune como el H_2O_2 , O_2^- , OH, el oxígeno singulete (Vodovotz, 1997) y el NO, tienen funciones biológicas importantes así como funciones microbicidas y citotóxicas (Dawson y col., 1996; Mac y col., 1997). La distancia de difusión del NO puede ser de 150- 300 μm de diámetro en 4-5 segundos y puede lisar el 100% de células singénicas en 15 h, al producir modificaciones químicas y alterar el potencial de membrana de las células afectadas, a través de la activación de canales de K^+ , Ca^{2+} y ATPasas (Mac y col., 1997). Aparentemente el NO es autooxidado después de alcanzar su blanco, por lo que es difícil calcular su concentración tóxica (Drapier y col., 1986; Drapier y col., 1988). El NO puede reaccionar con los grupos SH- de las proteínas, por lo que inhibe enzimas intracelulares SH-dependientes como la aconitasa (complejo I y II) (Lepoivre y col., 1991), afectando mecanismos de transducción y transcripción de las células. El NO también inactiva otras enzimas importantes como la proteína quinasa C, la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, la fosfotirosin fosfatasa y a la creatinina quinasa, entre otras, por lo que se altera el metabolismo celular (Granger y col., 1982; Drapier y col., 1988). El NO altera moléculas asociadas a las membranas mitocondriales como la NADH-ubiquinona oxidorreductasa (complejo I) y la succinato ubiquinona oxidorreductasa (complejo II) y el citocromo oxidasa C (complejo IV), por unión reversible a su grupo hemo por lo que la cadena respiratoria se ve afectada (Gorocica y col., 1999). En el núcleo el NO induce transición de G:C \Rightarrow A:T y la ruptura del ADN; ambos procesos son consecuencia de la N-nitración de los desoxirribonucleótidos. Además, el NO inactiva diversas enzimas involucradas en la reparación del ADN, teniendo importantes consecuencias biológicas. El daño producido al ADN induce

mutaciones, necrosis o apoptosis (Burney y col., 1997; Drapier y col., 1988). El inhibidor de la NOS, como N-monometil- L-arginina (L-NMMA), el cual es un análogo de la L- arginina, que disminuye la producción de NO (Yates y col., 1996).

7.3.- Determinación de NO en Modelos Biológicos

Ha sido difícil la detección de los niveles de NO en especímenes biológicos. Ya que se produce en pequeñas cantidades (nanomolares), la gran rapidez con que reacciona con el O₂ en solución, etc. Comúnmente se mide a través de reacciones de quimoluminiscencia en presencia de ácidos (Palmer y col., 1997) o sin acidificación (Miller y col., 1999), por ensayo de diazotización del ácido sulfanílico (Green y col., 1982), por resonancia electro-paramagnética (EPR) mediante trampas de compuestos nitrosos o de hemoglobina (Arroyo y col., 1991), y por mediciones espectrofotométricas de la conversión de la hemoglobina reducida a la meta hemoglobina (Kelm y col., 1988). La técnica más usada para medir los niveles de NO en modelos biológicos es la utilizada en el ensayo de diazotización del ácido sulfanílico desarrollada por Green y col. (1982). Este ensayo es una técnica estandarizado para medir nitritos inorgánicos, cuya acumulación es indicativa de la oxidación del NO. La técnica se basa en la adición de nitróxidos y ácido sulfanílico que interactúan con el N-(1-naftil) etilenediamina generando un producto que se monitorea por espectrofotometría (Ignarro y col., 1987). El nivel de NO puede ser calculado por medio de la comparación de los cambios de absorbancias observados en una curva de calibración de absorción de NO (Vodovotz, 1997).

8.- EL CULTIVO DE CÉLULAS NERVIOSAS

El primer esfuerzo para obtener cultivos de células nerviosas fue hecho en 1958, al aislar células de la glía de la materia blanca del cerebro. Sólo hasta 1967 se desarrollaron los principales procedimientos para el aislamiento de células del cerebro y, posteriormente, se han desarrollado otras técnicas para separar células de cerebelo y otros tejidos del SNC y el sistema nervioso parasimpático (Tovar, 2010).

Los cultivos celulares aislados o simples, se han establecido como una importante herramienta de investigación en diversos campos de la biomedicina y como alternativa fundamental para reemplazar o reducir el número de animales de experimentación; sin embargo, la finalidad de establecer un cultivo *in vitro* radica en garantizar en lo posible la obtención de condiciones similares a las del desarrollo postnatal *in vivo* (Pascual y col., 2000). El cultivo tienen la importante característica de desarrollar varios tipos celulares, permitiendo la interacción entre ellos y la reproducción de condiciones más acordes con la fisiología de las células y la influencia mutua entre ellas (Stoppelkamp y col., 2010).

Usando células en cultivo, las neuronas son capaces de diferenciarse morfológicamente y asemejarse a las células del tejido original. Las neuronas en cultivo pueden desarrollar propiedades fisiológicas similares a las observadas en células comparables *in situ* pudiendo contar contactos sinápticos con otros pequeños agregados celulares. Las células nerviosas son unas de las células más difíciles de cultivar debido a los grandes requerimientos de sustratos que necesitan para su desarrollo. Lo primero que necesitan son recipientes de vidrio o plástico muy bien tratados contra la contaminación porque de lo contrario esta clase de células no sobrevive al igual que tratado con algún sustrato

como poli-lisina u otra matriz que permitan la adherencia de las células y la formación de monocapas (Tovar, J., 2012); sin embargo, también es necesaria la presencia de factores extrínsecos para el crecimiento y diferenciación celular, como factores Neurotróficos, factores de crecimiento, citocinas y otras proteínas. El suero o el plasma empleado extraído de diferentes animales contiene todos los factores y proteínas mencionadas, el cual se liga con los medios completos que garantizan el desarrollo de las células al tener un microambiente similar a las condiciones fisiológicas (Freeman, 2006). El establecimiento de cultivos como alternativa a los modelos *in vivo* permite hacer estudios de desarrollo, neurotoxicidad, neurodegeneración, plasticidad y como base para el avance en el conocimiento de las enfermedades neurodegenerativas (Pascual y col., 2000), tal como la provocada por la infección del VIH, así también como la infecciones por protozoarios (*T. gondii*).

Se han descrito diversos modelos *in vitro* para estudiar por separado el efecto que tienen la infección por VIH y la infección por *T. gondii* sobre el SNC. Los modelos descritos incluyen cultivos primarios de células nerviosas humanas; líneas de células nerviosas y cultivos primarios de células nerviosas de ratón (Rozenfeld y col., 2005) y de rata (Grant y col., 1997; Grant y col., 1998; Granger y col., 1999; Kaul y col., 1999). Estos modelos han proporcionado valiosa información sobre la compleja interacción entre los agentes patógenos y las células del SNC (Alfonzo y col., 2010; Castellanos, 2010).

Nosotros estamos interesados en establecer un modelo, cultivando células nerviosas (astrocitos y neuronas) fetales de rata, que permita evaluar los efectos neurotóxicos de la presencia simultánea de los dos patógenos en los cultivos de dichas células del sistema nervioso. En nuestro estudio desarrollamos el cultivo de células nerviosas en la cual evaluamos los mecanismos de neurotoxicidad en incubación simultánea con VIH/*T. gondii*.

9.- OBJETIVOS.

9.1.- Objetivo general

El objetivo principal del estudio es evaluar diversos mecanismos neurotóxicos que se desencadenan en la co-infección VIH y *T. gondii*, utilizando un modelo *in vitro*. Estos mecanismos se determinaron mediante pruebas *in vitro*, utilizando células nerviosas aisladas de cerebro de fetos de ratas, cultivadas en la presencia simultánea de taquizoítos de *T. gondii* y de moléculas del VIH (gp41) o de la partícula viral completa, a partir de las cuales se midió la viabilidad, la apoptosis y necrosis celular, la producción de NO y la expresión de NFκB en estas células.

9.2.- Objetivos específicos

- i) Mantener la cepa RH de *Toxoplasma gondii* en el laboratorio.
- ii) Disección del cerebro de fetos de rata y purificación de células nerviosas de fetos de rata.
- iii) Cultivar *in vitro* las células nerviosas purificadas de fetos de ratas.
- iv) Infectar *in vitro* las células nerviosas de fetos ratas con taquizoítos de *T. gondii*.
- v) Cultivar *in vitro* las células nerviosas purificadas de fetos de rata en presencia de diferentes concentraciones de la glicoproteína del VIH, la gp41, así como con la partícula completa del virus.
- vi) Cultivar *in vitro* las células nerviosas purificadas de fetos de rata en presencia de la partícula viral del VIH y taquizoítos de *T. gondii*.
- vii) Medir la viabilidad de las células nerviosas de fetos de rata en las diferentes condiciones de cultivos mediante azul de Tripano.

- viii) Medir el porcentaje de Apoptosis (Anexina V-FITC) y Necrosis (Ioduro de Propideo), en células nerviosas de fetos de rata en las diferentes condiciones de cultivos, usando la técnica de citometría de flujo.
- ix) Medir la producción de NO de los sobrenadantes de los cultivos de células nerviosas de fetos de ratas en las diferentes condiciones de cultivo.
- x) Determinar la expresión del factor de transcripción NFκB en las células nerviosas de fetos de rata en las diferentes condiciones de cultivos, usando la técnica de citometría de flujo.

10.- MATERIALES Y MÉTODOS

10.1.- Obtención de Células Nerviosas de fetos de rata

Se obtuvieron células nerviosas de cerebros de fetos de ratas Sprague-Dawley de 17-19 días de gestación. Tras anestesiar a la rata gestante con Ketamina 40-80 mg/kg ($\approx 0.2-0.3$ ml de una solución 50mg/mL), combinada opcionalmente con Xilacina 5-10 mg/kg (≈ 0.1 mL de una solución 100mg/mL) y se espera por 10-15 minutos para que la anestesia haga su efecto, se procedió a la extracción por cesárea de los fetos, sacrificando seguidamente a la madre por ruptura cervical mientras se encuentra anestesiada. Se decapitaron los fetos, luego mediante corte a lo largo del cráneo desde el foramen, se procedió a extraer los cerebros fetales, los que se disecaron en condiciones estériles, separándolos de los cerebelos, troncos cerebrales y meninges. Se disociaron mecánicamente utilizando pipetas de Pasteur en presencia de medio RPMI/ 10% SFB. Se centrifugó la suspensión celular por 5 minutos a 1500 rpm ($\approx 390G$), se descartó el sobrenadante y se resuspendió en un volumen apropiado de RPMI / 10% SFB.

Posteriormente, se realizó el recuento de células nerviosas vivas recuperadas mediante cámara de Neubauer y Azul de Tripiano. Se sembraron las células nerviosas, a razón de $15-20 \times 10^6$ células en placas de Petri previamente tratadas con poli-lisina (favorece la adherencia), en 12-15 mL de RPMI / 10% de SFB como volumen final, a 37° C, 5% CO₂. Se cultivaron las células por 1-2 semanas, se observó diariamente su morfología, cambiando cada semana la mitad del medio de las placas, y se agregó medio fresco. Finalmente, se rompió la adherencia de las células nerviosas por tratamiento con tripsina (0.5% Trypsin-EDTA, Gibco/Invitrogen) en cada placa de Petri y se incubó por 15-20 minutos a 37°C., y luego se sembraron en placas de cultivo de 12/24 posos, tratadas previamente con poli-lisina, a una concentración de $2-3 \times 10^5$ células por poso.

10.2.- Obtención de Taquizoítos de *Toxoplasma gondii*

Los taquizoítos se obtuvieron a partir del líquido ascítico de ratones BALB/c infectados previamente por inoculación intraperitoneal de taquizoítos de *T. gondii* de la cepa RH. Los animales se sacrificaron por ruptura cervical 3 días después de la infección, y los parásitos se recuperaron en condiciones estériles, de la cavidad abdominal, utilizando una jeringa de insulina. Los parásitos obtenidos fueron lavados dos veces con PBS, para descartar fluido ascítico y restos/detritus celulares. Después de centrifugar a 1500rpm ($\approx 390G$), se resuspendieron los taquizoítos en medio de cultivo (RPMI, 10% SFB) para ser usados en la infección de las células nerviosas, previamente contabilizados en azul de Tripano, o para ser inoculados intraperitonealmente 2-3 animales sanos con ≈ 0.1 mL cada uno de suspensión de parásitos en PBS estéril (suspensiones de 15-20 ó de 20-30 parásitos/campo a 40x son recomendables para generar infecciones que se prolonguen por 4 ó 3 días, respectivamente).

10.3.- Infección de Células Nerviosas por *Toxoplasma gondii*

Se verificó la viabilidad de los parásitos obtenidos del ratón infectado, utilizando *azul de Tripano* y se procedió a la infección *in vitro* de células nerviosas de fetos de rata a diferentes relaciones *parásito/célula blanco* 1/100, 1/250, 1/500 y 1/1500, se dejó en cultivo por dos horas en medio RPMI y SFB al 10%, a 37°C y 5% de CO₂, para luego de lo cual se realizó dos lavados para descartar los parásitos no unidos. Se agregó un volumen apropiado de medio (1 mL/poso) y se cultivó las células nerviosas a diferentes tiempos de cultivo. Finalmente se aplicó el tratamiento tanto con gp41 como con el virus completo empleando la relación parásito/células 1/250, ya que con esta relación se obtuvieron los mejores resultados en la cinética de incubación favoreciendo la prolongación de la

viabilidad de las células nerviosas tratadas con el parásito durante el tiempo de cultivo, con resultados cercanos a lo que ocurre en pacientes co-infectados por VIH y *T. gondii*.

10.4. - Obtención de VIH

Se utilizó como fuente de viriones sobrenadantes de co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de donantes sanos y de pacientes VIH+. Brevemente, las CMSP fueron aisladas a partir de sangre heparinizada fresca de voluntarios sanos mediante un gradiente de densidad (Histopaque/Ficoll), centrifugándose a 2000 rpm ($\approx 400G$) por 30 min., las cuales fueron resuspendidas en medio completo (RPMI, suero fetal bovino 10% y antibióticos) en presencia de fitohemaglutinina e IL-2 (10 U/mL), lo que favoreció la activación de dichas células, y luego se colocaron en frascos de cultivo de 50 mL. Se ajustó a 1×10^6 células para 10 mL de medio y se cultivó por 48-72 horas. Posteriormente se suspendió las células (5×10^6) en 500 μ L y se mezcló con una suspensión de 5×10^6 CMSP (se empleó la misma metodología con Histopaque/Ficoll para separar las células) de un paciente infectado con VIH-1, en 500 μ L de medio completo, para un volumen final de 1 mL. Se incubó el co-cultivo a 37°C y 5% de CO₂ por un mínimo de 2 horas. Se añadió 9 mL de medio completo RPMI/10% SFB y se mezcló suavemente. Las células se lavaron una vez con 5ml de medio completo centrifugándolas 5 min a 1000g, se resuspendió a razón de 10^6 células/mL de medio completo y se cultivó en incubadora a 37°C/5% CO₂. Dos veces por semana se recolectó el sobrenadante de los co-cultivos, se contaron las células y se resuspendió a razón de 10^6 células/mL. Una vez por semana se agregó a los co-cultivos CMSP activadas de donantes sanos. Con los sobrenadantes recolectados se prepararon alícuotas en viales de 1.5 mL en frascos de eppendorf y se guardaron a -80°C.

10.5.- Cuantificación de la carga viral

Los niveles plasmáticos de ARN-VIH de los sobrenadantes obtenidos de la sesión anterior fueron medidos mediante la técnica de biología molecular de la RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) con un kit comercial. Estas mediciones fueron realizadas en el Instituto de Higiene.

10.6.- Cultivo de células nerviosas de feto de ratas en presencia de VIH o gp41

Los cultivos primarios de células nerviosas fetales de rata fueron sometidos a la presencia de los stocks virales titulados o en presencia de la molécula viral gp41 (BD) a diferentes concentraciones (100 pM, 100nM, 10nM y 1nM), resultando finalmente la concentración 10 nM como la óptima luego de los ensayos realizados. Se utilizó la dilución de $\frac{1}{2}$ ($> 2,5 \times 10^6$ copias/mL), completándose el 50% de volumen con medio completo/10% SFB para el tratamiento con el virus VIH. Después de las 2 horas de infección con *T. gondii* y lavadas las células, se procedió agregar los stocks virales previamente preparados. Se realizó la cinética de incubación a los 3, 5 y 7 días, recolectándose los sobrenadantes para medir NO (a través de la determinación de nitritos) en cada tiempo y las células se desprendieron de los posos con tripsina (0.5% Trypsin-EDTA, Gibco/Invitrogen) incubándose por 15-20 min, para medir finalmente la viabilidad celular, apoptosis/necrosis (estas dos últimas por citometría de flujo)

10.7.- Infección de células nerviosas de fetos de rata con taquizoítos de *T. gondii* en presencia simultánea de VIH o gp41

A partir de la relación óptima de parasito/célula (1/250) se procedió a infectar a las células nerviosas fetales, tal como se describió en la sección correspondiente. Después de 2 horas de incubación en medio RPMI y SFB al 10%, a 37°C y 5% de CO₂, se agregó la concentración óptima del VIH completo (1/2 > 2,5x10⁶ copias/ mL) o de la molécula viral gp41 (10 nM), y se cultivó las células nerviosas a diferentes tiempos (3, 5 y 7 días) de cultivo cumplido cada tiempo se recuperó los sobrenadantes para determinar NO y las células fueron removidas con tripsina para medir viabilidad apoptosis/necrosis.

10.8.- Determinación de la apoptosis y necrosis

La medición de apoptosis y necrosis de las células nerviosas fetales de rata se realizó mediante un kit comercial (BD) el cual está basado en la expresión de fosfatidilserina sobre la superficie de células que están en las primeras fases de la apoptosis. Esta fosfatidilserina es reconocida por annexina (Caffrey y col., 2000). Posteriormente se cuantificó el porcentaje de células apoptóticas mediante un marcaje selectivo con Annexina V conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC, siglas en inglés) así como el porcentaje de células necróticas, marcadas mediante yoduro de propidio usándose un 1 µL de reactivo. (BD). Para la identificación de las células nerviosas inmediatamente después del marcaje de la apoptosis, se usarán anticuerpos primarios: una IgG₁ de ratón anti-NeuN (para identificar neuronas, específicamente se une a proteínas del núcleo donde se envuelve el ADN, CHEMICON) y una IgG_{2b} de ratón anti-Proteína Ácida Fibrilar de la Glía-GFAP (para identificar astrocitos, se une a proteínas en el citoplasma) (BD), los cuales fueron incubados por 30 min, colocándose un 1µL de anticuerpo por cada 100 µL de suspensión de células. Las células antes fueron separadas

de la placa empleando tripsina (0.5% Trypsin-EDTA, Gibco/Invitrogen) por 15-20 en incubación en condiciones estándar. Después estas células se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS, usándose un volumen de 300 μ L por un tiempo de 10 min en incubación, luego se lavaron y se les agregó solución permeabilizante (Saponina al 0.01% de Sigma) con 5% de SFB en PBS, colocándose unos 350 μ L, se incubaron por 10 min; esto permite abrirle poros a las membranas de las células sin que colapse ya que previamente se fijaron los fosfolípidos. Posterior a la incubación, se lavaron las células y se procedió a incubarse estas células por 30 min en oscuridad con los anticuerpos secundarios (BD): un IgG anti-IgG₁ de ratón conjugada con APC (identificación de neuronas) y un IgG_{2a+b} conjugada con PE (identificación de astrocitos) anti-IgG_{2b} (BD). Se lavaron y el marcaje diferencial para identificación de las células apoptóticas y necróticas fue analizado a través de un citómetro de flujo (FACS-Excalibur, Beckon Dickeson, USA).

10.9.- Determinación de la expresión intracelular del factor de transcripción NF κ B

A partir del cultivo de las células nerviosas en presencia de las diferentes condiciones establecidas previamente, se midió el factor de transcripción NF κ B a nivel intracelular. Para ello, se usó un anticuerpo primario, IgG₁ de ratón anti-NF κ B (BD), el cual fue incubado por 30 min y para la determinación en este caso de astrocitos se usó una IgG_{2b} de ratón anti-GFAP como anticuerpo primario. Previamente las células nerviosas se fijaron con paraformaldehído al 4% (300 μ L) en PBS por 10 min. Se centrifugó y luego se permeabilizó por 10 min su membrana plasmática con 0.01% Saponina (Sigma) (350 μ L). Posterior a la incubación, se lavaron las células y se procedió a incubar estas células por 30 min en oscuridad con el anticuerpo secundario, una IgG₁ de ratón anti-IgG₁ conjugada con

APC (para identificar NFκB) y un IgG_{2a+b} -PE anti IgG_{2b} para identificar astrocitos. Finalmente, se lavaron las células y el marcaje se analizó a través de un citómetro de flujo (FACS-Excalibur, Beckon Dickeson, USA).

10.10.-Determinación de la producción de NO

La concentración de NO₂⁻ en los sobrenadantes de las diferentes condiciones de cultivo se realizó mediante el microensayo colorimétrico descrito por Green y col. (1982). Se incubó 100 μl de la muestra a probar con 300 μl del reactivo de Griess (1% sulfanilamida/0.1% nafiletileno diamina dihidroclorido/2.5% H₂PO₄) a temperatura ambiente por 10 min. La absorbancia se midió a 570 nm, donde la concentración de NO₂⁻ se estimó con ayuda de una curva patrón realizada con nitrito de sodio. Y se empleó las concentraciones para la elaboración de la curva desde 1, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 y 100 μM de NaNO₂.

10.11.-Análisis estadístico.

El análisis de los datos se llevó a cabo mediante el uso del programa *SigmaStat* para Windows. Se efectuó la comparación de los promedios encontrados en cada grupo de estudio por medio de la prueba *T de Student*, para aquellos datos que se distribuyeron en forma normal. Para aquellos casos que no superaron la prueba de normalidad, la comparación entre grupos se llevó a cabo aplicando la prueba de *Mann-Whitney*. Las correlaciones entre diferentes parámetros obtenidos mediante los ensayos *ex vivo* e *in vitro* se analizaron por la prueba de *Pearson Product Moment*, para datos con distribución normal y la prueba de *Spearman*, para datos no paramétricos. Las pruebas se consideraron estadísticamente significativas cuando los valores de *p* fueron menores a 0,05.

11.- RESULTADOS

11.1.- Viabilidad de Células Nerviosas de Fetos de Rata cultivadas en presencia simultánea con gp41 ó VIH/ *T. gondii*.

Se cultivaron células nerviosas de fetos de rata Sprague Dawley en placas de Petri. Una vez formada la monocapa de células, se trabajó con 4 condiciones: 1) Control, 2) gp41 o VIH, 3) *T. gondii*, 4) gp41 + *T. gondii* y VIH + *T. gondii*, donde los tiempos de interacción fueron a los 3, 5 y 7 días.

En la **figura 13** son mostrados los resultados obtenidos de los ensayos con las diferentes condiciones de cultivo. Se encontró que el grupo control presentó crecimiento celular durante el tiempo de cultivo, observando que hubo diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en el número de células cuando se comparó con la condición gp41/*T. gondii* (3 y 5 días), mientras que al 7º día de cultivo, la diferencia fue en relación a todas las condiciones. Por otra parte, la presencia de gp41 o de *T. gondii* ocasionó una disminución del número de células vivas durante el transcurso del cultivo, pero solamente hubo diferencia significativa ($p < 0.001$) cuando estaba presente el parásito. Cuando se analizaron los resultados obtenidos en la condición de gp41/*T. gondii*, se pudo observar una disminución drástica de la viabilidad celular, destacando que desde el 3º día de cultivo ya había diferencia significativa con el control ($p < 0.05$) y consigo mismo respecto a los otros días, pero al 7º día de cultivo se pudo apreciar la mayor brecha con respecto al control ($p < 0.0001$). Incluso, se pudo observar que en este último día de cultivo con la presencia simultánea de los dos factores produjo una disminución significativa de la viabilidad celular en relación a todas las condiciones de cultivo.

