



Universidad Nacional Autónoma de México



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



Efecto de la gonadectomía en la respuesta inmune contra

Plasmodium berghei ANKA.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLÓGO

PRESENTA:

Néstor Aarón Mosqueda Romo

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Martha Legorreta Herrera

ASESORA INTERNA:

Dra. María Esther Cruz Beltrán



MÉXICO, D.F.
2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis es el resultado del trabajo de muchas personas que de una u otra forma contribuyeron para concluir con esta meta, entre ellas quiero destacar en primer lugar a mis padres, **Teresa Romo González** y **José Carmen Mosqueda González**, gracias por cuidarme, por los valores que me han inculcado, por creer en mí y por darme la oportunidad de perseguir mis sueños.

A mis hermanos **Emmanuel, Eric y Ulises** por compartir su vida conmigo y en su mayoría pasar ratos agradables.

Debo agradecer de manera especial y sincera a la **Dra. Martha Legorreta Herrera** por aceptarme para realizar este proyecto bajo su dirección. Su apoyo, su paciencia y sus conocimientos han sido elementos invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como persona e investigador. Le agradezco también por siempre haberme facilitado los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis y por enseñarme que el único camino al éxito es el trabajo.

Al **Dr. Isaías Hazarmabeth Salgado Ugarte** por brindarme su amistad, por ayudarme a entender y a realizar el análisis estadístico de los datos.

A los Médicos Veterinarios Zootecnistas; **Adriana Altamirano Bautista, Román Hernández Meza, Dolores Elizabeth Guzmán Andrade y Everardo Arturo González Acevedo** por ayudarme a calibrar y a realizar las técnicas de cirugía, su conocimiento y apoyo fue muy importante para realizar este proyecto.

A mis sinodales:

Dra. María Esther Cruz Beltrán

Dra. Martha Legorreta Herrera

M. en C. Catalina Machuca Rodríguez

Dra. María de Lourdes Mora García

Dr. José Luis Morán Perales

Por las críticas y observaciones que hicieron a este trabajo, ya que sirvieron para mejorarlo.

Este trabajo recibió financiamiento del Proyecto PAPIIT IN217412, DGAPA, UNAM.

Gracias también a toda mi familia abuelos, tios, sobrinos y primos, en especial a **Everardo** y **Adan** quienes me tendieron la mano en los momentos difíciles de esta prueba.

A mis compañeros de escuela y laboratorio: a **Anita**, por que con su trabajo me inspiraba a ser mejor, a **Luis** por su amistad y su humildad a **Fidel** por su peculiar sentido del humor siempre haciendo más amena la estancia en el laboratorio y a **Karla** por siempre recibirme con una sonrisa y por darme ánimo en los momentos difíciles.

También quiero agradecer al Biólogo **Baldo Altube Moreno**, en primer lugar por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por confiar en mi y por que a pesar del poco tiempo que llevo de conocerlo me ha enseñado cosas muy importantes que han servido para mi desarrollo personal y profesional.

Por último quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México y en especial a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, que me dieron la oportunidad de formar parte de ellas.

Néstor Aarón Mosqueda Romo.

TABLA DE FIGURAS

FIGURAS	Pag.
1.- Áreas de riesgo.	6
2.- Ciclo biológico del <i>Plasmodium</i> .	8
3.- Interacción parásito-hospedero en la piel.	10
4.- Efectos del INF γ - en la respuesta inmune innata y adaptativa contra la malaria.	14
5.- Cepa CBA/Ca.	19
6.- Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa.	20
7.- Curvas típicas de amplificación de la PCR en tiempo real.	22
8.- Gráfica de la reacción en cadena de la polimerasa.	22
9.- Curva de disociación.	24
10.- Orquiectomía.	30
11.- Ovariectomía.	31
12.- Parasitemia	32
13.- Sobrevida de los grupos de ratones hembras.	35
14.- Sobrevida de los grupos de ratones machos.	36
15.- Sobrevida de los grupos de ratones hembras y machos intactos y gonadectomizados.	37
16.- Efecto de la gonadectomía sobre la pérdida de peso en ratones hembras.	38
17.- Efecto de la gonadectomía sobre la pérdida de peso en ratones machos.	39
18.- Efecto de la gonadectomía sobre la pérdida de peso en ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.	40
19.- Efecto de la gonadectomía sobre la concentración de hemoglobina en ratones hembras.	41
20.- Efecto de la gonadectomía sobre la concentración de hemoglobina en ratones machos.	42
21.- Efecto de la gonadectomía sobre la concentración de hemoglobina en ratones hembras y machos.	43
22.- Efecto de la gonadectomía sobre la parasitemia en ratones hembras.	44
23.- Efecto de la gonadectomía sobre la parasitemia en ratones machos.	45
24.- Efecto de la gonadectomía sobre la parasitemia en ratones hembras y machos.	46
25.- Efecto de la gonadectomía sobre la expresión de INF- γ .	47
26.- Efecto de la gonadectomía sobre la expresión de TNF- α .	48
27.- Efecto de la gonadectomía sobre la expresión de TGF- β .	49
28.- Efecto de la gonadectomía sobre la expresión de IL-10.	50

ÍNDICE

	Página
1. Resumen	1
2. Antecedentes	2
3. Introducción	3
3.1. Historia.....	3
3.1.1. <i>Plasmodium</i>	4
3.1.2. <i>Plasmodium murinos</i>	4
3.1.3. <i>Plasmodium berghei</i>	5
3.2. Distribución geográfica.....	5
3.3. Ciclo biológico.....	6
3.4. Respuesta inmune en malaria.....	8
3.4.1. El papel de los macrófagos y las células dendríticas.....	9
3.4.2. La participación de las células CD4 ⁺ y CD8 ⁺	10
3.4.3. La importancia de las células B.....	12
3.4.4. Las citocinas y su función en malaria.....	12
3.4.4.1. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).....	13
3.4.4.2. El interferón gamma (IFN- γ).....	13
3.4.4.3. El factor transformador del crecimiento- β (TGF- β).....	15
3.4.4.4. Interleucina 10 (IL-10).....	15
3.5. Hormonas sexuales e inmunidad.....	16
3.5.1. <i>Plasmodium</i> y las hormonas sexuales.....	18
3.6. Cepa CBA/Ca.....	19
3.7. Técnicas y fundamentos.....	19
3.7.1. PCR tradicional.....	19
3.7.2. PCR en tiempo real.....	21
3.7.3. Concentración de hemoglobina.....	24
4. Planteamiento del problema	25
5. Hipótesis	28
6. Objetivos	28
6.1. Objetivos Particulares.....	28
7. Diseño experimental	28
8. Metodología	29
8.1. Gonadectomía.....	29
8.1.1. Orquiectomía.....	29
8.1.2. Ovariectomía.....	30
8.2. Infección.....	31
8.3. Parasitemia.....	31

8.4.	Pérdida de peso.....	32
8.5.	Hemoglobina.....	32
8.6.	Sacrificio, extracción de plasma y de órganos.....	32
8.7.	Extracción de ARN.	33
8.8.	Cuantificación de ARN.....	33
8.9.	Retrotranscripción.....	33
8.10.	PCR en tiempo real.....	34
8.10.1.	Cuantificación de citocinas (INF- γ , TNF- α , TGF- β , IL-10) y β -actina en tejido.....	34
8.11.	Análisis estadístico.....	34
9.	Resultados	35
9.1.	Efecto de la gonadectomía sobre la sobrevivencia de ratones machos y hembras infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.....	35
9.2.	Efecto de la gonadectomía sobre la pérdida de peso de ratones machos y hembras infectados con <i>P. berghei</i> ANKA	37
9.3.	Efecto de la gonadectomía sobre la concentración de hemoglobina de ratones machos y hembras infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.....	40
9.4.	Efecto de la gonadectomía sobre la parasitemia en ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.	43
9.5.	Efecto de la gonadectomía sobre la expresión de citocinas de ratones machos y hembras infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.....	46
9.5.1.	Efecto de la gonadectomía sobre la expresión de INF- γ en ratones CBA/Ca infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.....	46
9.5.2.	Efecto de la gonadectomía sobre la expresión de TNF- α en ratones CBA/Ca infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.....	47
9.5.3.	Efecto de la gonadectomía sobre la expresión de TGF- β en ratones CBA/Ca infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.....	48
9.5.4.	Efecto de la gonadectomía sobre la expresión de IL-10 en ratones CBA/Ca infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.....	49
10.	Discusión	55
11.	Conclusiones	62
12.	Referencias Bibliográficas	63
13.	Anexo	76
13.1.	Materiales	76
13.1.1.	Reactivos y soluciones.....	76
13.1.2.	Equipo de laboratorio.....	77
13.1.3.	Material biológico.....	77

1. Resumen

La malaria es la enfermedad infecciosa que cobra el mayor número de vidas en el mundo. El parásito que la ocasiona es un protozoo del género *Plasmodium* que ha desarrollado resistencia a prácticamente todos los medicamentos disponibles y el mosquito vector se ha tornado resistente a los insecticidas convencionales. Aunque la incidencia de la enfermedad prácticamente es igual en los hombres que en las mujeres, los varones cursan con infecciones más severas y tienen mayor mortalidad que las mujeres, es decir se presenta dimorfismo sexual, la observación de que la malaria en humanos se intensifica en la pubertad en los hombres pero no en las mujeres sugiere que la circulación de hormonas sexuales interfiere en el dimorfismo que se presenta en esta enfermedad. Las hormonas esteroides sexuales además de afectar al sistema inmune, también alteran la expresión de los genes y las conductas que influyen la susceptibilidad y la resistencia a la infección, los mecanismos precisos que generan esas diferencias entre los esteroides sexuales se desconocen.

En este estudio se utilizaron tres grupos de ratones de la cepa CBA/Ca machos y hembras, gonadectomizados, sham; grupo de simulación de cirugía al cual solo se abrió y se cerró la línea media abdominal en las hembras y la línea media de la bolsa escrotal en los machos, y un grupo de ratones intactos, todos los grupos se infectaron con *Plasmodium berghei* ANKA a diferentes tiempos durante la infección se evaluaron parámetros asociados con la patología de la malaria como son: la parasitemia, la sobrevida, la pérdida de peso y las concentraciones de hemoglobina. Además se evaluó la expresión de las citocinas INF- γ , TNF- α , IL-10 y TGF- β en el bazo. Con los resultados demostramos la participación de las hormonas sexuales en el dimorfismo sexual que se presenta en la respuesta inmune de los ratones CBA/Ca durante la infección con *Plasmodium berghei* ANKA, puesto que la gonadectomía y por lo tanto concentraciones menores de hormonas sexuales disminuyeron la sobrevida, el peso corporal, la concentración de hemoglobina y aumentaron la parasitemia en las hembras, mientras que en los machos disminuyó la sobrevida y la parasitemia, pero no se afectó el peso corporal ni la concentración de hemoglobina. Además, la gonadectomía incrementó la expresión de INF- γ , TNF- α , IL-10 y TGF- β en las hembras, mientras que en los machos gonadectomizados, el incremento de INF- γ , TNF- α y TGF- β fue menor que en las hembras y no se modificaron los niveles de expresión de IL-10.

Además de las hormonas sexuales, también existen otros factores que están involucrados en el dimorfismo sexual que se presenta en malaria.

2. Antecedentes

La malaria es la enfermedad infecciosa que ocasiona el mayor número de muertes en el mundo [1]. El agente etiológico es el protozoo parásito del género *Plasmodium* que se transmite a los humanos por la picadura de la hembra del mosquito *Anopheles* infectada. Diversos factores son responsables de la persistencia de la malaria como: la resistencia del vector a los insecticidas y del parásito a los medicamentos, además el ciclo de vida del plasmodio es muy complejo y la gran variación antigénica del parásito, conduce a una respuesta inmune deficiente. Probablemente, la estrategia más importante para controlar esta enfermedad es desarrollar una vacuna efectiva, sin embargo para eso se requiere conocer y potenciar los mecanismos efectores de la respuesta inmune con el propósito de intervenir en la diferenciación y expansión del parásito en el huésped o en el vector [2].

Para generar inmunidad protectora contra *Plasmodium* se requiere de los linfocitos T. Estas células son importantes en la respuesta inmune celular y para la cooperación en la síntesis de anticuerpos [3]. Algunas subpoblaciones de células T producen IL-2, IFN- γ , TNF- α , a través de estas moléculas se activan los macrófagos, otras subpoblaciones de células T producen: IL-4, IL-5 e IL-6, que cooperan con los linfocitos B en la síntesis de anticuerpos, mientras que las células Th2 son importantes en la regulación de la respuesta inmune vía la producción de IL-10 y TGF- β [4].

Existe una relación funcional entre los sistemas inmune y endócrino que se comunican utilizando mediadores comunes y sus receptores. Un ejemplo de esto es el efecto que las hormonas sexuales ejercen sobre las distintas poblaciones de leucocitos (linfocitos T y B, Células NK, granulocitos y macrófagos), así como sobre la producción y liberación de citoquinas y proteínas inmunoreguladoras [5].

Los esteroides sexuales influyen las funciones del sistema inmune, resultando en un dimorfismo sexual ante malaria. La incidencia de la infección por *Plasmodium* es similar entre ambos sexos [6]. Sin embargo, los hombres son más susceptibles que las mujeres [7]. En los modelos experimentales de malaria murina los machos presentan mayor mortalidad que las hembras [8-11]. La castración de los machos reduce la mortalidad, mientras que la administración de testosterona la incrementa [10-12]. En las hembras infectadas con *P. berghei* aumentan las concentraciones de estradiol y progesterona [13, 14]. Además, se ha demostrado que las hormonas esteroides sexuales también alteran la expresión de diversos genes [15].

3. Introducción

La malaria es un problema mundial de salud pública y se calcula que cada año se presentan de 300 a 500 millones de casos clínicos y aproximadamente un millón de personas mueren a causa de esta enfermedad [16]. La gran mayoría de estos casos son niños, especialmente de zonas rurales con difícil acceso a centros de salud. La UNICEF reconoce que la malaria es una de las 5 principales causas de muerte en niños menores de 5 años [17]. La malaria también es una causa importante de anemia en infantes y en mujeres embarazadas, bajo peso en recién nacidos, partos prematuros y mortalidad infantil [16]. En México, en los últimos 50 años se ha pasado de 24 mil defunciones y 2.4 millones de casos, a menos de tres mil registros y ningún fallecimiento desde 1982 a la fecha [18]. Sin embargo, el riesgo es persistente, debido a la presencia de casos graves generados por *P. falciparum* en Centroamérica, por lo que es necesario continuar con los programas de control y vigilancia epidemiológica en todo el país [18].

Entre las enfermedades parasitarias la causada por el género *Plasmodium* spp., es una de las de mayor distribución geográfica, actualmente es endémica en 106 países [19], en América Latina *Plasmodium vivax* es el responsable de la mayoría de los casos. El control de la malaria en América Latina se ha dirigido a reducir las oportunidades para los diversos componentes participantes en la transmisión: los vectores, los parásitos y los reservorios de la infección en humanos. México ha liderado los esfuerzos con varios países centroamericanos para lograr la eliminación de esta enfermedad parasitaria [20].

El entendimiento de como las hormonas sexuales regulan los mecanismos moleculares e inmunológicos entre el parásito y el hospedero contribuirá a combatir de manera más eficaz y con mejores estrategias a la malaria.

3.1. Historia

La palabra paludismo, por su etimología deriva de palustre que significa zona pantanosa, fue el término con el que se designó a esta enfermedad en aquellas personas que vivían aledañas a esos sitios, o también conocida como malaria del italiano medieval “mal aire”. En 1880, Alphonse Laverán, cirujano del ejército francés, observó por primera vez a este microorganismo de múltiples formas; lo descubrió en extensiones (frotis) de sangre periférica, donde los hematíes parasitados (trofozoitos) presentaban un moteado de un pigmento negro junto a numerosos gránulos rosas (puntos de Shüffner) y descubrió cómo sufrían una transformación, para luego liberar múltiples esferas (merozoitos) dentro de los mismos eritrocitos, que muy pronto salían a la circulación; ya en el torrente sanguíneo algunos de ellos sufrían una nueva transformación que les daba el aspecto de semilunas (gametocitos) y en ocasiones vio como emitían algunos cuantos flagelos [21].

3.1.1. Plasmodium

El *Plasmodium* es un protozoo cuyo ADN codifica para al menos 5600 genes, pertenece al filo *Apicomplexa* (complejo de microtúbulos, denominados esporozoos), clase *esporozoea* (carecen de órganos de locomoción), subclase *Coccidia*, suborden *Haemosporina*. Existen cinco especies dentro del género *Plasmodium* que causan enfermedad en el humano: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium knowlesi*. Otros *Plasmodium* (*Plasmodium cynomologi* y *Plasmodium simium*) se encuentran en primates y de manera excepcional infectan al ser humano. El hombre actúa como reservorio y huésped intermediario por desarrollarse en él la fase asexual o esquizogónica. El mosquito del género *Anopheles* es el huésped definitivo, ya que en este se produce la fase de reproducción sexual del parásito. Sólo la hembra es hematófaga y por lo tanto, solo ella es la transmisora [22].

3.1.2. Plasmodium murinos

Desde su descubrimiento en el centro de África occidental a mediados del siglo 20, los parásitos de malaria murina: *Plasmodium berghei*, *P. chabaudi*, *P. vinckei* y *P. yoelii* se han convertido en el modelo animal de estudio de *Plasmodium* para la biología [23]. Se ha probado la utilidad de estos parásitos en el estudio de diversos aspectos de las interacciones parásito-hospedero-vector, la evaluación para posibles intervenciones en el control de la malaria y para probar hipótesis acerca de la biología de la malaria humana [23-25]. Las infecciones con plasmidios murinos son buenos modelos para estudiar parásitos humanos, se ha demostrado que diferentes especies son útiles para diversos aspectos de la biología [26]. Por ejemplo, *P. chabaudi* es un buen modelo para estudiar las infecciones dinámicas y la respuesta inmune [24], *P. berghei* es el mejor modelo biológico de estudio para la transmisión del parásito [27, 28].

Los parásitos de malaria murina se aislaron de ratones salvajes entre 1948 y 1974, de cinco diferentes países (Camerún, República central de África, Congo, Zaire y Nigeria) [23]. Durante este periodo se han descrito cuatro especies, que abarcan trece sub especies. Las “ratas de matorral” *Thamnomys rutilans* (también conocida como *Grammomys poensis*) y *Grammomys dolichurus* fueron los hospederos vertebrados más comunes y al mismo tiempo *Anopheles durenii millecampsii* frecuentemente se ha encontrado infectado por parásitos de malaria murina, los vectores de algunos de estos parásitos se desconocen [23].

3.1.3. *Plasmodium berghei*

Vincke y Labios descubrieron a *P.berghei* en 1948 [29]. *P. berghei* se ha aislado a partir de tres diferentes especies de ratas de matorral [23], el interés de estudiar los parásitos de la malaria murina es que son modelos prácticos para el estudio experimental de la malaria en humanos. Estos parásitos son análogos a los que generan malaria en el hombre y otros primates en la mayoría de los aspectos esenciales del ciclo de vida, la estructura, la fisiología y la patología [29].

3.2. Distribución geográfica

La malaria se presenta en zonas tropicales de África, Asia y Latinoamérica, es endémica en 106 países. De las cinco especies de *Plasmodium* que infectan al hombre, *Plasmodium vivax* se distribuye ampliamente y es la más común en regiones templadas. *Plasmodium falciparum* produce las formas más graves y es muy importante en África Subsahariana y en regiones tropicales. *Plasmodium ovale* se presenta solo en África. *Plasmodium malariae* se ubica en África, Latinoamérica y Nueva Guinea. *Plasmodium knowlesi* se encuentra en el sureste de Asia.

En México, en el año de 1954, había en promedio 25,000 defunciones en el país por paludismo, en ese entonces el número de habitantes era alrededor de 25 millones en el territorio nacional. Así, comenzó la Campaña Nacional de Erradicación del Paludismo en 1955. En los años siguientes, el número de defunciones fue disminuyendo: 25,000 en 1955, 18,000 en 1956, 16,353 en 1957, 14,575 en 1958, 9,000 en 1959, 7,000 en 1970 y 2,000 en 1971. A partir de 1979, empezó una tendencia de incremento que se controló. En los últimos años se han presentado un promedio de 4,000 personas infectadas con *Plasmodium*, fundamentalmente por *Plasmodium vivax*, Chiapas es el estado en donde se reportaron el 52% de los casos, Oaxaca con el 19% seguido de Sinaloa y Chihuahua, con el 13 y 9%, respectivamente (Figura 1). Existen distintos factores sociales, económicos y biológicos que intervienen para que se incremente el número de pacientes de paludismo en las distintas poblaciones [30].

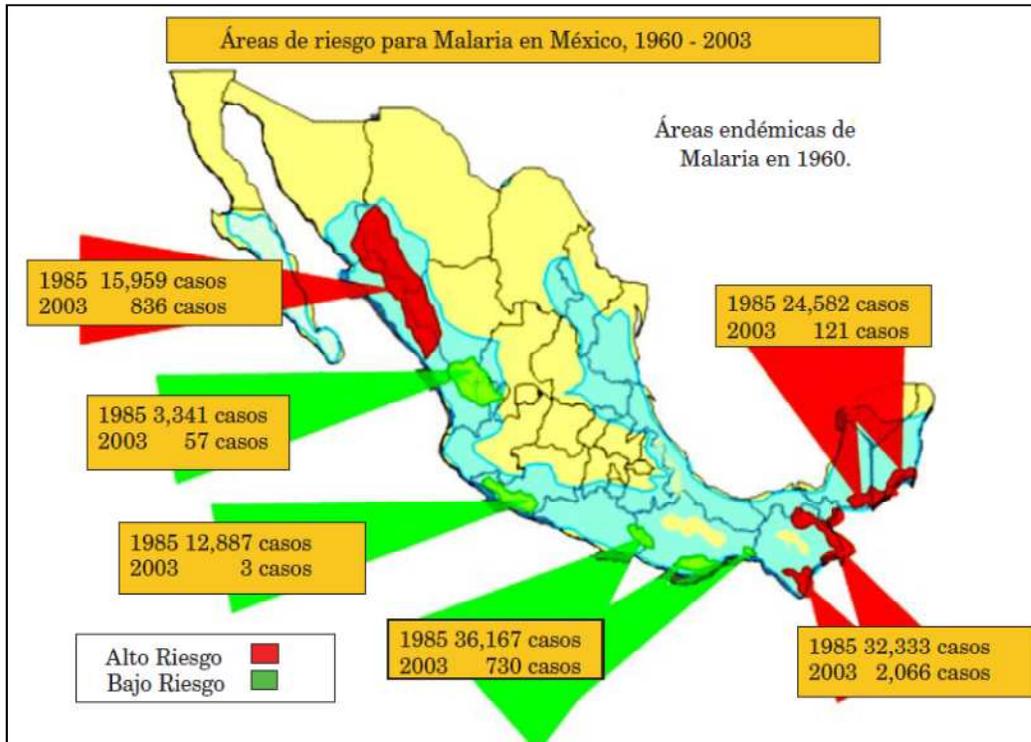


Figura 1. Áreas de riesgo (alto y bajo) para la transmisión de malaria en la República Mexicana y casos reportados en 1985 y 2003. Tomado de www.cdc.gov/Malaria/control-prevention.htm

3.3. Ciclo biológico

El ciclo exo-eritrocítico humano de *Plasmodium* se realiza en las células hepáticas; por división del núcleo del parásito, se originan acúmulos de varios millares de merozoitos que se liberan al romperse la célula huésped. Los merozoitos no pueden invadir nuevas células hepáticas pero si pueden invadir a los eritrocitos (Figura 2). Se denomina ciclo pre-eritrocítico al que ocurre cuando los esporozoítos inoculados por el mosquito transmisor originan a los merozoitos; tiene lugar durante el periodo de incubación del padecimiento. El ciclo exo-eritrocítico prácticamente no produce manifestaciones clínicas [22].