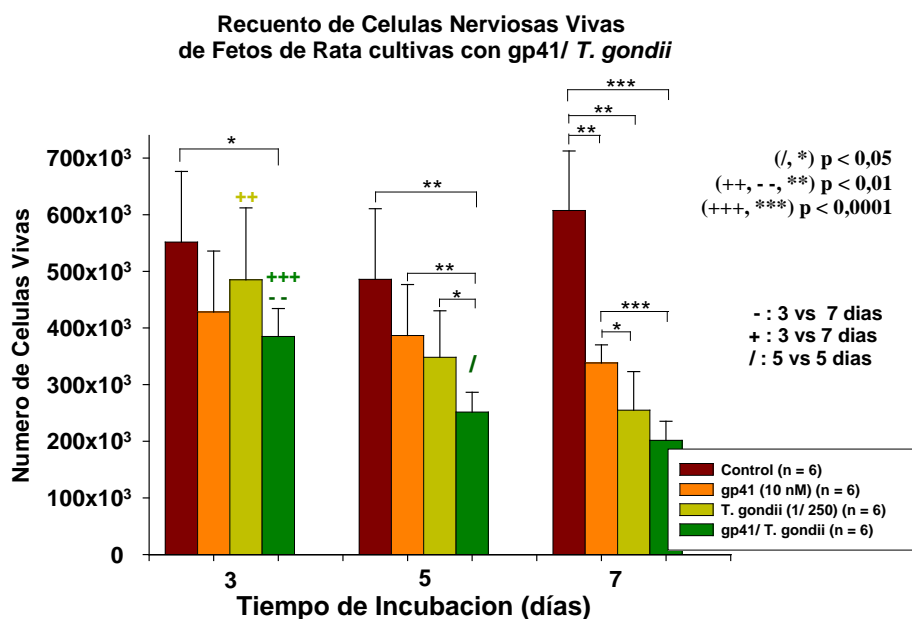


Figura 13. Viabilidad de células nerviosas de feto de rata cultivadas con gp41/*T. gondii*. En la figura se describe la interacción de gp41 y *T. gondii* sobre monocapas de células nerviosas, La viabilidad se cuantificó usando la cámara de Neubauer y se empleó Azul de Tripano como colorante de exclusión. Los resultados se representan por barras (promedio \pm DS). Los tratamientos fueron: Control: Células Nerviosas; gp41: Células Nerviosas + gp41 (10 nM); *T. gondii*: Parásito + Células Nerviosas (1/250); gp41/*T. gondii*: Células Nerviosas en interacción con ambos gp41 y *T. gondii*. Los pozos contenían entre 250-300.000 células. Los signos (+, -, /, *) señala diferencia significativa ($p < 0,05$); (++, --, //, **) indica mas significancia ($p < 0,01$) y (+++, ---, ///, ***) denota aun más significancia ($p < 0,0001$) que los casos anteriores, además se señala la diferencia en la misma condición a lo largo del tiempo de cultivo (-, +, /). Las diferencias en los promedios fueron analizadas por la prueba estadística T de Student para datos no pareados y Mann-Whitney para los no paramétricos. DS: Desviación Standard.

En la **figura 14** se observa el comportamiento de la viabilidad celular en presencia del virus completo. Los resultados evidencian que el número de células vivas aumentó significativamente en el control, indicando que hubo replicación celular ($p < 0.01$ en la mayoría de los casos) respecto a los tratamientos. En presencia solamente del virus en la monocapa celular se pudo observar que el número de células vivas se vio comprometido, produciéndose una disminución de sus valores, la cual fue significativamente diferente ($p < 0.01$) vs control a partir del 5° día de cultivo. Cuando se analizó la viabilidad en la presencia simultánea del virus y el parásito *T. gondii*, se constató que el número de células vivas fue el más bajo en relación a todas las condiciones durante la cinética ($p < 0.01$).

Mientras que la condición con el parásito *T. gondii* presentó diferencia significativa ($p < 0.01$) en el 3° y 7° día respecto vs control.

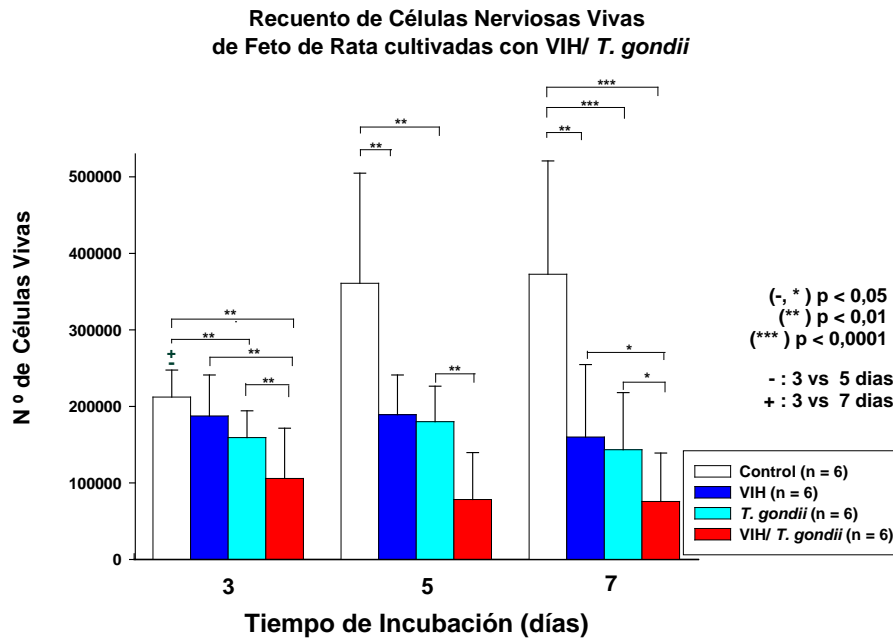


Figura 14. Recuento de células nerviosas vivas de feto de rata cultivadas con VIH/*T. gondii*. La viabilidad se determinó con el empleo de la cámara de Neubauer y se usó Azul de Tripano como colorante de exclusión. Se muestra el número de células nerviosas en incubación. Los resultados se representan por barras (promedio \pm DS). Control: 250-300.000 células/ pozo; VIH: células nerviosas + Virus ($> 2.500.000$ copias/mL); *T. gondii*: parásitos + células nerviosas (1/250); VIH/*T. gondii*: células nerviosas + patógenos. Los signos (-, *) señalan diferencia significativa ($p < 0,05$); ** diferencia más significativa ($p < 0,01$) y *** diferencia estadística aun con mayor significancia ($p < 0,0001$) respecto a los anteriores. Los signos + y - señalan diferencia entre la misma condición a lo largo del tiempo de cultivo. Las diferencias en los promedios fueron analizadas por la prueba estadística T de Student para datos no pareados y Mann-Whitney para los no paramétricos. DS: Desviación Standard.

11.2.- Mortalidad de Células Nerviosas de Feto de Rata cultivadas en forma simultánea con gp41/ *T. gondii* o VIH/ *T. gondii*

Cuando se analizaron los resultados de mortalidad obtenidos de los ensayos con las diferentes condiciones de cultivo se pudo evidenciar cambios importantes, tanto en la presencia de gp41 (**figura 15**) como de la partícula viral (**figura 16**). En el caso de los ensayos con la presencia de la glicoproteína viral en el cultivo celular, se pudo observar que en la condición control, los valores de mortalidad fueron inferiores significativamente al resto de las condiciones a lo largo de la cinética. Este resultado

observado en los controles es inversamente proporcional al encontrado en los controles de viabilidad, como se describió anteriormente, donde hubo replicación celular en la condición control. En presencia de la gp41, hubo un incremento del porcentaje de mortalidad vs control, incluso al 3° día de cultivo, pero la diferencia se hace significativa ($p < 0.05$) a partir del 5° día de cultivo. Pero además el porcentaje fue diferente ($p < 0.05$) en sí mismo en los días 5 y 7 vs 3 días.

En el caso de la condición de *T. gondii*, a pesar que presentó un aumento en el porcentaje de mortalidad al 5° día vs 3° día de cultivo ($p < 0.01$), no se evidenció diferencia significativa cuando se comparó con los valores del grupo control.

Finalmente, en la condición gp41/*T. gondii* se pudo constatar el mayor porcentaje de mortalidad respecto a la condición control a lo largo de la cinética, e incluso con tendencia también a ser diferente los valores al del resto de las condiciones. Es destacar que en el 7° día se presencié una ligera disminución en el porcentaje de mortalidad en todas las condiciones, excepto en gp41/*T. gondii* que fue similar al 5° día.

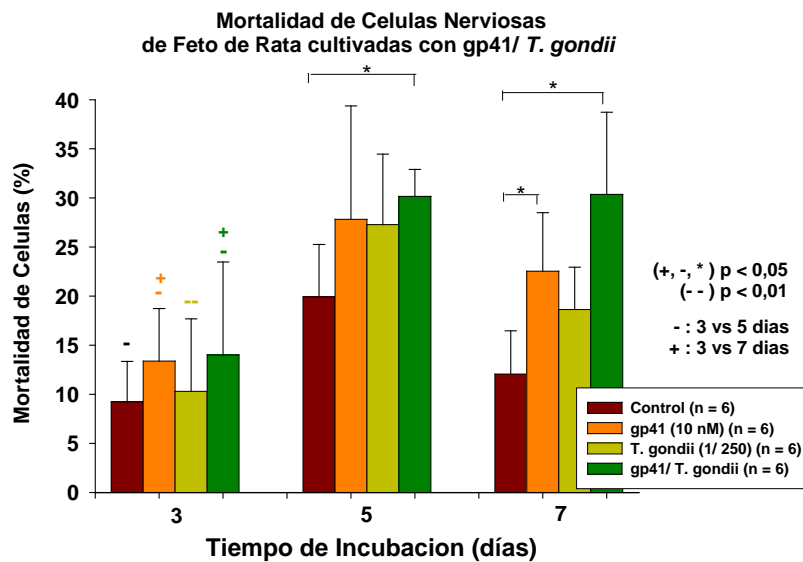


Figura 15. Mortalidad de células nerviosas de feto de rata cultivadas con gp41/*T. gondii*. El porcentaje de mortalidad se calculó a partir del número de células muertas usando Azul de Tripiano como colorante de exclusión y conteo en cámara de Neubauer. Los resultados se representan por barras (promedio \pm DS). Control: Células Nerviosas; gp41 (10 nM): Células Nerviosas + gp41; *T. gondii*: Parásito + Células Nerviosas (1/250); gp41/*T. gondii*: Células Nerviosas en interacción con ambos gp41 y *T. gondii*. Los pozos contenían entre 250-300.000 células. Los signos (+, -, *) indica diferencia estadística significativa ($p < 0,05$), dos (- -) indica mayor significancia estadística ($p < 0,01$), además se señala la diferencia en la misma condición pero a lo largo del tiempo de cultivo (+, -). Las diferencias en los promedios fueron analizadas por la prueba estadística T-Student para datos no pareados y Mann-Whitney para los no paramétricos. DS: Desviación Standard.

En la **figura 16** se muestra los resultados de mortalidad obtenidos en presencia del virus completo y sus respectivos controles. A partir del 3° día de cultivo, se puede describir un comportamiento similar al anterior ensayo (presencia de gp41), es decir, un aumento de la mortalidad con las diferentes condiciones de cultivo vs control. Observamos un aumento del porcentaje de mortalidad en la presencia del VIH, con diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en los días 3 y 7 respecto al control. En la condición con *T. gondii* se halló que existe un alto nivel de muerte en las células nerviosas a los 3° y 7° días de cultivo respecto al control ($p < 0.05$). Además, se observó en esta condición un aumento de la mortalidad a partir del 5° día vs 7° de cultivo ($p < 0.05$). Finalmente, en la condición VIH/*T. gondii*, se notó que el efecto de daño celular se potencia cuando ambos patógenos están juntos. Se obtuvieron los valores más altos de mortalidad con respecto al resto de las condiciones. Efectivamente, se pudo verificar un aumento de la mortalidad respecto al control y al resto de tratamientos ($p < 0.01$). Incluso, con esta condición se observó que la mortalidad aumenta a medida que suceden los días de cultivo, con diferencia estadística ($p < 0.05$).

Mortalidad de Células Nerviosas de Feto de Rata cultivadas simultáneamente con VIH/*T. gondii*

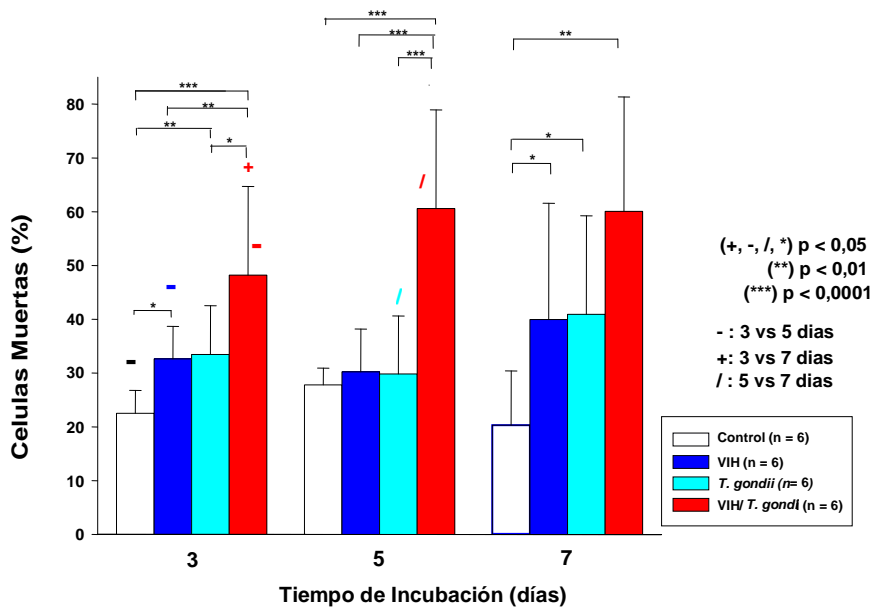


Figura 16. Mortalidad en células nerviosas de feto de rata cultivadas con VIH/*T. gondii*. Las células muertas se identificaron y contabilizaron con Azul de Tripano empleando cámara de Neubauer. Los resultados se representan por barras (promedio \pm DS). Las condiciones fueron: Control: 250-300.000 células/pozo; VIH: células + Virus ($>$ 2.500.000 copias/mL); *T. gondii*: parásitos + células (1/250); VIH/*T. gondii*: células en interacción con ambos patógenos. Todos los posos contenían el mismo número de células: 250-300.000. Los signos (+, -, /, *) indican diferencia estadística significativa ($p < 0,05$), ** indican mayor significancia ($p < 0,01$), *** aun mayor diferencia significativa ($p < 0,0001$) respecto a los anteriores. Los signos (+, -, /) indican diferencia en la misma condición pero a lo largo del tiempo de cultivo. Las diferencias en los promedios se analizaron por la prueba estadística T de Student para datos no pareados y Mann-Whitney para los no paramétricos. DS: Desviación Standard.

11.3.- Apoptosis en Células Nerviosas de Feto de Rata cultivadas en forma simultánea con gp41 o VIH/ *T. gondii*.

El VIH no infecta a células de rata pero la interacción de sus proteínas con las células puede conducir a daños irreparables de las mismas que terminan en apoptosis (Adamson y col., 1999a). Por otra parte el parásito *T. gondii* tiene un amplio efecto de infección sobre células de diferentes especies (Cordero y col., 1999); en nuestro caso infecta a las células de rata y les causa daños irreversibles. Nos propusimos a medir la apoptosis en

este trabajo empleado el fenotipo de la Anexina V mediante la técnica de citometría de flujo, cuyos resultados son mostrados en las **figuras 17, 18, 19, 20, 21**.

En la **figuras 17 y 18** se muestran citogramas de un experimento típico con los diferentes parámetros medidos por citometría de flujo en los cultivos de células nerviosas incubadas con gp41 y gp41/ *T. gondii* con sus respectivos controles en ambos casos. Los parámetros de dispersión se observan en las **figura 17A**, para el tratamiento control y **17C** para el tratamiento con gp41; mientras en la figura **18A** corresponde al control y **18C** hace referencia al tratamiento con gp41/ *T. gondii*. Para ambas figuras, en el eje Y se representa la complejidad de las células nerviosas viéndose así que unas células mostraron mayor complejidad que otras; en el eje X se muestra el tamaño de las células y al igual que la complejidad se observó que estas células varían en tamaño. Por otro lado en la figura **17B** corresponde al control y **17D** representa la condición con gp41, siguiendo este orden la figura **18B** está representado el control y en la **18D** el grupo gp41/ *T. gondii*. Ahora se representan en las figuras ya mencionadas (17B, 17D, 18B y 18D) las subpoblaciones de células en apoptosis de la muestra total diferenciándose del resto como se señala en la figura con la zona demarcada del citograma (cuadrante derecho inferior). Se observa que un porcentaje pequeño de la población celular total expresan la fosfatidilserina en la cara externa de la membrana de las células siendo estas reconocidas mediante la unión de la Anexina V. Observamos que en ambas figuras 17 y 18 los valores en los controles fueron menor respecto a las condiciones gp41 y gp41/ *T. gondii*. Los resultados obtenidos por citometría de flujo se procedieron a representarlos en la grafica de barras como se muestra en la **figura 19**.

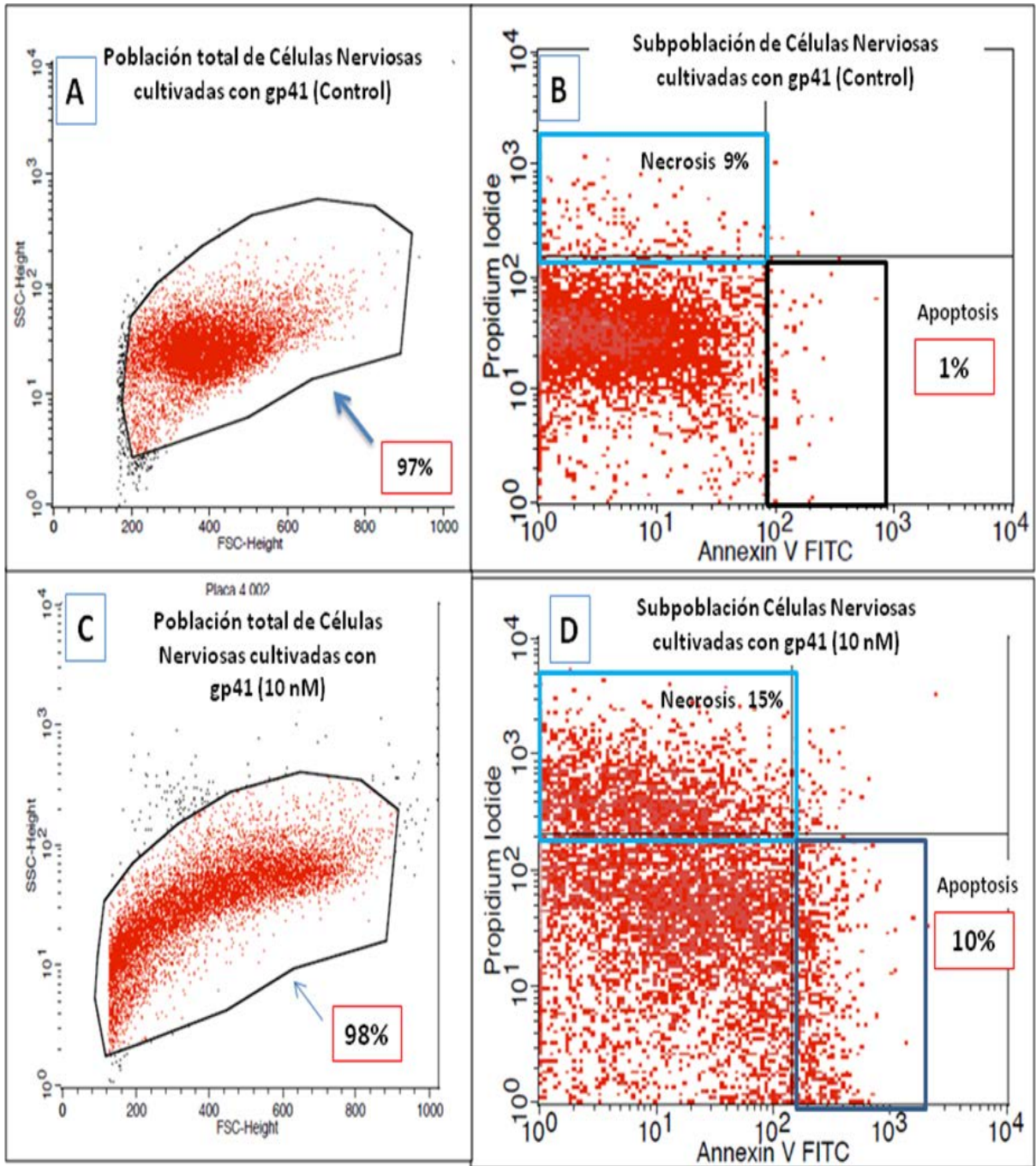


Figura 17. Citograma para la determinación de apoptosis en células nerviosas de feto de rata cultivadas con gp41. Determinación de apoptosis de un experimento típico. Se indica la complejidad y tamaño de la población total de células nerviosas cultivadas con gp41 (10 nM) (C) y su respectivo control (A). La población de células nerviosas apoptóticas se determinó usando el marcaje del fenotipaje de la Anexina V como se muestra en los cuadrantes [B (control) y D (gp41)]. La población de células necróticas se midió con el marcaje del ADN con yoduro de propidio como se muestra en (B) y (D). Los porcentajes están enmarcados en un recuadro.

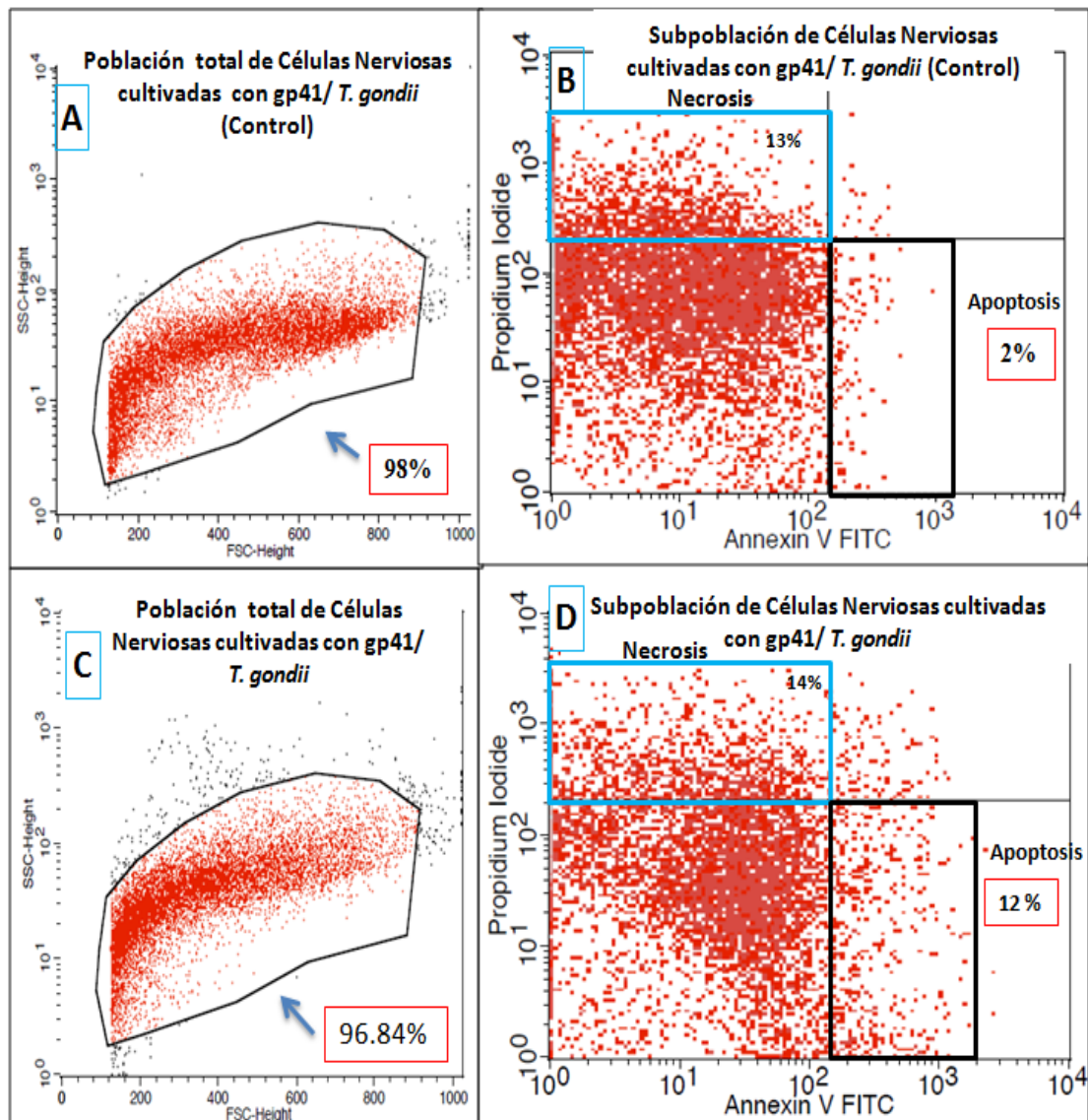


Figura 18. Citograma para la determinación de apoptosis en células nerviosas cultivadas con gp41/ *T. gondii* Determinación de apoptosis de un experimento típico. Se indica la complejidad y tamaño de la población total de células nerviosas cultivadas con gp41/ *T. gondii* (1/250) (C) y su respectivo control (A). La población de células nerviosas apoptóticas se determinó usando el marcaje del fenotipaje de la Anexina V como se muestra en los cuadrantes [B (control) y D (gp41/ *T. gondii*)]. La población necrótica se midió con el marcaje del ADN con yoduro de propidio, cuyos resultados son mostrados en (B) y (D). Los porcentajes están enmarcados en un recuadro.