P. falciparum carece de formas para-eritrocíticas, por lo cual este parásito no puede causar recaídas después de haberse destruido todas las formas eritrocíticas, tiene una longevidad de un año; durante este lapso pueden presentarse parasitemias extraordinariamente bajas que no originan molestias, o periodos llamados recrudescencias, en que al aumentar la parasitemia se producen las manifestaciones clínicas [22].

P. vivax origina recaídas principalmente durante el primer año, se pueden presentar hasta cuatro años después del primer ataque. *P. malarie* puede causar recaídas después de 30 años del primer ataque. Se denomina recaída a un nuevo ataque de paludismo ocasionado por una nueva parasitemia, que no se produce por una nueva infección, sino por una nueva invasión, a partir de formas exoeritrocíticas previamente establecidas dentro del hospedero [22].

El ciclo eritrocítico es el principal responsable de las manifestaciones clínicas de la malaria, se completa de 48 a 72 horas, según la especie de *Plasmodium*, presentan características morfológicas que permiten su diferenciación específica. La permanencia de este ciclo se limita por fenómenos de inmunidad [22]. Se presentan periodos febriles que se caracterizan por el paroxismo clásico que consiste de escalofrío y temblor, seguidos de elevación de la temperatura de hasta 40°C y sudoración profusa, que lleva en última instancia a fatiga extrema y somnolencia, cefalea y pérdida de peso [31, 32]. Las manifestaciones más graves de esta enfermedad incluyen: malaria cerebral, anemia grave, falla respiratoria, daño renal y alteraciones en el embarazo. Existen otros factores importantes como acidosis metabólica, hipoglicemia, e infecciones que contribuyen al desarrollo de falla orgánica múltiple y muerte [32].

El ciclo sexual se inicia en el hombre con la formación de gametocitos, que aparecen una semana después de iniciado el ciclo eritrocítico (Figura 2). En la infección por *P. falciparum*, la aparición de gametocitos se acompaña de la disminución de las formas esquizogónicas.

Cuando la hembra del mosquito del género *Anopheles* pica a personas portadoras ingiere gametocitos y en su estómago se termina la fase gametogónica del ciclo sexual, al reproducirse los ooquinetos; continua la fase esporogónica con la formación de ooquistes en la pared del estómago, los cuales liberan esporozoítos, que invaden las glándulas salivales y que infectan a un nuevo huésped vertebrado mediante la saliva del mosquito en el momento de la picadura (Figura 2) [22].

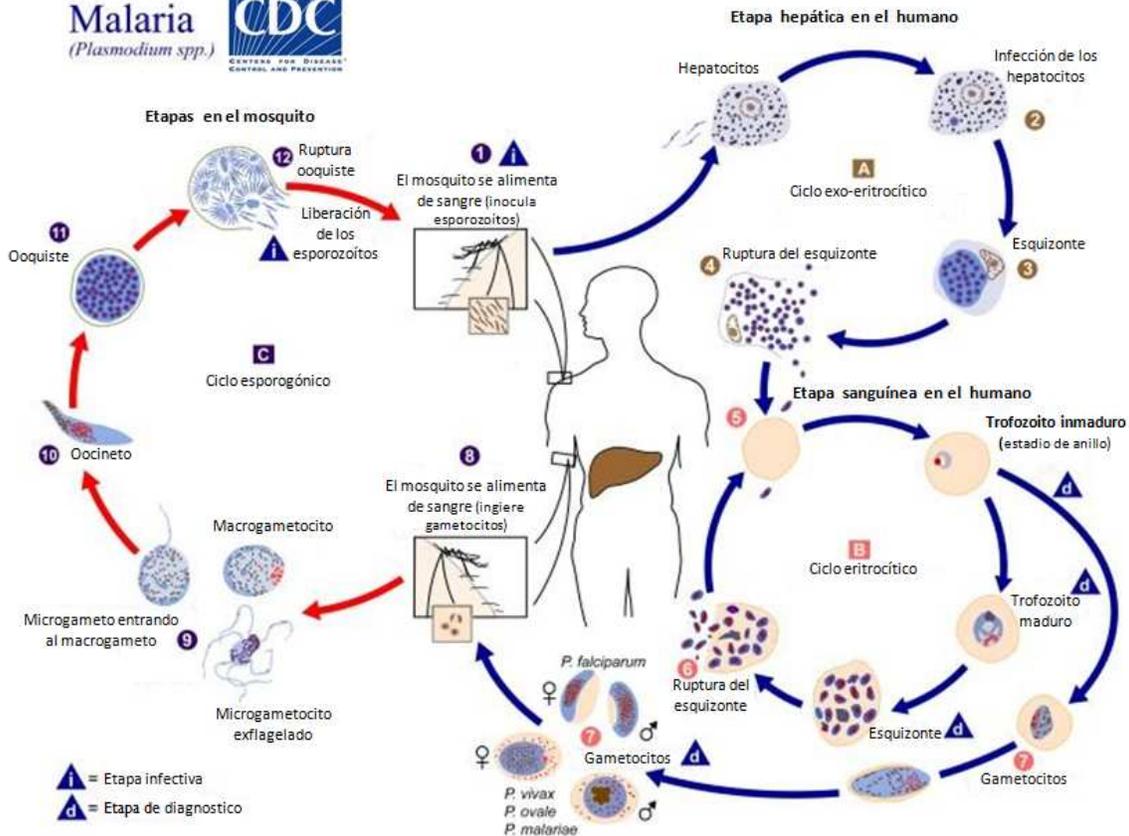


Figura 2. Ciclo biológico del *Plasmodium*. Al picar a un individuo, el mosquito infectado inocula los esporozoitos (1) estos parásitos se introducen a la circulación y se alojan en las células del parénquima hepático (2) donde el parásito se transforma en formas multinucleadas (3) que se rompen y liberan a los eritrocitos (4) para invadir a los eritrocitos (5) ahí se desarrollan los estadios de anillo trofozoitos y esquizontes y terminan con la ruptura del eritrocito y la liberación de los merozoitos (6) estos merozoitos infectan nuevos eritrocitos, después de un periodo de multiplicación asexual, una proporción de los merozoitos se diferencia en gametocitos de sexo femenino y masculino (7). El mosquito en una ingesta de sangre ingiere a los gametocitos (8) en el estómago del mosquito se lleva a cabo la fertilización (9), se forma el oocinetos (10) después el oocisto (11) y este se diferencia en el intestino para formar los esporozoitos (12). Modificado de <http://www.cdc.gov/>

3.4. Respuesta inmune en la malaria

Para generar inmunidad protectora contra malaria se requiere de los linfocitos T. Estas células desempeñan una función muy importante en el establecimiento de una respuesta inmune celular y en la síntesis de anticuerpos [3]. En la etapa eritrocítica de la infección con parásitos de *Plasmodium*, la inmunidad depende en gran medida de la citocina pro-inflamatoria $IFN-\gamma$ cuya síntesis se debe coordinar oportunamente por la respuesta inmune innata y la respuesta adaptativa que involucra a células: dendríticas, NK, T $CD8^+$, T cooperadoras $CD4^+$ y B [33, 34]. La participación de los linfocitos T $CD4^+$ es fundamental en el establecimiento de la inmunidad protectora contra el estadio hepático y eritrocítico del parásito, mientras que los linfocitos T $CD8^+$ se requieren en la fase hepática de la infección y los macrófagos, las células dendríticas y las células NK desempeñan un papel central durante el inicio de la enfermedad [35]. Es muy importante un balance entre la respuesta pro-inflamatoria y anti-inflamatoria, ya que esto es esencial para limitar el desarrollo del parásito y suprimir la patología como la malaria cerebral y la anemia severa

[36]. Los mecanismos involucrados en la inmunidad protectora y en la inmunopatología, se han estudiado intensamente, sin embargo el conocimiento sobre los mecanismos de las respuestas benéficas o perjudiciales en la etapa sanguínea de la malaria es muy limitado.

3.4.1. El papel de los macrófagos y las células dendríticas

Las células dendríticas son un grupo heterogéneo de células presentadoras de antígeno con un papel crucial tanto al inicio como en la regulación de la respuesta inmune en la infección con malaria. Las células dendríticas proveen un enlace crítico entre la respuesta inmune innata y la adaptativa [37-40], se especializan en procesar y presentar los antígenos a las células T, son las únicas células presentadoras de antígenos que pueden activar células T vírgenes [41], una de las propiedades más importantes es que son esenciales para disparar la respuesta inmune contra nuevos antígenos [41]. En los tejidos actúan como centinelas, atrapando y procesando a los antígenos [42], después de encontrarse con un daño, las células dendríticas maduran y migran a los órganos linfoides donde estimulan a las células T mediante la presentación de los antígenos [43, 44], de tal forma que influyen en la diferenciación de las células CD4⁺ en Th1 o Th2 [45, 46]. Se ha demostrado que en la infección con *Plasmodium* los mosquitos inyectan un gran número de esporozoitos en la dermis y no directamente a la circulación [47-50], donde comienza la interacción con las células dendríticas y con los macrófagos. Las células fagocíticas CD11b⁺ los eliminan en la piel [51]. Otra proporción de estos parásitos drena por la circulación linfática y se queda atrapada en el ganglio linfático proximal, donde interactúan con macrófagos y células dendríticas [51], se pueden asociar directa o indirectamente con células dendríticas convencionales CD11c⁺ [50], las cuales activan a las células T vírgenes para la producción de IL-2, INF- γ y TNF- α [52]. Muchos otros de estos parásitos los fagocitan las células de Kupffer que son los macrófagos del hígado y solo algunos logran infectar a los hepatocitos [51] (Figura 3).

Las células dendríticas procesan los antígenos para inducir la proliferación de clones de células T [53], son cruciales para el desarrollo de una respuesta protectora ya que activan a las células T CD8⁺ en la etapa pre-eritrocítica de la malaria [54], por otra parte, los mecanismos precisos del reconocimiento y el procesamiento de los eritrocitos infectados o merozoitos se conocen parcialmente. Las células dendríticas fagocitan a los eritrocitos infectados con *Plasmodium* y a los merozoitos [55], se ha descrito que también los macrófagos fagocitan *in vitro* [56-59], su actividad se puede mejorar con algunas fracciones del complemento y con la opsonización por los anticuerpos [57, 58], tanto las células dendríticas como los macrófagos son capaces de fagocitar glóbulos rojos infectados por *P. yoelii* [52, 60, 61] y *P. chabaudi* *in vitro* y presentar péptidos a las células T CD4⁺ [55]. Los tres tipos de células presentadoras de antígenos, células dendríticas, macrófagos y células B, se activan *in vivo* durante la infección con *P. yoelii* [62], las células CD11c⁺, los macrófagos y las células B son capaces de presentar péptidos de los merozoitos de *P. chabaudi* después de procesar a los glóbulos rojos parasitados [55, 63]. La fagocitosis de glóbulos rojos infectados o de merozoitos por las células dendríticas y los macrófagos explica cómo estas células son capaces de procesar y presentar los péptidos.

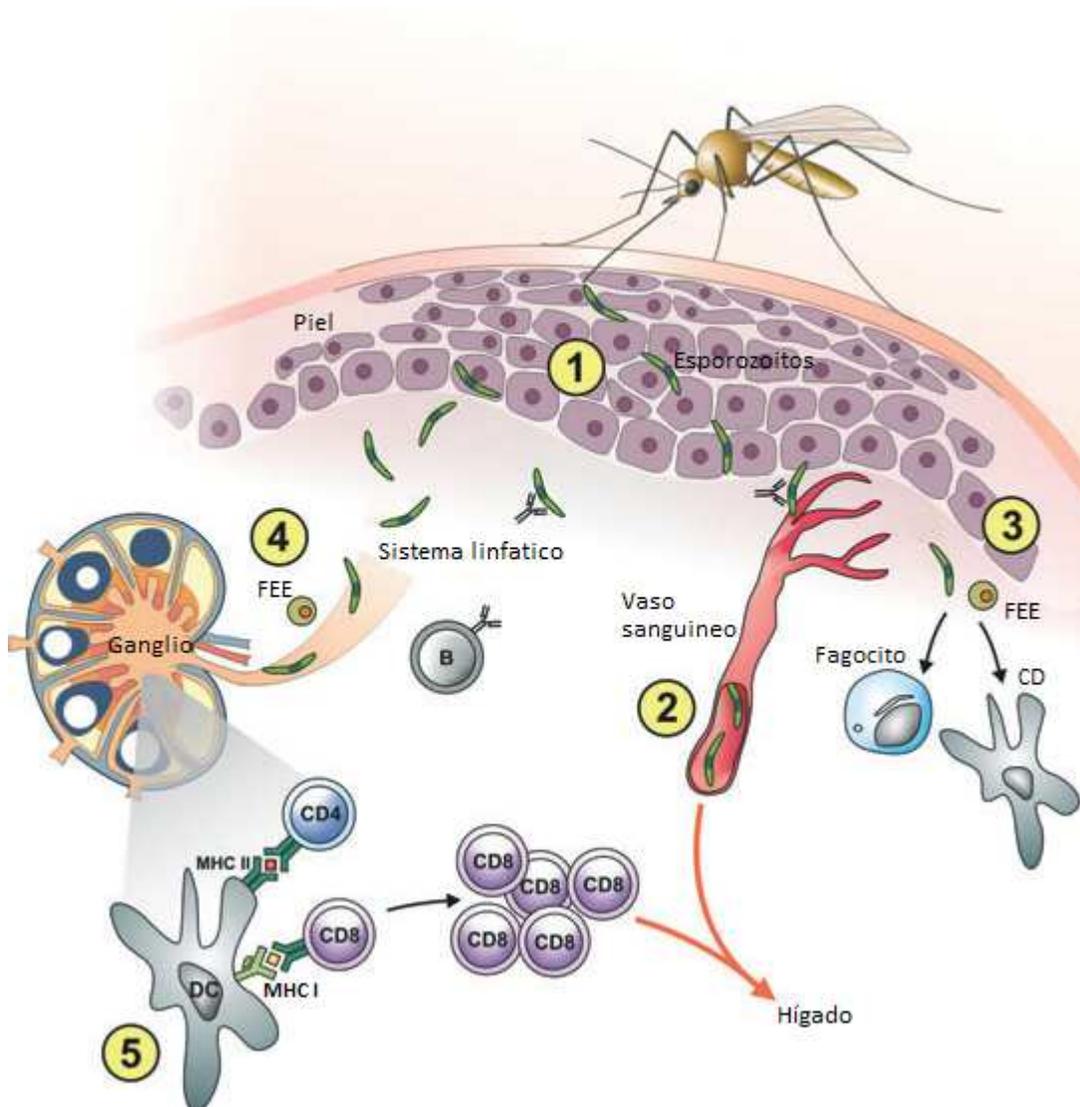


Figura 3. Interacción parásito-hospedero en la piel. El mosquito hembra del género *Anopheles* infectada inocula a los esporozoítos de *Plasmodium* (1). Los eporozoítos migran a través de las células de la dermis, entran al capilar sanguíneo y ahí se distribuyen rápidamente en el hígado a través de la circulación sanguínea (2). Algunos esporozoítos se inmovilizan en la piel antes de alcanzar la circulación y eventualmente los fagocitos los eliminan en la piel (3). El sistema linfático destruye a algunos esporozoítos en los ganglios linfáticos (4), lo que se torna en una fuente de antígenos que activan a las células T (5) [64].

3.4.2. La participación de las células CD4⁺ y CD8⁺

Las células T CD4⁺ pueden reconocer antígenos del parásito en un contexto de moléculas MHC clase II que portan las células presentadoras de antígeno profesionales y éstas células se dividen en dos subpoblaciones mayores, Th1 y Th2, con base en el patrón de citocinas que secretan después de la infección con *Plasmodium* [4] los distintos perfiles de citocinas que se expresan indican su función. Las células Th1 producen IL-2, IFN- γ , TNF- α , a través de estas moléculas se activan los macrófagos, mientras que las células Th2 producen: IL-4, IL-5, e IL-6, lo que proporciona cooperación con los linfocitos B para que sinteticen

anticuerpos, mientras que las células T reguladoras son importantes en la modulación de la respuesta inmune vía la producción de citocinas como IL-10 y TGF- β . Por lo tanto, las células Th1, las Th2 y las T reguladoras median cualitativamente distintas respuestas inmunológicas [4].

Las células CD8⁺ son las células citotóxicas capaces de inducir inmunidad contra estadios hepáticos de la infección causada por *Plasmodium* [65, 66].

Después de estar en contacto con las células presentadoras de antígeno los linfocitos T CD8⁺ se activan [67, 68]. Similar a la respuesta a otros agentes microbianos, los linfocitos T CD8⁺ pueden proliferar para generar poblaciones de memoria [69]. En general se creía que las células T CD8⁺ no pueden responder a los glóbulos rojos parasitados, pero recientemente se demostró en modelos murinos de malaria que en la etapa sanguínea de la infección se pueden generar respuestas específicas de células T CD8⁺ (citotóxicas) contra el parásito, por reacción cruzada de células presentadoras de antígeno [70, 71]. Por otra parte, se ha descrito que se presenta un aumento de la apoptosis de esplenocitos CD8⁺ después de la infección con *Plasmodium* lo que indica que estas células se estimulan durante la etapa eritrocítica de la infección, además estas células también producen IFN- γ y TNF- α [72] que son citocinas involucradas con la activación de macrófagos y por ende con la destrucción del parásito.

En soporte de la idea de que las células CD8⁺ se activan durante la fase temprana de la infección con *P. chabaudi* (día 4), se observó un marcado aumento de TNF- α a nivel de mRNA en las células CD8⁺ [72]. Adicionalmente, se ha demostrado la proliferación esplénica de linfocitos T CD8⁺ durante las fases sanguíneas de infección por *Plasmodium* [70, 71, 73].

Además, se ha demostrado que las células T CD8⁺ se activan durante la infección por *Plasmodium* en el estadio de sanguíneo [74]. Otros autores han sugerido que las células T CD8⁺ productoras de IFN- γ , perforina y granzima B se asocian con la inmunidad protectora contra la infección con *Plasmodium yoelii* 17XL en la etapa eritrocítica [73].

En conjunto, éstos resultados indican que las células T CD8⁺ se activan, proliferan y producen citocinas durante la fase sanguínea de la infección que causa *Plasmodium*.

3.4.3. La importancia de las células B

Las células B y los anticuerpos son necesarios para la eliminación del *Plasmodium* en la etapa eritrocítica de la infección. Los ratones que carecen de células B son incapaces de eliminar al *Plasmodium* ya que no se producen anticuerpos cuya función es eliminar a los parásitos durante las fases tardías de la infección [75-77]. La transferencia de suero inmune a ratones o a humanos previo a la infección con el *Plasmodium* puede disminuir o prevenir la infección en el hospedero [78, 79].

Los anticuerpos son importantes en la etapa eritrocítica de la enfermedad, sin embargo, la inmunidad sólo se desarrolla después de infecciones repetidas y se pierde sin una exposición continua al parásito. Los niveles de anticuerpos específicos se mantienen por un largo periodo de tiempo gracias a las células plasmáticas; que secretan anticuerpos. Aunque el tiempo de vida media de las células plasmáticas oscila entre los 3 y 5 días, los niveles de anticuerpos se pueden mantener por la proliferación y diferenciación continua de las células B que se activan con la exposición persistente del parásito [80, 81] o por estimulación policlonal [82-84].

En las poblaciones humanas expuestas a la malaria, los niveles de anticuerpos específicos para varios antígenos disminuyen rápidamente al final de la temporada de la transmisión [85-89]. Además, los niveles de anticuerpos específicos contra el *Plasmodium* disminuyen cuando las personas abandonan las regiones endémicas [90]. Estos datos contrastan con lo que se observa en ratones en los que las células B esplénicas *in vitro* son capaces de responder a los eritrocitos infectados después de 1 año de la infección con *P.chabaudi chabaudi* [91]. En conjunto, estos datos indican que la generación o mantenimiento de las células B de memoria y la larga duración de las células plasmáticas juega un papel importante en la infección por *Plasmodium*.

3.4.4. Las citocinas y su función en la malaria

Las citocinas son proteínas o glicoproteínas solubles que sintetizan los leucocitos y otros tipos de células, tienen actividad como mediadores citoquímicos en la comunicación entre células, no son moléculas efectoras por sí mismas. La mayoría se secretan, pero algunas se pueden expresar sobre la membrana celular. Las citocinas se unen a receptores específicos de la superficie celular de la célula diana; de este acoplamiento se traduce la señal y se activa la vía de los segundos mensajeros. Las citocinas tienen diferentes células diana y pueden estimular diferentes vías de señalización [5].

Se ha descrito que las citocinas pro-inflamatorias, especialmente la IL-12, el INF- γ y el TNF- α son esenciales para la protección contra malaria en la etapa eritrocítica; estas citocinas participan en la respuesta inmune innata y en la adaptativa [92, 93]. La resistencia a la malaria murina es absolutamente dependiente de las vías mediadas por el INF- γ [92]. El INF- γ y el TNF- α actúan sinérgicamente para optimizar la producción de óxido nítrico (NO) [94], que se ha asociado con la muerte del parásito [95]. El balance entre la respuesta inmune Th1 y Th2 así como la producción de citocinas pro- y anti-inflamatorias determinan la parasitemia, el grado de anemia, la severidad de la enfermedad clínica y la resolución de la infección por *Plasmodium* [96]. Los resultados experimentales en modelos murinos sugieren que para eliminar el parásito se requiere de una respuesta temprana tipo Th1, en la que se incrementan las concentraciones de INF- γ , seguido de una respuesta tipo Th2 donde aumenta la síntesis de IL-10, que es necesaria para completar la eliminación del parásito [97]. Se ha demostrado que la eliminación del parásito tiene relación con las concentraciones elevadas de IL-10 e INF- γ pero al mismo tiempo, la malaria severa también se ha asociado con una respuesta intensa tipo Th1 [98].

3.4.4.1. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)

Las complicaciones en la malaria se deben principalmente a la respuesta inmunitaria descontrolada del huésped hacia los antígenos del parásito, se ha descrito una correlación positiva entre la alta producción de TNF- α y la malaria severa [99]. También se ha demostrado que el TNF- α está involucrado en la muerte del parásito. A concentraciones fisiológicas, el TNF- α es antiparasitario, actúa sinérgicamente con el IFN- γ para inducir la producción de NO y otros radicales tóxicos involucrados en la muerte del parásito [100]. Por lo tanto, la resolución exitosa de la malaria y la evasión de los síntomas depende de alcanzar un nivel óptimo de TNF- α y otras citocinas inflamatorias.

3.4.4.2. El interferón gamma (INF- γ)

El INF- γ es un prototipo de citocina tipo Th1, induce la inmunidad mediada por células Th1, promueve la diferenciación de los linfocitos Th2, induce el cambio de clase de IgG a isotipos citofílicos y activa a los fagocitos [101].

Entre los linfocitos que sintetizan INF- γ como respuesta a la infección con *Plasmodium* se incluyen a las células: NK, T $\gamma\delta$, y T $\alpha\beta$. Las células T $\gamma\delta$ pueden reconocer antígenos de *Plasmodium* en el contexto MHC de clase II [102, 103] o clase I [104], inducen

proliferación y producción de INF- γ [103, 105, 106], las células NK y las células T $\gamma\delta$ pueden responder a los glóbulos rojos parasitados en ausencia de las células presentadoras de antígenos profesionales [107, 108]. Algunos autores sugieren que ésta respuesta depende de IL-2 [104, 109, 110], sin embargo, el receptor TCR $\gamma\delta$ también es capaz de reconocer antígenos no peptídicos particularmente fosfoantígenos, sin presentación del MHC. Las células NK sintetizan INF- γ en respuesta a los glóbulos rojos parasitados *in vitro*, este fenómeno depende de IL-12 e IL-18 [111], aunque los mecanismos de activación difieren entre éstas subclases de linfocitos y su magnitud varia según la etapa del parásito, la delimitación de estas vías y su contribución a la producción de INF- γ es un paso muy importante para la comprensión de la respuesta inmune en malaria [112, 113].