En la **figura 19** se muestran los resultados obtenidos mediante la lectura de las células por la técnica citometría de flujo, donde se indica el porcentaje de apoptosis celular al interactuar la gp41 del virus y el parásito *T. gondii* con el cultivo celular. Se encontró que hubo incremento de la apoptosis a partir del 3° día de cultivo en presencia de gp41,

dependiente del tiempo de cultivo ($p < 0.05$). Además, se observa que los valores de apoptosis mayores en relación a los valores del grupo control, los cuales son diferentes significativamente ($p < 0.05$) a partir del 5° día de cultivo. Sin embargo, en presencia de taquizoítos de *T. gondii*, se pudo observar que no hubo inducción de apoptosis durante toda la cinética, cuyos valores fueron similares respecto al grupo control. Mientras que la presencia simultánea de gp41/*T. gondii* ocasionó una tendencia al incremento del porcentaje de apoptosis y a partir del 5° día de cultivo se observó diferencia estadística ($p < 0.05$) respecto al control y a la condición *T. gondii*.

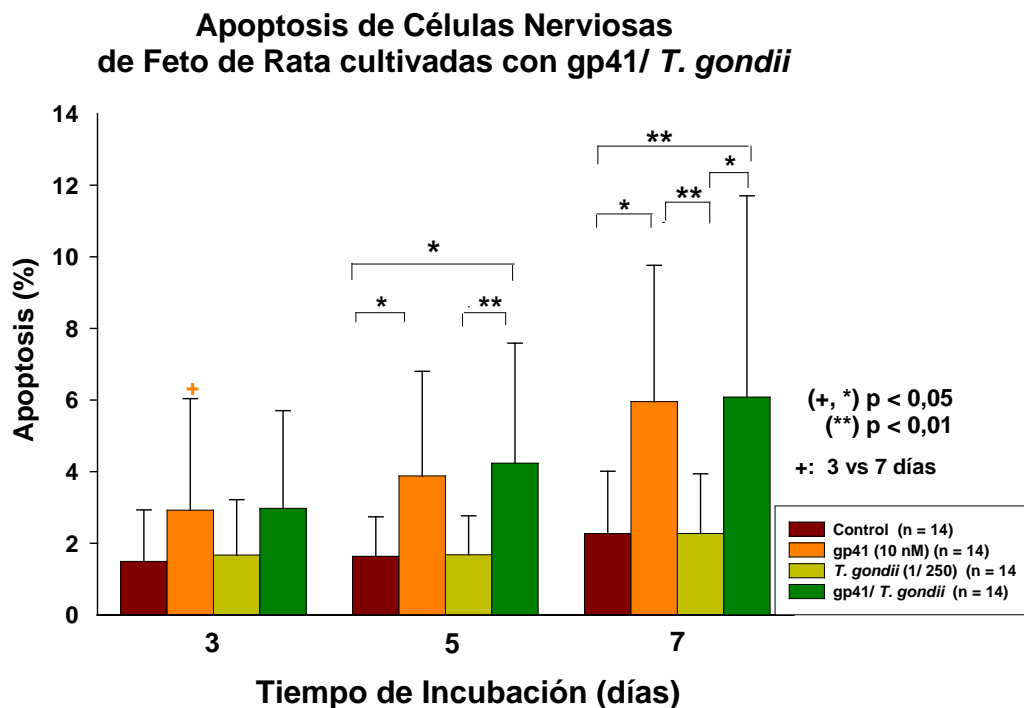


Figura 19. Apoptosis de Células de feto de rata cultivadas con gp41/*T. gondii*. La apoptosis se determinó por el marcaje del fenotipaje de Anexina V, usando la técnica de Citometría de Flujo. Los resultados se representan por barras (promedio \pm DS). Control: células nerviosas; gp41: células nerviosas + gp41 (10 nM); *T. gondii*: parásitos + células nerviosas (1/250); gp41/*T. gondii*: células nerviosas en interacción con la gp41 y el parásito. Los signos (+, *) indican diferencia estadística ($p < 0,05$), ** indican que existe aun mayor diferencia estadística ($p < 0,01$) entre las condiciones respecto a las anteriores. El signo + indica diferencia entre la misma condición a lo largo del tiempo de cultivo. Las diferencias estadísticas se determinaron empleando las pruebas T de Student para datos paramétricos y Mann-Whitney para los no paramétricos. DS: Desviación Standard.

En la **figura 20** se señala los resultados en un citograma de las células nerviosas incubadas con el virus VIH y el protozooario *T. gondii* utilizándose la técnica de

citometría de flujo, y al igual que con gp41, el virus indujo apoptosis en dichas células, estos valores se representan en la zona demarcada, indicándose primero en esta prueba paramétrica la distribución de complejidad y tamaño [figura 20A (Control) y 20C (VIH/ *T. gondii*)] en la población total de células nerviosas estimuladas. Del total de la población, una pequeña subpoblación de células se encontró inducida a apoptosis. Estos resultados se demarcan en el citograma (cuadrante inferior derecho) (figura 20B (Control) y 20D (VIH/*T. gondii*)). Así, también se señala el resultado de necrosis obtenido de la población total, identificadas con yoduro de propideo que se une al ADN.

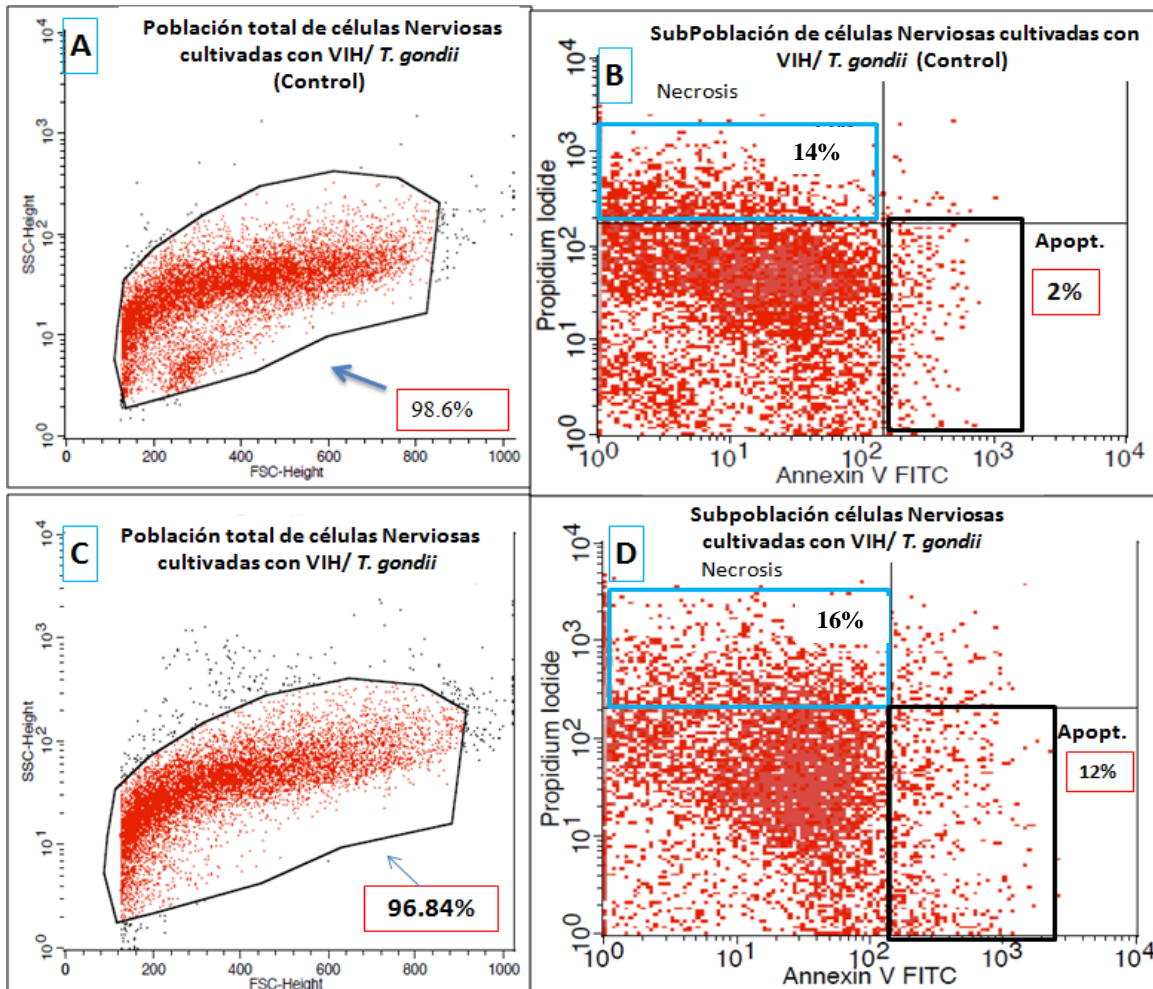


Figura 20. Citograma para medir Apoptosis de Células Nerviosas cultivadas con VIH/ *T. gondii*. Determinación de apoptosis de un experimento típico. Se indica la complejidad y tamaño de la población total de células nerviosas cultivadas con VIH/ *T. gondii* (1/250) (C) y su respectivo control (A). La población de células nerviosas apoptóticas se determinó usando el marcaje del fenotipaje de la Anexina V como se muestra en los cuadrantes [B (control) y D (VIH/ *T. gondii*)]. La población necrótica se midió con el marcaje del ADN con yoduro de propideo, cuyos resultados son mostrados en (B) y (D). Los porcentajes están enmarcados en un recuadro.

En la **figura 21** se muestra los resultados promedio del porcentaje de apoptosis inducido por la interacción del virus y *T. gondii* con las células nerviosas usando la técnica citometría de flujo. Los resultados obtenidos indican que la condición control presentó una disminución de la apoptosis dependiente del tiempo de cultivo, donde al 7° día se obtuvieron los valores más bajos respecto al 3° día ($p < 0.01$) y al 5° día ($p < 0.01$). Por otra parte, se puede observar que la presencia del VIH activó el proceso de apoptosis celular mostrando una tendencia mayor al del grupo control, pero observándose diferencia significativa solamente en el 7° día de cultivo ($p < 0.05$); mientras que en la presencia del parásito *T. gondii* no hubo inducción de apoptosis, cuyos valores no presentan diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los días del desarrollo del ensayo con respecto a los valores del grupo control.

Cuando se analizaron los valores de apoptosis bajo la presencia simultánea de VIH/*T. gondii*, se observó que ocurre un incremento de la apoptosis dependiente del tiempo de cultivo, se cuantificó los mayores valores del cultivo en relación a los del control, con diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$) partir del 5 día de cultivo. Incluso, se observó mayores valores de apoptosis en este 7° día de cultivo con respecto al resto de las condiciones del ensayo.

Apoptosis de Células Nerviosas de Feto de Rata cultivadas con VIH/ *T. gondii*

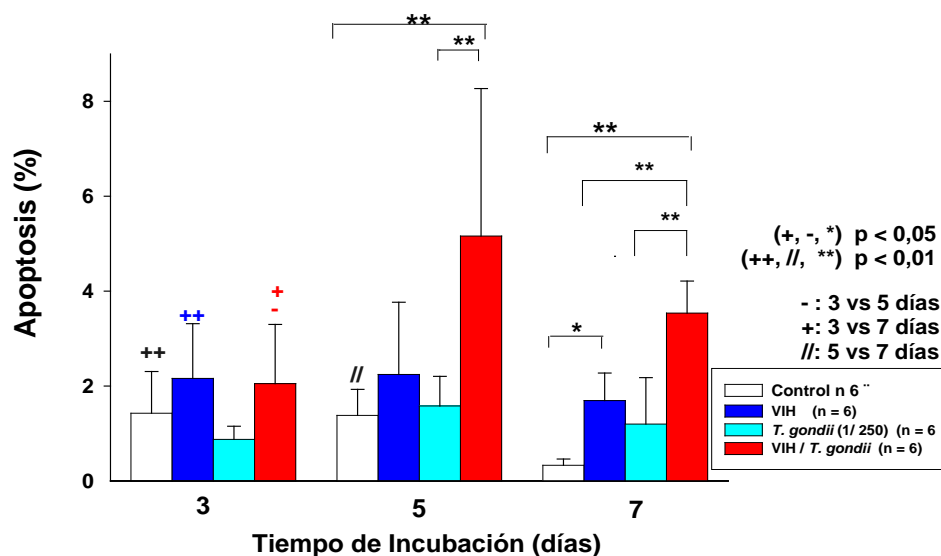


Figura 21. Apoptosis de Células Nerviosas de Feto de Rata cultivadas con VIH/*T. gondii*. El porcentaje de Apoptosis se determinó por el marcaje del fenotipaje de Anexina V, empleando para su análisis la técnica de Citometría de Flujo. Se cultivaron 250-300.000 células/pozo. Los resultados se representan por barras (promedio \pm DS). Las condiciones son: Control: células; VIH: células + Virus (2.500.000 copias/ ml); *T. gondii*: parásitos + células (1/250); VIH/*T. gondii*: células interactuando con ambos patógenos. Los (+, - *) indican diferencia estadística ($p < 0,05$), mientras que (++, //, **) indica diferencia estadística aun mas significativa ($p < 0,01$) entre las condiciones; por otro lado (-, +, /), señala diferencia estadística ($p < 0,05$) en la misma condición pero a lo largo del tiempo de cultivo. Las diferencias en los promedios se determinaron por la prueba estadística T de Student para los datos no pareados y Mann-Whitney para los no paramétricos. DS: Desviación Standard.

11.4.- Necrosis en Células Nerviosas de Feto de Rata cultivadas en forma simultánea con gp41 o VIH/ *T. gondii*

En la **figura 17 y 18** se muestra los resultados de inducción de necrosis cuantificada por citometría de flujo, donde en las **figuras 17A** (control), **17C** (gp41), y **18A** (control), **18C** (gp41/*T. gondii*). Se representan los parámetros de complejidad y tamaño de la población total, y en las **figuras 17B** (control), **17D** (gp41/ *T. gondii*) y **18B** (control), **18D** (gp41/*T. gondii*) se indica propiamente el resultado de la subpoblación de células que se encuentran en necrosis y que fueron marcadas por yoduro de propideo. También en la **figura 20A** (control), **20C** (VIH/*T. gondii*) se muestra la complejidad y tamaño, y

en **20B** (control), **20D** (VIH/*T. gondii*) se muestra los resultados de subpoblación de necrosis obtenidos con el virus completo y el protozooario señalado en el citograma.

En las **figuras 22 y 23**, se muestran los resultados de necrosis encontrados en las diferentes condiciones experimentales aplicadas a la monocapa de células nerviosas. En la **figura 22** se puede observar que al 3° y 5° día de cultivo, los valores de necrosis en las tres condiciones fueron similares a los encontrados en el grupo control, a pesar que hay una tendencia de mayor porcentaje de necrosis en las condiciones de gp41 y gp41/*T. gondii*. Sin embargo, en el último día de cultivo fue que se pudo observar que con estas dos últimas condiciones de cultivo hubo un aumento significativo de necrosis ($p < 0.05$) con respecto al control y en presencia del parásito. La condición gp41/*T. gondii* presentó que tal incremento es dependiente del tiempo.

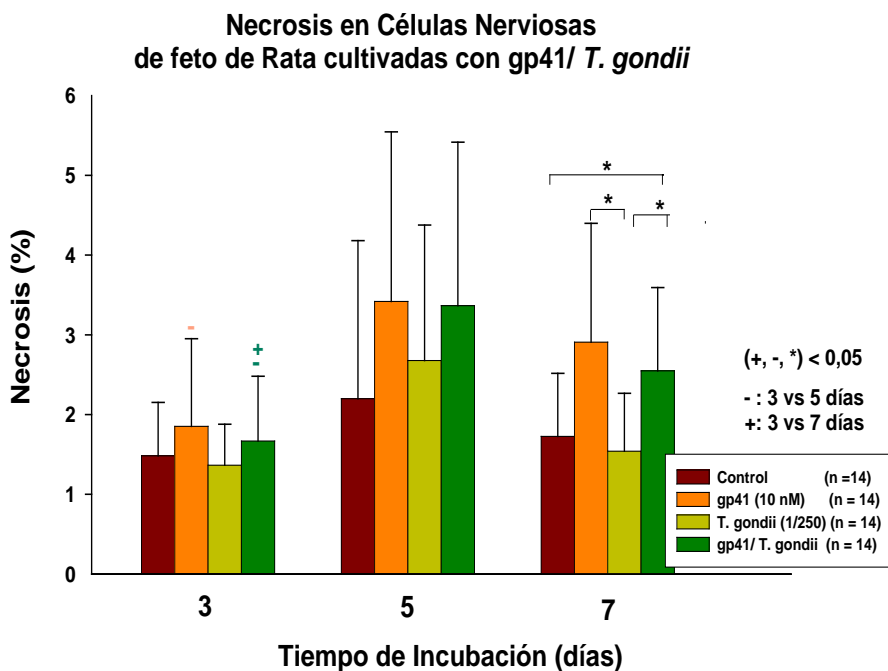


Figura 22. Necrosis en células nerviosas de feto de rata cultivadas con gp41/*T. gondii*. El porcentaje de Necrosis se determinó usando Yoduro de Propideo, que marca el ADN nuclear de la célula necrótica y se cuantificó mediante Citometría de Flujo. Las condiciones son: Control: Células nerviosas; gp41: Células Nerviosas + gp41 (10 nM); *T. gondii*: Parásitos + Células Nerviosas (1/250); gp41/*T. gondii*: Células Nerviosas interactuando con gp41 y *T. gondii*. Los resultados se representan por barras (promedio \pm DS). Los signos (+, -, *) indican diferencia estadística significativa ($p < 0,05$) entre las condiciones, además los signos (+, -) señalan diferencia estadística ($p < 0,05$) entre la misma condición pero a lo largo del tiempo de cultivo. Las diferencias en los promedios se determinaron por la prueba estadística T de Student para los datos no pareados y Mann-Whitney para los no paramétricos. DS: Desviación Standard.

En la **figura 23** se muestran los resultados obtenidos del porcentaje de necrosis en presencia del VIH/*T. gondii* sobre la monocapa de células nerviosas. El control presentó disminución significativa de la necrosis a lo largo de la cinética ($p < 0.05$). Sin embargo, en la condición de VIH/*T. gondii*, se pudo observar que a partir del 3° día de cultivo hubo un aumento de necrosis con respecto a los valores del grupo control y *Toxoplasma* ($p < 0.01$) manteniéndose hasta el 7° día de cultivo. Mientras que la presencia única del VIH, se observó que los valores de necrosis aumentaron significativamente ($p < 0.05$) a partir del 5° día de cultivo en relación al grupo control. Nuevamente se pudo verificar que la presencia de taquizoítos de *Toxoplasma* no induce necrosis en las células, cuyos valores fueron similares a los del grupo control durante toda la cinética.

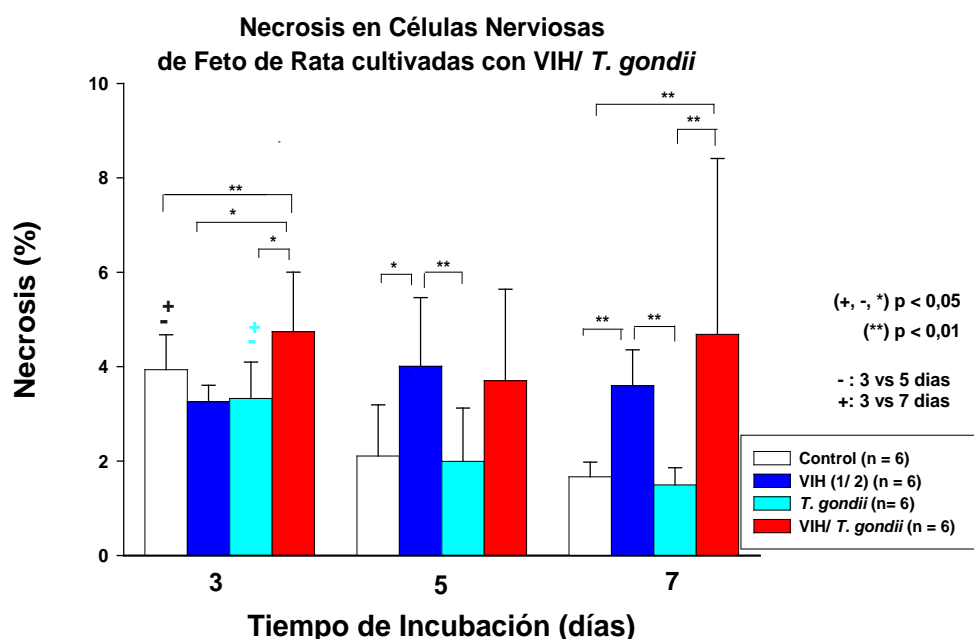


Figura 23. Necrosis en células nerviosas de feto de rata cultivadas con VIH/*T. gondii*. El porcentaje de Necrosis se determinó usando Yoduro de Propidio, que marca el DNA nuclear de la célula que están en necrosis y se cuantificó mediante Citometría de Flujo. Las condiciones son: Control: Células nerviosas; VIH: Células Nerviosas + Virus ($> 2.500.000$ copias/mL); *T. gondii*: Parásitos + Células Nerviosas; VIH/*T. gondii*: Células Nerviosas en interacción con ambos patógenos. Los resultados se representan por barras (promedio \pm DS). Se indica diferencia estadística significativa ($p < 0,05$) mediante los signos (+, -, *) y ** indica aun mayor diferencia estadística significativa ($p < 0,01$) entre las condiciones; la diferencia estadística ($p < 0,05$) entre la misma condición a lo largo de tiempo de cultivo se representa por los signos - y +. Las diferencias en los promedios se determinaron por la prueba estadística T de Student para los datos no pareados y Mann-Whitney para los no paramétricos. DS: Desviación Standard.

11.5.- Producción de NO en Células Nerviosas de Feto de Rata cultivadas en forma simultánea con gp41/*T. gondii* o VIH/*T. gondii*:

En las **figuras 24 y 25** se describe la producción de NO en las células nerviosas sometidas a diferentes condiciones. La presencia de gp41 en el cultivo celular produjo un aumento de la producción de NO respecto a la condición control y al grupo *T. gondii* ($p < 0.0001$), a lo largo del tiempo de cultivo (**figura 13**). Mientras que la presencia única de *T. gondii*, los valores de producción de NO sólo alcanzaron a 2 μM a lo largo de la cinética, valor similar al obtenido en el grupo control.

Cuando se cultivaron las células con gp41/*T. gondii*, se pudo observar un aumento estadísticamente significativo en la producción de NO desde el 1° día hasta el 7° día de cultivo en relación a los valores del grupo control y al grupo de los parásitos solamente. Asimismo, con ambas condiciones: gp41 y gp41/*T. gondii*, producen un aumento a lo largo del tiempo de cultivo, que inician con 10 μM al 1° día de cultivo hasta casi 30 μM en el último día cultivo.

Es importante indicar que entre las condiciones de gp41 y gp41/*T. gondii* no se observó ninguna diferencia estadística respecto a la producción de NO.