El INF- γ también media la respuesta inmune contra bacterias intracelulares y algunos virus [114-116], esta involucrado en la protección contra protozoarios parásitos intra y extra celulares como *Leishmania* spp. [117], *Trypanosoma cruzi* [118] y *Toxoplasma gondii* [119]. En la infección con *Plasmodium* el INF- γ constituye un componente importante de la inmunidad contra ambas etapas de la infección ya que se genera tanto en la respuesta inmune innata como en la adaptativa (Figura 4).

Efectos del INF- γ en la respuesta inmune innata y adaptativa contra malaria

Función	Referencias
Repuesta inmune innata	
Incrementa la producción de especies reactivas del nitrógeno (iNOS) en los hepatocitos contra los parásitos intrahepáticos.	[120-122]
Incrementa la producción de especies reactivas del nitrógeno (iNOS) y del oxígeno (H ₂ O ₂) por los monocitos contra parásitos durante la etapa eritrocítica.	[123-125]
Favorece la fagocitosis de los merozoítos y de los glóbulos rojos infectados.	[56, 124, 126, 127]
Inhibe la infección al mosquito por los gametocitos	[128]
Interacción entre los sistemas innatos y adaptativos	
Blanco de las respuestas proinflamatorias de los TLR's	[129-132]
Incrementa la expresión de moléculas del MHC clase I y II	[133]
Mejora la respuesta de los anticuerpos contra la etapa eritrocítica	[134]
Respuesta inmune adaptativa	
Incrementa la relación entre células Th1/Th2	[135]
Induce el cambio de clase de IgG a isotipos citofílicos	[136]
Induce y mejora la respuesta celular de memoria	[137, 138]

Figura 4. Efectos del INF- γ en la respuesta inmune innata y adaptativa contra la malaria.

La evidencia más convincente del papel protector del IFN- γ contra el *Plasmodium* es que las concentraciones de INF- γ elevadas se asocian con una disminución de la multiplicación asexual del parásito, aunque en todos los casos se presentan parasitemias [139]. El IFN- γ , es importante en el control del parásito en la etapa sanguínea [140, 141], en apoyo a esta idea se demostró que los ratones knockout para IFN- γ ^{-/-} [125, 142, 143] o para su receptor IFN- γ R^{-/-} [92], no controlan la infección en la etapa eritrocítica y sucumben por hiperparasitemia. Lo mismo ocurre en animales inmunocompetentes, cuando el IFN- γ se neutraliza con anticuerpos monoclonales durante la infección [144-146].

La malaria clínica se caracteriza por respuestas proinflamatorias intensas, en particular la producción de IL-1 β , IL-6, TNF- α y pirógenos endógenos, que inducen fiebre alta. La sobreproducción de estas citocinas también se relaciona con la inmunopatología, en la malaria cerebral y con la producción de IFN- γ [147-151].

3.4.4.3. El factor transformador del crecimiento beta (TGF- β)

Diversas estirpes celulares sintetizan al TGF- β entre las cuales están los macrófagos y las células T [152], esta citocina tiene propiedades pro- y anti-inflamatorias, dependiendo de su entorno y de su concentración [153].

El TGF- β regula negativamente la patogénesis causada por citocinas pro-inflamatorias, suprime la producción de TNF- α y del óxido nítrico en los macrófagos [154, 155]. Además, suprime la producción de IFN- γ y TNF- α en las células NK [156]. Los ratones infectados con *P. berghei* tratados con un anticuerpo que neutraliza al TGF- β presentaron mayor parasitemia y tuvieron una menor sobrevida que los ratones control, además, la neutralización de TGF- β puede convertir a una cepa no letal en una infección letal [157].

3.4.4.4. Interleucina 10 (IL-10)

La IL-10 es una citocina anti-inflamatoria, es importante en la regulación de la respuesta inmune del hospedero, así como lo es el TGF- β . La mayor fuente de la IL-10 son las subpoblaciones de células T incluidas las células Th1, las células Th2, las células Tr1 (CD25⁺Foxp3⁻) y las células T reguladoras (Treg) (CD25⁺Foxp3⁺). Originalmente se creía que la principal fuente de IL-10 eran las células Th2. Ahora sabemos que las células Tr1; una subpoblación de células CD4⁺ producen niveles altos de IL-10 y éstas células se desarrollan a partir de células T vírgenes bajo la influencia de IL-27 [158-160] y el TGF- β induce su expresión [161], por lo tanto, la fuente de IL-10 no son solo las subpoblaciones de las células T, también lo son diferentes estirpes de leucocitos [162-165].

Aparentemente, los monocitos y los macrófagos son las principales células que inhiben los efectos de la IL-10 [166] y ésta a su vez inhibe la liberación de mediadores pro-inflamatorios de dichas células, por lo tanto inhibe la secreción INF- γ [167, 168] y la presentación del antígeno por parte de los monocitos y los macrófagos. Por otra parte, la IL-10 inhibe la síntesis de IL-12 en las células presentadoras de antígeno y reduce la producción de INF- γ en las células T [169].

De tal forma que los niveles altos de IL-10 y de TGF- β se asocian con la inhibición de la respuesta pro-inflamatoria, lo que origina parasitemias altas, anemia severa y la muerte en ratones infectados con *Plasmodium*. Se ha descrito que la deficiencia de IL-10 [170, 171], o el bloqueo de su receptor [172] regula la parasitemia durante la infección por *Plasmodium*, lo que prolonga la supervivencia de los ratones. Los ratones deficientes de IL-10 disminuyen la replicación del parásito en comparación con los ratones silvestres [171]. Por otro lado, se ha descrito que la IL-10 protege contra la malaria, ya que los niveles bajos de IL-10 incrementan la síntesis de TNF- α e INF- γ , lo que podría asociarse con anemia grave, debido a la fagocitosis de glóbulos rojos no infectados y a la diseritropoyesis [173] y aunque los ratones deficientes de IL-10 desarrollan menores niveles de parasitemia que los ratones silvestres en la infección por *Plasmodium*, también desarrollan patología hepática [171, 174, 175] y cerebral [176, 177]. La inflamación que se asocia a la muerte del parásito, se incrementa en los ratones deficientes de IL-10. La IL-10 se requiere para suprimir la patología hepática y cerebral en el huésped durante la infección.

3.5. Hormonas sexuales e inmunidad

Existe una evidente interrelación entre el sistema endócrino y el sistema inmunológico. Un ejemplo de esto es el efecto que las hormonas sexuales ejercen sobre las distintas poblaciones de leucocitos (linfocitos T y B, células NK, granulocitos y macrófagos), así como sobre la síntesis de citocinas y anticuerpos [5]. Por ejemplo, los linfocitos T expresan receptores para testosterona y la interacción del receptor y su ligando puede inducirles apoptosis [178], probablemente por eso los hombres tienen un menor porcentaje de linfocitos T que las mujeres, aunque el número de linfocitos totales es igual en ambos sexos [179]. La testosterona también inhibe la producción de IgG e IgM [180] y de las citocinas tipo Th2, en particular la IL-4, no se han descrito diferencias en las concentraciones de otras citocinas tipo Th2 como la IL-10 entre hombres y mujeres fértiles o postmenopáusicas, ni su efecto “*in vitro*” [181], lo que sugiere que los andrógenos inducen la producción de citocinas de tipo Th1 [182].

Por otro lado, en los linfocitos T reguladores y en los T citotóxicos se detectaron receptores para estradiol y se observó que esta hormona potencia la función anti-inflamatoria de los

linfocitos T reguladores. Asimismo, se ha comprobado que los estrógenos aumentan el número de progenitores de Linfocitos B en la médula ósea y en ratones. Los estrógenos protegen a estos progenitores de la apoptosis, e incrementan la sobrevivencia de las células B esplénicas. Las concentraciones altas de estrógenos también aumentan la producción de anticuerpos [183]. Por otro lado, se ha demostrado que los macrófagos expresan el receptor alfa de estrógenos (ER α) mientras que los monocitos expresan el receptor beta (ER β), el estradiol es otra hormona esteroide que en concentraciones fisiológicas aumenta el número de macrófagos circulantes, puesto que produce un aumento en el número de colonias granulocítico-macrofágicas en la médula ósea [184]. Además, se ha descrito que los macrófagos peritoneales tratados con distintas dosis de 17 β -estradiol aumentan su capacidad citotóxica, producen más TNF- α y cambian de morfología [185], también se demostró que las concentraciones altas de estradiol y progesterona (mayores a 10⁻⁷ M) inhiben la producción de IL-1 de los macrófagos, mientras que las concentraciones bajas de ambas hormonas (menores a 10⁻⁹ M) resultan estimulantes [186]. Los estrógenos favorecen la degranulación y aumentan tanto la actividad de la enzima óxido nítrico sintetasa como la actividad de mieloperoxidasa en estas células, por lo cual aumentaría su actividad microbicida [187, 188].

Los estrógenos inducen disminución tanto del número como de la actividad de las células NK aunque no disminuyen la producción de citocinas [189, 190]. Sin embargo, otros investigadores detectaron diferencias en las citocinas de acuerdo a la fase del ciclo menstrual [191], observaron que en la fase luteal (días 6-9 post pico de LH) aumentaba el porcentaje de los polimorfonucleares, monocitos y linfocitos, así como también los niveles de IL-4 lo que originó un aumento de citocinas tipo Th2, probablemente por el aumento de las concentraciones de estradiol y progesterona [191].

En cuanto a las citocinas pro-inflamatorias como la IL-1 y el TNF- α , se ha descrito que en las mujeres aumentan sus niveles durante la fase luteal [192], además el estradiol inhibe la síntesis de la IL-2 y de su receptor [193]. Otros investigadores han descrito que el estradiol también inhibe la síntesis de INF- γ , sin embargo, existe controversia en esta información [181, 194].

No existen diferencias en las concentraciones de citocinas de tipo Th1 (INF- γ , IL-2), ni citocinas de tipo Th2 (IL-4 e IL-10) entre hombres y mujeres, ni tampoco durante las distintas fases del ciclo menstrual [195]. No obstante, la relación INF- γ /IL-4, es el doble que en las mujeres tanto en la fase folicular como en la fase luteal, lo que sugiere que las mujeres presentan un perfil de citocinas tipo Th2, lo que implica una mayor síntesis de anticuerpos [195].

3.5.1. *Plasmodium* y las hormonas sexuales

En el humano, la incidencia de la infección por *Plasmodium* suele ser similar entre ambos sexos [6], sin embargo, las diferencias en la intensidad de la infección se registran en el grado de parasitemia, que es más alta en los hombres que en las mujeres [6, 7, 196]. La observación de que la parasitemia por *P. falciparum* aumenta en la pubertad de los hombres, pero no en las mujeres, sugiere que el tipo de esteroide sexual circulante puede influir en este resultado [7].

En roedores infectados con *Plasmodium*, los machos son más propensos a morir que las hembras [8, 10, 11, 197, 198]. La mortalidad en ratones machos infectados con *P. chabaudi* o *P. berghei* se reduce con la castración, mientras que la administración exógena de testosterona la aumenta, [10, 12]. Además, la inyección de dosis altas de testosterona en ratones hembras disminuye la producción de anticuerpos, el número de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II de las células en el bazo y la expresión de genes de respuesta al *Plasmodium* en el hígado, pero no afecta la producción de citocinas [8, 199]. Por otra parte, los receptores para esteroides sexuales se expresan en diferentes células del tejido linfoide, así como en los linfocitos circulantes, en los macrófagos y en las células dendríticas [200-203]. La unión de los esteroides sexuales a sus respectivos receptores influye directamente en las vías de señalización celular, incluyendo el factor nuclear- κ B (NF- κ B), lo que resulta en la producción diferencial de citocinas y quimiocinas por las células del sistema inmune [204]. Considerando que la señalización celular a través de NF- κ B induce la expresión de genes de la respuesta inmune e inflamatoria, la señalización de las hormonas esteroides podrían antagonizar la respuesta mediada por NF- κ B dando lugar a la comunicación entre los sistemas endocrino e inmunológico [204].

Se ha descrito que tanto en roedores como en humanos las respuestas inflamatorias son necesarias en el desarrollo de la inmunidad protectora, pero deben regularse para prevenir la patología [35]. El momento y el cambio de la respuesta Th1 a Th2 durante el curso de la infección por *Plasmodium* se modula por las respuestas reguladoras, incluida la producción del factor transformador de crecimiento β (TGF- β) e IL-10 [172, 205]. La mayoría de los estudios que caracterizan la respuesta inmunitaria protectora contra la infección de la malaria en la etapa eritrocítica han utilizado ratones hembras. El desarrollo y el momento de la respuesta inmune protectora durante la infección con *Plasmodium* spp difiere entre hombres y mujeres por efecto de las hormonas sexuales, sin embargo se desconocen los mecanismos que modulan este dimorfismo.

3.6. Cepa CBA/Ca

A partir de un cruce de una hembra Bagg albino y un macho DBA por Strong en 1920. La cepa CBA se seleccionó para una baja incidencia de tumores mamarios. Distribuida a través del Laboratorio Jackson a Haldane y Gruneberg en 1932, para Carter (CBA/Ca) en 1947. La subcepa CBA/Ca es la más utilizada en la investigación británica. La ausencia del tercer molar inferior en un 18%, pocas variantes esqueléticas, desarrollan algunos tumores mamarios en los criadores.



Figura 5. Cepa CBA/Ca.

3.7. Técnicas y fundamentos

3.7.1. PCR tradicional

La reacción en cadena de la polimerasa, cuyas iniciales en inglés son PCR (“Polymerase chain reaction”), es una técnica que desarrollo Kary Mullis a mediados de los años 80. Con esta metodología se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico [206]. El método utiliza un par de oligonucleótidos sintéticos también conocidos como primers, iniciadores o cebadores, cada uno hibrida a una hebra del ADN blanco de doble cadena, la ADN polimerasa reconoce el híbrido que actúa como un sustrato y la enzima , sintetiza una hebra complementaria mediante la adición secuencial de desoxiribonucleótidos (Figura 6) [206].

Teóricamente, en condiciones óptimas el nivel de amplificación del ADN en la PCR se duplica con cada ciclo; sin embargo en la práctica, después de determinado número de ciclos, la amplificación se detiene gradualmente. Entra primero a una fase lineal y luego a una estacionaria, a la que se denomina fase de “meseta”, se debe al agotamiento de la actividad enzimática y a la insuficiencia para llevar a cabo la extensión del número masivo de complejos ADN blanco-oligonucleótidos, presentes en los ciclos que anteceden a este

fenómeno. [207, 208]. Las temperaturas de desnaturalización varían de 92 a 98°C y las de extensión (70 a 74°C) generalmente son estándares para todas las reacciones. La temperatura que tiene el efecto más crítico en la especificidad es la de alineación, la cual está determinada principalmente por la temperatura media de fusión (TM) de los oligonucleótidos [208].

Los oligonucleótidos se aparean a una determinada temperatura de alineación por complementariedad al ADN blanco. El alto grado de complementariedad entre las bases nitrogenadas de los oligonucleótidos y del ADN blanco permite utilizar altas temperaturas de alineación, lo que favorece la especificidad de la reacción [207, 208].

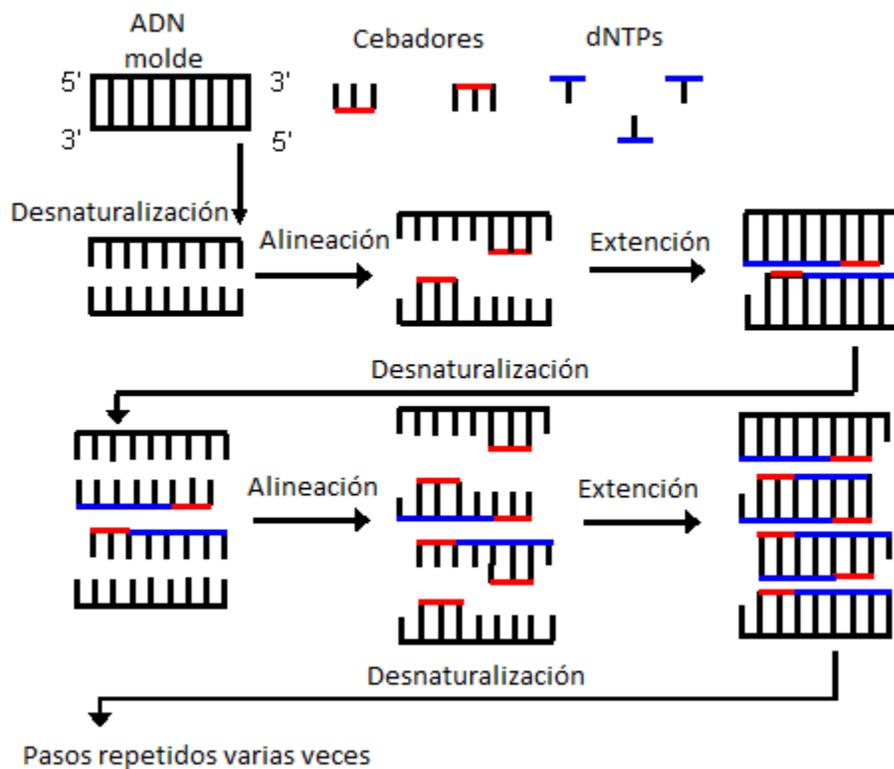


Figura 6. Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa. La mezcla de reacción contiene: la secuencia de ADN que se quiere amplificar, dos oligonucleótidos sintéticos o primers marcados en rojo que servirán como cebadores, una ADN polimerasa termoestable (Taq) y los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato -dATP, dGTP, dCTP y dTTP- marcados con azul. La mezcla de reacción se somete a ciclos sucesivos, el primer paso es la desnaturalización, se realiza por calentamiento de la mezcla a 95°C, lo que origina que se separen las dos cadenas del ADN molde. Después se reduce la temperatura para permitir el apareamiento de las bases de ambos cebadores en el ADN complementario (temperatura de alineación). Posteriormente, la cadena nueva se extiende partir del extremo 3' de los cebadores gracias a la enzima Taq polimerasa para ello se incrementa la temperatura a 72°C y esto finaliza un ciclo, cuando termina cada ciclo, la cantidad de ADN molde aumenta al doble.

3.7.2. PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real es un método revolucionario basado en la PCR tradicional. Esta variación permite amplificar secuencias específicas de ADN más de un billón de veces. Higuchi y colaboradores consiguieron en el año 1992 la primera demostración de la PCR en tiempo real, la cual representa otro salto tecnológico importante ya que ha abierto la posibilidad de nuevas y poderosas aplicaciones para la investigación a nivel mundial. Esta reacción es un proceso de amplificación por PCR y detección simultánea del ADN amplificado en “tiempo real”, pudiendo realizarse dicha detección por medio de diferentes químicas [209].

La PCR en tiempo real generalmente involucra el empleo de sondas fluorogénicas que “iluminan o fluorescen” mostrando la cantidad de ADN presente en cada ciclo de amplificación.

Por otra parte, el ADN complementario (ADNc) generado bajo condiciones adecuadas a partir de la retrotranscripción de un templado de ARN, se puede utilizar también como ADN blanco en la PCR en tiempo real. Durante la amplificación, la rapidez con que la señal fluorescente alcanza el nivel umbral (Threshold level), se correlaciona con la cantidad inicial de ADN blanco, permitiendo de esta manera poder cuantificarlo. El número de ciclos necesarios para que la señal fluorescente alcance el nivel umbral, se conoce como Threshold cycle (C_T) y es el parámetro en el cual se fundamenta la cuantificación. A mayor C_T , menor será la cantidad de ADN blanco o templado inicial. La Figura 7 muestra curvas típicas de amplificación, donde se grafica en el eje de las ordenadas el aumento de fluorescencia producido durante el transcurso de la reacción (7a: graficado en escala lineal y 7b: en escala logarítmica) y en el eje de las abscisas, cada ciclo de la PCR. La línea horizontal de color morado indica el valor umbral de fluorescencia a partir del cual se definen los C_T , se fija este umbral en la fase exponencial de la reacción.

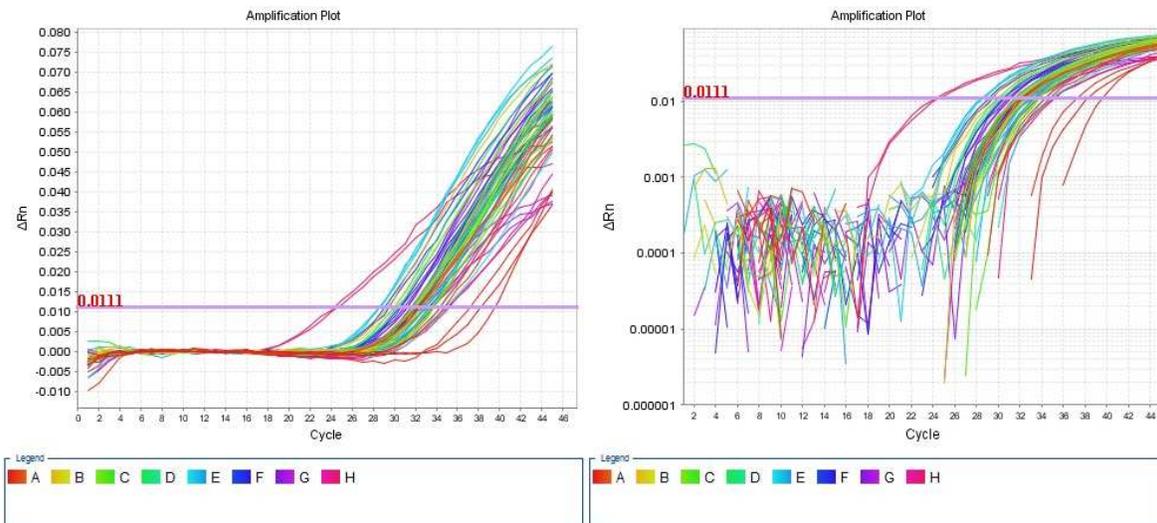


Figura 7. Curvas típicas de amplificación de la PCR en tiempo real. La figura 7a panel izquierdo es una gráfica en escala lineal y la figura 7b panel derecho es una gráfica en escala logarítmica.

Una de las ventajas fundamentales de la PCR en tiempo real en relación a la PCR tradicional de punto final, es que en la primera las mediciones se realizan en la etapa exponencial de la reacción donde en teoría, por cada ciclo de amplificación se acumula el doble de producto respecto al ciclo anterior, asumiendo una eficiencia del 100%. Por el contrario, en la PCR de punto final la detección del producto de amplificación se realiza en la fase de meseta de la reacción, donde la misma ya se detuvo y hay degradación de producto. Por lo tanto, medidas realizadas en esta fase, no ofrecen resultados muy confiables en cuanto a la cantidad inicial de templado de la muestra (Figura 8).

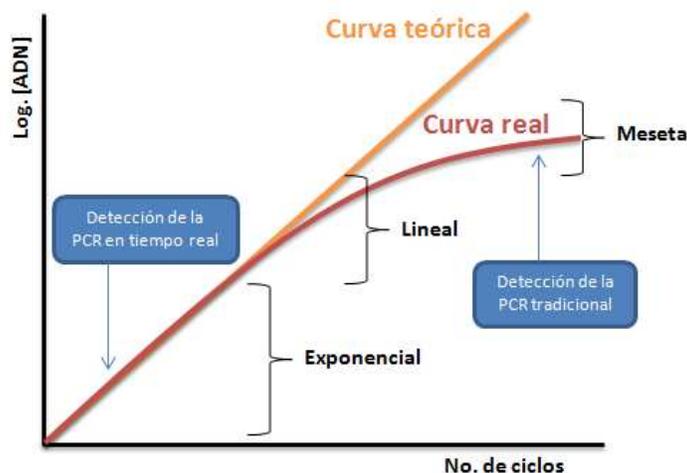


Figura 8. Grafica de la reacción en cadena de la polimerasa. Etapas de la reacción de amplificación [209].

Otras ventajas de la PCR en tiempo real son:

- El sistema de detección evita la manipulación de amplificado, lo que minimiza el grave problema de contaminaciones con el mismo.
- Rapidez en la obtención de resultados.
- Rango dinámico amplio para la cuantificación.
- Permite determinar la eficiencia de la reacción.
- Genera una variabilidad mínima en los resultados, lo que permite una cuantificación confiable y precisa.

La habilidad que posee la PCR en tiempo real para monitorear el progreso de la amplificación del ADN blanco en tiempo real, se logra mediante diferentes químicas e instrumentación específicas. Generalmente, las químicas consisten en diferentes compuestos fluorescentes o fluoróforos que pueden proporcionar una detección de tipo no específica (colorantes fluorescentes) o específica (cebadores y sondas fluorescentes).

Dentro de los colorantes fluorescentes, el más utilizado es el SYBR Green I® que se une al ADN doble hebra de manera inespecífica, esta es su principal desventaja ya que se une independientemente de la secuencia del ADN, por lo que puede generar resultados falsos positivos al detectar ADN espurios como son los dímeros de cebadores de la reacción. Una forma de asegurar en estos casos la especificidad de la detección, es analizar las curvas de disociación (Figura 9). La presencia de dos o más picos, sugiere que se ha obtenido más de un amplicón y que el proceso de amplificación no fue específico para el ADN blanco. Por otra parte, están los sistemas de señalización basados en cebadores fluorescentes. Estos varían considerablemente desde el más simple llamado LUX™ primers (Light Upon Extension) a los más complejos como Scorpion™ primers. Ambos tipos de cebadores poseen en solución, una secuencia corta auto-complementaria que hace que los mismos estén “apagados” (quenched) y no emitan fluorescencia. Cuando se produce la hibridación del cebador al ADN blanco y su estructura se despliega, se observa un incremento importante en la fluorescencia, el cual es medido justamente durante esta etapa [210].

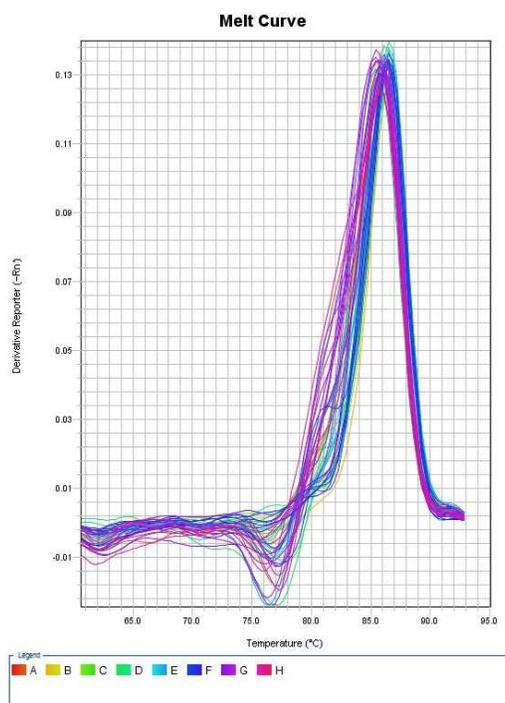


Figura 9. Curvas de disociación. Las muestras se realizaron por triplicado, tres líneas del mismo color corresponden a un triplicado, al observar solo un pico en la grafica significa que la amplificación fue solo del producto deseado, es decir la amplificación fue específica.

La cuantificación relativa se utiliza para analizar cambios en la expresión de un gen en una muestra dada en relación a un gen constitutivo, (esos genes generalmente no sufren cambios de expresión bajo las condiciones experimentales, por lo que sirven como estándares internos) a otra muestra de referencia, por ejemplo en respuesta a un tratamiento. Esas muestras de referencia contienen genes invariables, llamados constitutivos, los cuales normalmente no sufren cambios en su expresión bajo las condiciones experimentales, sirviendo por lo tanto como estándares internos [211].

3.7.3. Concentración de hemoglobina.

La hemoglobina, es el componente principal de los glóbulos rojos, es una proteína conjugada que sirve de vehículo para el transporte de oxígeno y de CO₂. Totalmente saturada, contiene alrededor de 1.34mL de oxígeno por gramo. La masa de eritrocitos de un adulto contiene unos 600g de hemoglobina, capaz de trasportar 800mL de oxígeno. La anemia, es una disminución de la concentración de hemoglobina por debajo de lo normal, constituye una alteración frecuente y complica otras enfermedades como la malaria. La concentración de hemoglobina se expresa en gramos por 100mL de sangre o gramos por decilitro (g/dL). De las formas de la hemoglobina que están adaptadas a la fotometría, la

cianometahemoglobina es la que posee las ventajas más grandes. Todas las formas de la hemoglobina que pueden encontrarse en la sangre (oxihemoglobina, hemoglobina reducida, carboxihemoglobina y metahemoglobina, pero no sulfametahemoglobina) se convierten íntegramente en cianometahemoglobina por la adición del reactivo de Drabkin.

Principio. Se emplea una solución de ferricianuro y cianuro potásico (reactivo de Drabkin). El ferricianuro convierte el hierro ferroso de la hemoglobina en férrico para formar metahemoglobina, que se combina con el cianuro potásico para formar cianometahemoglobina, [212] este compuesto es estable y puede cuantificarse espectrofotométricamente a 540nm.

4. Planteamiento del problema

La malaria o paludismo es la enfermedad infecciosa con mayor mortalidad en el mundo por lo que constituye un problema de salud mundial, además afecta el bienestar económico de millones de personas dado que el 40% de la población mundial tiene riesgo de contraerla. Actualmente, no existe una vacuna efectiva y los medicamentos antipalúdicos son la única terapia para la enfermedad [140].

Los esfuerzos por eliminar la malaria han sido intensos en muchas partes del mundo, sin embargo su erradicación se ha dificultado debido a que el parásito ha desarrollado resistencia a prácticamente todos los medicamentos antimaláricos [140], el mosquito vector ha adquirido resistencia a los insecticidas [213], además la enorme variabilidad antigénica del parásito así como su complejo ciclo de vida dificultan el establecimiento de una respuesta inmune eficaz contra el parásito [19]. A pesar de la intensa investigación que se ha desarrollado durante décadas, se conoce poco sobre la inmunidad contra el *Plasmodium* [214].

Los linfocitos T CD4⁺ son los encargados de organizar una respuesta inmune apropiada contra un reto antigénico particularmente por una polarización de la respuesta inmune [215]. Las 2 principales subclases de linfocitos T CD4⁺ generan respuestas tipo Th1 y Th2 que poseen diferentes patrones de producción de citocinas y como consecuencia juegan diferentes papeles durante la respuesta inmune contra *Plasmodium* [215]. Se requiere de una respuesta tipo Th1 o proinflamatoria para reclutar y activar a las células encargadas de eliminar al parásito [3], pero también se requiere generar una respuesta tipo Th2 antiinflamatoria que regule a la respuesta tipo Th1 y que genere anticuerpos para eliminar completamente al *Plasmodium* [3] y además aceleren una respuesta inmune secundaria.

Sin embargo, cuando se carece de la regulación de ambas respuestas se pueden generar patologías tan graves que pueden conducir a la muerte.

Por otro lado, la determinación del genotipo sexual en la concepción, seguida por el desarrollo fisiológico y endocrinológico provoca múltiples y complejas diferencias entre machos y hembras en muchas especies sexualmente dimórficas. Las diferencias se basan en la producción, secreción y concentraciones circulantes de estrógenos, progesterona y testosterona [215]. Tanto en las mujeres como en las hembras de otras especies, los estrógenos y la progesterona provocan que predomine una respuesta tipo Th2 [5], lo cual resultaría beneficioso para la gestación, pero al mismo tiempo favorecería la aparición de enfermedades autoinmunes. Contrariamente, la testosterona provoca que en los machos predomine la respuesta inmune tipo Th1 [5].

Los machos de distintas especies son más susceptibles que las hembras a muchas enfermedades causadas por protozoarios, diversos estudios de campo y laboratorio han relacionado esta susceptibilidad con la circulación de hormonas sexuales [216].

El *Plasmodium* es un protozoario que causa dimorfismo sexual en sus hospederos. La incidencia de la malaria en los humanos es similar en ambos sexos. Sin embargo, los hombres tienden a tener mayor mortalidad y patologías más severas que las mujeres, la observación de que la infección con *P. falciparum* (el plasmodio más virulento para el humano) se intensifica en la pubertad en los hombres pero no en las mujeres sugiere que la circulación de hormonas sexuales interfiere en este resultado, por lo que es de suma importancia entender los mecanismos de la respuesta inmune en el humano para diseñar estrategias eficientes para el control del parásito. El estudio de los mecanismos de respuesta inmune en el humano, en condiciones experimentales bien definidas está muy limitado, debido tanto a razones éticas como técnicas. Sin embargo, se pueden analizar críticamente utilizando modelos murinos de la enfermedad [26], lo que ha contribuido a entender parcialmente los mecanismos de inmunidad, además los sistemas inmunes del humano y del ratón son sumamente parecidos y se cuenta con la secuenciación de prácticamente todos los genes del ratón. La castración en ratones machos reduce la mortalidad, mientras que la administración exógena de testosterona la incrementa después de la infección con *P. chabaudi* [216]. Los ratones gonadectomizados, inyectados con testosterona e infectados con *Plasmodium* y disminuyen el número de las subpoblaciones de leucocitos con respecto a los ratones gonadectomizados infectados que no se les administró de testosterona, lo que sugiere que la testosterona fue responsable de la supresión de la producción de leucocitos y del sistema inmune [12]. Finalmente, la infección con *P. chabaudi* en ratones machos y hembras gonadectomizados e intactos permite que los machos intactos desarrollen menor sobrevivencia y mayor pérdida de peso en

comparación con los demás grupos durante la infección, lo que sugiere que las hormonas sexuales masculinas afectan este resultado. Por otro lado, las hembras intactas presentaron mayor supervivencia, menor pérdida de peso y mayores concentraciones de hemoglobina, lo que sugiere que las hormonas sexuales femeninas durante la infección con *P. chabaudi* modulan positivamente la respuesta inmune contra el parásito [216].

Por lo anterior, es probable que las hormonas sexuales influyan en la expresión de genes involucrados en la respuesta inmune. Un hallazgo interesante es que las ratonas hembras intactas expresaron mayores concentraciones de ARNm que codifica para INF- γ que las hembras gonadectomizadas [216]. Sin embargo, no se conocen con precisión los mecanismos de la respuesta inmune que se modifican por la influencia de los esteroides sexuales durante la malaria. Entender esos mecanismos permitiría desarrollar diferentes estrategias que lleven a controlar al *Plasmodium* con mayor eficacia.

Finalmente, es sumamente importante estudiar como las hormonas modifican la respuesta inmune, porque cada vez existen más mujeres que utilizan terapias de remplazo hormonal, así como también se ha incrementado notablemente el uso de anticonceptivos, además que cotidianamente, ingerimos hormonas porque los alimentos que consumimos de origen animal o vegetal las contienen. Todo este consumo y administración de hormonas sexuales podría modificar profundamente la respuesta inmune contra patógenos, no únicamente parásitos, también virus y bacterias, pero importantemente podría modificar la efectividad de las vacunas que ya funcionaban adecuadamente.

En este trabajo, analizamos el impacto de la gonadectomía (que reduce importantemente la fuente de esteroides sexuales en machos y hembras), sobre la patología medida como: parasitemia, pérdida de peso y anemia, asimismo evaluamos el efecto de la gonadectomía sobre la supervivencia y expresión de genes de citocinas pro-inflamatorias como IFN- γ , TNF- α y de citocinas anti-inflamatorias como TGF- β e IL-10, que son moléculas importantes en la respuesta inmune celular contra el plasmodio. El entender de manera más profunda los mecanismos de cómo las hormonas sexuales impactan a la respuesta inmune ayudará a mejorar la efectividad del tratamiento contra la malaria.

5. Hipótesis

Si las hormonas sexuales están involucradas en la respuesta inmune contra la malaria, entonces la gonadectomía modificará la sobrevida, la pérdida de peso, la parasitemia, la concentración de hemoglobina y la expresión de citocinas en los ratones infectados con *P. berghei* ANKA.

6. Objetivo general

Estudiar los efectos de la gonadectomía en la respuesta inmune contra *Plasmodium berghei* ANKA.

6.1. Objetivos particulares

- Estudiar el efecto de la gonadectomía sobre la pérdida de peso y la sobrevivencia en ratones infectados con *P. berghei* ANKA.
- Evaluar el efecto de la gonadectomía sobre la parasitemia y la concentración de hemoglobina en ratones infectados con *P. berghei* ANKA.
- Cuantificar el efecto de la gonadectomía en la expresión de citocinas (IFN- γ , TNF- α , TGF- β e IL-10) en ratones infectados con *P. berghei* ANKA.

7. Diseño experimental

Se utilizaron 6 grupos de 5 ratones CBA/Ca cada uno, 3 de machos y 3 de hembras de 5-6 semanas de edad que se encontraban en desarrollo prepuberal [217], con un peso de 18-20 gramos a los que se les extirparon las gónadas (Gx), como controles de la cirugía se utilizaron ratones a los que se les sometió a cirugía pero que no se les extrajeron las gónadas (sham) y ratones intactos. Cuatro semanas después de la cirugía se infectaron con *P. berghei* ANKA y se analizaron diversos parámetros asociados con la patología como son: la parasitemia, la concentración de hemoglobina que es una medida de la anemia y la pérdida de peso. Se prepararon grupos de ratones machos y hembras como se describió anteriormente, que no se infectaron para determinar si las variables estudiadas se modificaban por la extirpación de gónadas.

A todos los grupos de ratones a partir del día 3 post-infección se les extrajo una muestra de sangre diariamente para evaluar la parasitemia, se sacrificaron al día 9 post-infección y se extrajo el bazo para evaluar la expresión de ARN mensajero que codifica para las citocinas IFN- γ , TNF- α , TGF- β e IL-1.

8. Metodología

8.1. Gonadectomía

Preparación del ratón

Las cirugías se realizaron de 7am a 10am hrs. Para anestésiar a los ratones, se utilizó una anestesia disociativa compuesta de xilacina-ketamina a razón de 15 mg/kg y 100 mg/kg, respectivamente por vía intraperitoneal [218].

Primero se administró la xilacina y alrededor de 4 minutos después se administró la ketamina. Cuatro minutos después, se verificó plano anestésico mediante la ausencia del reflejo patelar. Una vez alcanzado el plano anestésico, se procedio a la cirugía [219].

8.1.1. Orquiectomía

El ratón se colocó en la tabla de disección en posición de cubito dorsal. Se rasuró la zona del escroto, se desinfectó con jabón quirúrgico, se colocó yodo y alcohol al 70 %.

Se presionó ligeramente, con los dedos pulgar e índice hacia la parte caudal del abdomen para desplazar los testículos hacia el escroto. Una vez desplazados, se realizó una incisión transversal de 0.5 a 1.0 cm en la parte media de la bolsa escrotal.

Se sujeto uno de los testículos con las pinzas de disección por la parte caudal y se suturó con un punto a la altura del epidídimo para reducir el riesgo de hernia inguinal y hemorragia. Una vez realizado el punto de sutura, con las tijeras de disección se cortó el ligamento de la cola del epidídimo. El mismo procedimiento se siguió para el otro testículo; de esta forma se extirparon los testículos. El escroto se suturó mediante sujete separado con una sutura absorbible de ácido poliglicólico del número 4.0.

Sobre la herida se paso una torunda con yodo para reducir el riesgo de infección y el ratón se regreso a su jaula, el tiempo de recuperación del animal oscilo entre los 5 y 10 minutos.

Para ayudar a tener una mejor y pronta recuperación, después de la cirugía se administró al ratón un analgésico (Meloxicam) y un antibiótico (Enrofloxacina) a razón de 2 mg/kg el día de la cirugía y 10 mg/kg durante tres días respectivamente para reducir el riesgo de infecciones [219].



Figura 10. Orquiectomía. Fotografía tomada durante la extirpación de testículos a un ratón CBA/Ca en el bioterio de la FES Zaragoza.

8.1.2. Ovariectomía

Para anestesiarse a las hembras se siguió el mismo procedimiento que en los machos. La hembra se colocó en la tabla de disección en posición de cubito dorsal. Se realizó la asepsia de la cicatriz umbilical hacia el pubis con jabón quirúrgico, yodo y alcohol al 70%.

Se realizó una incisión de 1 a 1.5 cm sobre la línea media en la segunda mitad entre la cicatriz umbilical y el pubis. El área del corte debe reducirse al mínimo para ayudar al ratón a controlar la pérdida de calor. Con las pinzas iris se tomó un cuerno uterino y se expuso a través de la incisión. Se identificó el ovario para colocar una pinza homeostática a la altura del oviducto y otra al final del ovario; se realizaron dos cortes uno en cada extremo del ovario. Se localizó el otro cuerno uterino y se repitió la operación.

Durante la cirugía, se agregaron algunas gotas de solución salina estéril para rehidratar a los órganos expuestos. Después de la extirpación de los dos ovarios, los planos musculares y la piel se unieron mediante sujete continuo con una sutura absorbible del número 4-0.

Sobre la herida se pasó una torunda impregnada con yodo para reducir el riesgo de infección y el ratón se regresó a su jaula, el tiempo de recuperación del animal osciló entre los 5 y 10 min.



Figura 11. Ovariectomía. Fotografía tomada durante la extirpación de ovarios a un ratón CBA/Ca en el bioterio de la FES Zaragoza.

8.2. Infección

El parásito se descongeló y se inyectó i.p. en dos ratones sanos de aproximadamente 4 semanas de edad. A partir del día 4 post infección, se tomaron muestras sanguíneas para analizar la parasitemia en frotis sanguíneos teñidos con Giemsa. Cuando la parasitemia alcanzó aproximadamente un 30% (5-6 días post infección), se extrajo una muestra de sangre y se preparó un inóculo para infectar con 10^3 eritrocitos parasitados con *P. berghei* ANKA a cada uno de los ratones de los distintos grupos experimentales.

8.3. Parasitemia

Se realizó un corte fino con tijeras en el extremo de la cola del ratón, se extrajo una gota de sangre que se depositó en un portaobjetos, con otro portaobjetos se extendió la gota de sangre a lo largo del portaobjetos, se fijó con metanol absoluto y se tiñó con colorante de Giemsa por 30 minutos, se lavó el colorante con agua de la llave y las preparaciones se dejaron secar al aire. Los parásitos se visualizaron por microscopía óptica y el porcentaje de eritrocitos parasitados se evaluó en relación al número de eritrocitos totales. Cuando se presentaban menos de dos eritrocitos parasitados por campo, se contaron 50 campos; si la parasitemia excedía a 2 eritrocitos por campo se contaron 200 eritrocitos totales.

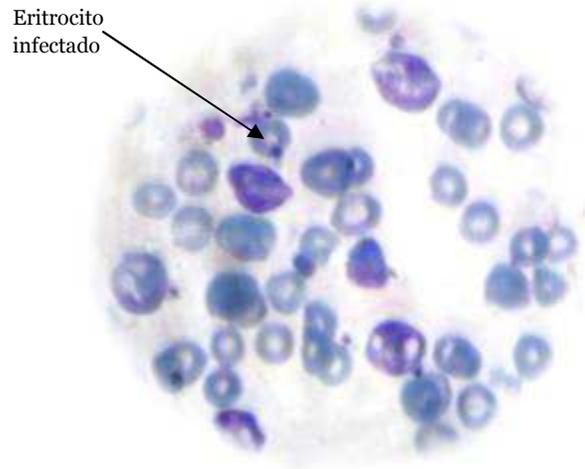


Figura 12. Parasitemia. Fotografía tomada de un frotis sanguíneo de un ratón infectado con *P. berghei* ANKA en el microscopio óptico a un aumento de 100X.

8.4. Pérdida de peso

Los ratones se pesaron diariamente y se consideró el peso del día cero de la infección como el 100% de peso.

8.5. Hemoglobina

En el día cero y a partir del día 4 post infección, diariamente se evaluó la concentración de hemoglobina hasta el día del sacrificio (día 9 post-infección), para lo cual se agregaron 498 μ L de reactivo de Drabkin en tubos Eppendorf y se le adicionaron 2 μ L de sangre de la cola, se mezcló hasta obtener una solución homogénea, la concentración de hemoglobina se evaluó por espectrometría a una longitud de onda de 540 nm, para obtener la concentración de hemoglobina, los resultados de la absorbancia se interpolaron en una curva patrón de hemoglobina.

8.6. Sacrificio, extracción de plasma y de órganos

Se etiquetaron tubos Eppendorf de 1.5mL con rótulos para bazo y sangre. En los tubos donde se adicionó la sangre se agregaron 200 μ L de PBS/heparina.

- En el día 9 post infección se sacrificó a los ratones por dislocación cervical. Se extrajo la sangre del corazón con una pipeta Pasteur y se colocó en el tubo Eppendorf. Se separó una alícuota de sangre total para aislar ARN.

Se giró al ratón hacia el lado izquierdo y se cortó la piel para dejar visible el bazo, se eliminó toda la grasa, se extrajo el bazo y se colocó en una tapa previamente esterilizada, se pesó en la balanza analítica y se registró su peso. El bazo se colocó en el tubo cubierto con

organza estéril y se adicionaron 1000µL de PBS con heparina. Se macero el tejido con un émbolo, se adicionaron 4mL de PBS estéril y se centrifugo a 3000 rpm por 5 minutos a 4-6°C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón en 1mL de PBS estéril y se adicionó el tejido en los tubos etiquetados como ARN.

8.7. Extracción de ARN

Este método se basa en adicionar un reactivo caotrópico (isotiocianato de guanidinio) combinado con la extracción de fenol:cloroformo y una precipitación con alcohol isopropílico.

Se resuspendió el botón celular que se obtuvo durante la centrifugación de la sangre y se adicionaron 5 mL de agua para lisar a los eritrocitos, se centrifugó a 300rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante, se adicionaron 400µL de solución de Trypure. Se agitó vigorosamente durante 5 minutos. Se transfirió la mezcla de tejido a un tubo Eppendorf y se adicionaron 200µL de una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (49:1). Se agitó en vortex 15 min y se centrifugó a 8000 rpm durante 15 minutos. Se transfirió la fase acuosa a un tubo estéril etiquetado, se adicionaron 500µL de isopropanol previamente enfriado a -70°C y se centrifugó a 4°C durante 15 minutos a 13,000rpm. Se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 200µL de etanol al 80% en agua con dietil pirocarbonato (DEPC), se centrifugaron a 4°C durante 15 minutos a 13,000rpm, se eliminó el sobrenadante y los tubos se cubrieron con papel parafilm, se realizaron perforaciones en el parafilm y se dejó secar a temperatura ambiente toda la noche. Una vez seco, se disolvió en 50µL de agua DEPC.