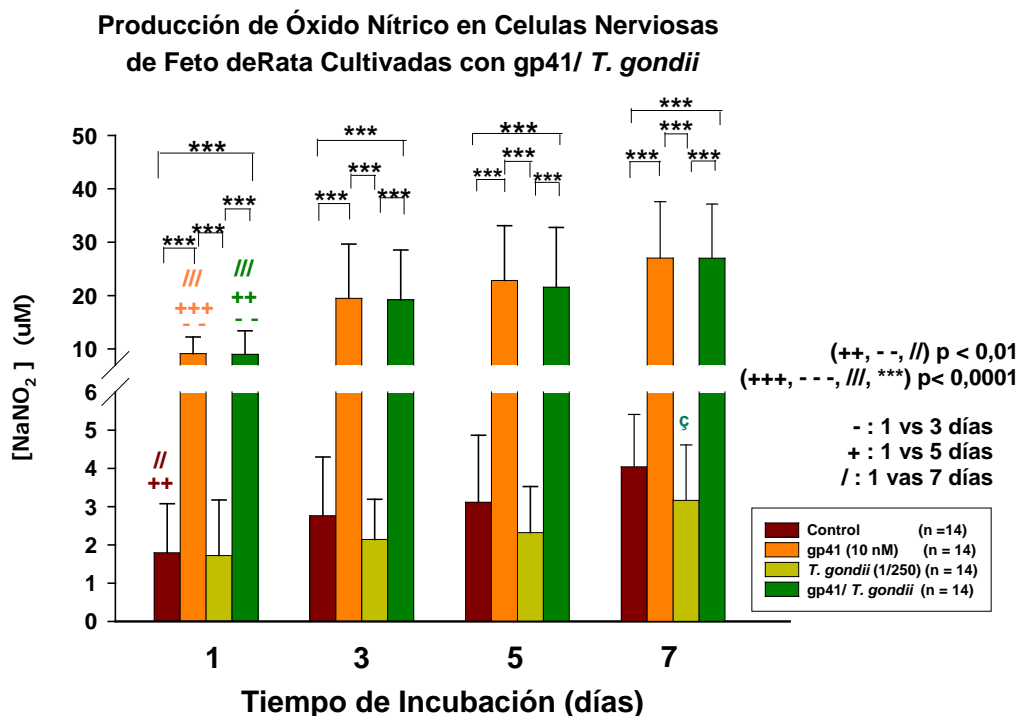


Figura 24. Producción de Óxido Nítrico en células nerviosas de feto de rata cultivadas con gp41/*T. gondii*. La concentración de NaNO_2 fue cuantificada por el reactivo de Griess. Las condiciones comprende: Control: Células Nerviosas; gp41: Células Nerviosas + gp41 (10 nM); *T. gondii*: Parásitos + Células Nerviosas (1/ 250); gp41/*T. gondii*: Células Nerviosas en interacción con gp41 y parásito. Se tiene de 250-300.000 células/pozo. Los resultados se representan por barras (promedio \pm DS). Los signos (++, --, //) indican diferencia bastante significativa ($p < 0,01$) y hubo aun mayor significancia estadística indicada por los signos (+++, ---, ///, ***) con $p < 0,0001$; además se señala la diferencia estadística entre la misma condición a lo largo del tiempo (+, -, /), como se muestra en la leyenda de la grafica. Las diferencias en los promedios se determinaron por la prueba estadística T de Student para los datos no pareados y Mann-Whitney para los no paramétricos. DS: Desviación Standrad.

Cuando se analizaron los resultados obtenidos de la producción de NO en presencia del VIH, se pudo observar que el comportamiento fue similar a los encontrados en el ensayo anterior (**figura 24**). Se encontró que la presencia del VIH y VIH/*T. gondii* se produce un incremento significativo de la producción de NO ($p < 0.0001$) a lo largo del cultivo (**figura 14**) en relación a los valores obtenidos en el grupo control y al grupo *T. gondii* durante toda la cinética. La condición donde estuvo presente *T. gondii* solamente produjo valores de NO similares a los del grupo control (**figura 25**).

Producción de Óxido Nítrico en Células Nerviosas de Feto de Rata cultivadas con VIH/ *T. gondii*

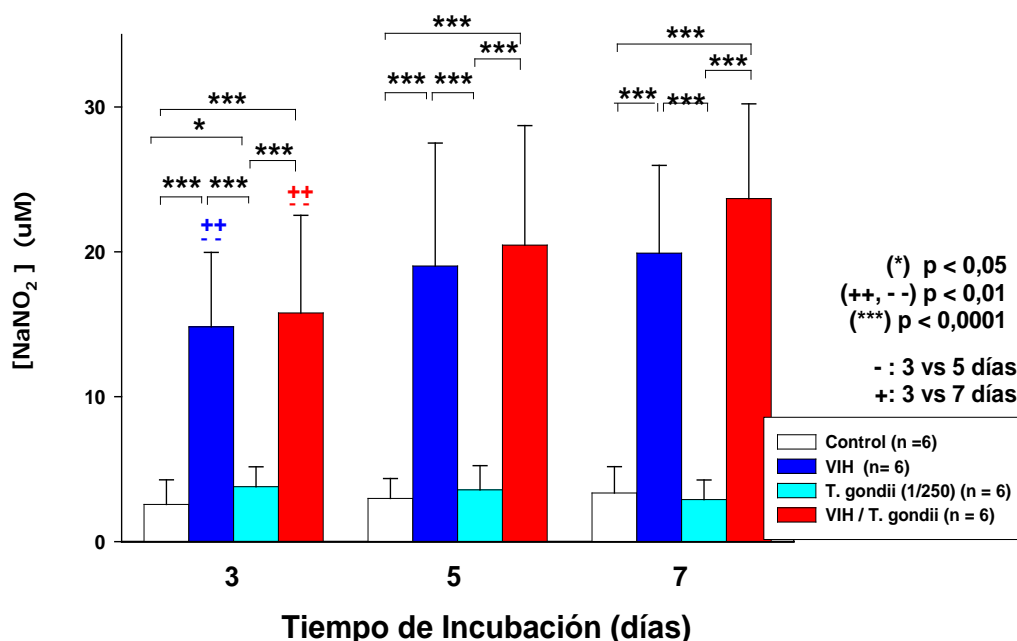


Figura 25. Producción de Óxido Nítrico en células nerviosas de feto de rata cultivadas con VIH/*T. gondii*. La concentración de NaNO₂ fue cuantificada por el reactivo de Griess. Las condiciones comprende: Control: Células Nerviosas; VIH: Células Nerviosas + Virus (> 2.500.000 copias/mL); *T. gondii*: Parásitos + Células Nerviosas (1/250); VIH/*T. gondii*: Células Nerviosas en interacción con ambos VIH y *T. gondii*. Se tiene de 250-300.000 células/ pozo. Los resultados se representan por barras (promedio ± DS). El * indica diferencia estadística significativa (p < 0,05), los signos (+, -) es este caso indica diferencia estadística mas significativa (p < 0,01) y señala la diferencia encontrada en la misma condición pero a lo largo del tiempo de cultivo; por otro lado los *** señala diferencia estadística mucho mas significativa (p < 0,0001) que el resto. Las diferencias en los promedios se determinaron por la prueba estadística T de Student para los datos no pareados y Mann-Whitney para los no paramétricos.

11.6.- Correlación de Apoptosis versus Producción de NO en Células Nerviosas de Feto de Rata cultivadas con gp41 o gp41/*T. gondii*; VIH o VIH/ *T. gondii*

En la **figura 26** se observa la correlación existente entre la producción de NO y el porcentaje de apoptosis cuando interactúa gp41y gp41/*T. gondii* con la monocapa de las células nerviosas. Se observa que existe una correlación positiva estadísticamente significativa (p < 0.0001) entre estos dos parámetros, es decir, a medida que aumenta la

concentración de NO en el medio de cultivo, aumenta también la inducción de apoptosis en presencia de gp41 y *T. gondii* en el cultivo de células nerviosas.

Correlación entre el Porcentaje de Apoptosis vs Producción de Óxido Nítrico en Células Nerviosas cultivadas con gp41/ *T. gondii* (3 - 7 días)

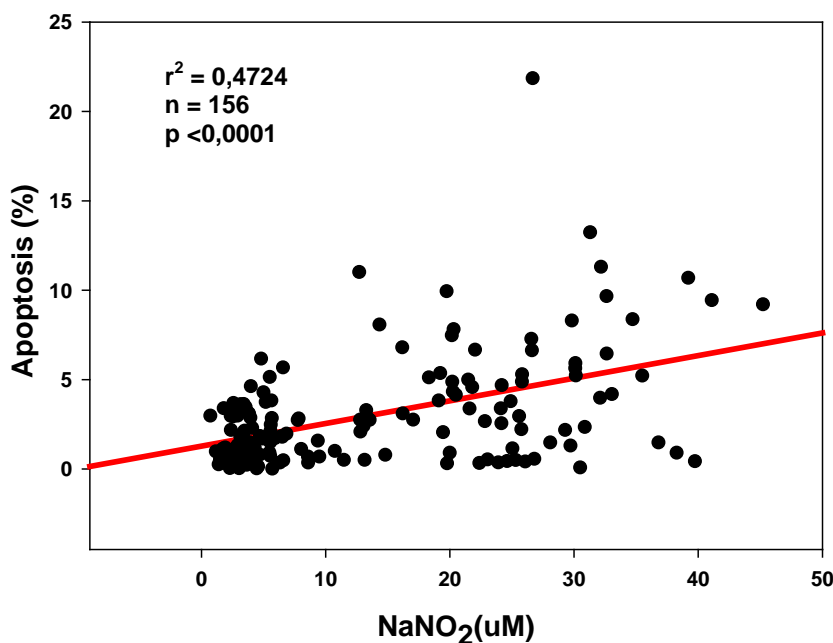


Figura 26. Correlación de NO versus Apoptosis en Células Nerviosas de Feto de Rata cultivadas simultáneamente con gp41/*T. gondii*. Se midió tanto la Apoptosis como la [NO] en la condición gp41/*T. gondii* a los 3, 5 y 7 días de incubación con las células. La Apoptosis se determinó por Anexina V y se cuantificó por Citometría de Flujo. La [NO] se determinó por el reactivo de Griess a 570 nm. La correlación entre los diferentes parámetros obtenidos mediante los ensayos *in vitro* se analizó por la prueba de *Pearson Product Moment*, para datos con distribución normal. Las pruebas se consideraron estadísticamente significativas si los valores de $p < 0,05$.

En la **figura 27** se muestra el análisis de correlación entre la producción de NO y el porcentaje de apoptosis en presencia de VIH y VIH/*T. gondii*. Los resultados indican claramente que existe una correlación positiva estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) entre ambos parámetros. Al aumentar la concentración de NO en el medio se aumenta la inducción de apoptosis en las células nerviosas en cultivo. Esto parece guardar en cierta medida una proporcionalidad entre los aumentos de NO y el porcentaje de apoptosis.

Correlación entre el Porcentaje de Apoptosis vs Producción de Óxido Nítrico en Células Nerviosas cultivadas con VIH/ *T. gondii* (3 - 7 días)

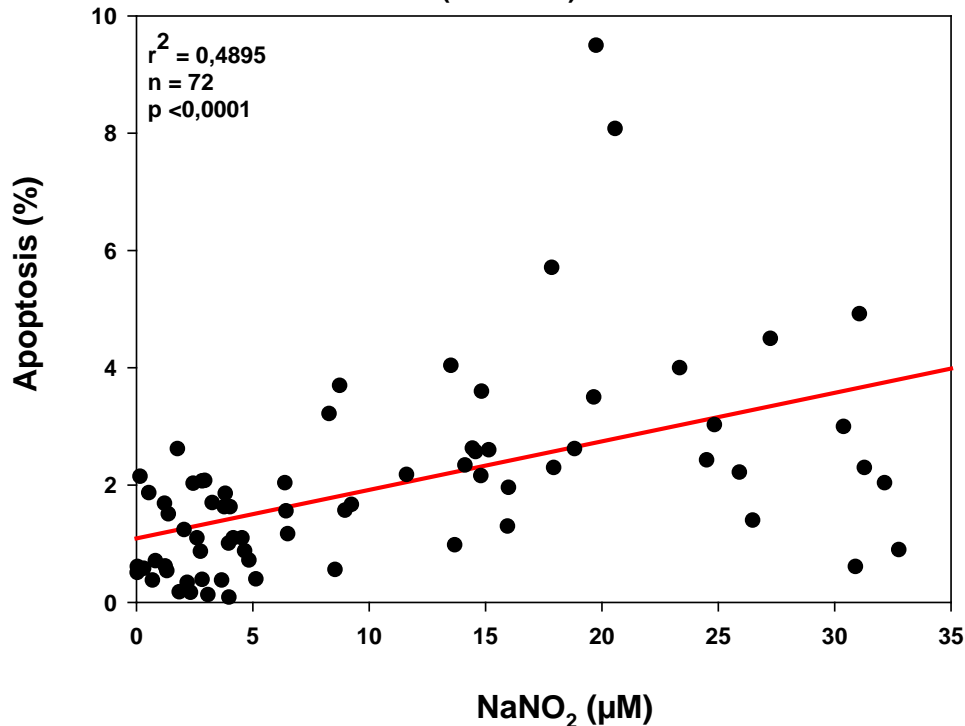


Figura 27. Correlación de NO versus Apoptosis en Células Nerviosas de Feto de Rata cultivadas simultáneamente con VIH. Se midió tanto la Apoptosis como la [NO] en la condición VIH a los 3, 5 y 7 días de incubación con las células. La apoptosis se determinó por Anexina V y se cuantificó por Citometría de Flujo. La [NO] se determinó por el reactivo de Griess a 570 nm. La correlación entre los diferentes parámetros obtenidos mediante los ensayos *in vitro* se analizó por la prueba de *Pearson Product Moment*, para datos con distribución normal. Las pruebas se consideran estadísticamente significativas si los valores de $p < 0,05$.

11.7.- Expresión del Factor Nuclear κ B (NF κ B) en Astrocitos de Fetos de Rata cultivados simultáneamente con VIH/ *T. gondii*.

La población de astrocitos se identificó con anticuerpos específicos conjugado con fluorocromo y cuantificado mediante citometría de flujo, se le determinó la expresión del NF κ B a diferentes tiempos de incubación (2, 4, 6 y 24 horas) bajo la presencia de VIH y *T. gondii*, y cuyos resultados se muestran en un citograma de un experimento típico en la **figura 29**. Se observa así los resultados obtenidos luego de la lecturas de las células estimuladas con VIH/*T. gondii* mediante el empleo de la técnica de citometría de flujo. En la **figura 28** se muestra el citograma correspondiente a la condición control en el

ensayo realizado con VIH/ *T. gondii* incubados en células nerviosas de fetos de rata. En **A** se indica el parámetro de complejidad y tamaño de la población celular; en **B**, la subpoblación de astrocitos (zona demarcada) de la población total de células nerviosas; en **C**, las células que expresan NFκB y en **D**, se demarca la subpoblación de astrocitos que expresan el NFκB. Estos resultados se graficaron en barras en la figura 30.

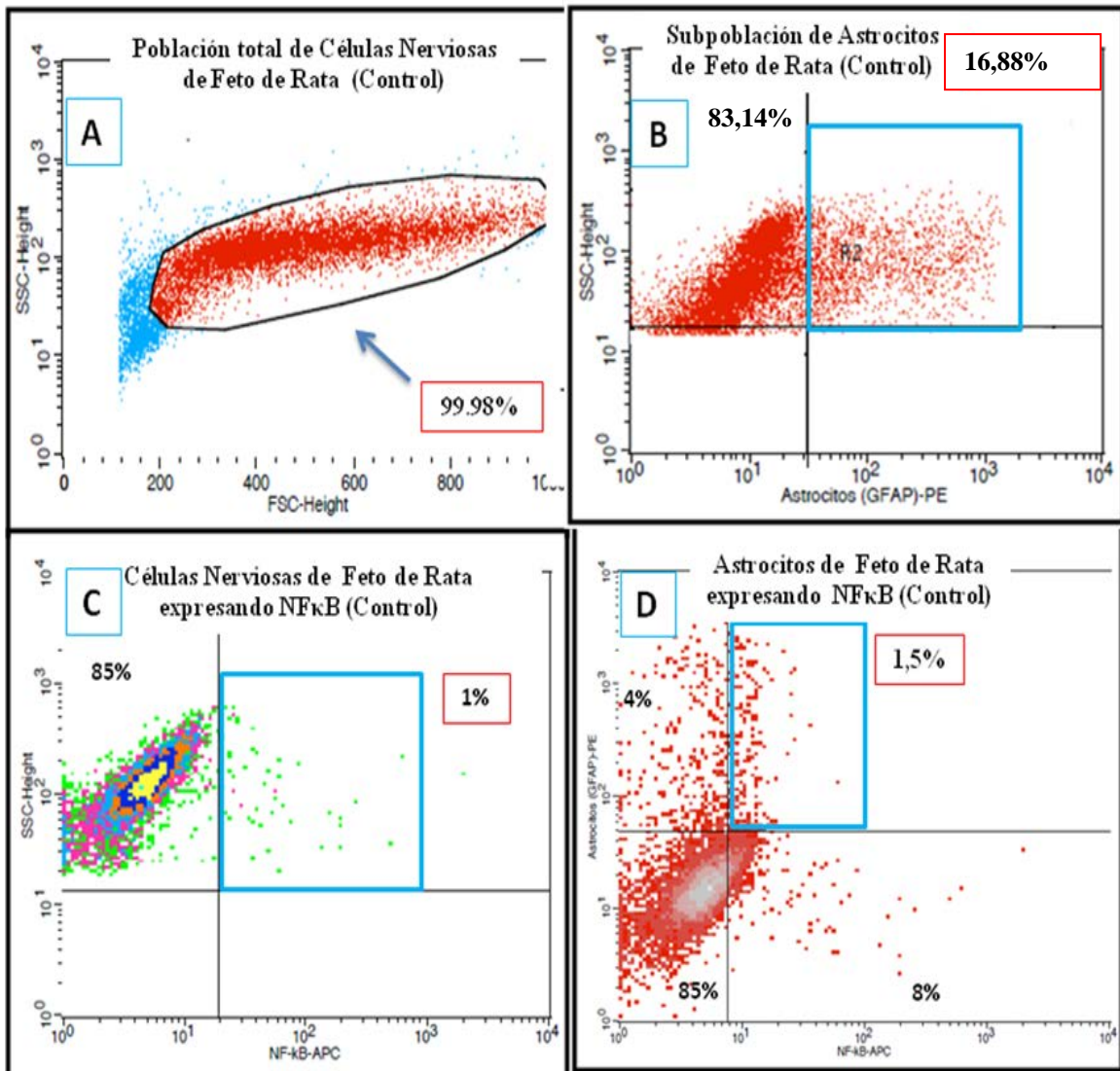


Figura 28. Citograma de la expresión de NFκB en Astroцитos de Fetos de Rata correspondiente a la condición control del ensayo de incubación de células nerviosas con VIH/ *T. gondii*: Se muestra los resultados obtenidos de un experimento típico. Se señala los parámetros de complejidad y tamaño (A). Además se indica en la zona demarcada la subpoblación de astrocitos presente en la población total de células nerviosas (B). De la población total se observa una subpoblación de células nerviosas que expresan NFκB (C). Finalmente se muestra una subpoblación del total de astrocitos que expresaron NFκB (zona demarcada) (D). Para determinar la expresión NFκB se usó un anticuerpo primario anti-NFκB y un secundario IgG1 anti-NFκB-APC; los Astroцитos se determinaron usando un anticuerpo primario IgG1 anti-GFAP y como secundario un Anti- IgG_{2a+b}-PE.

En la **figura 29** se muestran los resultados en citograma típico de la expresión de NFκB en astrocitos de fetos de rata cultivados con virus VIH y el protozooario *T. gondii* de forma simultánea. En **A** se muestra los parámetros de distribución del tamaño y la complejidad de la población total de células nerviosas; en **B** se señala en la zona demarcada la subpoblación de astrocitos del total de la población de células estimulada; en **C** se indica una subpoblación de células nerviosas que expresan NFκB y finalmente en **D** se indica la subpoblación de astrocitos del total de la población de células nerviosas que expresan el NFκB y el valor de alto interés en nuestro trabajo. Al comparar la condición de expresión de NFκB observamos mayor valor de expresión de este factor donde estuvo presente VIH/ *T. gondii*, al igual se observó menor porcentaje de astrocitos en esta condición comparado a su control. Los resultados fueron graficados en barras en la **figura 30**.

Los resultados obtenidos en la medición de expresión de NFκB en astrocitos de fetos de rata incubados con VIH/ *T. gondii* indicaron que a partir de las 2 horas de estimulación, aumenta las células que expresan el NFκB en presencia de VIH y VIH/*T. gondii*, (3% y 6%, respectivamente) vs control (2%), mientras que en presencia de *T. gondii* fue casi cercano al 4% de expresión en ese mismo tiempo de incubación (2 horas), pero sin diferencia estadísticamente significativa con respecto a los valores del grupo control. Sin embargo, a medida que transcurre el tiempo, los valores disminuyen en todas estas condiciones y se hacen similares a los del grupo control, excepto a las 4 horas de estimulación, donde se mantienen altos los valores de células expresando este factor nuclear en presencia del VIH (**figura 30**).

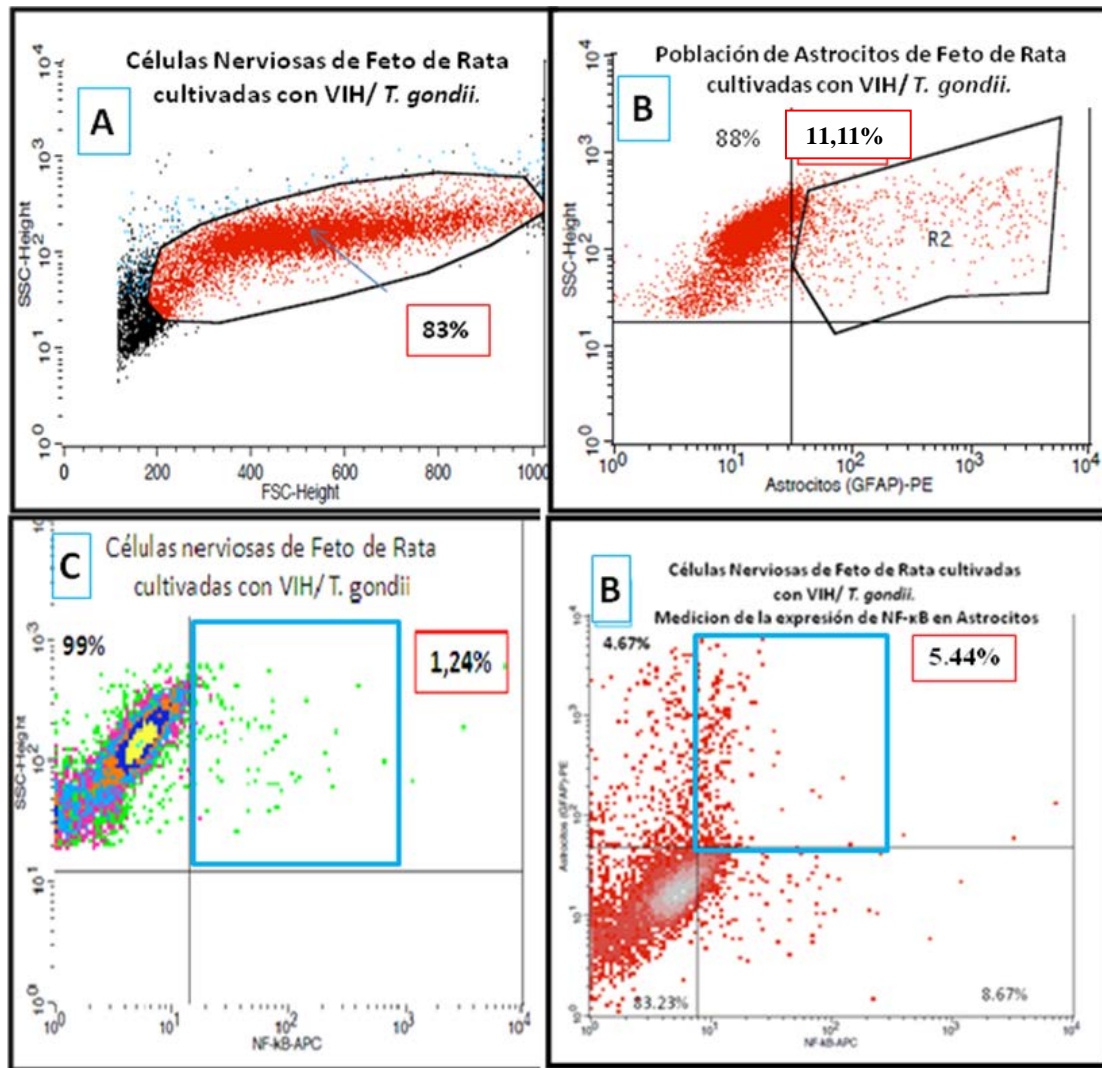


Figura 29. Citograma de la expresión de NFκB en Astrocitos de Fetos de Rata incubados con VIH/ *T. gondii*: Se muestra los resultados obtenidos de un experimento típico. Se señala los parámetros de complejidad y tamaño de la población de células nerviosas (A). Además se indica en la zona demarcada la subpoblación de astrocitos presente en la población total de células nerviosas (B). De la población total se observa una subpoblación de células nerviosas que expresan NFκB (C). Finalmente se muestra una subpoblación del tota de astrocitos que expresaron NFκB (zona demarcada) (D). Para determinar la expresión NFκB se usó un anticuerpo primario anti-NFκB y un secundario IgG1 anti-NFκB-APC; los Astrocitos se determinaron usando un anticuerpo primario IgG1 anti-GFAP y como secundario un Anti-IgG_{2a+b}-PE.