8.8. Cuantificación de ARN

Se tomaron 2µL de ARN y se adicionaron a 198µL de agua estéril dilución (1:100). Se midió la absorbancia a 260nm, 280 nm

Cálculo:

$$\text{ARN}\mu\text{g}/\mu\text{L} = \frac{A_{260} \times 40\mu\text{g} \times \text{factor de dilución}}{1000\mu\text{L}}$$

8.9. Retrotranscripción

- En un tubo Eppendorf de 600 μ L se colocó 1.0 μ L de oligo dT, se adicionó el volumen de ARN que contenía 1.5 μ g y se completo el volumen a 10 μ L con agua estéril. Se calentó por 10 min a 65°C e inmediatamente se colocó en hielo, se centrifugó por 5 segundos a 10,000rpm. Se adicionaron 4 μ L de amortiguador First Strand, 2 μ L de dTT 1.5M, 200U de la enzima MMLV-RT, 40U del inhibidor de RNAsa y 0.5mM de dNTP's. Se incubó a 37°C durante una hora y a 55°C por 5 minutos en el termociclador.

8.10. PCR tiempo real

8.10.1. Cuantificación de Citocinas (INF- γ , TGF- β , TNF- α , IL-10) y β -actina en tejido

- Se amplificaron los genes de de β -actina, INF- γ TGF- β e IL-10 con 6mM de MgCl₂, 0.03U de Taq Polimerasa, ROX a 1X y los oligos correspondientes a una concentración de 200nM. Para amplificar el gen de TNF- α la concentración de MgCl₂ fue de 3mM. Cada gen se amplificó en el termociclador de Applied Biosystems 7500 para PCR en tiempo real con temperaturas de desnaturalización de 95°C, de extensión de 72°C y de alineamiento de 60°C para los genes de β -actina, INF- γ , TGF- β , para TNF- α la temperatura de alineamiento fue de 65°C mientras que para IL-10 fue de 63°C.

8.11. Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico STATA 11.0, en el cual se realizó la prueba de Levene para ver si los datos cumplen con la homocedasticidad; en caso de tener un valor de P mayor a 0.05 se aceptó H₀ de (varianzas iguales) y se procedio a realizar ANDEVA, si esta prueba era significativa (P < 0.05) se rechazó H₀ y se realizó la tabla de comparaciones múltiples (Bonferroni). En el caso de que los datos no cumplieran con la homocedasticidad se realizó la prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba no paramétrica para comparaciones múltiples (Z).

9. Resultados

9.1. Efecto de la gonadectomía sobre la sobrevida de ratones machos y hembras infectados con *P. berghei* ANKA

Se utilizaron grupos de ratones (5 por grupo) gonadectomizados, sham e intactos (hembras y machos) se infectaron con 1×10^3 eritrocitos parasitados con *P. berghei* ANKA. Diariamente se registró la sobrevida. En el día 10 post-infección se detectó diferencia significativa en la sobrevida entre las hembras intactas y las Gx (*H/intactas vs *H/Gx $P < 0.05$), la sobrevida fue del 80% y del 20% respectivamente, las hembras Gx alcanzaron el 100% de mortalidad en el día 11 (*H/intactas vs *H/Gx $P < 0.05$) un día antes que las hembras sham e intactas (Figura 13). La gonadectomía en las hembras infectadas con *P. berghei* ANKA provocó una disminución significativa en la sobrevida.

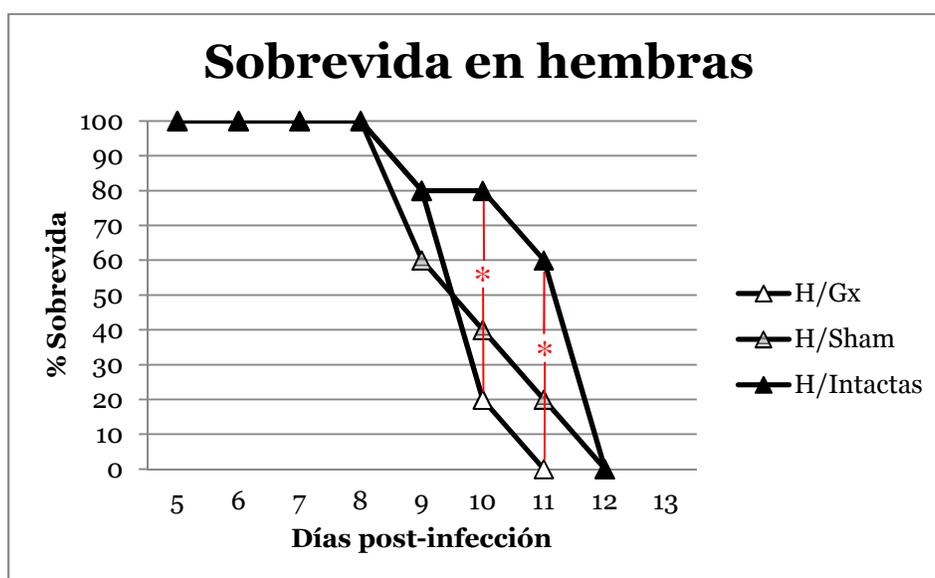


Figura 13. Sobrevida en los grupos de ratones hembras. Se infectaron con *P. berghei* ANKA 3 grupos de ratones CBA/Ca hembras, diariamente se revisaron para evaluar la sobrevida. La línea con triángulos sin relleno representa al grupo al que previo a la infección se le extrajeron las gónadas (H/Gx), la línea con triángulos degradados a las hembras sham (H/Sham) y la línea con triángulos rellenos al grupo de ratonas intactas (H/Intactas). Cada grupo está constituido por 5 ratonas, las líneas representan el porcentaje promedio de la sobrevida a través de los días post-infección. * indica diferencia estadística entre los grupos ($p \leq 0.05$) indicar la prueba estadística.

Los machos Gx comenzaron a morir antes que los machos intactos, en el día 10 post-infección la sobrevivencia de los machos intactos fue del 100% mientras que en los machos Gx fue del 60%, sin embargo la totalidad de los ratones machos Gx murieron el mismo día que los machos intactos, (día 13 post-infección). En el día 12 post-infección se detectó diferencia significativa entre el grupo intacto y el sham (*M/intactos vs *M/sham $P < 0.05$), el grupo sham fue el que presentó una menor sobrevivencia de los tres (Figura 14).

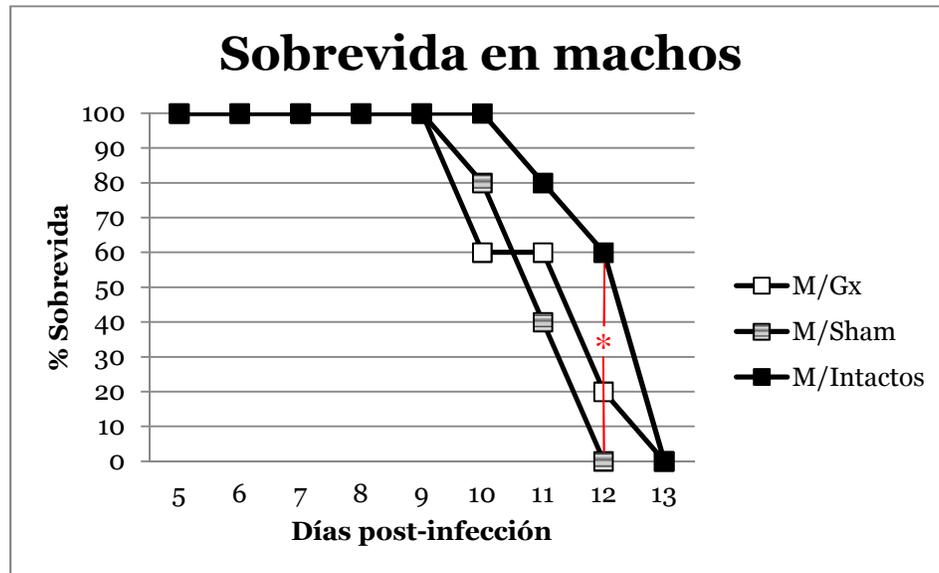


Figura 14. Sobrevivencia en los grupos de ratones machos. Se infectaron con *P. berghei* ANKA 3 grupos de ratones CBA/Ca machos, diariamente se revisaron para evaluar la sobrevivencia. La línea con cuadros sin relleno representa al grupo al que previo a la infección se le extrajeron las gónadas (M/Gx), la línea con cuadros degradados a los machos sham (M/Sham) y la línea con cuadros rellenos a grupo de ratones intactos (M/Intactos). Cada grupo está constituido por 5 ratones, las líneas representan el porcentaje promedio de la sobrevivencia a través de los días post-infección. * indica diferencia estadística entre los grupos ($p \leq 0.05$) indicar la prueba estadística.

Se comparó la sobrevivencia entre el grupo de hembras intactas contra el grupo de machos intactos, interesantemente, se detectó que las hembras murieron antes que los machos intactos: en el día 12 post-infección se presentó diferencia significativa (*M/intactos vs *H/intactas $P < 0.05$) ya que la sobrevivencia de las hembras intactas fue de 0% mientras que en las machos intactos fue del 60%. El total del grupo correspondiente a los machos intactos fue el día 13 (Figura 15).

Sobrevida en machos y hembras

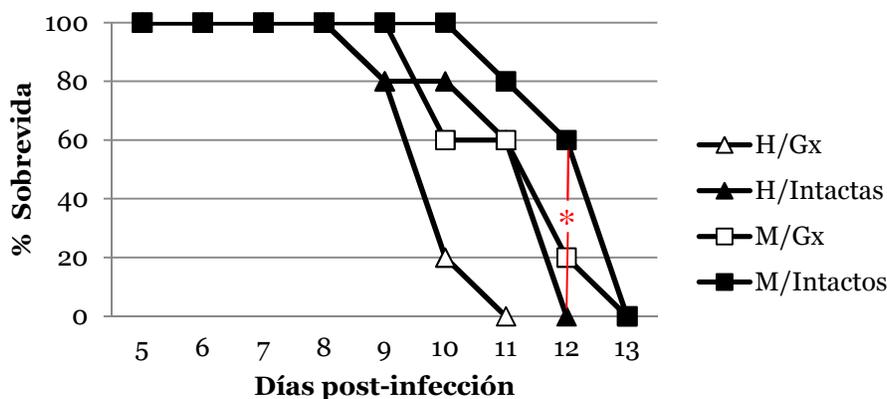


Figura 15. Sobrevida de los grupos de hembras y machos intactos y gonadectomizados. Se infectaron con *P. berghei* ANKA 4 grupos de ratones CBA/Ca dos de machos y dos de hembras, diariamente se evaluó la sobrevida. Las líneas con triángulos representan a los dos grupos de hembras, los triángulos sin relleno a las gonadectomizadas (**H/Gx**) y los triángulos con relleno a las intactas (**H/Intactas**), las líneas con cuadros representan a los dos grupos de machos, los cuadros sin relleno a los gonadectomizados (**M/Gx**) y los cuadros con relleno a los intactos (**M/Intactos**). Cada grupo está constituido por 5 ratones, las líneas representan el porcentaje de sobrevida a través de los días post-infección. * indica diferencia estadística entre los grupos ($p \leq 0.05$) indicar la prueba estadística que se utilizó.

9.2. Efecto de la gonadectomía sobre la pérdida de peso de ratones machos y hembras infectados con *P. berghei* ANKA

Para determinar el efecto de la gonadectomía sobre la pérdida de peso en los ratones infectados con *P. berghei* ANKA, se evaluó diariamente el peso corporal de los diferentes grupos de ratones (intactos, sham y Gx). Después de la inoculación con *P. berghei* ANKA el peso corporal disminuyó progresivamente hasta el día que murieron todos los grupos de ratones hembras (Figura 16). Sin embargo, el peso corporal de las hembras intactas disminuyó significativamente más lentamente que las hembras Gx en los días post infección (*H/intactas vs *H/Gx $P < 0.05$), por otra parte el grupo sham presentó una mayor pérdida de peso al final de la infección.

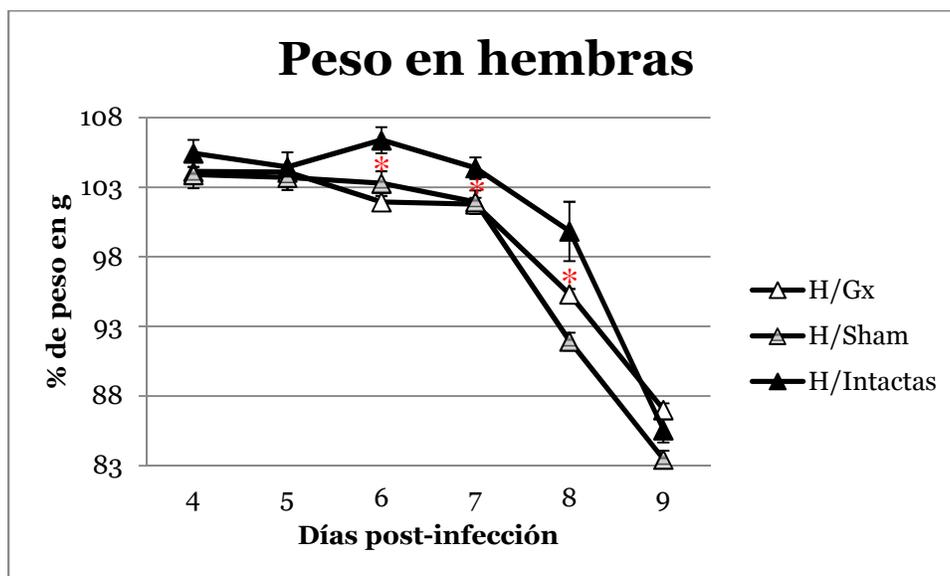


Figura 16. Efecto de la gonadectomía sobre la pérdida de peso en ratones hembras. 3 grupos de ratones CBA/Ca hembras se infectaron con *P. berghei* ANKA, diariamente se pesaron para evaluar la pérdida de peso. Se consideró el 100% del peso el día en el que se infectaron. La línea con triángulos sin relleno representa al grupo al que previo a la infección se le extrajeron las gónadas (**H/Gx**), la línea con triángulos degradados a las hembras sham (**H/Sham**) y la línea con triángulos rellenos al grupo de ratonas intactas (**H/Intactas**). Cada grupo está compuesto por 5 ratonas, las líneas representan el porcentaje promedio del peso perdido durante los días post-infección y las líneas entre ellos al error estándar de la media (SEM), * indica diferencia estadística entre los grupos ($p \leq 0.05$) para calcular el valor de P se realizó ANDEVA.

El peso corporal se incrementó ligeramente en todos los grupos de ratones machos en el día 5 post-infección, y el aumento de peso en el grupo Gx fue significativamente mayor que en el grupo intacto (*M/Gx vs *M/intactos $P < 0.05$) y que en el grupo sham. Posteriormente, la tendencia a la pérdida de peso fue similar en los tres grupos, pero el grupo sham fue el que desarrollo la mayor pérdida de peso a lo largo de la infección, mientras que el grupo intacto fue el que a partir del día 7 presentó la menor pérdida de peso (Figura 17).

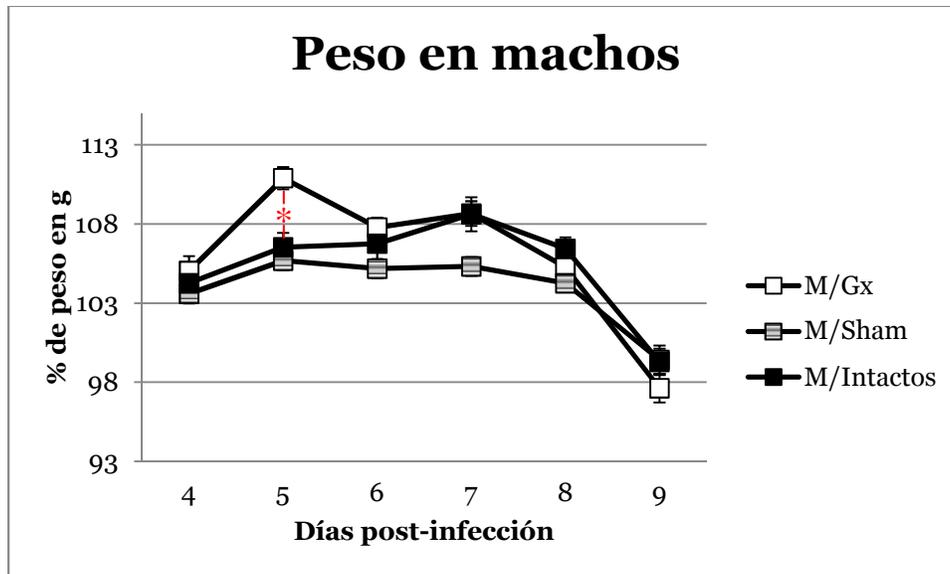


Figura 17. Efecto de la gonadectomía sobre la pérdida de peso en ratones machos. 3 grupos de ratones CBA/Ca machos se infectaron con *P. berghei* ANKA, diariamente se pesaron para evaluar la pérdida de peso. Se consideró el 100% del peso el día en el que se infectaron. La línea con cuadros sin relleno representa al grupo al que previo a la infección se le extrajeron las gónadas (**M/Gx**), la línea con cuadros degradados a los machos sham (**M/Sham**) y la línea con cuadros rellenos al grupo de ratones intactos (**M/Intactos**). Cada grupo está constituido por 5 ratones, las líneas representan el porcentaje promedio del peso durante los días post-infección y las líneas entre ellos al error estándar de la media (SEM), * indica diferencia estadística entre los grupos ($p \leq 0.05$) para calcular el valor de P se realizó ANDEVA.

Al comparar la pérdida de peso en los grupos de ratones machos y hembras intactas se detectó que las hembras tienden a perder más peso y más rápidamente que los machos, sobre todo después del día 7 post-infección (*M/intactos vs *H/intactas $P < 0.05$) y que la gonadectomía afecta más a las hembras que a los machos (Figura 18).

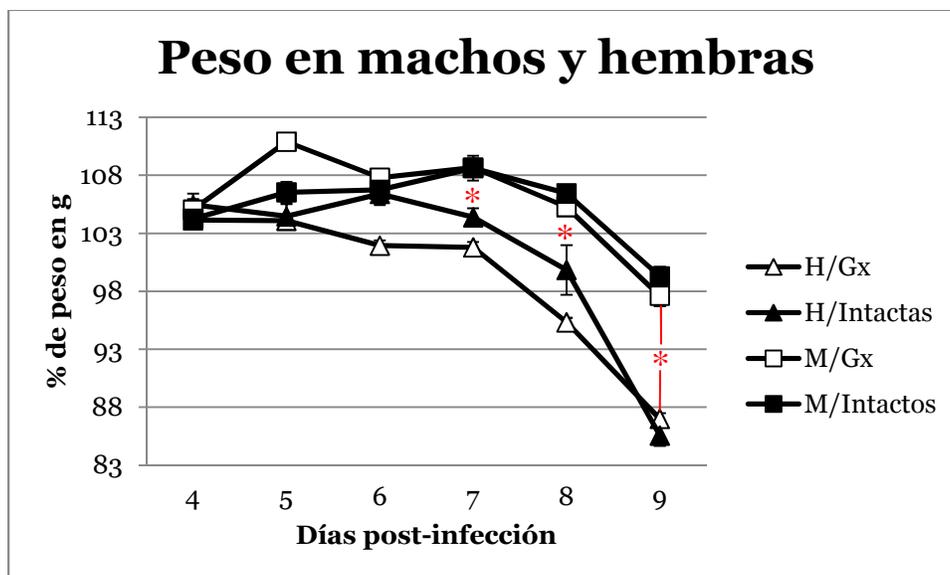


Figura 18. Efecto de la gonadectomía sobre la pérdida de peso en los ratones infectados con *P. berghei* ANKA. Cuatro grupos de ratones CBA/Ca se infectaron con *P. berghei* ANKA dos de machos y dos de hembras, diariamente se pesaron para evaluar la pérdida de peso. Se consideró el 100% del peso el día en el que se infectaron. Las líneas con triángulos representan a los dos grupos de hembras, los triángulos sin relleno a las gonadectomizadas (**H/Gx**) y los triángulos con relleno a las intactas (**H/Intactas**), las líneas con cuadros representan a los dos grupos de machos, los cuadros sin relleno a los gonadectomizados (**M/Gx**) y los cuadros con relleno a los intactos (**M/Intactos**). Cada grupo está constituido por 5 ratones, las líneas representan el porcentaje promedio del peso perdido durante los días post-infección y las líneas perpendiculares al error estándar de la media (SEM), para calcular el valor de P se realizó ANDEVA.

9.3. Efecto de la gonadectomía sobre la concentración de hemoglobina de ratones machos y hembras infectados con *P. berghei* ANKA.

Para evaluar si las hormonas sexuales influyen sobre la anemia, en este trabajo se estudió si la gonadectomía afecta la concentración de hemoglobina en machos y hembras infectados con *P. berghei* ANKA.

La concentración de hemoglobina en las hembras se incrementó hasta el día 6 post infección. Después de ese día se detectó una tendencia a disminuir hasta el día 8 post-infección, cuando se invirtió la tendencia de todos los grupos de ratones a un ligero incremento en la concentración de hemoglobina. Las hembras Gx presentaron menores concentraciones al final de la infección con *P. berghei* ANKA que la hembras intactas, es importante señalar que el grupo sham presentó concentraciones similares a las del grupo Gx al final de la infección (Figura 19).

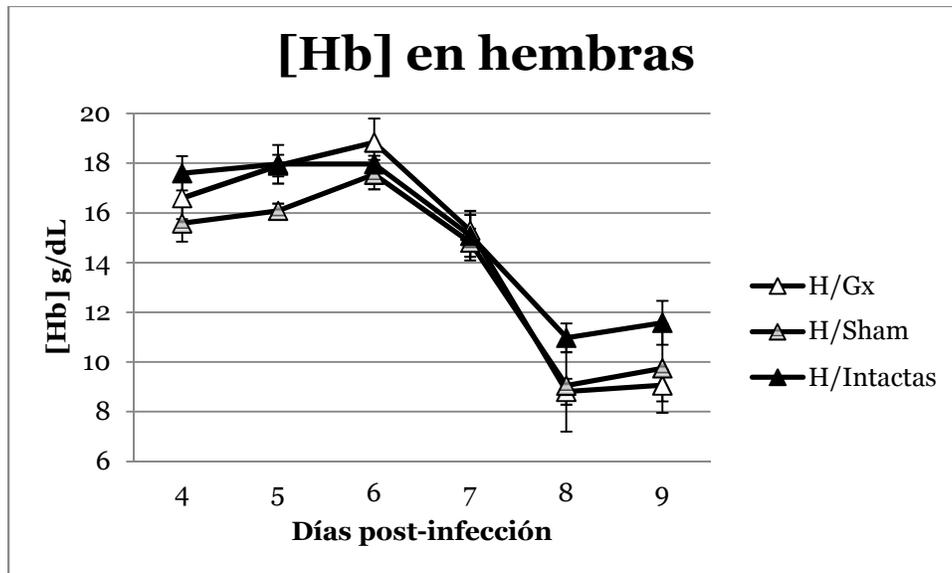


Figura 19. Efecto de la gonadectomía sobre la concentración de hemoglobina en ratones hembras. Tres grupos de ratones CBA/Ca hembras se infectaron con *P. berghei* ANKA, a partir del día 4 post-infección se midió la concentración de hemoglobina diariamente. La línea con triángulos sin relleno representa al grupo al que previo a la infección se le extrajeron las gónadas (**H/Gx**), la línea con triángulos degradados al grupo sham (**H/Sham**) y la línea con triángulos rellenos al grupo de ratonas intactas (**H/Intactas**). Cada grupo está constituido por 5 ratonas, las líneas representan el promedio de la concentración de hemoglobina durante los días post-infección y las líneas entre ellos al error estándar de la media (SEM), para calcular el valor de P se realizó ANDEVA.

Por el contrario, en los ratones machos la gonadectomía no modificó significativamente la concentración de hemoglobina, ya que ambos grupos: los Gx y los intactos presentaron valores similares a lo largo de la infección con *P. berghei* ANKA (Figura 20).