Cuando se analizó la expresión de este factor nuclear en células humanas, células mononucleares de sangre periférica (CMSP), como un experimento control, en presencia de PHA, se pudo observar un aumento de los valores a partir de las 6 horas de estimulación hasta las 24 horas en relación a los valores obtenidos de estas células sin estimulación (**figura 30**).

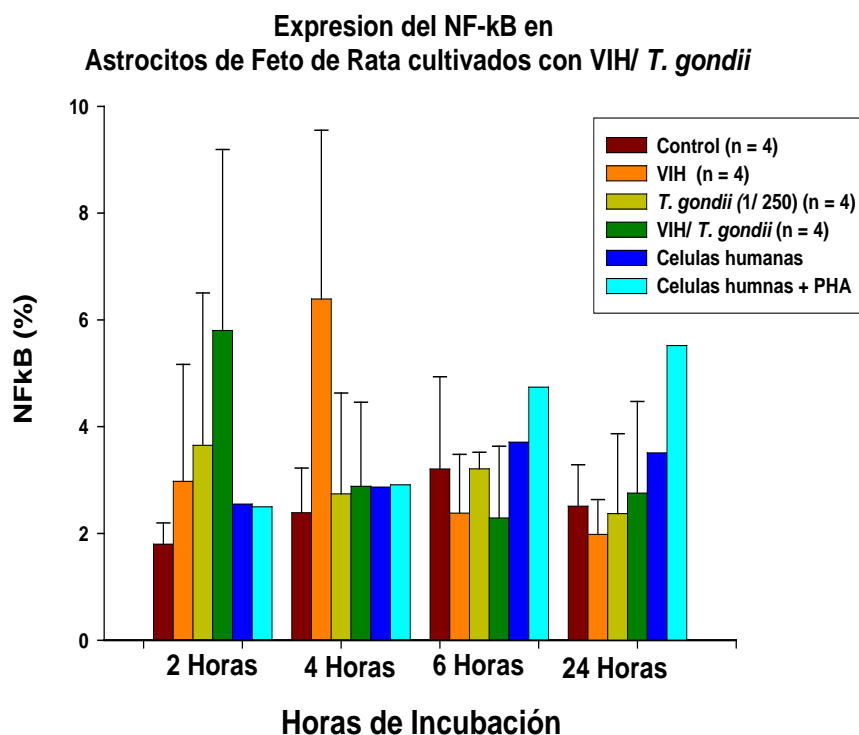


Figura 30. Expresión del Factor Nuclear κB en Astrocitos de Feto de Rata cultivados simultáneamente con VIH/ *T. gondii*. Se cultivaron en placas de 24 unas 200- 250000 células/ poso. Se emplearon dos anticuerpos: primario (IgG1 anti-NFκB) y el secundario (anti-IgG1) conjugado a APC para identificar la expresión en los astrocitos; para conocer la población de astrocitos (no mostrada) se empleó IgG1 anti GFAP (Anticuerpo primario) y un IgG1_{2a+b} conjugado a PE (Anticuerpo secundario), usando la técnica Citometría de Flujo. Las condiciones de ensayo fueron: Control: células nerviosas; VIH: células nerviosas + virus (> 2500000 copias/ mL); *T. gondii*: parásitos + células nerviosas; VIH/*T. gondii*: células nerviosas en interacción con ambos patógenos; Células Humanas: linfocitos + monocitos; Células Humanas + PHA. Los resultados se representan por barras (promedio ± DS). Las diferencias en los promedios se determinaron por la prueba estadística T de Student para los datos no pareados y Mann-Whitney para los no paramétricos. DS: Desviación Standard.

11.9.- Producción de NO en Astrocitos de Fetos de Rata estimulados simultáneamente con VIH/ *T. gondii* y en Células Mononucleares de Sangre Periférica estimuladas con PHA

Se procedió a medir la producción de NO en las células nerviosas de fetos de rata y en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de humano en presencia de las diferentes condiciones de estimulación. Los resultados obtenidos (**figura 28**) indican

que la producción de NO incrementa en las células nerviosas a partir de las 2 horas de estimulación en presencia de VIH y VIH/*T. gondii* ($> 6 \mu\text{M}$). Tal incremento es dependiente del tiempo. Además, se observa que aumenta significativamente ($p < 0.01$) con respecto a los valores del grupo control y al grupo *T. gondii*. Pero en el caso de la presencia única del parásito no se estimula producción de este radical. Finalmente, cuando se analizaron los resultados obtenidos a partir de las CMSP en presencia de PHA se pudo observar que los valores de NO aumenta en relación a su grupo control a partir de las 2 horas de estimulación y durante toda la cinética ($p < 0.05$) respecto al control. Sin embargo, los valores nunca alcanzan a los obtenidos por las células nerviosas de feto de ratas.

**Producción de Óxido Nítrico en:
Células Nerviosas de Feto de Rata cultivadas con VIH/ *T. gondii*
y en
Células Mononucleares de Sangre Periférica de Humano**

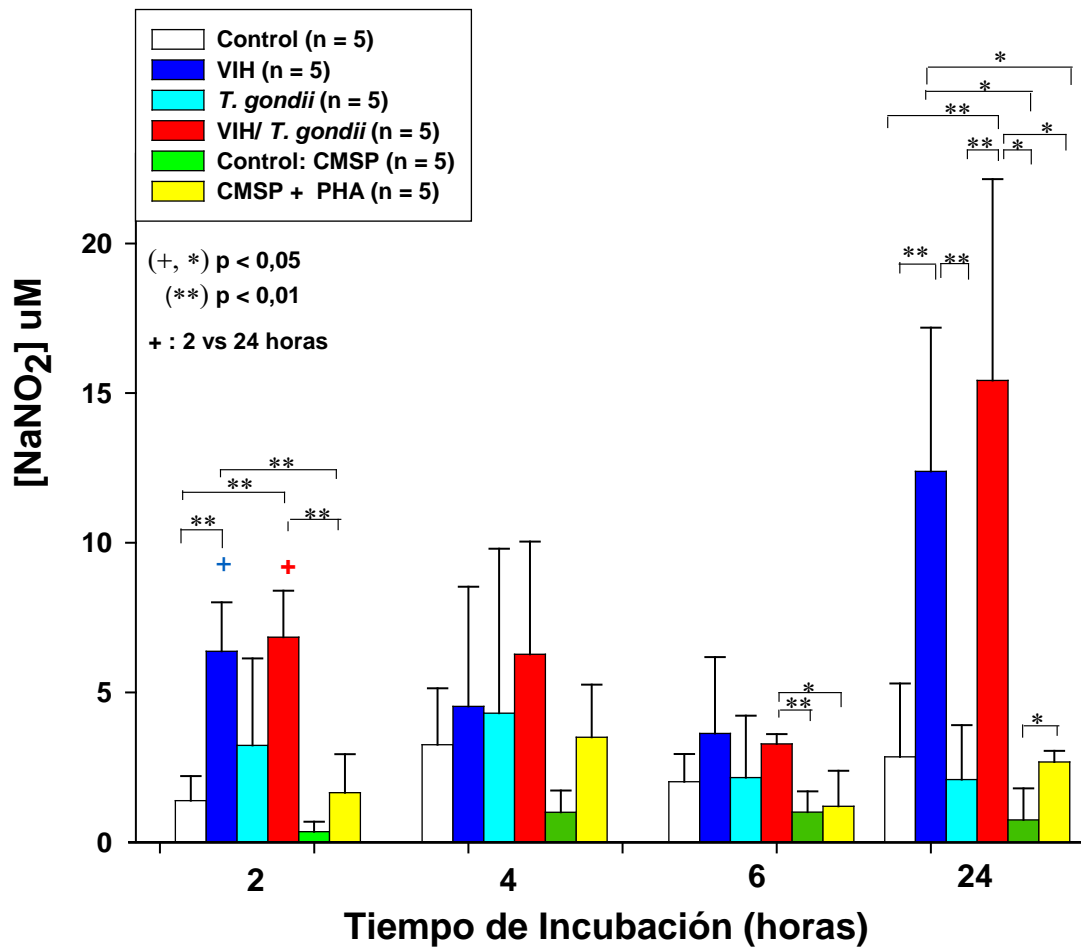


Figura 31. Producción de Óxido Nítrico en Células Nerviosas de Feto de Rata cultivadas simultáneamente y Células Mononucleares de Sangre Periféricas de Humano con VIH/*T. gondii*: La concentración de NaNO₂ fue cuantificada por el reactivo de Griess a 570 nm. Se cultivaron en placas de 24 unas 200- 250.000 células/pozo. Las condiciones de ensayo fueron: Control: Astroцитos; VIH: Células Nerviosas + Virus (> 250.000 copias/mL); *T. gondii*: Parásitos + Células Nerviosas; VIH/*T. gondii*: Células Nerviosas en interacción con ambos patógenos; Células Humanas: linfocitos; Células Humanas + PHA. Los resultados se representan por barras (promedio ± DS). Los signos (+, *) indica diferencia estadística significativa (p < 0,05); en el caso de ** señala diferencia estadística aun mas significativa.(p < 0,01). El signo + señala la diferencia entre la misma condición a lo largo del tiempo de cultivo. Las diferencias en los promedios se determinaron por la prueba estadística T de Student para los datos no pareados y Mann-Whitney para los no paramétricos. DS: Desviación Standard.

12.- DISCUSIÓN

Los mecanismos neurotóxicos que se activan durante la co-infección VIH/*T. gondii* se conocen muy poco. A pesar que se han descritos algunos de estos mecanismos cuando ocurren por separado estas infecciones en humanos, tal como la demencia asociada al virus (*HAD*, del inglés, *HIV-associated dementia*) que pueden desarrollar en individuos infectados durante el curso de la enfermedad (Navia y col, 1986; Price y col., 1988.), cuyas evidencias indican que los mecanismos indirectos son más propensos que los ocasionados directamente por el virus en esta patogénesis (Wesselingh y col., 1993; Janssen y col., 1992). Asimismo, la infección por *T. gondii* puede conducir a una encefalitis, generalmente mortal (Grant y col., 1990; Fauci, 1993), donde los mecanismos neurotóxicos involucrados están asociados a procesos proinflamatorios. Sin embargo, el cuadro neuropatológico se complica al estar presentes ambos patógenos en los pacientes co-infectados, ocasionando enormes dificultades para su estudio. Es por ello nuestro interés en este trabajo, el de investigar el papel que desempeñan algunos de estos mecanismos neurotóxicos presentes en la co-infección VIH/*T. gondii*. Para esto se usó un modelo *in vitro* de células nerviosas de fetos ratas, las cuales fueron infectadas con taquizoítos de *T. gondii* en presencia de la glicoproteína viral gp41 o del virus completo. A partir de estos cultivos se estudió la activación de ciertos mecanismos proinflamatorios y neurotóxicos que pudieran darnos respuestas de las interrogantes planteadas al inicio de este párrafo.

La ausencia de infección productiva del VIH en las neuronas humanas por carecer del receptor CD4 (Adamson y col., 1986; Adamson y col., 1996; James y col., 1999) sugiere que mecanismos indirectos, donde están involucradas las proteínas del virus y los productos de la respuesta inmune generados durante la lesión del cerebro, son los

posibles responsables que conducen a la patogénesis de la HAD (Lipton y col., 1991; Lipton y 1995; Lipton y col., 1998; Adamson y col., 1999b). Es por ello que en la primera parte de este estudio se investigó los posibles efectos de la gp41 del VIH en los cultivos celulares. A partir de estos ensayos se pudo constatar que la gp41 ejerce cambios drásticos sobre algunos de los parámetros biológicos de estas células cuantificados en este trabajo. Efectivamente, se encontró que la presencia de la gp41 produjo una disminución en el recuento de células vivas (**figura 13**), concomitante con una alta mortalidad, medida por el azul de Tripano (**figura 15**). Se ha demostrado que la exposición de tejido cerebral a concentraciones bajas de glicoproteínas de la envoltura del VIH-1, tales como la gp41, que en nuestro caso fue a 10 nM, provoca un daño morfológico neuronal similar al que se encuentra en los pacientes con encefalitis ocasionada por este virus, afectación relacionada con el retardo de las conductas motoras complejas y de la ejecución (Brenneman y cols., 1988). A favor de nuestros resultados, en la observación visual de los cultivos, se pudo observar desde los primeros días de estimulación que la presencia de la gp41 produjo amplias áreas dañadas sobre la monocapa de células nerviosas, así como un alto número de células muertas con mucha presencia de detritos en las placas de cultivo (**resultados no mostrados**). La gp41 se origina de la escisión de la gp160 provocada por proteasas intracelulares (Willey y col., 1988; Haseltine, 1989; Earl y col., 1991), que permanece insertada en la membrana de las células infectadas (Willey y col., 1991; Bird y col., 1990), la cual, es detectada fácilmente en el cerebro de individuos infectados (Kure y col., 1991; Dickson y col., 1993.), y cuyas concentraciones se correlacionan con la severidad y progresión de la HAD en adultos (Adamson y col., 1996; Rostasy y col., 1998) y en niños (Dickson y col., 1989). Además, esta proteína puede inducir la expresión de citocinas pro-inflamatorias, incluyendo TNF- α , interleucina 1 β (IL-1 β), factor activador de plaquetas

(PAF), y la iNOS, tanto en cultivos humanos como de roedores (Merrill y col, 1992; Koka y col., 1995), así como la IL-10 en monocitos humanos (Barcova y col., 1998). Asimismo, se ha descrito que el C-terminal del dominio de fusión de la gp41 puede crear poros en células nerviosas, ocasionando daños por pérdida del equilibrio electroquímico y osmótico (Caffrey y col., 2000), por lo tanto, puede producir una toxicidad no específica (Adamson y col., 1999b; Koka y col., 1995).

Nuestros resultados demuestran que esta glicoproteína viral puede inducir una fuerte apoptosis en las células nerviosas de los roedores (**figura 19**) y una alta producción de NO (**figura 24**) en los cultivos celulares, incluso, ambos parámetros están correlacionados proporcionalmente, es decir, la producción de este radical está correlacionado positivamente con la inducción de la apoptosis (**figura 26**). Estos resultados sugieren que la inducción de la producción del NO puede ser uno de los mecanismos neurotóxicos responsables del daño cerebral observado en los pacientes infectados. Se ha demostrado que la inducción de la muerte por NO en las células es similar tanto en roedores como en tejidos humanos (Adamson y col., 1999b). En esta interacción gp41- célula se puede activar la producción de metabolitos reactivos de nitrógeno y oxígeno, moléculas tóxicas en células nerviosas de mamíferos incluidas las células humanas (Perrin y col., 1998; Koka y col., 1995; Adamson y col., 1999b). Aunado a esto, se ha descrito que esta glicoproteína es capaz de inducir la producción de NO en mezclas de cultivos de células gliales y neuronales (Adamson y col. 1996). Además, en este último trabajo, los autores demuestran que en cultivos primarios de células nerviosas, la gp41 induce la muerte de las células nerviosas en un 50 - 60% en tiempos largos de incubación, como son a los 5, 7 y más días (Adamson y col. 1996, Adamson y col., 1999a), los cuales coinciden con nuestros resultados, de los cuales se

pudo observar que la población de células tratadas con gp41 incrementó la frecuencia de apoptosis entre los 3 - 7 días respecto a su control, ocasionando que a los 7 días de cultivo, el número de células vivas que quedan es casi la mitad de las que habían al 3° día de cultivo.

Se han estudiado los mecanismos por los que la gp41 puede inducir la apoptosis celular. Se ha demostrado que esta proteína puede producir apoptosis por la activación de manera indirecta al interactuar con los receptores de quimiocinas en astrocitos que conllevan a generar NO (Polo y col., 2006), pero también puede activar los receptores de quimiocinas en células de la microglia que responderá produciendo IL-1beta que activará también a los astrocitos para producir NO (Aillet y col., 1994; Adamson y col., 1996). En los mapeos de epítomos de la gp41 se ha encontrado una región de dominio neurotóxico en esta proteína que conduce a la inducción de la iNOS en cultivos de células nerviosas de roedores (Chan col., 1997), en células gliales humanas (Kwon y col., 1989; Koka y col., 1995), y en macrófagos perivasculares, produciendo apoptosis mediante mecanismos dependientes o independientes de las caspasas (Ohnimus y col., 1997; LaBonte y col., 2003). Se ha demostrado que el NO por ser tóxico conlleva a la apoptosis en neuronas (Kelm y col., 1988; Kaul y col., 2005), incluso, existe una correlación entre la cantidad de gp41 y la generación de NO que disparan la muerte por apoptosis en pacientes con HAD (Adamson y col., 1986; Adamson y col., 1999b).

Cuando se provocó la interacción de los cultivos celulares con el VIH completo, se produjo un comportamiento similar en la viabilidad/mortalidad celular al obtenido con la presencia de la gp41, pero los efectos fueron más pronunciados, observándose valores de mortalidad mayores (**figura 16**) y una menor viabilidad (**figura 14**). El

número de copias de VIH por mL que usamos en nuestros ensayos fue de 2,5 millones, cantidad que no sabemos si es equivalente a la concentración de 10 nM de la gp41 usada en nuestros ensayos. Sin embargo, aparte de los efectos que puede ejercer la gp41 presente en la partícula viral, estos resultados sugieren que hay otros mecanismos neurotóxicos que se activan por la partícula viral completa. Efectivamente, se conoce que el VIH-1 puede causar apoptosis en células nerviosas por diferentes mecanismos moleculares (Lipton, 1995; Lipton, 1998; Krebs y col., 2000). Uno de ellos es mediante la participación de moléculas conocidas como FAS/CD95, que corresponde al receptor presente en la superficie celular y FAS ligando (FasL), las cuales inducen la apoptosis (Leonardo y col., 1989). Otra vía de inducción de apoptosis es por las proteínas del virus, diferentes a la gp41, que ejercen diversos efectos nocivos, entre las cuales tenemos: a) la proteína Tat del VIH-1, la cual ha sido demostrada como inductora de apoptosis. Se conoce que esta proteína viral estimula la apoptosis inducida por FAS y por TNF- α a través de la inhibición de la síntesis de la Mn-SOD (Superóxido Dismutasa dependiente de Manganeso) (Roulston y col., 1999); b) la proteína gp120 del virus VIH que se une a los receptores CD4 en células de la microglia, macrófagos y linfocitos T, puede interactuar también con los receptores de NMDA y con los receptores de quimiocinas (CXCR4 y CCR5), por lo que dispara la entrada de calcio en las neuronas, y por lo tanto aumento de la concentración intracelular, lo que conlleva a producir apoptosis en estas células (Navia y col., 1986; Lipton y col., 1995; Yeung y col., 1995; Kaul y col., 2007). Se ha encontrado en modelos con roedores, una disminución significativa en el número de células neuronales en la región del hipocampo expuestos a gp120, y esta disminución es similar a la observada en los cerebros de los pacientes con VIH (Krauthwohl y col., 2004) y puede ser perjudicial para el desarrollo de nuevas neuronas (Okamoto y col., 2007); c) la proteína Vpr puede bloquear la división celular

(Re y col., 1997); las células que expresan Vpr detiene la fase G2 del ciclo celular (Braaten y col., 1995; He y col., 1995). La expresión de Vpr parece prevenir la activación del complejo p34cdc2/ciclina B, conocido regulador del ciclo celular, importante para la entrada en mitosis. Asimismo, la Vpr interacciona con la proteína uracil-ADN-glicosilasa (UNG) (Stanley y col., 1997), y de esta manera la Vpr puede modular la expresión de VIH-1 en células monocíticas (Schenone y col., 1986; Hogan y col., 2000). En resumen, todos estos resultados lo que nos confirma es que el VIH puede ejercer efectos más poderosos sobre nuestros cultivos celulares que la gp41 aislada, posiblemente por las proteínas presentes en él: gp120, Tat, Vpr y el mismo virus, los cuales pueden estar interfiriendo con la replicación de las células en cultivo, ejerciendo efectos nocivos en el ciclo de división celular, especialmente deteniéndolo en G1 e induciendo apoptosis.

Es importante destacar que los valores obtenidos de apoptosis en todos estos ensayos no concuerdan con los altos porcentajes de mortalidad celular medidos mediante el azul de Tripiano en los mismos. A pesar que esto puede indicar una contradicción, podemos explicar estos resultados de la siguiente forma. Desde el primer momento en que las células son estimuladas por factores tóxicos, comienzan a responder ante el estímulo produciendo diferentes mediadores proinflamatorios, generando la activación de la apoptosis (Ohnimus y col., 1997; Kaul y col., 2007). Es por ello que en este trabajo se usó el método de Anexina V para cuantificar la apoptosis, debido a que el mismo puede detectar las fases iniciales de este proceso cuando las células comienzan exponer la fosfatidilserina sobre la cara externa de la membrana celular (Seabra y col., 2004). Sin embargo, como nuestros ensayos, la apoptosis se midió después de 72 horas de cultivo, no se pudo cuantificar aquellas células apoptóticas que se activaron justo en los días

iniciales de la estimulación. Por lo que posiblemente, al transcurrir el tiempo de cultivo, al 3° día, muchas células ya habrán perdido la estructura, pueden estar en las fases finales de apoptosis y hasta semidesintegradas, reflejándose con una alta mortalidad (medida por inclusión del colorante) pero con bajos valores de apoptosis. Solo aquellas células que estén expresando la fosfatidilserina en el momento del marcaje serán reconocidas como células apoptóticas, ocasionando una posible subestimación de los valores. Sin embargo, nuestros resultados siguen siendo validos, gracias a los controles presentes en los ensayos.

Se ha comprobado que la necrosis celular, otra vía de muerte que existe en las células, es un proceso desordenado e independiente de energía, el cual, presenta cambios irreversibles en el núcleo celular (cariólisis) y pérdida de la estructura citoplasmática. Además, ocurre una clara disfunción en la mitocondria y aumento en el volumen celular, desencadenando citólisis y posterior liberación del material citoplasmático hacia el exterior de la célula, por lo que produce inflamación y aéreas necróticas en los tejidos afectados (Zhivotovsky y col., 2001). En los ensayos de necrosis realizados en este estudio, se pudo observar que tanto la gp41 como el virus completo ejercieron un efecto necrotizante en las células nerviosas, especialmente al 7° día en el primer caso (**figura 22**) y durante todo el cultivo en el segundo (**figura 23**). No está muy claro el mecanismo por el cual el VIH y la gp41 inducen necrosis, pero en algunos trabajos se menciona la capacidad del virus de inducir trastornos necróticos en células del SNC (Navia y col., 1986; Brenneman y cols., 1988; Lipton, 1995; Adamson y col., 1999a; Krebs y col., 2000; Polo y col., 2006). También las proteínas del VIH como la gp41 pueden conducir a disparar una inflamación profunda en el SNC que abarca gran parte

del tejido como se ha demostrado en varias autopsias en pacientes con demencia (Polo y col., 2006).

En la condición en donde el parásito *T. gondii* infecta a las células nerviosas observamos una disminución de la viabilidad en la población celular con respecto al control desde el primer día de tratamiento, acentuándose el efecto hacia el último día (figuras 13-16). Asimismo, se pudo observar bajo microscopio una alta pérdida de la monocapa de células nerviosas vivas (**resultados no mostrados**), como consecuencia mayormente del efecto de replicación binaria del parásito que lisa la célula hospedadora, tal como se ha descrito anteriormente (Dennemann y col., 1991). Además, en nuestros cultivos primarios se pudo observar un aumento de la parasitemia del *T. gondii* por la multiplicación activa del parásito en las células. Adicionalmente, se notó que con la proporción 1/250 (parásito/células) usada en nuestros cultivos, el efecto de daño se observó claramente al microscopio al 5° día de cultivo pero se acentúa mayormente al 7° día de la infección (**resultados no mostrados**). Se pudo identificar claramente rosetas en la monocapa celular que corresponden al sitio de inicio de la infección a partir de uno ó unos pocos parásitos que se multiplican a grandes velocidades mediante división binaria estableciéndose los múltiples focos de infección (**resultados no mostrados**), tal como se ha descrito anteriormente (Soulsby, 1987; Rivera y col., 2010), lo que nos indica que una vez que se coloca la dosis de parásitos controlada y entra en contacto con la célula, la parasitemia se visualiza a los 5 días de infección, lo que concuerda con los trabajos de Frenkel (1986) y Cordero y col. (1999)

Por otra parte, un elemento a considerar en los análisis de nuestro modelo *in vitro* es que están ausentes células del sistema inmune periférico, sólo se tiene mayormente células

de la microglia y macrófagos perivascuales, que en su defecto no logran controlar la parasitemia por completo. En cambio en los tejidos donde esta presente la acción del sistema inmune, su multiplicación da lugar a pequeños focos de necrosis rodeados de células inflamatorias, especialmente mononucleares que terminan finalmente en la formación de quistes como respuesta a la presencia inmune innata y adaptativa (Vidal., 1990; Rivera y col., 2010). La gravedad de las lesiones que se produce depende del grado de destrucción tisular originada directamente por la multiplicación de taquizoítos en el interior de las células y agravadas en ocasiones por la reacción inflamatoria que se instaura. Si la infección alcanza niveles altos, los animales pueden morir a corto plazo (Cordero y col. 1999).

Es importante mencionar que a pesar que la infección por *T. gondii* produjo una alta tasa de mortalidad celular en nuestros cultivos, no fue a causa de la apoptosis, ya que los valores obtenidos de células apoptóticas fueron similares a los del control (**figuras 19 y 21**). Este hecho puede deberse a que el patógeno inhibe la activación de la cascada de caspasas, lo que le permite permanecer más tiempo dentro de la célula hospedadora y replicarse así de forma asexual hasta provocar la lisis en dicha célula, como lo demostraron Fernández y col. (1994), Nicholson y col. (1995), Duan y col. (1996) y Felices y col (2002). Lo que nos indica que *T. gondii* afecta las células mayormente por lisis más que por apoptosis, ocasionando que perdure por más tiempo en el interior y alcance una mayor replicación de los taquizoítos. Por otra parte, también se observó que la infección por este protozario no indujo la producción de NO en los cultivos celulares (**figuras 24 y 25**), lo que sugiere que la ausencia de este mecanismo, importante inductor de apoptosis en células nerviosas, sea otra de las causas que no se haya producido la misma con altos valores en los ensayos en presencia del protozoario. El

mecanismo por el cual la infección por *T. gondii* protege las células de la inducción de la apoptosis aún no ha sido aclarado del todo, pero se sabe que es un proceso activo, es decir, requiere de la presencia de parásitos vivos. De acuerdo a los modelos actuales de inducción de apoptosis, *T. gondii* probablemente puede activar la función de las tres proteasas Cpp-32 (Nicholson y col., 1995; Tewari y col., 1995), el ICE-LAP 3 (Duan y col., 1996) y Mat-2 (Fernandes y col., 1995), por lo cual, se bloquea la apoptosis inducida por granzima (Darmon y col., 1995). Por otra parte, los trabajos de Fernandes y col. (1994), Himeno y col. (1996) y Nicholson y col. (1995), demuestran que la infección por *T. gondii* en las células hospedadoras, las hace resistentes a la fragmentación del ADN (última fase de la apoptosis). Pero esta resistencia protectora como se ha descrito, no protege a estas células infectadas de la lisis segura a las que finalmente son conducidas. La perforina, que puede formar lesiones líticas independientes de la inducción de apoptosis, es probablemente la responsable de la lisis de las células infectadas. Por otra parte, es posible que la acción activada de Fas sea inhibida por la infección con *T. gondii*, lo que reduce la destrucción temprana de las células infectadas, con lo que aumenta la propagación del parásito tanto en el cultivo, como en el individuo (Tewari y col., 1995). La lisis, en la ausencia de la apoptosis, puede no ser tan perjudicial en la eliminación del parásito, como lo serían los efectos apoptóticos normales que comprometen la supervivencia de *T. gondii* y su estadio tanto en células en cultivo como en el hospedador (Miller y col., 1972; Pedrol y col., 1990; Nash y col., 1998; Merrill y col., 1999). Por otra parte, también se ha observado que *T. gondii* no evade específicamente la respuesta inmune a través de su capacidad para inhibir la apoptosis, sino, más bien, puede prolongar la vida de la célula hospedadora, que de otro modo podría sufrir apoptosis debido a la presión de la infección (Moore y col., 1994; Luder y col., 1999).

En otro orden de ideas, la inhibición de la producción de NO que encontramos en los ensayos de células infectada por *T. gondii* fue sorprendente, ya que se sabe que uno de los primeros mecanismos citotóxicos que se activan en los astrocitos y en las microglías, para eliminar este patógeno que compromete la integridad del tejido nervioso (Denkers y col., 1998). Sin embargo, se ha demostrado *in vivo* que la forma replicativa de *T. gondii*, los taquizoítos, bloquea numerosos genes en células infectadas (Lee, 2006). Entre los genes reprimidos por los taquizoítos, están los que codifican para IL-12 y TNF- α ; dos principales citocinas implicadas en la iniciación de las respuestas de NO e inflamatoria (Buzoni y col., 2006). Se ha verificado también que *T. gondii* puede inducir la síntesis del Factor Transformador de Crecimiento- β (TGF- β), el cual es un modulador potente de la respuesta inmune (Vodovotz, 1997) y tiene un efecto inhibitor directo sobre la expresión iNOS. En estudios realizados *in vitro* en macrófagos de ratón, el TGF- β 1 fue capaz de desestabilizar el ARNm de la iNOS, retrasándose la síntesis de la enzima iNOS y acelerando su degradación (Vodovotz y col., 1994; Weiss y col., 2001). Posiblemente, esto también puede ocurrir en las células de la microglía, pues como se ha descrito, éstas se comportan como macrófagos y tienen funciones inmunes localmente (Yano y col., 2002). Además, también puede darse este hecho en los astrocitos, grandes productores de NO en presencia de patógenos (Lipton., 1991). La producción de TGF- β 1, inducida por la infección por *T. gondii*, puede inhibir los genes del IRF-1 (Factor Regulador del Interferon-1), lo que conduce finalmente a la inhibición de la producción de INF- γ . Esta citocina tiene una amplia acción en la respuesta inmune en la eliminación del parásito al activar la producción de NO (**figura 9**) estimulando también al factor NF κ B (Dreyer y col., 1990; Fauci, 1996; Feinstein y col., 1996; Denkers y col., 1998), por lo que la inhibición de INF- γ favorece la estadía del parásito

al suprimir la respuesta inmune. Así como se ha demostrado que la inhibición de la iNOS por *T. gondii* ocurre al inhibir NFκB en las células, el cual disminuye la producción de NO (Green y col., 1982; Frenkel., 1986; Griscavage y col., 1995).

La presencia simultánea de gp41 o VIH/*T. gondii* en su forma activa (taquizoíto) en el SNC, debe potenciar los efectos neurotóxicos que ejercen ambos agentes por separado. Esto se evidenció en nuestro modelo *in vitro*, donde se pudo observar una mayor exacerbación de los efectos neurotóxicos en relación a los obtenidos cuando fueron sometidas las células con estos factores por separado. Durante todo el tiempo del cultivo se vió claramente la disminución de la viabilidad y el aumento de la mortalidad celular (**figuras 13 y 14**), debido al aumento de la parasitemia por parte del *T. gondii*, así como por la acumulación de daños y de neurotoxicidad motivado a la interacción de la gp41 con los receptores de las células nerviosas. El daño observado sobre la monocapa nos indica la acción del parásito especialmente lisando a las células y por el otro lado, la glicoproteína induce cambios neurotóxicos en el ambiente celular y en la misma célula, que en forma conjunta representa una sinergia de los daños por los tratamientos por separado. El mayor efecto de *T. gondii* se debe a su alta capacidad de lisis (Rivera y col., 2010) más que el de inducir neurotoxicidad, mientras el efecto de la gp41 es debido al desarrollo de mecanismos neurotóxicos, ya descritos (Lipton, 1995; Weissenhorn y col., 1997; Adamson y col., 1999a; 1999b).

Adicionalmente, en la co-infección VIH/*T. gondii*, se ha encontrado que la estimulación *in vitro* con taquizoítos y sus metabolitos mejoran la replicación del VIH dentro de las células hospedadoras como macrófagos y microglia (reservorios) ocasionando un efecto apoptótico de manera más eficaz (Bala y col., 1994; Basu y col., 2004). Por otro lado se

ha estudiado también que la infección por *T. gondii* en ratones transgénicos, a los que se le han colocado múltiples copias de ADN proviral de VIH-1, conducen la activación de la expresión de ARNm viral a través de la inducción de NFκB (Masliah y col., 1996; Gazzinelli y col., 1997). Este hallazgo sugiere la existencia de un doble efecto de la presencia simultánea de VIH como de *T. gondii*. Este modelo de ratones transgénicos y el nuestro realizado en cultivos de células nerviosas, nos dice entonces que realmente se genera una potenciación de daño en el SNC en pacientes co-infectados con VIH y *T. gondii*. Adicionalmente, se ha descrito que al estar simultáneamente presentes ambos patógenos, el VIH-1 puede socavar la inmunidad adquirida generada en el individuo contra el parásito (Grant y col., 1990; Dal y col., 1992), como resultado, el parásito es capaz de potenciar la replicación del VIH-1 en las células hospedadoras al mismo tiempo, conduciendo finalmente a la reactivación de la toxoplasmosis (Cullen y col., 1989; Dennemann y col., 1991; Denkers y col., 1998).

Un hecho que hay que destacar de nuestros resultados es que la presencia simultánea del virus y el parásito produjo en los cultivos celulares un mayor porcentaje de apoptosis, a pesar que la presencia sola del protozooario no induce la muerte celular. La similar producción de NO que se obtuvo en nuestros ensayos con VIH/*T. gondii* y gp41/*T. gondii* (ver **figuras 24 y 25**), pero con diferencias en la inducción de apoptosis, nos hace pensar que esta alta producción del radical no sea la causa del fenómeno encontrado. Aunque en nuestros resultados con el virus completo solamente ó en presencia de *Toxoplasma* observamos al igual que con gp41 o gp41/*T. gondii* una correlación entre la inducción de apoptosis y la [NO], notándose así que al aumentar los niveles de NO se incrementó también la inducción de apoptosis (**figura 27**). No podemos explicar cuál o cuáles serían los mecanismos que ocasionan este fenómeno, pero seguramente el

protozooario está creando un microambiente que favorece conjuntamente con la presencia del virus la sobre expresión de receptores, con los que interaccionan las proteínas virales que, finalmente conducen a un nivel mayor de apoptosis en comparación al resto de las condiciones establecidas. Reforzando esta idea, se ha descrito que la infección con *T. gondii* en pacientes con VIH-1 contribuye a un incremento significativo en la inducción de la transcripción proviral, y el aumento de ADN y proteínas dentro de la célula que conduce a incrementar la apoptosis en células nerviosas (Gazzinelli y col., 1996; Krebs y col., 2000; Yabar., 2003).

En la condición VIH/*T. gondii*, nosotros observamos una mayor inducción de necrosis al 3° día respecto al control ($p < 0.05$) y al 7° día vs al resto de las condiciones de cultivo ($p < 0.001$) (**figura 23**). Estos resultados indican que el virus induce necrosis en células nerviosas, posiblemente por la interacción del virus con los receptores de quimiocinas y la generación de especies reactivas de oxígeno por parte de la microglia y astrocitos. Es importante destacar que en los márgenes de la necrosis observados en biopsias humanas, hay un gran número de taquizoítos, formas quísticas, nodulillos microgliales y una discreta respuesta inflamatoria perivascular con células de apariencia macrofágica (Sotrel y col., 1989). En nuestro cultivo se pudo observar a diferentes aumentos en el microscopio, las rosetas de taquizoítos que son focos de infección en la monocapa, con similar descripción de los autores (**datos no mostrados**).

La última parte de este estudio se quiso investigar el papel que está ejerciendo la molécula NF κ B en los mecanismos neurotóxicos encontrados en nuestros ensayos con la presencia simultánea del VIH/*T. gondii* o gp41/*T. gondii*. Esto permitiría comprender mejor estos mecanismos de neurotoxicidad que son desencadenados en pacientes co-

infectados. A pesar que los resultados obtenidos son preliminares, podemos decir que la presencia del VIH y VIH/*T. gondii* induce la activación de este factor en las células nerviosas a las 2 horas de incubación, siendo mayor en la última condición (**figura 30**), lo que sugiere que ambos factores potencian la expresión de este factor nuclear. Estos resultados confirman resultados anteriores de la temprana activación de este factor nuclear (Song y col., 1998; Julius y col., 2008). Sin embargo, la presencia de *T. gondii* en nuestros cultivos, no indujo la expresión de este factor. Varios estudios han demostrado la presencia de NFκB en los astrocitos (Sparacio y col., 1992), células de Schwann y la microglia (Nakajima y col., 1998), así como en neuronas de varias regiones del SNC, incluyendo córtex, hipocampo y también en el cerebelo (Kaltschidt y col., 1994). Estas observaciones sugerían que la vía NFκB participa en procesos fisiológicos del SNC, pero también esta activación de NFκB ha sido observada en respuesta a lesiones neuronales en situación de trauma o infección. (Xu y col., 2005). Los análisis de modelos experimentales con lesión cerebral, revelan que la vía NFκB puede modular la degeneración y recuperación neuronal. En este sentido, se asocia el incremento de la activación de NFκB en respuesta a la lesión con daño neuronal (Stefka, M., 2011). La activación de NFκB mediada por factores neurotróficos (del inglés, *Neurotrophic Factor* [NTFs]), neurotransmisores y calcio, promueven la supervivencia y crecimiento neuronal, regeneración axonal y regula la plasticidad sináptica en varios modelos *in vivo* e *in vitro*, tanto en el SNC maduro como durante el desarrollo (Cui y col., 2000; Stefka., 2011). Pero también se ha visto que la activación de la vía NFκB puede provocar apoptosis en el SNC. La activación de la vía en respuesta a estrés oxidativo o a la activación del receptor NMDA, así como y en respuesta a estímulos apoptóticos, promueve la apoptosis aumentando la expresión génica de las proteínas pro-apoptóticas como Bax y Bcl-xs en neuronas corticales (Kaltschmidt y col., 2005).

Esta función dual de este factor nuclear ha sido observada en diferentes situaciones, donde se ha demostrado que niveles demasiados bajos, como niveles demasiados altos de activación de la vía NFκB y mantenidos durante un largo período de tiempo, pueden causar muerte neuronal (Masliah y col., 1996; Mattson y col., 2001).

Un hecho adicional a nuestros resultados, es que observamos que hubo generación de NO en aquellas células nerviosas que expresaron el factor nuclear NFκB, coincidiendo con la presencia de gp41, VIH o la combinaciones de gp41/*T. gondii* y VIH/*T. gondii*, y tal producción se mantuvo en el tiempo a pesar que la expresión de la molécula nuclear disminuyó (**figura 31**). Se ha descrito que el factor NFκB es el principal activador de la iNOS (Xie y col., 1994). Como ya explicamos anteriormente, el VIH puede producir NO en forma directa o indirecta a través de sus proteínas interactuando con los receptores de quimiocinas (Narvia y col., 1986; Abbas y col 1999; Lipton y col., 1991; Lipton, 1995; Adamson y col., 1999a; Adamson y col., 1999b; Kaul y col., 1999; Krebs y col., 2000; Kaul y col., 2001; Kaul y col., 2007). Posiblemente esta producción del radical fue a través de la vía del factor NFκB. Pero, por parte, observamos que en presencia del protozoario en nuestros cultivos, no hubo ni producción de NO ni la expresión del factor NFκB. Un trabajo reciente de Butcher y col. (2001) ha demostrado la capacidad de este patógeno para invadir las células sin activar respuesta proinflamatoria, tales como la producción de NO, uno de los mecanismos clave parasiticidas utilizados en las infecciones intracelular por protozoos (Caamano y col., 1999). *T. gondii* parece ser capaz de suprimir la actividad de NFκB. La base molecular de esta supresión no es está bien clara, pero una posible explicación puede deberse a la proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70) de *T. gondii*, la cual está asociada a la protección del parasito, contra el efecto del NO inducido en células inmunes, además

esta proteína participa en la inhibición de NFκB. De hecho, Kim y col. (1997) demostraron con el uso de cepas virulentas de *T. gondii*, la inhibición de la translocación de NFκB en macrófagos y su efecto en la expresión de la iNOS era dependiente de la expresión de HSP70 por el parásito. Finalmente, se ha encontrado que en células infectadas con *T. gondii*, a pesar de la rápida fosforilación y degradación de IκB, el factor NFκB no se trasloca al núcleo (**figuras 10 y 11**), por lo que *T. gondii* induce una respuesta defectuosa de IL-12 y TNF-α (Butcher y col., 2001; Shapira y col., 2002).

10.- CONCLUSIONES

- El protocolo usado para la purificación de células nerviosas de fetos ratas nos permitió obtener un modelo *in vitro* para los cultivos en condiciones de viabilidad por largo tiempo, contribuyendo a la realización de los diferentes ensayos biológicos para la evaluación de varios mecanismos neurotóxicos que se desencadena tanto con la proteína gp41 así como con el virus VIH, sumado a los efectos del parásito *Toxoplasma gondii*.
- La proporción de parásito/células (1/250) y la concentración de 10 nM de la gp41 fueron las cantidades idóneas para el desarrollo de este estudio.
- La alta mortalidad y la baja viabilidad de las células nerviosas producidas por la infección con taquizoítos de este parásito se debieron directamente a su gran capacidad de lisis. La ausencia de inducción de mecanismos neurotóxicos, como producción de NO y la apoptosis en dichas células, indican que son otros los mecanismos que están involucrados en la patogenicidad del protozooario en el SNC.
- La presencia de la gp41 (10 nM) en los cultivos de células nerviosas de feto de rata ocasionó una gran mortalidad con una alta frecuencia de apoptosis, la cual esta última está correlacionada con una alta producción de NO. Estos resultados indican claramente que esta glicoproteína viral es capaz de crear daños en el SNC cuando está presente, y uno de los mecanismos citotóxicos que activa es mediado por NO.
- Sin embargo, en la presencia del VIH completo, los efectos sobre estos parámetros: la viabilidad, mortalidad, inducción de apoptosis y NO, fueron muchos más notables que cuando se estimulan estas células con la gp41. Estos resultados sugieren que los mecanismos neurotóxicos que desencadena la infección por el VIH son producidos no solamente por la gp41 sino por otras moléculas y/o mecanismos directos e indirectos del virus.

- La presencia simultánea de la gp41/*T.gondii* o VIH/*T. gondii* ocasionan los mayores efectos citotóxicos en el cultivo celular, obteniéndose los mayores valores en mortalidad, apoptosis, necrosis y la producción de NO del estudio. Estos resultados sugieren que la combinación de los efectos de lisis por parte del protozooario, más los efectos apoptóticos y proinflamatorios del virus y de su partícula gp41, crean un microambiente muy tóxico en el SNC. Todos estos resultados sugieren que la co-infección de estos dos patógenos en el paciente generan tales alteraciones, llevándolo posiblemente a la encefalitis mortal.
- Observamos una tendencia en la activación de la expresión NFκB en los astrocitos de fetos de rata infectados con el parásito *Toxoplasma gondii*, pero en presencia del virus observamos mayores valores de activación, esto mismo podría estar ocurriendo en presencia de la glicoproteína gp41, que aunque no determinamos la expresión de este factor en presencia de esta glicoproteína el comportamiento observado en los ensayos de producción de NO y apoptosis coincide con lo descrito por otros autores. Sin embargo, en la presencia simultánea de ambos patógenos (VIH/ *T. gondii*), se obtiene la mayor activación, indicando que a través de la vía del factor nuclear κB sea el origen de la producción de NO como mecanismos proinflamatorio e inductor de apoptosis.

15.- BIBLIOGRAFIA

Abbas, A., Lichtman, A., Pober, J. 1999. Inmunología celular y molecular. Editorial Interamericana McGrawHill. Tercera edición, Madrid, España.

Abbas, K., Andrew, L., Jordan, P. 1995. Inmunología Celular y Molecular. Segunda edición. Editorial Interamericana. Madrid. España.

Acha, P., Cifres, B. 1994. Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a Los Animales. Organización para la Salud (OPS)/ Organización Mundial de la Salud (OMS), Estados Unidos.

Adamson, C; Kopnisky, K; Dawson, T; Dawson; V. 1999b. Mechanisms and Structural Determinants of HIV-1 Coat Protein, gp41-Induced Neurotoxicity. *J. Neurosci.* **19(1): 64-67.**

Adamson, D, McArthur, J; Dawson, T; Dawson, V. 1999a. Course of HIV-associated dementia: correlations with gp41, iNOS and macrophage/microglial activation. *Mol Med*, in press.

Adamson, D., Dawson, T., Zink, M., Clements, J., Dawson, V. 1986. Neurovirulent simian immunodeficiency virus infection induces neuronal, endothelial and glial apoptosis. *Mol Med.* **2: 417- 428**

Adamson, D., Wildemann, B., Sasaki, M., Glass, J., McArthur J, Christov, V., Dawson T., Dawson, V. 1996. Immunologic NO synthase: elevation in severe AIDS dementia and induction by HIV-1 coat protein, gp41. *Science* **274:1917-1921.**

Aillet, F., Gougerot, P., Virelizier, J., Israel, N. 1994. Appraisal of potential therapeutic index of antioxidants on the basis of their *in vitro* effects on HIV replication in monocytes and inteleukin 2- induced lymphocyte proliferation. *AIDS Res. Hum. Retrov.* **10: 405-411.**

Alcaro, M., Peroni, E., Rovero, P., Papini, A. 2003. Synthetic Peptides in the Diagnosis of HIV infection. Current protein and peptide, *Science.* **4(4): 285-290.**

Alfonzo, M. 2008. El papel del linfocito T CD8 en la infección con VIH en niños y adultos. Trabajo de ascenso para Titular. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Alfonzo, M., Rangel, H., Escobar, E. 2010. Proyecto Estudio de los efectos neurotóxicos del Virus de Inmunodeficiencia Humana y *Toxoplasma gondii* en células del Sistema Nervioso Central. Escuela de Medicina Vargas. Universidad Central de Venezuela- IVIC. Caracas. Venezuela.