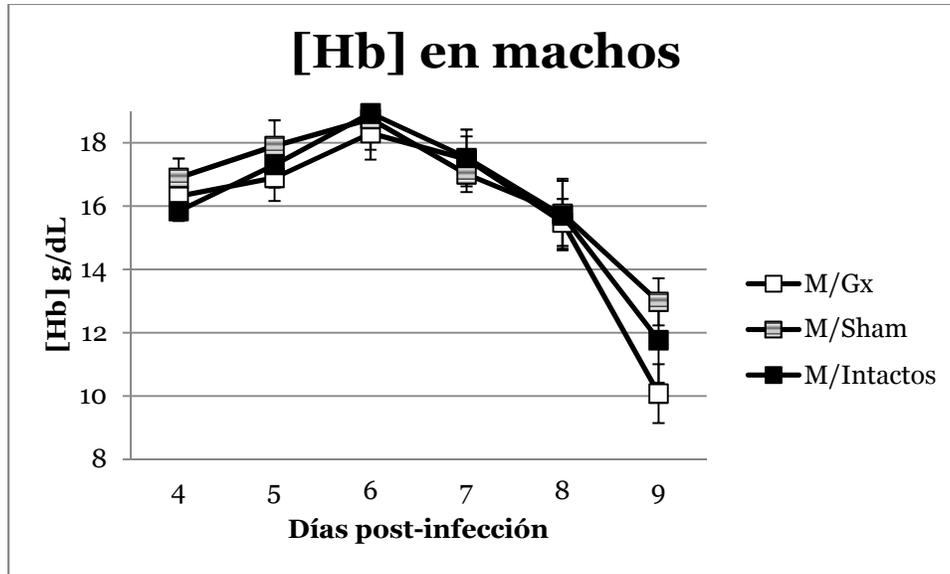


Figura 20. Efecto de la gonadectomía sobre la concentración de hemoglobina en ratones machos. Tres grupos de ratones CBA/Ca machos se infectaron con *P. berghei* ANKA, a partir del día 4 post-infección, se midió la concentración de hemoglobina diariamente. La línea con cuadros sin relleno representa al grupo al que previo a la infección se le extrajeron las gónadas (**M/Gx**), la línea con cuadros degradados al grupo sham (**M/Sham**) y la línea con cuadros rellenos al grupo de ratones intactos (**M/Intactos**). Cada grupo está constituido por 5 ratones, las líneas representan el promedio de la concentración de hemoglobina durante los días post-infección y las líneas entre ellos al error estándar de la media (SEM), para calcular el valor de P se realizó ANDEVA.

Al comparar la concentración de hemoglobina entre los machos intactos y las hembras intactas, se detectó que las hembras presentaron menores concentraciones de hemoglobina en los días 7 y 8 post-infección (*M/intactos vs *H/intactas $P < 0.05$) y que la gonadectomía afectó más a las hembras que los machos, puesto que las concentraciones de hemoglobina disminuyeron de forma significativa (*H/intactas vs *H/Gx $P < 0.05$) en las hembras Gx, mientras que los machos intactos y los gonadectomizados presentaron concentraciones similares a lo largo de la infección (Figura 21).

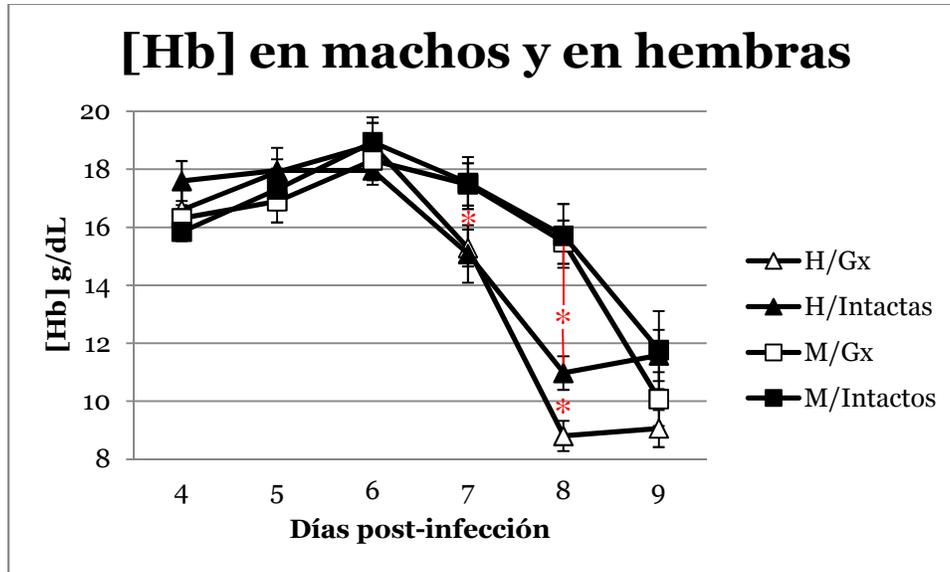


Figura 21. Efecto de la gonadectomía sobre la concentración de hemoglobina en ratones machos y hembras. Cuatro grupos de ratones CBA/Ca se infectaron con *P. berghei* ANKA dos grupos de machos y dos de hembras. A partir del día 4 post-infección se midió la concentración de hemoglobina diariamente. La línea con triángulos sin relleno representa al grupo de hembras al que previo a la infección se le extrajeron las gónadas (**H/Gx**), la línea con triángulos rellenos al grupo de ratonas intactas (**H/Intactas**), la línea con cuadros sin relleno representa al grupo de machos al que previo a la infección se le extrajeron las gónadas (**M/Gx**) y la línea con cuadros rellenos al grupo de ratones intactas (**M/Intactos**). Cada grupo está constituido por 5 ratones, las líneas representan el promedio de la concentración de hemoglobina durante los días post-infección y las barras verticales representan al error estándar de la media (SEM), para calcular el valor de P se realizó ANDEVA.

9.4. Efecto de la gonadectomía sobre la parasitemia en ratones infectados con *P. berghei* ANKA

Se evaluó si la gonadectomía modifica la proliferación del parásito, para ello se evaluó la parasitemia diariamente a partir del día 4 post infección. Cuando se comparó la parasitemia en los grupos de ratones hembras se detectó que el grupo Gx desarrolló parasitemias más altas que el grupo de hembras intactas, en particular en el día 8 post-infección (*H/Gx vs *H/intactas $P < 0.05$). Interesantemente, la cirugía en el grupo sham, también incrementó la parasitemia (Figura 22).

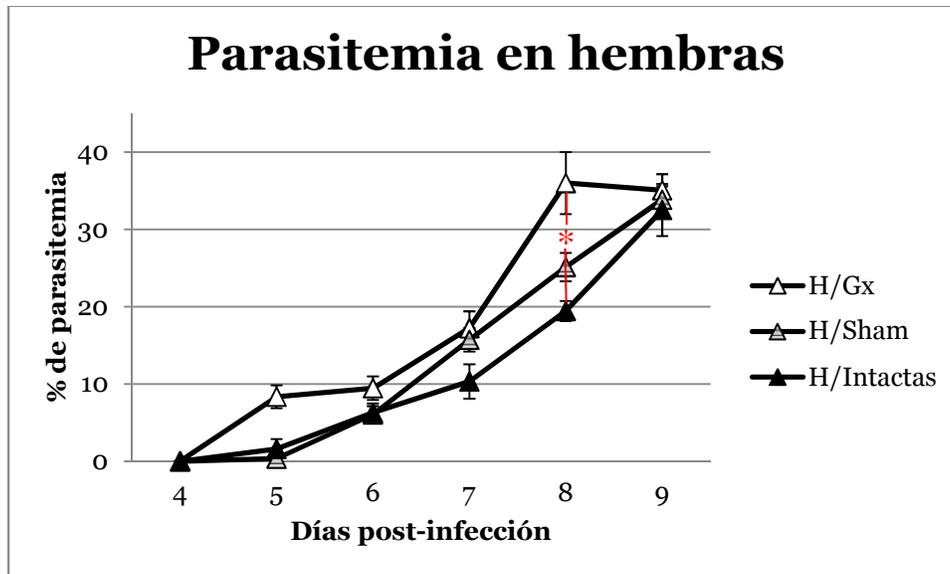


Figura 22. Efecto de la gonadectomía sobre la parasitemia en ratones hembras. Tres grupos de ratones CBA/Ca hembras se infectaron con *P. berghei* ANKA, a partir del día 4 post infección la parasitemia se evaluó diariamente. La línea con triángulos sin relleno representa al grupo al que previo a la infección se le extrajeron las gónadas (**H/Gx**), la línea con triángulos degradados a las hembras (**H/Sham**) y la línea con triángulos rellenos al grupo de ratonas intactas (**H/Intactas**). Cada grupo está constituido por 5 ratonas, las líneas representan el porcentaje promedio de la parasitemia durante los días post-infección y las barras verticales al error estándar de la media (SEM), para calcular el valor de P se realizó ANDEVA.

Para evaluar si la gonadectomía modificaba la parasitemia en los ratones machos, se infectaron grupos de ratones Gx, sham e intactos con *P. berghei* ANKA. El grupo de machos Gx desarrolló parasitemias menores que el grupo intacto en el día 8 post-infección (*M/intactos vs *M/Gx $P < 0.05$) pero no detectamos diferencia significativa al comparar con el grupo sham, en general no se detectó diferencia en la cinética de la parasitemia entre ambos grupos. La cirugía sin extirpación de gónadas, si influyó en la parasitemia, la parasitemia se incrementó en los días 6 y 7 post-infección en el grupo sham pero después fue menor en los días 8 y 9 en comparación con el grupo de ratones intactos pero en los días 8 y 9 post-infección disminuyó significativamente (*M/intactos vs *M/Sham $P < 0.05$) con respecto al grupo de machos intactos (Figura 23).

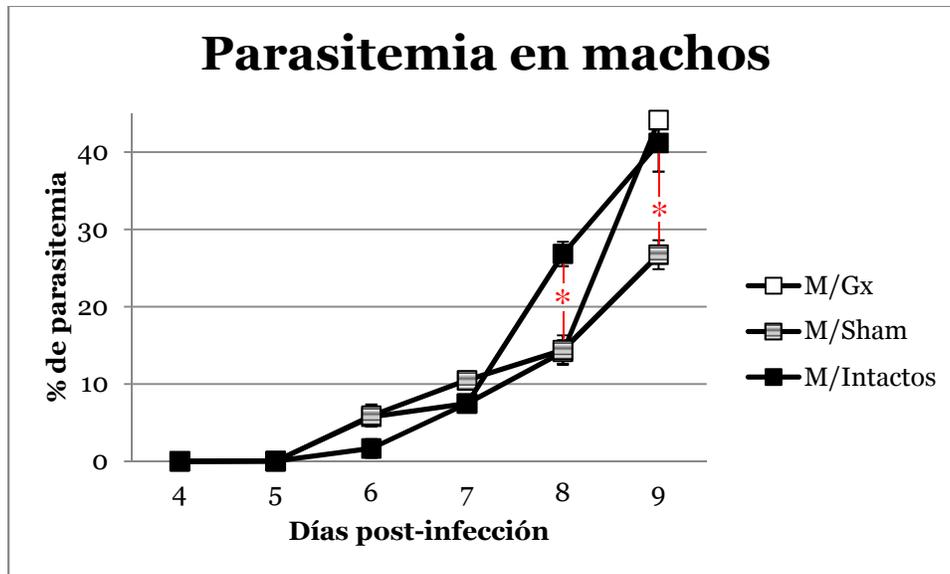


Figura 23. Efecto de la gonadectomía sobre la parasitemia en ratones machos. Tres grupos de ratones CBA/Ca machos se infectaron con *P. berghei* ANKA a partir del día 4 post infección la parasitemia se evaluó diariamente. La línea con cuadros sin relleno representa al grupo al que previo a la infección se le extrajeron las gónadas (**M/Gx**), la línea con cuadros degradados a las machos (**M/Sham**) y la línea con cuadros rellenos al grupo de ratones intactos (**M/Intactos**). Cada grupo está compuesto por 5 ratones, las líneas representan el porcentaje promedio de la parasitemia durante los días post-infección y las barras verticales al error estándar de la media (SEM), para calcular el valor de P se realizó ANDEVA.

Para evaluar si la gonadectomía afectaba más a los machos o a las hembras, se compararon los datos de la parasitemia en los grupos gonadectomizados e intactos (machos y hembras). Al analizar la parasitemia de machos intactos y hembras intactas, se observó que en los días 8 y 9 los machos presentaron parasitemias mayores (*M/intactos vs *H/intactas $P < 0.05$), la gonadectomía en las hembras aumentó la parasitemia significativamente (*H/Gx vs *H/intactas $P < 0.05$) a lo largo de la infección, mientras que en los machos las parasitemias fueron similares durante la infección entre los grupos Gx e intactos (Figura 24).

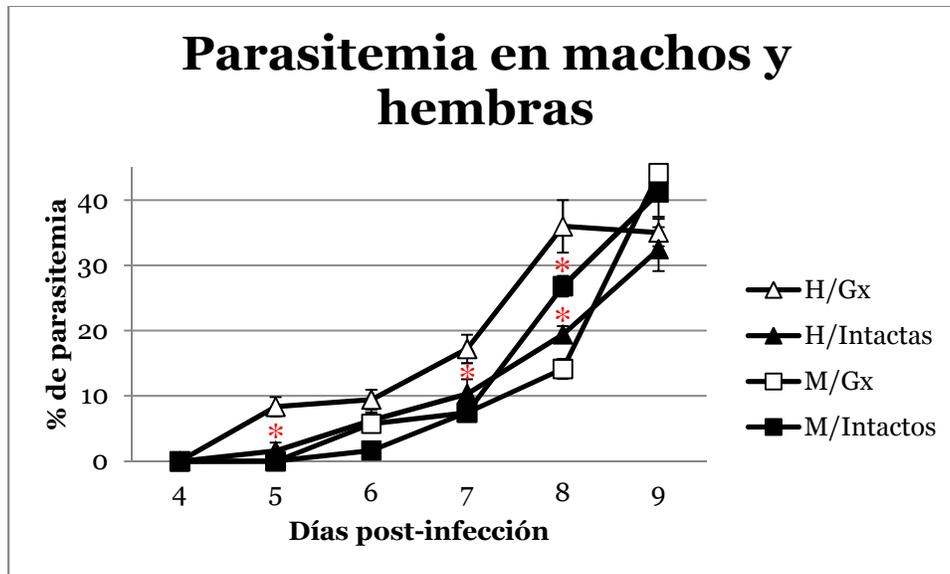


Figura 24. Efecto de la gonadectomía sobre la parasitemia en ratones machos y hembras. Cuatro grupos de ratones CBA/Ca se infectaron con *P. berghei* ANKA dos grupos de machos y dos de hembras, a partir del día 4 post-infección se midió la parasitemia diariamente. La línea con triángulos sin relleno representa al grupo de hembras al que previo a la infección se le extrajeron las gónadas (**H/Gx**), la línea con triángulos rellenos al grupo de ratonas intactas (**H/Intactas**), la línea con cuadros sin relleno representa al grupo de machos al que previo a la infección se le extrajeron las gónadas (**M/Gx**) y la línea con cuadros rellenos al grupo de ratones intactos (**M/Intactos**). Cada grupo está constituido por 5 ratones, las líneas representan el porcentaje promedio de la parasitemia durante los días post-infección y las líneas entre ellos al error estándar de la media (SEM), para calcular el valor de P se realizó ANDEVA.

9.5. Efecto de la gonadectomía en la expresión de citocinas en ratones machos y hembras intactos infectados con *P. berghei* ANKA

9.5.1 Efecto de la gonadectomía sobre la expresión de IFN- γ en ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA.

La gonadectomía incrementó la expresión de INF- γ tanto en las hembras como en los machos (*M/intactos vs *M/Gx $P < 0.05$), lo que sugiere que las hormonas esteroides masculinas y femeninas regulan negativamente la expresión de INF- γ en los ratones infectados con *P. berghei* ANKA (*H/intactas vs *H/Gx $P < 0.05$). Interesantemente, el grupo sham presentó valores más altos que los demás grupos (Figura 25).

No se encontraron diferencias significativas en la expresión de IFN- γ entre machos y hembras intactas, y en ambos sexos la gonadectomía favoreció la expresión de INF- γ (Figura 25).

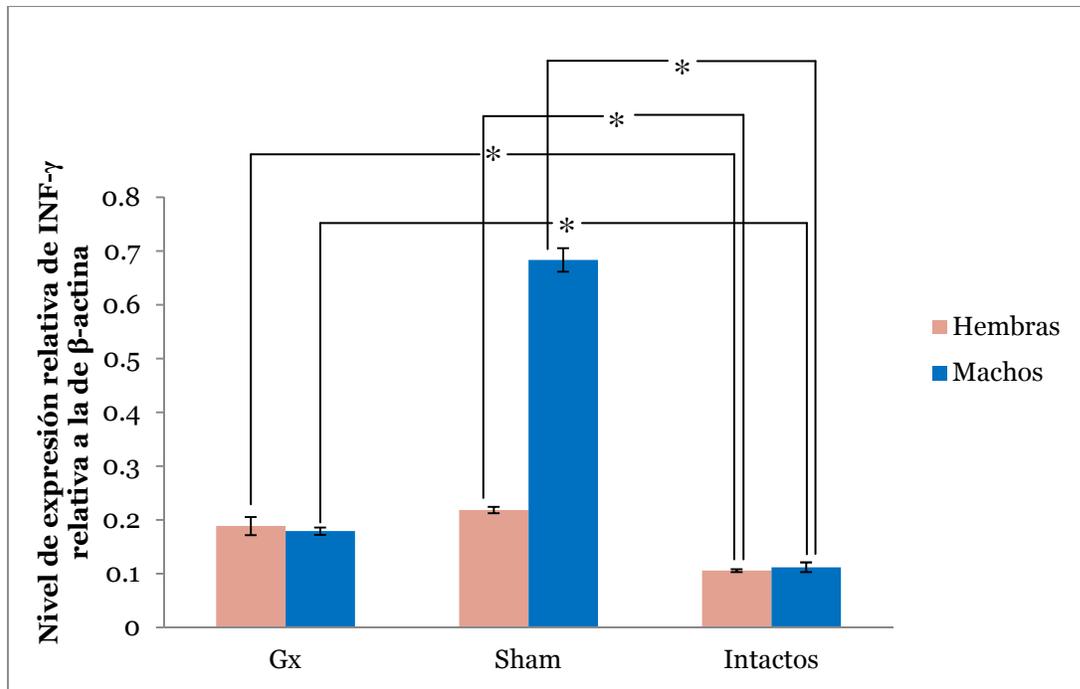


Figura 25. Efecto de la gonadectomía sobre la expresión de INF- γ con relación a β -actina en el bazo de ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA. Se infectaron 6 grupos de ratones CBA/Ca machos y hembras con *P. berghei* ANKA. En el día 9 post-infección se sacrificaron para extraer el ARNm del bazo, retrotranscribirlo y evaluar el nivel de expresión de INF- γ por PCR en tiempo real. Se normalizaron todos los grupos con los datos de la expresión de INF- γ en ratones de su mismo sexo y tratamiento sin infección. Cada grupo está constituido por 5 ratones, las barras representan las medias de cada grupo y las líneas verticales representan al error estándar de la media, para calcular el valor de P se realizó ANDEVA.

9.5.2 Efecto de la gonadectomía sobre la expresión de TNF- α en ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA.

La gonadectomía incrementó la expresión de TNF- α en los ratones de ambos sexos, en las hembras el incremento resultó significativo (*H/intactas vs *H/Gx $P < 0.05$). Interesantemente, la cirugía por sí sola aumento la expresión de TNF- α en ambos sexos esto podría explicarse por el efecto inflamatorio que genera la cirugía (Figura 26). Los grupos sham obtuvieron las expresiones más altas con respecto de los demás grupos.

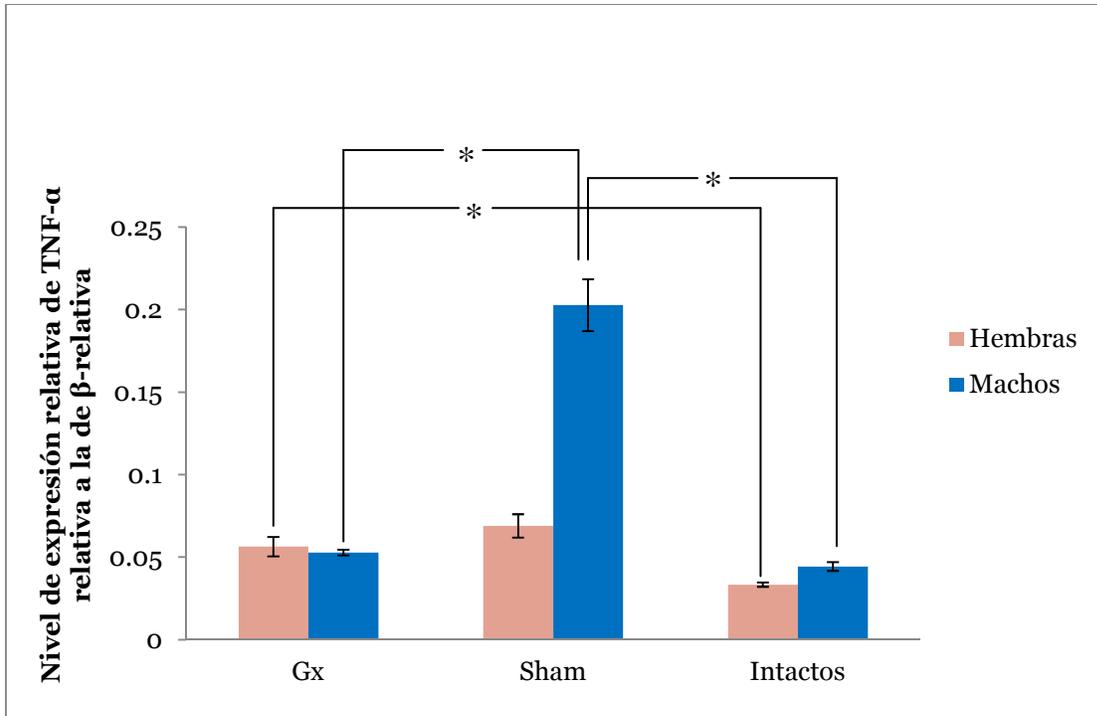


Figura 26. Efecto de la gonadectomía sobre la expresión de TNF- α con relación a β -actina en el bazo de ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA Se infectaron 6 grupos de ratones CBA/Ca machos y hembras con *P. berghei* ANKA. En el día 9 post-infección se sacrificaron para extraer el ARNm del bazo, retrotranscribirlo y evaluar el nivel de expresión de TNF- α por PCR en tiempo real. Se normalizaron todos los grupos con su mismo sexo y tratamiento sin infección. Cada grupo está constituido por 5 ratones, las barras representan las medias de cada grupo y las líneas verticales representan al error estándar de la media, para calcular el valor de P se realizó ANDEVA.

9.5.3 Efecto de la gonadectomía sobre la expresión de TGF- β en ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA.

La gonadectomía tanto en las hembras como en los machos indujo un incremento no significativo de la expresión de TGF- β (Figura 27), lo que sugiere que las hormonas sexuales regulan negativamente la expresión de esta citocina. Interesantemente, el grupo sham presentó valores muy similares a los del grupo Gx en las hembras, mientras que en los machos el grupo sham presentó los valores más altos, lo anterior indica que la cirugía induce procesos inflamatorios que se reflejan en los niveles de citocinas en los ratones infectados con el *Plasmodium*.

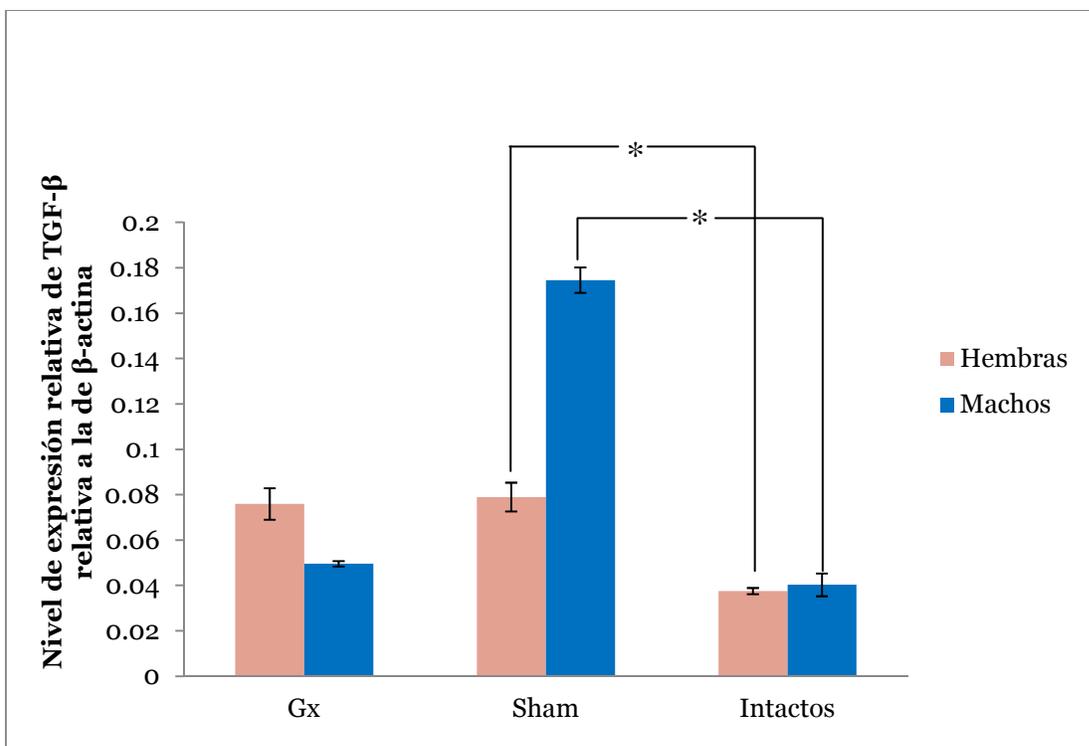


Figura 27. Efecto de la gonadectomía sobre la expresión de TGF-β con relación a β-actina en el bazo de ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA. Se infectaron 6 grupos de ratones CBA/Ca machos y hembras con *P. berghei* ANKA. En el día 9 post-infección se sacrificaron para extraer el ARNm del bazo, retrotranscribirlo y evaluar el nivel de expresión de TGF-β por PCR en tiempo real. Se normalizaron todos los grupos con su mismo sexo y tratamiento sin infección. **Cada grupo está constituido por 5 ratones, las barras representan las medias de cada grupo y las líneas verticales representan al error estándar de la media, para calcular el valor de P se realizó ANDEVA.**

9.5.4 Efecto de la gonadectomía sobre la expresión de IL-10 en ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA.

En las hembras, la gonadectomía incrementó la expresión de IL-10 sin ser significativa, mientras que en los machos no se modificó la expresión de esta citocina. Interesantemente, en los machos el grupo sham presentó el valor más alto para la expresión de esta citocina (Figura 28), nuestros resultados sugieren que las hormonas sexuales femeninas regulan negativamente la expresión de IL-10 y las hormonas masculinas no modificaron la expresión de esta citocina.

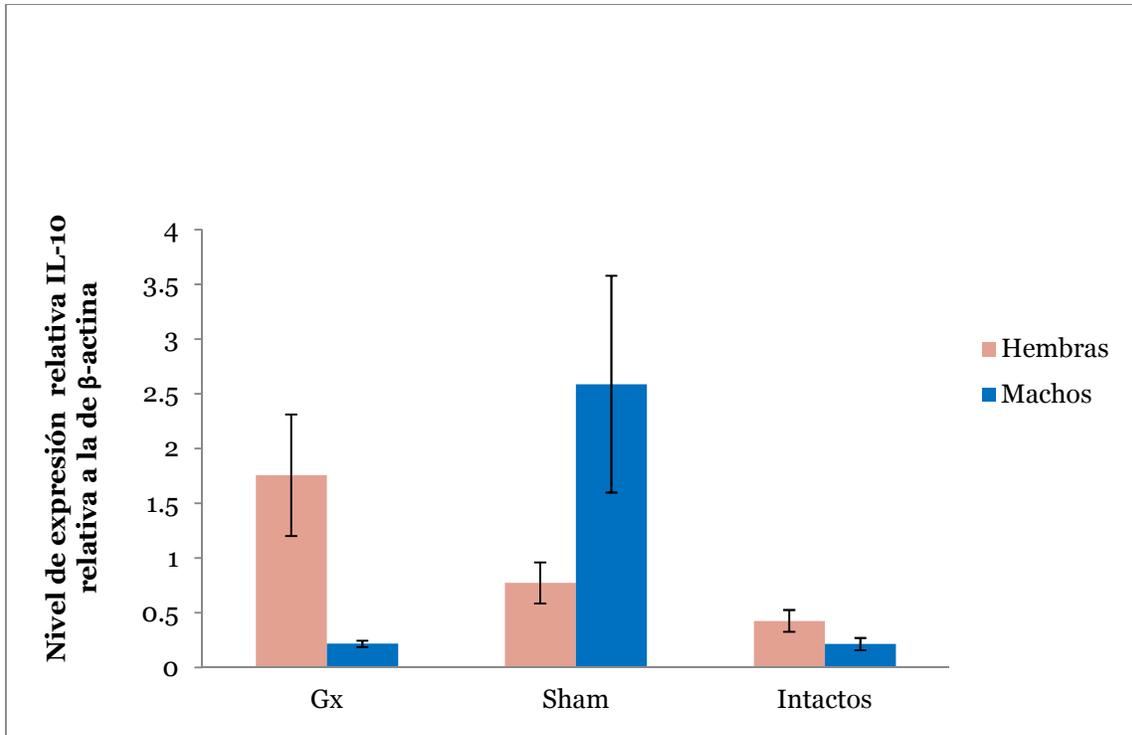


Figura 28. Efecto de la gonadectomía sobre la expresión de IL-10 con relación a β -actina en el bazo de ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA. Se infectaron 6 grupos de ratones CBA/Ca machos y hembras con *P. berghei* ANKA. En el día 9 post-infección se sacrificaron para extraer el ARNm del bazo, retrotranscribirlo y evaluar el nivel de expresión de IL-10 por PCR en tiempo real. Se normalizaron todos los grupos con su mismo sexo y tratamiento sin infección. Cada grupo está constituido por 5 ratones, las barras representan las medias de cada grupo y las líneas verticales representan al error estándar de la media, para calcular el valor de P se realizó ANDEVA.

10. Discusión

Se ha demostrado dimorfismo sexual en muchas enfermedades parasitarias incluyendo la malaria, esto es un sexo es más susceptible que el otro. Para evaluar si el dimorfismo sexual que se presenta en la malaria depende de las hormonas sexuales, se inocularon grupos de ratones CBA/Ca machos y hembras Gx, sham e intactos con *P. berghei* ANKA y se evaluaron los siguientes parámetros: la sobrevivida, la pérdida de peso, la parasitemia, la concentración de hemoglobina y los niveles de expresión de los genes relacionados con la respuesta inmune: INF- γ , TNF- α , TGF- β e IL-10.

Sobrevida

En general se ha descrito que los machos son más susceptibles que las hembras a muchas enfermedades parasitarias incluida la malaria y que la gonadectomía incrementa la sobrevida en los machos [220] y no afecta a las hembras cuando se infectan con *P. chabaudi* [216], lo cual contrasta con nuestros resultados, ya que la gonadectomía disminuyó la sobrevida para ambos sexos y en el día 10 post-infección la gonadectomía afectó un 40% más la sobrevida de las hembras que la de los machos. Cuando se compara la sobrevida de machos intactos contra hembras intactas observamos que las hembras intactas mueren antes. Por otra parte, los grupos sham de ambos sexos se comportan diferente en relación al grupo intacto. En las hembras sham la sobrevida disminuyó con respecto de las intactas pero es mayor que la de las Gx y en los machos el grupo sham fue el que tuvo menor sobrevida de los tres grupos.

Una probable explicación a la diferencia de nuestros resultados y los descritos por el grupo de Amy Cernetich es que se utilizaron cepas de parásito y de ratón distintos a los de este trabajo, ya se ha descrito que los efectos de las hormonas gonadales en las infecciones parasitarias varían con: las especies de parásito, la cantidad de parásito y la cepa de ratón [221, 222]. En cuanto a los grupos sham es probable que debido al proceso inflamatorio y el estrés provocado durante la cirugía disminuyera la sobrevida con respecto de los intactos, ya que estos procesos están relacionados con la respuesta inmunológica y es probable que por ello estos ratones tengan una menor sobrevida.

Peso

Se ha demostrado que la pérdida de peso se puede modificar al cambiar los niveles de los esteroides sexuales [220]. En la infección con *P. chabaudi* al extraer las gónadas a ratones hembras, la recuperación de su peso a partir del día de la infección es más lento en comparación con la hembras intactas, por el contrario, en los machos al extraer las gónadas la recuperación de peso es más rápido que el de los machos intactos [220]. Nuestros resultados están acorde con este hallazgo, ya que las hembras Gx perdieron peso más rápidamente que las hembras intactas, por el contrario, en los machos durante la mayoría de los días post-infección la pérdida de peso resultó similar en ambos grupos. En el comienzo los machos Gx presentaron más peso que los intactos. Interesantemente, los grupos sham de ambos sexos se mantuvieron con menor peso en algunos de los días post-infección, una probable explicación a este fenómeno es que debido al estrés generado durante la cirugía hay una liberación importante de glucocorticoides los cuales promueven la movilización de ácidos grasos del tejido adiposo [223].

Concentración de hemoglobina

En la infección con *Plasmodium* uno de los problemas más graves es la generación de anemia, las razones pueden ser varias: la gran cantidad de eritrocitos destruidos durante la infección, que el parásito se alimenta de hemoglobina, la fagocitosis de los eritrocitos parasitados y la eliminación de eritrocitos sanos por el sistema inmune [224]. La influencia del sexo en la resistencia a *Plasmodium* murino se ha atribuido en varias ocasiones a una mayor eritropoyesis en las hembras que en los machos [225]. En este trabajo se estudió si la gonadectomía afecta la concentración de hemoglobina en machos y hembras infectados con *P. berghei* ANKA. La gonadectomía y por lo tanto, la disminución de esteroides sexuales generó mayor anemia en las hembras que en los machos, lo que sugiere que las hormonas sexuales están involucradas en la eritropoyesis en malaria. Por el contrario, en los ratones machos, no detectamos que la gonadectomía generar diferencias significativas en la concentración de hemoglobina.

Cernetich y colaboradores detectaron tendencias similares a las que obtuvimos en estos experimentos, en un modelo en donde utilizaron *P. chabaudi* en ese estudio la gonadectomía disminuyó la concentración de hemoglobina de las hembras. Cuando se compararon machos intactos y hembras intactas, las hembras presentaron menores concentraciones de hemoglobina que los machos intactos en el día 21 post-infección [220].

Los grupos sham no presentaron diferencias significativas a las des los demás grupos.

Parasitemia

Evaluar la parasitemia en los ratones gonadectomizados permite determinar si las hormonas sexuales influyen en la proliferación del parásito, dado que los estrógenos son antioxidantes y la eliminación de los plasmodios se ha asociado a la presencia de especies reactivas del nitrógeno y del oxígeno, el disminuir el efecto antioxidante del estradiol por la gonadectomía debería afectar el porcentaje de parasitemia. Para analizar esta posibilidad, todos los grupos de ratones machos y hembras (sham, Gx e intactos) se infectaron con *P. berghei* ANKA y a partir del día 4 post infección se evaluó la parasitemia.

La gonadectomía en las hembras aumentó la parasitemia significativamente a lo largo de la infección, mientras que en los machos las parasitemias fueron similares durante la infección entre los grupos Gx e intactos, sin embargo, el día 8 post-infección la parasitemia

se incremento en el grupo de machos intactos en comparación con el Gx y en los días 8 y 9 post-infección el grupo sham presento menor parasitemia que los intactos.

Cernetich y colaboradores han descrito que la gonadectomía incrementa la parasitemia tanto en los machos como en las hembras y que los machos intactos presentan mayores parasitemias que las hembras [220], en el presente estudio la gonadectomía incrementó la parasitemia de las hembras pero disminuyó la de los machos, el grupo de machos intactos desarrolló mayores parasitemias que las hembras intactas, nuestros resultados difieren a los publicados por este grupo, en los machos gonadectomizados, ya que en nuestro estudio la gonadectomía disminuyó la parasitemia en los machos (día 8 post-infección), una probable explicación a esta diferencia es que la testosterona tiene actividad inmunosupresora [204], por lo que es probable que los ratones intactos al tener una mayor concentración de testosterona desarrollaron mayores parasitemias. Acorde con lo anterior, se ha descrito que los ratones tratados con testosterona e infectados con *P. chabaudi* desarrollaron mayores parasitemias que su grupo control [226]. Por otra parte el grupo sham en los machos en los 2 ultimos días de la infección presento menores parasitemias lo cual pareciera contradictorio pero algunos estudios han descrito que el cortisol que es una hormona que se libera entre otras situaciones por someterse a estrés inhibe la producción de testosterona [227], es probable que debido a ello el grupo sham presente menores parasitemias la final de la infección ya que el proceso de cirugía provoco en este grupo un estrés importante y por consiguiente la liberación de corticosteroides.

Citocinas

En la respuesta inmune contra el *Plasmodium*, se activan ambos tipos de respuestas: la pro-inflamatoria que se caracteriza por el incremento de la expresión de citocinas tipo Th1 como TNF- α e IFN- γ , así como una respuesta anti-inflamatoria tipo Th2, en donde se aumenta la expresión de citocinas como la IL-10 y el TGF- β . Ambos tipos de respuestas se requieren para controlar y eliminar las infecciones provocadas por *P. chabaudi* AS [228], también el momento y la magnitud de la producción de citocinas son factores cruciales que pueden influir en la resolución de la infección [229]. Para evaluar si las hormonas sexuales modulan la expresión de estos genes en la infección que causa el *Plasmodium*, en este trabajo se estudió si la gonadectomía modificaba los niveles de expresión de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α e IFN- γ así como de las citocinas anti-inflamatorias IL-10 y TGF- β en ratones CBA/Ca intactos y gonadectomizados de ambos sexos e infectados con *P. berghei* ANKA, para ello en el día 9 post infección con el *Plasmodium*, se extrajo el ARN mensajero de bazo, se retrotranscribió para obtener el DNAc y se amplificaron por PCR en

tiempo real los genes de las citocinas: IFN- γ , TNF- α , TGF- β e IL-10 en el día 9 post-infección.

INF- γ

El INF- γ es una citocina pro-inflamatoria involucrada en la eliminación del parásito [35]. Se ha descrito que las poblaciones de leucocitos disminuyen en ratones tratados con testosterona después de la infección con *P. berghei* ANKA [12] y por lo tanto al realizar la gonadectomía en ratones machos se esperaría un incremento de los niveles de INF- γ .

Por otra parte se ha demostrado que en la infección con *P. chabaudi* AS la gonadectomía en los machos incrementa la expresión de INF- γ mientras que en las hembras la disminuyó [216].

Nuestros resultados no coinciden con los publicados por Certnetich y colaboradores, para las hembras pero si con lo que describieron para los machos, en donde la gonadectomía disminuyó la expresión de INF- γ en las hembras, pero la incrementó en los machos, es probable que estas diferencias se deban a que se utilizaron cepas de parásito y de ratón diferentes. Certnetich utilizó la infección con *P. chabaudi* en ratones C57BL/6 y el día post-infección en que se realizó la determinación también fue diferente. Interesantemente, el grupo sham en ambos sexos presentó los valores más altos en la expresión de esta citocina, es probable que esto se deba a que la inflamación producida durante la cirugía influya en la expresión de INF- γ ya que algunos autores han descrito el efecto inmunosupresor tanto de la testosterona [12] como de los corticosteroides [227], pero también se ha descrito que estas dos hormonas se inhiben entre ellas por lo cual es probable que al inhibirse estas dos hormonas inmunosupresoras [227] exista una mayor expresión de esta citocina pro-inflamatoria.

TNF- α

Se ha descrito que el estradiol tiene un efecto dual en la secreción de TNF- α , en concentraciones bajas potencia su producción, mientras que a dosis altas la inhibe [223, 224]. Además, el estradiol puede tener actividad pro- o anti-inflamatoria si la concentración es baja o alta, respectivamente [230].

Por otro lado, la testosterona a concentraciones fisiológicas actúa sobre los macrófagos, inhibiendo la producción de TNF- α [231].

En este trabajo la gonadectomía incrementó la expresión de TNF- α en los ratones de ambos sexos, en las hembras el incremento resultó significativo, lo que concuerda con lo descrito en la literatura [223, 224] en donde las concentraciones bajas de estradiol

promueven una respuesta tipo Th1 y la actividad inmunosupresora de la testosterona se inhibió al extraer las gónadas, lo que mejora la expresión de TNF- α . Interesantemente, la gonadectomía por si sola aumento la expresión de TNF- α en ambos sexos esto podría explicarse por el efecto inflamatorio que genera la cirugía.

TGF- β

El TGF- β es una citocina que regula negativamente la patogénesis causada por citocinas pro-inflamatorias, ya que suprime la producción de INF- γ , TNF- α y de las especies reactivas de oxígeno [154, 155], es una citocina fundamental en la resolución de la malaria [99]. Se ha descrito que la expresión de citocinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF- β es más alta en las hembras que en los machos y se ha sugerido que esto depende de las hormonas sexuales [232]. Además, se ha descrito que la testosterona incrementa la expresión de TGF- β [233], por otra parte la relación entre los estrógenos y el TGF- β sigue siendo materia de controversia ya que algunos autores han descrito que los estrógenos tienen la habilidad de inhibir su producción [234], mientras que otros informaron que el estradiol incrementa su expresión [235]. Nuestros resultados sugieren un papel antagonico por parte de las hormonas sexuales femeninas en la expresión de TGF- β ya que la gonadectomia incrementa su expresión, sin embargo el grupo sham también presento valores más altos con respecto del intacto por lo cual es difícil determinar si esta diferencia es debida a las hormonas sexuales únicamente o a que el organismo intenta neutralizar el efecto inflamatorio de la cirugía. En los machos intactos y Gx no se observaron cambios. El grupo sham fue el que tuvo la expresión más alta de esta citocina lo cual sugiere que la cirugía por si sola incrementa su expresión. Por otra parte no se detectó diferencia significativa entre machos y hembras intactos.

IL-10

La IL-10 es una citocina inmunoreguladora, durante la infección con *Plasmodium* reduce la expresión excesiva de citocinas tipo Th1 (TNF- α e INF- γ) que se asocian con la inmunopatología de la malaria [236, 237].

Se ha descrito que las hembras de muchas especies presentan un perfil de citocinas tipo Th2 [195], lo que daría como resultado una mayor producción de citocinas anti-inflamatorias como IL-10 e IL-6 y esto podría relacionarse con las circulación de hormonas esteroides, ya que el estradiol tiene un efecto directo en la secreción de citocinas, particularmente IL-10 se ha asociado con la inhibición de TNF- α [238].

En el presente estudio no se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos estudiados, pero observamos que la gonadectomía aumento la expresión de IL-10 en las hembras mientras que no la modifico en los machos el grupo sham de los machos fue el que tuvo la expresión más alta de esta citocina y entre machos intactos y gonadectomizados los valores fueron similares.

En el presente estudio la ovariectomía incremento la expresión de todas las citocinas estudiadas y lo hizo de manera significativa para las citocinas pro-inflamatorias (INF- α y TNF- γ), algunos autores han descrito que el estradiol puede disminuir [239] o aumentar [240] la expresión de INF- γ , por otra parte, también se ha descrito que la progesterona puede mejorar [241] o inhibir [242] la producción de TNF- α , nuestros resultados sugieren que las hormonas sexuales femeninas regulan negativamente la expresión de estas citocinas en los ratones infectados con *P. berghei* ANKA ya que al extraer las gónadas y por tanto la fuente primaria de las hormonas femeninas, se incrementaron los niveles de expresión de estas citocinas. Además, las hembras presentaron menor sobrevida, mayor pérdida de peso, mayores parasitemias y menores concentraciones de hemoglobina, este hallazgo se podría explicar porque si bien las citocinas pro-inflamatorias son necesarias para activar a la respuesta inmune y eliminar al parásito, no obstante, su expresión exacerbada sin una adecuada regulación por parte de las citocinas tipo Th2 (TGF- β e IL-10) genera patología severa en la infección con *Plasmodio* e inclusive puede causar la muerte. La ovariectomía incremento de manera significativa la expresión de TNF- α , esta citocina ocasiona la caquexia o pérdida de peso [243], además también se ha asociado con el desarrollo de anemia, que es una de las complicaciones más relevantes en la malaria, puesto que el TNF- α activa a los macrófagos para fagocitar eritrocitos [244] y al haber mayor pérdida de peso y mayor anemia hay una menor sobrevida en este grupo. Se ha demostrado que el INF- γ es necesario para generar protección en malaria tanto en la etapa hepática como en la sanguínea. Sin embargo, los niveles elevados de esta citocina también pueden generar patología, en el presente trabajo detectamos que las ratonas gonadectomizadas desarrollaron un incremento significativo en la expresión de las citocinas pro-inflamatorias (INF- γ y TNF- α) y aunque también incrementaron la expresión de las citocinas anti-inflamatorias (TGF- β e IL-10) la diferencia con respecto al grupo control no resultó significativa, por lo cual en las hembras gonadectomizadas no se reguló adecuadamente la respuesta inflamatoria, lo que generó patologías graves como la anemia y la caquexia en la infección con *P. berghei* ANKA.

Por otra parte la orquiectomía incremento la expresión de la citocinas INF- γ , TNF- α y TGF- β , pero no modifico la expresión de IL-10 y el incremento solo fue significativo para

INF- γ , este grupo de ratones comenzó a morir antes que los intactos y presento menores parasitemias, pero no tuvo diferencias en las concentraciones de hemoglobina y la pérdida de peso, es probable que al incrementarse la expresión de INF- γ por la gonadectomía la eliminación del parásito se dio de forma más eficaz por lo cual presentaron menores parasitemias, en cuanto los otros parámetros de patología no detectamos diferencias significativas. Es importante señalar que la gonadectomía tanto en machos como en hembras incrementó la expresión de las citocinas y que en ambos sexos al realizar la extracción de las gónadas se presentaron mayores complicaciones en la infección con *P. berghei* ANKA.

Los grupos sham tanto de los machos como de las hembras se comportaron diferente a su grupo intacto, esto sugiere que la cirugía por si sola, es decir sin extirpar los ovarios también tuvo un efecto importante en la modulación de la respuesta inmune y en los diversos parámetros asociados a la patología que se estudiaron en esta investigación. Una probable explicación a este fenómeno es que durante la cirugía se generó un proceso inflamatorio muy importante, durante el cual actúan una serie de moléculas que están relacionadas no solo con el sistema inmune sino entre ellas, por ejemplo; durante la cirugía se produce un estrés muy importante y los radicales libres producidos durante la malaria son importantes para regular la respuesta inmune, de la misma forma durante este proceso se liberan cantidades importantes de corticosteroides y estas moléculas están relacionadas directamente con los procesos de inflamación, inmunológicos y con las hormonas sexuales masculinas y femeninas. Es probable que debido a todos estos fenómenos se detectaron diferencias entre dichos grupos.