Aliberti, A. 2005. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii* *Nature reviews . Immunol.* **5: 162-170**

Alimonti, J., Ball, T., Fowker, K. 2003. Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in immunodeficiency virus of infection and AIDS. *J. General of Virology.* **5: 1649-1647**

- Arroyo, C., Kohno, M. 1991. Difficulties encountered in the detection of nitric oxide (NO) by spin trapping techniques. A cautionary note. *Freed Radic. Res. Commun.* **14**: 145-155.
- Art, F., Prasanna, M.D. 1994. Prevalence of Toxoplasma Antibodies in blood donors in Al- Hassa. *J. Parasitol.* **14(3)**: 1-6.
- Atías, A. 1994. Parasitología Clínica. Editorial Publicaciones Mediterraneo. Tercera Edición. Santiago de Chile. Chile.
- Baeuerle, P., Henkel, T. 1994. Function and activation of NF-kappaB in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* **12**: 141-179.
- Bagetta, G., Corasaniti, M., Paoletti, A., Berliocchi, I., Nistico, R., Giammariolo, A., Malorni, W, Finazzi, A. 1998. HIV-1 gp120- induced Apoptosis in the rat neocortex involves enhanced expression of cyclo-oxygenase type 2 (COX-2). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **244**: 819-824.
- Bala, S., G., Englund, J., Kovacs, L., Wahl, M., Martin, A., Sher, R., Gazzinelli, T. 1994. *Toxoplasma gondii* soluble products induce cytokine secretion by macrophages and potentiate in vitro replication of a monotropic strain of HIV. *J. Eukaryot. Microbiol.* **41**:7.
- Barcova, M., Kacani, L., Speth, C., Dierich, M. 1998. gp41 envelope protein of human immunodeficiency virus induces interleukin (IL)-10 in monocytes, but not in B, T, or NK cells, leading to reduced IL-2 and interferon-gamma production. *J. Infect. Dis.* **177**: 905-913
- Barre, F., Chermann, J., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C y colaboradores. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* **220**:868.
- Basu, A., Krady, J., Levinson, S. 2004. Interleukin-1: A master regulator of neuroinflammation. *J. Neurosci. Res.* **78**: 151-156.
- Beaver, P., Chester, J., Clifton, R., Cupp, E. 1986. Parasitología Clínica. Editorial Salvat Editores. Segunda edición. Madrid, España.
- Becerril, M.A. 2011. Parasitología Médica. Editorial McGraw Hill. Tercera edición. México D.F. México.
- Bhopale, G. 2003. Pathogenesis of toxoplasmosis. *Comp. Immuno. Microbiol. Infect. Dis.* **26**: 213-222
- Biachi, R. 2006. VIH y Sida: un enfoque a 25 años de su emergencia. Grupo de Estudios de VIH/Sida del Sureste, A.C. Primera Edición. Yucatan, México.

- Bird, C., Burke, J., Gleeson, P., McCluskey, J. 1990. Expression of human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) envelope gene products transcribed from a heterologous promoter. Kinetics of HIV-1 envelope processing in transfected cells. *J. Biol. Chem.* **265**: 19151–19157.
- Bonfante, R., Alvarez, N., Anzola, N., Crespo, L., Bonfante, R., Peñaloza, S. 1984. Toxoplasmosis en pacientes de 14 estados de Venezuela. *Bol. Ofic. Sanit. Panam.* **96(6)**: 502-510.
- Boven, A., Gomes, L., Hery, C., Gray, F., Verhoef, J., Portegies, P., Tardieu, M y col. 1999. Increased Peroxynitrite Activity in AIDS Dementia complex: Implications for the Neuropathogenesis of VIH-1 Infection. *J. Immunology.* **162**: 4319-4327.
- Braaten, D., Franke, E., Luban, J. 1995. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr arrests the cell cycle in G2 by inhibiting the activation of p34cdc2-cyclin B. *J. Virol.* **69**: 6859.
- Brenneman, D., Westbrook, G., Fitzgerald, S., Ennist, D., Elkins, K., Ruff, M., Pert, C. 1988. Neuronal cell killing by the envelope protein of HIV and its prevention by vasoactive intestinal peptide. *Nature.* **335**: 639–642.
- Bridget, A., Puffer, A., Altamura, Theodore, C., Pierson, W. 2004. Determinants within gp120 and gp41 contribute to CD4 independence of SIV Envs. *Virology.* **327(1)**:16-25.
- Burney, S., Tamir, S., Gal, A., Tannenbaum, S. 1997. A mechanistic analysis of nitric oxide induced cellular toxicity. Nitric oxide. *Biol. Chem.* **1**: 130-144.
- Butcher, B., Kim, L., Johnson, P., Denkers, E. 2001. Toxoplasma gondii tachyzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by preventing nuclear translocation of the transcription factor NF-κB. *J. Immunol.* **167**: 2193-2201.
- Buzoni, D., Werts, C. 2006. Toxoplasma gondii and subversion of the immune System. *Trends. Parasitol.* **22(10)**: 448- 452.
- Caamano, J., Alexander, J., Craig, L., Bravo, R., Hunter, C . 1999. The NF-κB family member RelB is required for innate and adaptive immunity to *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* **163**:4453.
- Caffrey, M., Braddock, T., Louis, J., Abu-Asab, M., Kingma, D., Liotta, L., Tsokos, M y colaboradores. 2000. Biophysical Characterization of gp41 Aggregates Suggests a Model for the Molecular Mechanism of HIV-associated Neurological Damage and Dementia. *J. Biological. Chemistry.* **275(26)**: 19877–19882.
- Camacho, J. 2009. La funcionalidad de los Linfocitos T CD4+ anti-VIH y anti-*Toxoplasma gondii* y seropositivos a *Toxoplasma gondii*. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Campisi, J. 2003. Cellular senescence and apoptosis: how cellular responses might influence aging phenotypes. *Exp. Gerontology.* **38**: 5-11.

- Casanova, P. 2002. Toxoplasmosis cerebral durante la infección por el virus de inmunodeficiencia humana. *Rev. Cubana Med.* **41(5): 1-3**
- Castellanos, C. 2010. Funcionamiento Neurocognitivo de Personas que Viven con VIH y Toxoplasmosis Encefálica (parte I). *Redalyc. Ciencia y Sociedad. Rep. Dominicana.* **35(2): 216-234.**
- Castillo, M. 2004. Toxoplasmosis congénita. Una enfermedad con demasiados interrogantes. *An Pediatr (Barc).* **61: 1-5.** (Online. Disponible en: <http://db.doyma.es/cgiin/wdbcgi.exe/doyma/mrevista.fulltext?pident=13064588>). [Citado 01 de Septiembre de 2012].
- Castro de A. 2012. Panorama general de infección por el VIH. (online). Plasmia Biotech. Disponible en: http://www.plasmabiotech.com/actividades_humanitarias.php. [Citado 01 de Septiembre de 2012].
- Chan, D., Fass, D., Berger, J., Kim, P. 1997. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell.* **89: 263–273.**
- Chávez, A. 1998. Aislamiento de *Toxoplasma gondii* en Carne de Cerdo. Costa Rica.
- Clayton, L., Hussey, R., Steinbrich, R., Ramachandran, H., Husain, Y., Reinherz, E. 1988. Substitution of murine for human CD4 residues identifies amino acids critical for HIV-gp120 binding. *Immunol.* **335: 363-366.**
- Coffin, J., Haase, A., Levy, J., Montagnier, S., Oroszlan, S., Teich, N., Temin, H y colaboradores. 1986. Human immunodeficiency viruses. *Science* **232:697.**
- Colombo, F., Vidal, J., Penalva, A., Hernandez, A., Bonasser, F., Nogueira, R., Focaccia, R. and Pereira, V. 2005. Diagnosis of Cerebral Toxoplasmosis in AIDS Patients in Brazil: Importance of Molecular and Immunological Methods Using Peripheral Blood Smears. *J. clin. microbiol.* **43(10):5044-5047.**
- Conti, F. 2010. Fisiología Médica. Primera edición. Editorial Mc Graw Hill. China.
- Combs, C., Karlo, J., Kao, S., Landreth, G. 2001. Beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNF α -dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J. Neurosci.* **2: 1179-1188.**
- Cordero del Campillo, M; Rojo, F; Martinez, A; Sánchez, M; Hernández, S; Navarrete, I; Diez, P y col. 1999. Parasitología Veterinaria. Editorial Mc Graw- Hill. España
- Courad, P. 1999. Interactions between lymphocytes, macrophages and central nervous system cells. *J. Leukoc. Biol.* **56: 407-415.**
- Cui, Q., Harvey, A. 2000. CNTF promotes the regrowth of retinal ganglion cell axons into murine peripheral nerve grafts. *Neuroreport.* **11(18): 3999-4002.**

- Cullen, B., Greene, W. 1989. Regulatory pathways governing HIV-1 replication. *Cell*. **58**: 423-426.
- Dal, G., McArthur, J., Aylward, E., Selnes, O., Nance, E., kumar, A. 1992. Patterns of cerebral atrophy in VIH-1-infected individuals. *Neurology*. **42(11)**: 2125-2130.
- Dannemann, B., Israelki, D, Leoung, G., McGraw, T., Mills, J., Remington, J. 1991. Toxoplasma serology, parasitemia and antigenemia in patients at risk for toxoplásmica encephalitis. *AIDS*. **5**: 1363-1365.
- Darmon, A., Nicholson, D., Bleackley, R. 1995. Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature*. **377**: 446.
- Dawson, V. 1999. Role of the Nitric Oxide in VIH dementia. *Neuro Aids*. **2**: 9.
- Dawson, V., Kizushi, V., Huang, P., Snyder, S., Dawson, T. 1996. Resistance to neurotoxicity in cortical cultures from neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. *J. Neurosci*. **16**: 2479 –2487.
- De La Rosa, M., Bolívar, J., Pérez, H.A. 1999. Infección por *Toxoplasma gondii* en Amerindios de la Selva Amazónica de Venezuela. *Medicina*. **59**. (online. Disponible en: <http://www.medicinabuenosaires.com/vol59-99/6/toxoplasmosis.htm>. [Citado 01 de Septiembre de 2012]
- Denkers, E., Gazzinelli, R. 1998. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**: 569–588.
- Derdeyn, C., Hunter, E. 2008. Viral characteristics of transmitted HIV. *Current Opinion in HIV and AIDS*. **3(1)**: 16-21.
- Díaz, O., Estévez, M.J., García, P.M. 2003. Sero- epidemiología de la toxoplasmosis en una comunidad indígena Yucpa de la Sierra de Perijá, Estado Zulia, Venezuela. (Online). *Rev Méd Chile*. **131(9)**: 7-11. Disponible en:http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003498872003000900006&lng=es&nrm=iso. [Citado 01 de Septiembre de 2012].
- Dickson, D., Belman, A., Park, Y., Wiley, C., Horoupian, D., Llena, J., Kure, K y colaboradores. 1989. Central nervous system pathology in pediatric AIDS: an autopsy study. *APMIS*. **8**: 40 –57.
- Dickson, D., Lee, S., Mattiace, L., Yen, S., Brosnan, C. 1993. Microglia and cytokines in neurologic disease, with special reference to AIDS and Alzheimer’s disease. *Glia* . **7**: 75– 83.
- DiDonato, J., Mercurio, F. 1996. Mapping of the inducible ikappaB phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol. Cell Biol*. **16(4)**: 1295-1304.

Drapier, J., Hibbs, J. 1986. Murine cytotoxic activated macrophages inhibit aconitase in tumor cell. Inhibition involves the iron-sulphur prosthetic group and is reversible. *J. Clin. Invest.* **78**: 790-796.

Drapier, J.C., Hibbs, J. 1988. Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cell result in L-arginine dependent inhibition mitochondrial iron sulfur enzymes in macrophage effector cells. *J. Immunol.* **140**: 2829-2834

Dreyer, E., Kaiser, P., Offermann, J., Lipton, S. 1990. HIV-1 coat protein neurotoxicity prevented by calcium channel antagonists. *Science.* **248**:364–367.

Duan, G., Chinnaiyan, A., Hudson, P., Wing, J., He, W., Dixit, V. 1996. ICE-LAP3, a novel mammalian homologue of the *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 is activated during Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **271**:162.

Dubey, J. 1988. Toxoplasmosis of Animals and Man. *Publisher, CRC.* 322 p. Estados Unidos de Norte América.

Dzierszinky, F., Nishi, M., Ouko, L., Roos, D. 2004. Dynamics of *Toxoplasma gondii* Differentiation. *Eukaryotic Cell.* **3(4)**: 992-1003.

Earl, P., Moss, B., Doms, R. 1991. Folding, interaction with GRP78- BiP, assembly, and transport of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J. Virol.* **65**: 2047–2055.

Epstein L., Geldelman H. 1993. Human immunodeficiency virus type 1 infection of de nervous system: pathogenic mechanisms. *Ann Neurol*, 33: 429-436.

Etheredge, G.D., Frenkel, J.K. 1995. Human *Toxoplasma* infection in kuna and Embera children in the Bayano and San Blas, Eastern Panama. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **53(5)**: 448-457.

Fauci, A. 1996. Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. *Nature.* **384 (6609)**: 529-534.

Fauci, A. S. 1993. Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implications for therapy. *Science* 262:1011–1018.

Feinstein, D., Galea, E., Aquino, D., Li, G., Xu, H., Reis, D. 1996. Heat shock protein 70 suppresses astroglial-inducible nitric oxide synthase expression by decreasing NF- κ B activation. *J. Biol. Chem.* 271:17724.

Felices, G. 2002. Detreminación de la Seroprevalencia de Toxoplasmosis en Alpacas y Llamas en la Estación Experimental Instituto INIA-PUNO. Tesis para optar al Título de Médico Veterinario. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

Filisetti, D., Candolfi, E. 2004. Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann. Ist. Sup. Sanità.* **40(1)**: 71-80.

Fernandes, A.T., Litwack, G. and E. S. Alnemri, E.S. 1994. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *J. Biol. Chem.* **269**:30761.

Fernandes, T., Takahashi, A., Armstrong, A., Krebs, J., Fritz, K, L., Tomaselli, J., Wang, L y colaboradores. 1995. Mch3, a novel human apoptotic cysteine protease highly related to CPP32. *Cancer Res.* **55**:6045.

Fernández, M., Sibaya, M., Granier, A. 1986. Encuesta seroepidemiológica de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* en 125 mujeres embarazadas del Oriente del estado de Tabasco. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* **43(5)**: 27-278.

Figallo, L., Maekelt, G.A. 1962. Anticuerpos de *Toxoplasma* en parturientas y recién nacidos de la maternidad "Concepción Palacios" de Caracas. *Arch. Ven. Med. Trop. Para. Med.* **4**: 289.

Fortaleciendo la Respuesta Nacional y Conjunta al VIH y sida. Informe Anual. 2009. Programa de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA) en Venezuela.

Frankel, A., Young, J. 1998. HIV-1: Fifteen protein and RNA. *Annu rev. Biochem.* **67**: 1-25.

Freeman, M. 2006. Sculpting the nervous system: glial control of neuronal development. *Current. Opinion Neurobiol.* **16**: 119-125.

Frenkel, J.K. 1986. La inmunidad en la Toxoplasmosis. *Bol of Sanit Panamam.* **100(3)**: 288.

Gallo, R.C., Sarin, P., Gelmann, E.P., Guroff, R., Richardson, E., Kalyanaraman V., Mann, D y colaboradores. 1983. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired
Ganong, W. 1992. Fisiología Médica. Decimotercera edición. Editorial El Manual Moderno. México D.F. México.

Ganong, W. 1992. Fisiología Médica. Decimotercera edición. Editorial El Manual Moderno. México D.F. México.

Garcia, J., del Rio, C., Souteyrand, Y. 2009. HIV infection in the Americas: improving strategic information to improve response. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 51:1-3.

Garden G.A, Budd S.L, Tsai E, Hanson L, Kaul M, D'Emilia D.M, Friedlander RM, Yuan J, Masliah E, Lipton S.A. 2002. Caspase cascades in human immunodeficiency virus-associated neurodegeneration. *J. Neurosci.* **22(10)**:4015-4024.

Garg, U., Hassid, A. 1991. Nitric oxide decrease cytosolic free calcium in BALB/C 3T3 fibroblasts by a cyclic GMP independent mechanism. *J. Biol. Chem.* **266**: 9-12.

- Gavaller, B. 1950. Toxoplasmosis humana en Venezuela. Presentación de los tres primeros casos congénitos. *Arch. Ven. Pat. Trop. Para. Med.* **2**: 265-268.
- Gazzinelli, R., Sher, A., Cheever, A., Gerstberger, S., Martin, M.A., Dickie, P. 1996. Infection of human immunodeficiency virus 1 transgenic mice with *Toxoplasma gondii* stimulates proviral transcription in macrophages *in vivo*. *J Exp Med.* **183**:1645-1655.
- Gazzinelli, R., Sher, A., Gerstberger, M., Dickie. 1997. Infection of human immunodeficiency virus transgenic mice with *Toxoplasma gondii* stimulates proviral transcription in macrophages *in vivo*. *J. Exp. Med.* **183**:1645–1655.
- Gelbard H., Epstein L. HIV encephalopathy in children. 1995. *Curr Opin Pediatr.* **7(6)**: 655-662.
- Gendelman, H., Lipton, S., Tardieu, M., Bukrinsky, M., Nottet, H. 1994. The neuropathogenesis of HIV-1 infection. *J Leukoc. Biol.* **56**: 389-398.
- Ghosh, S., May, M. 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **16**: 225-260.
- Gómez, J.E., Alvarado, F., Hernández, C., Cuervo, S., Saravia, J. 2001. Tratamiento de la fase aguda de la toxoplasmosis cerebral con Clindamicina- Falcidar (pirimetamina-sulfadoxina) en pacientes infectados por VIH. *Infectio.* **5(3)**: 162-168.
- Gongora, A., González, P., Castro, C., Pavia, N., Lara, D., Alonzo, D., palacios, E. 1998. Anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en pacientes con VIH en Yucatan. *Rev. Invest. Clin.* **50(5)**: 419-422.
- González, F., Garcia, M.J. 2005. The Neuropathogenesis of AIDS. *Nat. Rew. Immunol.* **5**: 69-81.
- Gorocica, P., Chávez, R., Lascurain, R , Espinosa, B., Zenteno, E. 1999. Óxido nítrico, una molécula multifuncional. *Rev. Inst. Nat. Enf. Resp. Mex.* **12(4)**: 300-304.
- Granger, D., Leninger, A. 1982. Site of inhibition of mitochondrial electron transport in macrophage injured neoplastic cell. *J. Cell. Biol.* **95**: 527.
- Grant , A., Djomand, G., Smets, P., Kadio, A., Coulibaly, M., Kakou, A. 1997. Profound immunosuppression across the spectrum of opportunistic disease among hospitalized HIV-infected adults in Abidjan. *Côte d'Ivoire. AIDS.* **11**:1357-1364.
- Grant, A., Sidibe, K., Domoua, K., Bonard, D., SyllaKoko, F., Dosso, M. 1998. Spectrum of disease among HIV-infected adults hospitalised in a respiratory medicine unit in Abidjan, Côte d'Ivoire. *International J. Tuberculosis and Lung Disease.* **2**:926-934.
- Grant, I., Gold, J., Rosenblum, M., Niedzwiecki, D., Armstrong, D. 1990. *Toxoplasma gondii* serology in HIV-infected patients: the development of central nervous system toxoplasmosis. *AIDS.* **4 (6)**: 519-521.

- Green, L., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**: 131.
- Griscavage, J; Hobbs, A; Ingarro, L. 1995. Negative modulation of nitric oxide synthasa by nitric oxide and nitroso compounds. *Adv. Pharmacol.* **34**: 215-234.
- Guillemin, J., Brew, J. 2004. Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *J. Leukoc. Biol.* **75**: 388-397.
- Gupta, S., Sundaram, C. 2010. Inhibiting NF-kappa B activation by small molecules as a therapeutic strategy. *Biochim. Biophys. Acta.* **1799(10-12)**: 775-787.
- Guyton, A. 1989. Anatomia y fisiología del sistema nervioso. Neurociencia básica. Edición 1989. Editorial Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Guyton, A. Hall, J. 1997. Tratado de Fisiología Médica. Novena edición. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana. México D.F, México.
- Haseltine, W. 1989. Development of antiviral drugs for the treatment of AIDS: strategies and prospects. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **2**: 311-334.
- Hayden, M., Ghosh, S. 2008. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell.* **132(3)**: 344-362.
- He, J., Choe, S., Walker, R. 1995. Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity. *J. Virol.* **69**: 6705.
- Hesselgesser, J., Horuk, R. 1999. Chemokine and chemokine receptors expression in the central nervous system. *J. Neurovirology.* **2**: 13-26.
- Hesselgesser, J., Taub, D., Baskar, P., Greenberg, M., Hoxie, J., Kolson, D., Horuk, R. 1998. Neuronal apoptosis induced by HIV-1 gp120 and the chemokine SDF-1 alpha is mediated by the chemokine receptor CXCR4. *Curr. Biol.* **8**:595-598.
- Hill, J., Mervis, R., Avidor, R., Moody, T., Brenneman, D. 1993. HIV envelope protein-induced neuronal damage and retardation of behavioral development in rat neonates. *Brain Res.* **603**: 222-233.
- Himeno, K., Hisaeda, H. 1996. Contribution of 65-kDa heat shock protein induced by gamma delta T cells to protection against *Toxoplasma gondii* infection. *Immunol. Res.* **15**:258.
- Hoffmann, A., Natoli, G. 2006. Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene.* **25(51)**: 6706-6716.
- Hogan, T., McAllister, J., Steimer, K., Ross, H., Wigdahl, B. 2000. Vpr-mediated HIV-1 LTR trans-activation: Implications relevant to CNS infection. *J. Neurovirology.* **6**: 430.

Ho-yen, D. 1992. Immunocompromised patients. In: Human toxoplasmosis, edited by Ho-Yen, O., Joss, A. Oxford: Oxford University Press. Londres, Inglaterra. http://www.e.spanol.ninds.nih.gov/trastornos/complicaciones_neurologicas_del_sida.htm [consultado 10 de Noviembre de 2011].

Huber, J., Egleton, R., Davis, P. 2001. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *TRENDS in Neurosciences*. **24(12)**.

Ignarro, L., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E., Chaudhuri, G. 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **84**: 9265-9269.

Informe sobre la epidemia mundial de sida. 2008. Resumen de orientación. Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/Sida (ONUSIDA) (Versión en español).

James, H; Sharer, L; Zhang, Q; Wang, H; Epstein, L; Reed, J; Gelbard, H. 1999. Expression of caspase-3 in brains from paediatric patients with HIV-1 encephalitis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. **25**: 380–386.

Janssen, R., Nwanyanwu, O., Selik, R., Stehr, J. 1992. Epidemiology of human immunodeficiency virus versus encephalopathy in the United States. *Neurology*. **42**: 1472–1476.

Julius, C., Heikenwalder, M. 2008. Prion propagation in mice lacking central nervous system NF-kappa B signalling. *J. Gen Virol*. **89(6)**: 1545-1550.

Kaltschmidt, B., Widera, D. 2005. Signaling via NF-kappa B in the nervous system. *Biochim. Biophys. Acta*. **1745(3)**: 287-299.

Kaltschmidt, C., Kaltschmidt, B. 1994. Constitutive NF- kappa B activity in neurons. *Mol. Cell Biol*. **14(6)**: 3981-3992.

Kaplan, D., Sieg, S. 1998. Role of the Fas/Fas Ligand Apoptotic Pathway in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Disease. *J. General of Virology*. **72(8)**: 6279-6281.

Kaul, M., Gwenn, A., Stuart, A. 2001. Pathways to neuronal injury and apoptosis in VIH-associated dementia. *Nature*. **410**: 988-994.

Kaul, M., Lipton, S. 1999. Chemokines and activated macrophages in HIV gp120-induced neuronal apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96(14)**: 8212-8216.

Kaul, M., Ma, Q., Medders, K., Desai, M., Lipton, S. 2007. HIV-1 coreceptors CCR5 and CXCR4 both mediate neuronal cell death but CCR5 paradoxically can also contribute to protection. *Cell Death Differ*. **14**: 296–305.

Kaul, M., Zheng, J., Okamoto, S., Gendelman, H., Lipton, S.A. 2005. HIV 1 infection and AIDS: consequences for the central nervous system. *Nature*. **12**: 878-892.

- Kelm, M., Feelish, M., Spahr, R., Piper, H.M., Noak, E., Shrader, J. 1988. Quantitative and kinetic characterization of nitric oxide and EDRF release from cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **154**: 257- 244.
- Kim, Y., de Vera, M., Watkins, S., Billiar, T. 1997. Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumour necrosis factor α -induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression. *J. Biol. Chem.* **272**:1402.
- Kindt, T., Goldsby, R., Osborne, B. 2007. Inmunología de Kuby. Sexta Edición. Editorial Mc Graw Hill. México D.F. México.
- Koka, P., He, K., Camerini, D., Tran, T., Yashar, S., Merrill, J. 1995. The mapping of HIV-1 gp160 epitopes required for interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha production in glial cells. *J. Neuroimmunol.* **57**: 179 –191.
- Krebs, F., Ross, H., McAllister, J., Wigdahl, B. 2000. HIV-1-associated central nervous system dysfunction. *Adv Pharmacol.* **49**: 315-385.
- Kronke, K., Fehsel, K., Kolb, V. 1997. Nitric oxide: Cytotoxicity versus cytoprotection. How, why, when, and where? Nitric oxide. *Biol. Chem.* **1**:107-120.
- Krathwohl, M.D., Kaiser, J.L. 2004. HIV-1 promotes quiescence in human neural progenitor cells. *J. Infect. Dis.* **190**: 216–226.
- Kure, K., Line, J., Lyman, W., Sociro, R., Weidenheim, K., Hirano, A., Dickson, D. 1991. Human Immunodeficiency Virus-1 infection of nervous system: An autopsy study of 268 adults, pediatrics, and fetal brains. *Hum. Pathol.* **22**: 700-710.
- Kwon, N., Nathen, C., Suder, D. 1989. Reduced biopterin as a cofactor in the generation of nitrogen oxides by murine macrophage. *J. Biol. Chem.* **264**: 20496.
- LaBonte, J., Madani, N., Sodroski, J. 2003. Cytolysis by CCR5-using human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins is dependent on membrane fusion and can be inhibited by high levels of CD4 expression. *J. Virol.* **77**: 6645–6659.
- Lancaster, J. 1997. A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. Nitric oxide. *Biol. Chem.* **1**: 18-30.
- Laubenberger, J., Haussinger, D., Bayer, S., Thielemann, S., Scheneider, B., Munding, A., Henning, J., Langer, M., 1996. VIH-related Metabolic Abnormalities in the Brain: Depiction with Proton MR Spectroscopy with Short Echo Times. *Radiology.* **199**: 805-810.
- Lee, C. 2006. Screening for *Toxoplasma gondii*-regulated transcriptional responses in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Infect. Immun.* **74**: 1916–1923.
- Lenardo, M., Baltimore, D. 1989. NF- κ B: A pleiotropic Mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell.* **58**: 227-229.

- Lepoivre, M., Fieschi, F., Coves, J., Thelander, L., Fontecave, M. 1991. Inactivation of ribonucleotide reductase by nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**: 442-448
- Lesueur, A. 1996. Manifestaciones neurológicas ligadas al VIH. *Rev. Per. Neurol.* **2**: 2-3.
- Lipton, S. 1995. Neuronal injury associated with HIV-I: Approaches to treatment. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**:159-177.
- Lipton, S., Gendelman, H. 1998. Demencia asociada con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida. *N. Engl. J. Med.* **332**: 934-940.
- Lipton, S., Sucher, N., Kaiser, P., Dreyer, E. 1991. Synergistic effects of HIV coat protein and NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *Neuron.* **7**: 111-118.
- Liu, B., Hong, J. 2003. Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **304**: 1-7.
- Lizarazo, J. 2006. Infecciones oportunistas del sistema nervioso central en pacientes con VIH atendidos en el Hospital Universitario Erasmo Meoz, Cúcuta, 1995-2005. *Infectio.* **10(4)**: 226-231.
- Lopez, L., Beckert, T. 1999. La Demencia Asociada al Síndrome Inmunodeficiencia Adquirida y la Hipótesis Dopaminérgica. *Neuropsychology Research Program. Department of Neurology and Psychiatry. University of Pittsburgh School of Medicine. Pittsburgh, Pennsylvania.*
- Luder, C; Giraldo, V; Sendtner, M; Gross, U. 1999. *Toxoplasma gondii* in primary rat CNS cells: differential contribution of neurons, astrocytes, and microglial cells for the intracerebral development and stage differentiation. *Exp. Parasitol.* **93**: 23-32.
- Luft, B.J., Remington, J.S. 1992. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin. Infect. Dis.* **15**: 211-222.
- Lyons, R., Johnson, A. 1995. Heat shock proteins of *Toxoplasma gondii*. *Parasite. Immunol.* **17**:353.
- Mac, J; Xie, Q; Natham, C. 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* **15**: 323-350.
- Maekelt, A., Barraez, S., Sánchez, Z., Barraez, T. 1965. La prueba de la Hemaglutinación Indirecta aplicada al diagnóstico de la Toxoplasmosis. *Archi Ven. Med. Trop. Parasitol. Med.* **5**: 465-470.
- Maekelt, A., Barraez, S., Sánchez, Z., Barraez, T. 1965b. La prueba de la Hemaglutinación Indirecta aplicada al diagnóstico de la Toxoplasmosis. *Archi Ven. Med. Trop. Parasitol. Med.* **5**: 465-470.

- Maekelt, A.G., Gómez, Z. 1965a. Estado actual del estudio sobre la Toxoplasmosis en Venezuela. *Antioquía Médica*. **15(5)**: 327-328.
- Martín, J., Kolson, D. 2002. Chemokine receptor in the brain: their role in HIV infection and pathogenesis. *AIDS*. **16**: 1709-1730.
- Martínez, S.R., Machin, R., Suárez, M., Fachado, A. 1989. Aspectos seroepidemiológicos de la Toxoplasmosis en 2 municipios de la provincia de Ciego de Avila. *Rev. Cubana Med. Trop.* **41(2)**: 214-225.
- Masliah, E., Ge, N., Mucke, L. 1996. Pathogenesis of HIV-1 associated neurodegeneration. *Crit Rev Neurobiol.* **10**:57-67.
- Mattson, M. 2003. Insulating axons via NF-kappa B. *Nat. neurosci.* **6(2)**: 105-106..
- Mattson, M., Camandola, S. 2001. NF-kappa B in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *J. Clin. Invest.* **107(39)**: 247-254.
- Maubon, D., Ajzenberg, D., Brenier, M., Darde, M., Pellus, H. 2008. What are the respective. host and parasite contributions to toxoplamasis?. *Trends in Parasitology.* **24(7)**: 299-303.
- McFadden, D.C., Camps, M., Boothroyd, J.C. 2001. Resistance as a tool in the study of old and new drug targets in *Toxoplasma*. *Drug. Resist. Updat.* **4**: 79-84.
- Memet, S. 2006. NF-kappaBfuntions in the nervous system: from development to disease. *Biochem. Pharmacol.* **72(9)**: 1180-1195.
- Merberg, P., Kinney, W. 1996. Gene expression of the transcription factor NF-kappa B in hppocampus: regulation by synaptic activity. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **38(2)**: 179-190.
- Merrill, J., Koyanagi, Y., Zack, J., Thomas, L., Martin, F., Chen, I. 1992. Induction of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in brain cultures by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **66**: 2217-2225.
- Miller, C; Smith, N; Johnson, A. 1999. Cytokines, nitric oxide, heat shock proteins and virulence in *Toxoplasma*. *Parasitol. Today.* **15**: 418.
- Miller, N., Frenkel, J., Dubey, J. 1972. Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals, and in birds. *J. Parasitol.* **58**: 928.
- Mocroft, A., Ledergerber, B., Katlama, C., Kirk, O., Reiss, P., 'Arminio, M., Knysz, B y colaboradores. 2003. Decline in the AIDS and death rates in the EuroSIDA study: an observational study. *Lancet.* **362**: 22-29.
- Moncade, S., Higgs, A. 1993. Mechanism of disease. *Engl. J. Med.* **329**: 2002-2011
- Moore, K., Matlashewski, G. 1994. Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. *J. Immunol.* **152**:2930.

- Moore, K., Matlashewski, G. 1994. Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. *J. Immunol.* **152**:2930.
- Moroni, M., Antinori, S. 2003. HIV and direct damage of organs: disease spectrum before and during the highly active antiretroviral therapy era. *AIDS.* **17(1)**: 51-64.
- Nabel, G., Baltimore, D. 1987. An Enducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature.* **326**: 711-713.
- Nakajima, K., Kohsaka, S. 1998. Functional roles of microglia in the central nervous system. *Hum. Cell.* **11(3)**: 141-155.
- Nash, P., Purner, M., Leon, R., Clarke, P., Duke, R., Curiel, T. 1998. *Toxoplasma gondii* Infected Cells Are Resistant to Multiple Inducers of Apoptosis. *J. Immunol.* **160**: 1824-1830.
- National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) . 2010. (online)
- Navarro, P., Reyes, H. 2000. Infecciones Parasitarias en la Frontera del Tercer Milenio. RFM. (online). **23 (1)**: 4. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S079846920000100002&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0798-0469. [citado: 20 de agosto de 2012].
- Navia, B., Eun, C., Petito, C., Price, R. 1986. The AIDS dementia complex. II. *Neuropathology Ann Neurol.* **19**: 525-535.
- Nicholson, D., Ali, A., Thornberry, N., Vaillancourt, J., Ding, C., Gallant, M., Gareau, T y colaboradores. 1995. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature.* **376**: 37.
- Ohnismus, H., Heinkelein, M., Jassoy, C. 1997. Apoptotic cell death upon contact of CD4+ T lymphocytes with HIV glycoprotein-expressing cells is mediated by caspases but bypasses CD95 (Fas/Apo-1) and TNF receptor. *J. Immunol.* **159**: 5246-5252.
- Okamoto, S., Kang, Y., Brechtel, C., Siviglia, E., Russo, R., Arjay, C., Harrop, A, Scott y col. 2007. HIV/gp120 Decreases Adult Neural Progenitor Cell Proliferation via Checkpoint Kinase-Mediated Cell-Cycle Withdrawal and G1 Arrest. *Cell Stem Cell.* **1**: 230-236.
- Oropeza, P., Raga, M.N. 1952. Toxoplasmosis humana en Venezuela. *Archi. Ven. Pat. Trop. Para. Med.* **15**: 363-366.
- Palmer, T.D., Takahashi, J., Gage, F.H. 1997. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol. Cell. Neurosci.* **8**: 389-404.
- Pantaleo, G., Fauci, A. 1996. Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 825.
- Pascual, J. M., Gonzales, F., Cerdan, S., Carceller, F., Roda, J. M. 2000. Fisiopatología de las células gliales en la isquemia cerebral. *Neurocirugia.* **11**: 247-25.

Pascual, J., González, F., Prieto, R., Cerdán, S., Roda, J. 2004. La barrera hematoencefálica: desarrollo de una estructura que permite la heterogeneidad funcional del sistema nervioso central. *Rev Neurol.* **38** (6): 565-581.

Pedrol, E., Gonzalez, J., Gatell, J., Mallolas, J., Miro, J., Grans, F. 1990. Central nervous system toxoplasmosis in AIDS patients: efficacy of an intermittent maintenance therapy. *AIDS.* **4**: 511.

Perkins, N. 2006. Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene.* **25(51)**: 6717-6730.

Perrin, C., Fenouillet, E., Jones, I. 1998. Role of gp41 glycosylation sites in the biological activity of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Virology.* **242**: 338–345.

Persidsky, Y., Gendelman, E. 2003. Mononuclear phagocyte immune and neuropathogenesis of VIH-1 infection. *J. Leukoc. Biol.* **74**: 691-701.

Pinon, J.M. 2003. Approche multidisciplinaire de la toxoplasmose congénitale. Différences dans les stratégies européennes. *Arch. Pédiatr.* **10**: 29.

Polo, R., Sanz, J., Cánoves, D., Fernandez, J., Galindo, M., Gatell, J., Iñiguez, J. 2006. Recomendaciones Sobre Manejo de los Trastornos Relacionados con la Infección de VIH. Hospital General Universitario de Valencia. Secretaría del Plan Nacional sobre el Sida. Madrid, España.

Price, R., Brew, B., Sidtis, J., Rosenblum, M., Scheck, A., Cleary, P. 1988. The brain in AIDS: central nervous system HIV-1 infection and AIDS dementia complex. *Science.* **239**: 586–592.

Re, L. 1997. HIV-1 Vpr: G2 cell cycle arrest, macrophages and nuclear transport. *Prog Cell Cycle Res.* 1997. **3**: 21.

Rivera, N., Mondragón, R. 2010. Cistogénesis de *Toxoplasma gondii*. *REB. Redalyc.* **29(1)**: 13-18.

Rodríguez, E., Pineda, J. 1999a. Encuesta seroepidemiológica de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* en mujeres gestantes del Estado de Guerrero. Resumen. p 77. XIV Congreso Latinoamericano de Parasitología, Acapulco, México.

Rodríguez, E., Pineda, J.C. 1999b. Prevalencia de anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* en donadores de sangre. Resumen. p 77. XIV Congreso Latinoamericano de Parasitología. Acapulco, México.

Rostasy, K., Monti, L., Kneissl, M, Bell, J., Hedreen, J., Navia, B. 1998. Proinflammatory mediators and HIV infection in the basal ganglia: their pathogenetic relationship to the AIDS dementia complex. *Neurosci. HIV Infect.* **1**: 30.

Roulston, A; Marcellus, R; Branton, P. 1999. Viruses and apoptosis. *Ann. Rev. Microbio.* **53**: 577-628

Rozenfeld C, Martinez R, Seabra S, Santanna C, Gonçalves J.G., Bozza, M., Moura-Neto V, De Souza, W. 2005. Toxoplasma gondii prevents neuron degeneration by interferon-gamma-activated microglia in a mechanism involving inhibition of inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta1 production by infected microglia. *Am J Pathol.* **167(4)**:1021-1031.

Sacks, D., Sher, A. 2002. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat. Immunol.* **3**: 1041–1047.

Sadler, M., Brink, N.S., Gazzard, B.G. 1998. Management of intracerebral lesions in patients with HIV: a retrospective study with discussion of diagnostic problems. *Quarterly J. Med.* **91(3)**: 205-217.

Salud Pública. Seroepidemiología de la Toxoplasmosis en México. 1992. (en línea). México. Disponible en: <http://www.insp.mx/rsp/articulos/articulo.php?id=001245> [Citado 08 de Noviembre 2011].

Sanchez, M., Anvarro, I., Galicia, O., Sanchez, F., Murillo, E., Gomez, M., Rivero, M y col. 1999. Aspectos moleculares de la demencia asociada al SIDA. *Rev. Mex de Salud Mental.* **22 (2)**: 49-65.

Schenone, H., Contreras, M., Salinas, P., Sandoval, L., Peña, A.M., Rodriguez H., Villaroel F., Rojas, A. 1986. Prevalencia de la infección humana, estudiada mediante la reacción de Hemaglutinación Indirecta, en las tres primeras regiones. *Bol. Chil. Parasitol.* **41**: 36-39.

Seabra, S; De Souza, W; Da Matta; R. 2004. *Toxoplasma gondii* exposes phosphatidylserine inducing a TGF- β 1 autocrine effect orchestrating macrophage evasion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **324**: 744–752.

Sen, R., Baltimore, D., 1986. Inducibility of k Emanunoglobulin enhancer- binding protein NF-kB by post-translational mecitanis,. *Cell.* **47**: 921-928.

Shapira, S., Speirs, K., Gerstein, A, Caamano, J., Hunter, C. 2002. Suppression of NF-kB activation by infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Infect. Dis.* **185**: 66-72.

Sharer L. 1992. Pathology of HIV-1 infection of the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* **51**: 3-11.

Situación de la epidemia de sida. 2009. Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/Sida (ONUSIDA) y Organización Mundial de la Salud (OMS) (versión en español).

Sompol, P., Xu, Y. 2006. NF-kappa B-associated MnSOD induction protects against beta-amyloid-induced neuronal apoptosis. *J. Mol. Neurosci.* **29(3)**: 279-288.

Song, W., Lahiri, K. 1998. Molecular cloning of the promoter of the gene seconding the Rhesus monkey beta-amyloid precursor protein: structural characterization and a comparative study with other species. *Gene.* 217(1-2): 151-164.

- Soto, U. R., Tarazon, S. 1993. Toxoplasmosis y Embarazo. *Kasmera*. **21(1-4)**: 1-36.
- Sotrel, A. 1989. The nervous system. cap 8en "Pathology and pathophysiology of AIDS and HIV-related diseases. Harawi SJ, O'Hara CJ. Eds. *Chapman and Hall Medical*. Londres, Inglaterra.
- Soulsby, E. 1987. Parasitología y Enfermedades parasitarias. Editorial Interamericana. México D.F, México.
- Sparacio, S., Zhang, Y. 1992. Cytokine regulation of Interlukin-6 gene expression in astrocytes involves activation of an NF-kappa B-nuclear protein. *J. Neuroimmunol.* **39(3)**: 231-242.
- Stanley, J., Henriksen, S., Prospero, O., Philips, T., Elder, J., Young, W., Bloom, F y col. 1997. Cortical neuronal cytoskeletal changes associated with HIV infection. *J. Neurovirol.* **3**: 283-289.
- Stefka, M. 2011. Estudio de la función de la vía NF-kappa B en las motoneuronas espinales y su relación con la atrofia muscular espinal. Tesis Doctoral en Neurociencia. Universidad de Lleida. Lleida, España.
- Stein, B., Gowda, S. 1987. PH-independent HIV entry into CD4-positive T cells via virus envelope fusion to the plasma membrane. *Cell.* **49**: 659.
- Stein, D., Korvich, J., Vermund, S. 1992. CD4+ lymphocyte cell enumeration for prediction of clinical course of human immunodeficiency virus disease: a review. *J. Infect. Dis.* **165**: 135.
- Stevenson, M. 2003. HIV-1 pathogenesis. *Nat. Med.* **9(7)**: 853-860.
- Stin, F., Pearce, D., Erdreich, A., Pardo, A., Kim, S. 2003. Induction of Intercellular Adhesion Molecule-1 on Human Brain Endothelial cells by VIH-1 gp 120: role of CD4 and Chemokine Receptors. *Lab. Invest.* **83**: 1787-1798.
- Stoppelkamp, S., Riedel, G., Platt, B. 2010. Culturing conditions determine neuronal and glial excitability. *J. Neurosci. Methods.* **194**: 132-138.
- Tam, W., Lee, H. 2000. Cytoplasmic sequestration of rel proteins by IkappaBalpha requires CRM1-dependent nuclear export. *Mol. Cell Biol.* **20(6)**: 2269-2284.
- Tamatani, M., Che, H. 1999. Tumor necrosis factor induce Bcl-2 and bcl-x expression through NF -kappa B activation in primery hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* **274(13)**: 8531-8538.
- Taylor, D., Jones, F. 2005. Stimulation of microglia metabotropic glutamate receptor mGlu2 triggers tumor necrosis factor alpha-induced neurotoxicity in concert with microglial-derived Fas ligand. *J. Neurosci.* **25(11)**: 2952-2964.

Tewari, M., Quan, K.L., O'Rourke, S., Desnoyers, Z., Zeng, D., R. Beidler, G. G., Poirer, G. S., y colaboradores. 1995. Yama/PPP32b, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell*. **81**: 801.

Tovar, J. 2012. Cultivos celulares. Programa del curso Neurobioquímica. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. (Online). Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/neurobioquimica/cultivoscell.htm>. [Citado 01 de Septiembre de 2012]

Treinta años de sida: Las naciones en la encrucijada. Informe completo. 2011. Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/Sida (ONUSIDA).

Triolo, M., Traviezo, L. 2006. Seroprevalencia de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en gestantes del municipio Palavecino, estado Lara, Venezuela. *Kasmera*. **34**: 7-13.

Trujillo, F., Mercado, J., Magaña, A.G., Raygoza, M. 1999. Estudio comparativo de familias que convivieron con gatos seropositivos y seronegativos a infección por *Toxoplasma gondii* en la zona metropolitana de ciudad Guzmán, Jalisco. México. Resumen. p 22. XIV Congreso Latinoamericano de Parasitología, Acapulco, México.

Valdes, R. VIH-SIDA y Embarazo: Actualización y Realidad en Chile. 2002. (online). *Rev. chil. obstet. ginecol.* **67(2)**: 160-166. http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S07177526200200016&lng=es&nrm=iso. ISSN 0717-7526. [Citado 03 de Noviembre de 2011].

Vidal, L. 1990. Prevalencia de Anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en Cabras de la Provincia de Lima. Tesis para optar el Título de Médico Veterinario. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

Vitkovic L., Tardieu M. 1998. Neuropathogenesis of HIV-1 infection. Outstanding questions. *C R Acad Sci*. **3(321)**: 1015-1021.

Vodovotz, Y. 1997. Control of nitric oxide production by transforming growth factor α -1: Mechanistic insight and potential relevance to human disease. Nitric oxide. *Biol. Chem.* **1**: 3-7.

Vodovotz, Y., Bogdan, C. 1994. Control of nitric oxide synthase expression by transforming growth factor-beta: implications for homeostasis. *Prog Growth Factor Res* **5**:341-351.

von Bernhardi, R., Eugénin, J. 2004. Microglia - astrocyte interaction in Alzheimer's disease: modulation of cell reactivity to A β . *Brain Res*. **1025**: 186-193.

Weiss, L.M., Kim, K. 2001. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front in Biosc.* **5**: 391-405.

- Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S., Skehel, J., Wiley, D. 1997. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature*. **387**: 426-430
- Wesselingh, S., Power, C., Glass, J., Tyor, W., McArthur, J., Farber, J., Griffin, J., Griffin, D. 1993. Intracerebral cytokine mRNA expression in AIDS dementia. *Ann. Neurol.* **33**: 576–582.
- West, M; Lowe, A; Karn, J. 2001. Activation of human immunodeficiency virus transcription in T cells revisited: NF- κ B p65 stimulates transcriptional elongation. *J Virol.* **75(18)**: 8524-8537.
- White, K., Marleta, M. 1992. Nitric oxide synthase is a cytochrome P450 type hemoprotein. *Biochemistry.* **31**: 6627-6631.
- Wiley, C., Masliah, E., Morey, M., Lemere, C., DeTeresa, R., Grafe, M., Hansen, L., Terry, R. 1991. Neocortical damage during HIV infection. *Ann. Neurol.* **29**: 651– 657.
- Willey, R., Bonifacino, J., Potts, B., Martin, M., Klausner, R. 1988. Biosynthesis, cleavage, and degradation of the human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein gp160. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 9580 –9584.
- www.blogsida.com. [Consultada: 11 de noviembre de 2011]
- Wyss, T., Yan, F., Lin, A., Lambris, J., Alexander, J. 2002. Prominent neurodegeneration and increased plaque formation in complement-inhibited Alzheimer's mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**: 10837-10842.
- Xie, O; Kashiwabara, Y; Nathan, C. 1994. Role of transcription factor NF- κ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **269**:4701.
- Xion, E., Zeng, Y., Lewis, T., Zheng, J., Persidsky, Y., Gendelman, H. 2000. VHI-1 Infected mononuclear phagocyte secretory products affect neuronal physiology leading to cellular demise: relevant for VIH-1-associated dementia. *J. NeuroVirology.* **6(1)**: 14-23.
- Xu, W., Chi, L. 2005. Increased production of reactive oxygen species contributes to motor Neuron death in a compression mouse Model of spinal cord injury. *Spinal Cord.* **43(4)**: 204-213.
- Xuenan, X. 2004. Toxoplasma Full-Length cDNA project. Database. (online). Disponible en <http://www.fullmal.hgc.jp/tg/docs/toxoplasma.html>. [Citado 03 Noviembre de 2011]
- Yabar, C. 2003. Eventos Moleculares, Genéticos e Inmunológicos durante la interacción VIH-Hombre. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud. Publica.* **20(2)**: 107-115.
- Yano, A., Mun, H., Chin, M., Norose, K., Hata, K., Kobayashi, M., Aosai, F y col. 2002. Roles of IFN- γ on stage conversion of an obligate intracellular protozoan parasite, *Toxoplasma gondii*. *Int. Rev. Immunol.* 2002. **21**: 405–421.

Yates, D.H., Kharitonov, S.A., Thomas, P., Barnes, P.J. 1996. Endogenous nitric oxide is decreased in asthmatic patients by an inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **154**: 247-250.

Yeung, C., Pulliam, L., Lau, A. 1995. The HIV envelope protein gp120 is toxic to human brain-cell cultures through the induction of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha. *AIDS* **9**:137-143.

Zhivotovsky, B., Orrenius, S. 2001. Current Concepts in Cell Death. En: Wiley, J. & Sons (eds). *Current Protocols in Cell Biology*. USA: *Wiley InterScience*. **18**:1-18.

Zuñiga, C., Garcia, A., Lorca, M. 1999. Distribución geográfica y aspectos epidemiológicos de la Toxoplasmosis en Honduras. Resumen. p 75. XIV Congreso Latinoamericano de Parasitología. Acapulco, México.