11. Conclusiones

La ovariectomía en las ratonas CBA/Ca disminuyó la sobrevivencia, el peso corporal, la concentración de hemoglobina y aumentó la parasitemia durante la infección con *P. berghei* ANKA en relación al grupo de ratonas intactas. Además también incremento la expresión de todas las citocinas.

La orquiectomía disminuyó la sobrevivencia y la parasitemia, pero no afecto el peso corporal ni la concentración de hemoglobina durante la infección con *P. berghei* ANKA, la orquiectomía también incrementó la expresión de INF- γ , TNF- α y TGF- β pero no afecto los niveles de expresión de IL-10.

Nuestros resultados demuestran que las hormonas sexuales participan en el dimorfismo sexual en malaria puesto que la gonadectomía afectó más a las hembras que a los machos quienes presentaron resultados muy parecidos al de los intactos. Además, la gonadectomía también modificó de forma diferencial la expresión de genes involucrados en la respuesta inmune e impactó más a las hembras que a los machos.

Además de las hormonas sexuales, también existen otros factores que están involucrados en el dimorfismo sexual que se presenta en malaria.

La mayoría de los estudios en roedores se han realizado en diferentes modelos experimentales, por lo cual es difícil comparar nuestros resultados con los ya publicados.

12. Referencias bibliográficas

1. Snow, R.W., et al., *The global distribution of clinical episodes of Plasmodium falciparum malaria*. Nature, 2005. **434**(7030): p. 214-7.
2. Good, M.F., *Vaccine-induced immunity to malaria parasites and the need for novel strategies*. Trends Parasitol, 2005. **21**(1): p. 29-34.
3. Engwerda, C.R. and M.F. Good, *Interactions between malaria parasites and the host immune system*. Curr Opin Immunol, 2005. **17**(4): p. 381-7.
4. Taylor-Robinson, A.W., et al., *The role of TH1 and TH2 cells in a rodent malaria infection*. Science, 1993. **260**(5116): p. 1931-4.
5. Barañao, R.I., *Hormonas sexuales y respuesta inmunológica*. Revista SAEGRE, 2009. **16**(2): p. 20-30.
6. Wildling, E., et al., *Malaria epidemiology in the province of Moyen Ogoov, Gabon*. Trop Med Parasitol, 1995. **46**(2): p. 77-82.
7. Landgraf, B., et al., *Parasite density of Plasmodium falciparum malaria in Ghanaian schoolchildren: evidence for influence of sex hormones?* Trans R Soc Trop Med Hyg, 1994. **88**(1): p. 73-4.
8. Benten, W.P., F. Wunderlich, and H. Mossmann, *Testosterone-induced suppression of self-healing Plasmodium chabaudi malaria: an effect not mediated by androgen receptors?* J Endocrinol, 1992. **135**(3): p. 407-13.
9. Benten, W.P., et al., *Testosterone-induced compared with oestradiol-induced immunosuppression against Plasmodium chabaudi malaria*. J Endocrinol, 1993. **139**(3): p. 487-94.
10. Wunderlich, F., et al., *Testosterone and other gonadal factor(s) restrict the efficacy of genes controlling resistance to Plasmodium chabaudi malaria*. Parasite Immunol, 1991. **13**(4): p. 357-67.
11. Zhang, Z., et al., *Possible modulation by male sex hormone of Th1/Th2 function in protection against Plasmodium chabaudi chabaudi AS infection in mice*. Exp Parasitol, 2000. **96**(3): p. 121-9.
12. Kamis, A.B. and J.B. Ibrahim, *Effects of testosterone on blood leukocytes in plasmodium berghei-infected mice*. Parasitol Res, 1989. **75**(8): p. 611-3.

13. Barthelemy, M., et al., *Oestrus cycle perturbations and hypotrophy of clitoral glands in malaria-infected female BALB/c mice*. Parasitol Res, 2003. **89**(2): p. 134-40.
14. Kitay, J.I., *Enhancement of steroidogenesis by rat adrenal slices in vitro with estradiol-17-beta*. Nature, 1961. **192**: p. 358-9.
15. Klein, S.L., *The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior*. Neurosci Biobehav Rev, 2000. **24**(6): p. 627-38.
16. Organization, W.H., 2009.
17. Phillips, R.S., *Current status of malaria and potential for control*. Clin Microbiol Rev, 2001. **14**(1): p. 208-26.
18. Rodriguez, D.J., *“las enfermedades transmitidas por vector en México”*. Rev Fac Med, 2002. **3**(45): p. 126-141.
19. Organization, W.H., 2011.
20. Betanzos-Reyes, A.F., *La malaria en México. progresos y desafíos hacia su eliminación*. Bol Med Hosp Infant Mex, 2011. **68**: p. 159-168.
21. Jimenez, J.R., *Infectología clínica*. editorial el manual moderno, 2008. **1ª edición** p. 325-333.
22. Biagi, F., *Enfermedades parasitarias*. editorial fournier, 1976. **2ª edición**: p. 159-170.
23. Killick-Kendrick, R., *Taxonomy, Zoography and Evolution*. Rodent Malaria, 1978: p. 1-52.
24. Stephens, R., R.L. Culleton, and T.J. Lamb, *The contribution of Plasmodium chabaudi to our understanding of malaria*. Trends Parasitol, 2012. **28**(2): p. 73-82.
25. Carlton, J.M., et al., *Of mice and malaria mutants: unravelling the genetics of drug resistance using rodent malaria models*. Trends Parasitol, 2001. **17**(5): p. 236-42.
26. Craig, A.G., et al., *The role of animal models for research on severe malaria*. PLoS Pathog, 2012. **8**(2): p. e1002401.
27. Guttery, D.S., A.A. Holder, and R. Tewari, *Sexual development in Plasmodium: lessons from functional analyses*. PLoS Pathog, 2012. **8**(1): p. e1002404.
28. Khan, S.M., et al., *Proteome analysis of separated male and female gametocytes reveals novel sex-specific Plasmodium biology*. Cell, 2005. **121**(5): p. 675-87.
29. Carter, R. and C.L. Diggs, *Plasmodia of rodents*. Parasitic Protozoa, 1977. **3**: p. 359-465.
30. Romero-Cabello, R., *Microbiología y parasitología humana bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. editorial medica panamericana, 2007. **3ª edición**: p. 1439-1454.
31. Cohen, J. and W.G. Powderly, *Infectious disease*. Mosby, 2004. **5**: p. 1579–1591.
32. Mandell, B.D., *Principles and Practice of Infectious Disease*. Elsevier., 2005: p. 3121-3138.
33. Stevenson, M.M. and E.M. Riley, *Innate immunity to malaria*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(3): p. 169-80.
34. McCall, M.B. and R.W. Sauerwein, *Interferon-gamma--central mediator of protective immune responses against the pre-erythrocytic and blood stage of malaria*. J Leukoc Biol, 2010. **88**(6): p. 1131-43.
35. Langhorne, J., et al., *Dendritic cells, pro-inflammatory responses, and antigen presentation in a rodent malaria infection*. Immunol Rev, 2004. **201**: p. 35-47.
36. Artavanis-Tsakonas, K., J.E. Tongren, and E.M. Riley, *The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology*. Clin Exp Immunol, 2003. **133**(2): p. 145-52.
37. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 767-811.

38. Mellman, I. and R.M. Steinman, *Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines*. Cell, 2001. **106**(3): p. 255-8.
39. Rescigno, M. and P. Borrow, *The host-pathogen interaction: new themes from dendritic cell biology*. Cell, 2001. **106**(3): p. 267-70.
40. Urban, B.C., N. Willcox, and D.J. Roberts, *A role for CD36 in the regulation of dendritic cell function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(15): p. 8750-5.
41. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
42. Sallusto, F., et al., *Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products*. J Exp Med, 1995. **182**(2): p. 389-400.
43. De Smedt, T., et al., *Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo*. J Exp Med, 1996. **184**(4): p. 1413-24.
44. Fontecha, M.A., et al., *Regulation of Dendritic Cell Migration to the Draining Lymph Node Impact on T Lymphocyte Traffic and Priming*. J Exp Med, 2003. **4**: p. 615-621.
45. Moser, M. and K.M. Murphy, *Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development*. Nat Immunol, 2000. **1**(3): p. 199-205.
46. Kapsenberg, M.L., *Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(12): p. 984-93.
47. Sidjanski, S. and J.P. Vanderberg, *Delayed migration of Plasmodium sporozoites from the mosquito bite site to the blood*. Am J Trop Med Hyg, 1997. **57**(4): p. 426-9.
48. Yamauchi, L.M., et al., *Plasmodium sporozoites trickle out of the injection site*. Cell Microbiol, 2007. **9**(5): p. 1215-22.
49. Vanderberg, J.P. and U. Frevort, *Intravital microscopy demonstrating antibody-mediated immobilisation of Plasmodium berghei sporozoites injected into skin by mosquitoes*. Int J Parasitol, 2004. **34**(9): p. 991-6.
50. Amino, R., et al., *Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal*. Nat Med, 2006. **12**(2): p. 220-4.
51. Amino, R., et al., *Host cell traversal is important for progression of the malaria parasite through the dermis to the liver*. Cell Host Microbe, 2008. **3**(2): p. 88-96.
52. Perry, J.A., et al., *Dendritic cells from malaria-infected mice are fully functional APC*. J Immunol, 2004. **172**(1): p. 475-82.
53. Plebanski, M., et al., *Direct processing and presentation of antigen from malaria sporozoites by professional antigen-presenting cells in the induction of CD8 T-cell responses*. Immunol Cell Biol, 2005. **83**(3): p. 307-12.
54. Jung, S., et al., *In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens*. Immunity, 2002. **17**(2): p. 211-20.
55. Quin, S.J. and J. Langhorne, *Different regions of the malaria merozoite surface protein 1 of Plasmodium chabaudi elicit distinct T-cell and antibody isotype responses*. Infect Immun, 2001. **69**(4): p. 2245-51.
56. Kumaratilake, L.M. and A. Ferrante, *Opsonization and phagocytosis of Plasmodium falciparum merozoites measured by flow cytometry*. Clin Diagn Lab Immunol, 2000. **7**(1): p. 9-13.
57. Kumaratilake, L.M., et al., *Enhancement of neutrophil-mediated killing of Plasmodium falciparum asexual blood forms by fatty acids: importance of fatty acid structure*. Infect Immun, 1997. **65**(10): p. 4152-7.
58. Giribaldi, T., et al., *Mechanisms of band 3 oxidation and clustering in the phagocytosis of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes*. Redox Rep, 2003. **8**: p. 300-303.

59. Urban, B.C., et al., *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. *Nature*, 1999. **400**(6739): p. 73-7.
60. Bruna-Romero, O. and A. Rodriguez, *Dendritic cells can initiate protective immune responses against malaria*. *Infect Immun*, 2001. **69**(8): p. 5173-6.
61. Ocana-Morgner, C., M.M. Mota, and A. Rodriguez, *Malaria blood stage suppression of liver stage immunity by dendritic cells*. *J Exp Med*, 2003. **197**(2): p. 143-51.
62. Luyendyk, J., et al., *Antigen-presenting cell function during Plasmodium yoelii infection*. *Infect Immun*, 2002. **70**(6): p. 2941-9.
63. Langhorne, J., S.J. Quin, and L.A. Sanni, *Mouse models of blood-stage malaria infections: immune responses and cytokines involved in protection and pathology*. *Chem Immunol*, 2002. **80**: p. 204-28.
64. Hafalla, J.C., O. Silvie, and K. Matuschewski, *Cell biology and immunology of malaria*. *Immunol Rev*, 2011. **240**(1): p. 297-316.
65. Schofield, L., et al., *Gamma interferon, CD8+ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites*. *Nature*, 1987. **330**(6149): p. 664-6.
66. Weiss, W.R., et al., *CD8+ T cells (cytotoxic/suppressors) are required for protection in mice immunized with malaria sporozoites*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(2): p. 573-6.
67. Sano, G., et al., *Swift development of protective effector functions in naive CD8(+) T cells against malaria liver stages*. *J Exp Med*, 2001. **194**(2): p. 173-80.
68. Chakravarty, S., et al., *CD8+ T lymphocytes protective against malaria liver stages are primed in skin-draining lymph nodes*. *Nat Med*, 2007. **13**(9): p. 1035-41.
69. Hafalla, J.C., et al., *Short-term antigen presentation and single clonal burst limit the magnitude of the CD8(+) T cell responses to malaria liver stages*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(18): p. 11819-24.
70. Lundie, R.J., et al., *Blood-stage Plasmodium infection induces CD8+ T lymphocytes to parasite-expressed antigens, largely regulated by CD8alpha+ dendritic cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(38): p. 14509-14.
71. Miyakoda, M., et al., *Malaria-specific and nonspecific activation of CD8+ T cells during blood stage of Plasmodium berghei infection*. *J Immunol*, 2008. **181**(2): p. 1420-8.
72. Legorreta-Herrera, M., et al., *Nitric oxide is involved in the upregulation of IFN-gamma and IL-10 mRNA expression by CD8(+) T cells during the blood stages of P. chabaudi AS infection in CBA/Ca mice*. *Int J Biol Sci*, 2011. **7**(9): p. 1401-11.
73. Imai, T., et al., *Involvement of CD8+ T cells in protective immunity against murine blood-stage infection with Plasmodium yoelii 17XL strain*. *Eur J Immunol*, 2010. **40**(4): p. 1053-61.
74. Chandele, A., et al., *Phenotypic and functional profiling of malaria-induced CD8 and CD4 T cells during blood-stage infection with Plasmodium yoelii*. *Immunology*, 2011. **132**(2): p. 273-86.
75. Langhorne, J., et al., *A role for B cells in the development of T cell helper function in a malaria infection in mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(4): p. 1730-4.
76. von der Weid, T. and J. Langhorne, *Altered response of CD4+ T cell subsets to Plasmodium chabaudi chabaudi in B cell-deficient mice*. *Int Immunol*, 1993. **5**(10): p. 1343-8.
77. van der Heyde, H.C., et al., *The resolution of acute malaria in a definitive model of B cell deficiency, the JHD mouse*. *J Immunol*, 1994. **152**(9): p. 4557-62.
78. Jarra, W., et al., *Protective immunity to malaria. Studies with cloned lines of Plasmodium chabaudi chabaudi and P. berghei in CBA/Ca mice. II. The effectiveness and inter- or intra-species specificity of the passive transfer of immunity with serum*. *Parasite Immunol*, 1986. **8**(3): p. 239-54.

79. Cohen, S., G.I. Mc, and S. Carrington, *Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria*. Nature, 1961. **192**: p. 733-7.
80. Gatto, D., et al., *Regulation of memory antibody levels: the role of persisting antigen versus plasma cell life span*. J Immunol, 2007. **178**(1): p. 67-76.
81. Zinkernagel, R.M. and H. Hengartner, *Protective 'immunity' by pre-existent neutralizing antibody titers and preactivated T cells but not by so-called 'immunological memory'*. Immunol Rev, 2006. **211**: p. 310-9.
82. Bernasconi, N.L., E. Traggiai, and A. Lanzavecchia, *Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells*. Science, 2002. **298**(5601): p. 2199-202.
83. Bernasconi, N.L., N. Onai, and A. Lanzavecchia, *A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells*. Blood, 2003. **101**(11): p. 4500-4.
84. Crompton, P.D., et al., *The TLR9 ligand CpG promotes the acquisition of Plasmodium falciparum-specific memory B cells in malaria-naive individuals*. J Immunol, 2009. **182**(5): p. 3318-26.
85. Cavanagh, D.R., et al., *A longitudinal study of type-specific antibody responses to Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 in an area of unstable malaria in Sudan*. J Immunol, 1998. **161**(1): p. 347-59.
86. Aribot, G., et al., *Pattern of immunoglobulin isotype response to Plasmodium falciparum blood-stage antigens in individuals living in a holoendemic area of Senegal (Dielmo, west Africa)*. Am J Trop Med Hyg, 1996. **54**(5): p. 449-57.
87. Fonjungo, P.N., et al., *A longitudinal study of human antibody responses to Plasmodium falciparum rhoptry-associated protein 1 in a region of seasonal and unstable malaria transmission*. Infect Immun, 1999. **67**(6): p. 2975-85.
88. Fruh, K., et al., *Human antibody response to the major merozoite surface antigen of Plasmodium falciparum is strain specific and short-lived*. Infect Immun, 1991. **59**(4): p. 1319-24.
89. Giha, H.A., et al., *Nine-year longitudinal study of antibodies to variant antigens on the surface of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes*. Infect Immun, 1999. **67**(8): p. 4092-8.
90. Soares, I.S., et al., *Antibody response to the N and C-terminal regions of the Plasmodium vivax Merozoite Surface Protein 1 in individuals living in an area of exclusive transmission of P. vivax malaria in the north of Brazil*. Acta Trop, 1999. **72**(1): p. 13-24.
91. Pearson, C.D., et al., *Induction of secondary antibody responses to Plasmodium chabaudi in vitro*. Clin Exp Immunol, 1983. **52**(1): p. 121-8.
92. Favre, N., et al., *The course of Plasmodium chabaudi chabaudi infections in interferon-gamma receptor deficient mice*. Parasite Immunol, 1997. **19**(8): p. 375-83.
93. Stevenson, M.M., et al., *IL-12-induced protection against blood-stage Plasmodium chabaudi AS requires IFN-gamma and TNF-alpha and occurs via a nitric oxide-dependent mechanism*. J Immunol, 1995. **155**(5): p. 2545-56.
94. Jacobs, P., D. Radzioch, and M.M. Stevenson, *In vivo regulation of nitric oxide production by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon, but not by interleukin-4, during blood stage malaria in mice*. Infect Immun, 1996. **64**(1): p. 44-9.
95. Rockett, K.A., et al., *Killing of Plasmodium falciparum in vitro by nitric oxide derivatives*. Infect Immun, 1991. **59**(9): p. 3280-3.
96. Bakir, H.Y., C. Tomiyama, and T. Abo, *Cytokine profile of murine malaria: stage-related production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines*. Biomed Res, 2011. **32**(3): p. 203-8.

97. Taylor-Robinson, A.W., *Regulation of immunity to malaria: valuable lessons learned from murine models*. Parasitol Today, 1995. **11**(9): p. 334-42.
98. Ho, M., et al., *Interleukin-10 inhibits tumor necrosis factor production but not antigen-specific lymphoproliferation in acute Plasmodium falciparum malaria*. J Infect Dis, 1995. **172**(3): p. 838-44.
99. Engwerda, C., et al., *Experimental models of cerebral malaria*. Curr Top Microbiol Immunol, 2005. **297**: p. 103-43.
100. Anstey, N.M., et al., *Nitric oxide in Tanzanian children with malaria: inverse relationship between malaria severity and nitric oxide production/nitric oxide synthase type 2 expression*. J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 557-67.
101. Schroder, K., et al., *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(2): p. 163-89.
102. Behr, C. and P. Dubois, *Preferential expansion of V gamma 9 V delta 2 T cells following stimulation of peripheral blood lymphocytes with extracts of Plasmodium falciparum*. Int Immunol, 1992. **4**(3): p. 361-6.
103. Goodier, M., et al., *Human peripheral blood gamma delta T cells respond to antigens of Plasmodium falciparum*. Int Immunol, 1992. **4**(1): p. 33-41.
104. Jones, S.M., M.R. Goodier, and J. Langhorne, *The response of gamma delta T cells to Plasmodium falciparum is dependent on activated CD4+ T cells and the recognition of MHC class I molecules*. Immunology, 1996. **89**(3): p. 405-12.
105. Hensmann, M. and D. Kwiatkowski, *Cellular basis of early cytokine response to Plasmodium falciparum*. Infect Immun, 2001. **69**(4): p. 2364-71.
106. D'Ombra, M.C., et al., *gammadelta-T cells expressing NK receptors predominate over NK cells and conventional T cells in the innate IFN-gamma response to Plasmodium falciparum malaria*. Eur J Immunol, 2007. **37**(7): p. 1864-73.
107. Behr, C., et al., *Plasmodium falciparum stimuli for human gammadelta T cells are related to phosphorylated antigens of mycobacteria*. Infect Immun, 1996. **64**(8): p. 2892-6.
108. Pichyangkul, S., et al., *Activation of gammadelta T cells in malaria: interaction of cytokines and a schizont-associated Plasmodium falciparum antigen*. J Infect Dis, 1997. **176**(1): p. 233-41.
109. Rzepczyk, C.M., et al., *Experimental human Plasmodium falciparum infections: longitudinal analysis of lymphocyte responses with particular reference to gamma delta T cells*. Scand J Immunol, 1996. **43**(2): p. 219-27.
110. Waterfall, M., A. Black, and E. Riley, *Gammadelta+ T cells preferentially respond to live rather than killed malaria parasites*. Infect Immun, 1998. **66**(5): p. 2393-8.
111. Artavanis-Tsakonas, K. and E.M. Riley, *Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live Plasmodium falciparum-infected erythrocytes*. J Immunol, 2002. **169**(6): p. 2956-63.
112. Gessani, S. and F. Belardelli, *IFN-gamma expression in macrophages and its possible biological significance*. Cytokine Growth Factor Rev, 1998. **9**(2): p. 117-23.
113. Frucht, D.M., et al., *IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge*. Trends Immunol, 2001. **22**(10): p. 556-60.
114. Buchmeier, N.A. and R.D. Schreiber, *Requirement of endogenous interferon-gamma production for resolution of Listeria monocytogenes infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(21): p. 7404-8.
115. Huang, S., et al., *Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor*. Science, 1993. **259**(5102): p. 1742-5.

116. van den Broek, M.F., et al., *Immune defence in mice lacking type I and/or type II interferon receptors*. *Immunol Rev*, 1995. **148**: p. 5-18.
117. Murray, H.W., B.Y. Rubin, and C.D. Rothermel, *Killing of intracellular Leishmania donovani by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine*. *J Clin Invest*, 1983. **72**(4): p. 1506-10.
118. Torrico, F., et al., *Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute Trypanosoma cruzi infection in mice*. *J Immunol*, 1991. **146**(10): p. 3626-32.
119. Schariton-Kersten, T.M., et al., *In the absence of endogenous IFN-gamma, mice develop unimpaired IL-12 responses to Toxoplasma gondii while failing to control acute infection*. *J Immunol*, 1996. **157**(9): p. 4045-54.
120. Nussler, A.K., et al., *In vivo induction of the nitric oxide pathway in hepatocytes after injection with irradiated malaria sporozoites, malaria blood parasites or adjuvants*. *Eur J Immunol*, 1993. **23**(4): p. 882-7.
121. Seguin, M.C., et al., *Induction of nitric oxide synthase protects against malaria in mice exposed to irradiated Plasmodium berghei infected mosquitoes: involvement of interferon gamma and CD8+ T cells*. *J Exp Med*, 1994. **180**(1): p. 353-8.
122. Tsuji, M., et al., *Development of antimalaria immunity in mice lacking IFN-gamma receptor*. *J Immunol*, 1995. **154**(10): p. 5338-44.
123. Ockenhouse, C.F., S. Schulman, and H.L. Shear, *Induction of crisis forms in the human malaria parasite Plasmodium falciparum by gamma-interferon-activated, monocyte-derived macrophages*. *J Immunol*, 1984. **133**(3): p. 1601-8.
124. Shear, H.L., et al., *Role of IFN-gamma in lethal and nonlethal malaria in susceptible and resistant murine hosts*. *J Immunol*, 1989. **143**(6): p. 2038-44.
125. Su, Z. and M.M. Stevenson, *Central role of endogenous gamma interferon in protective immunity against blood-stage Plasmodium chabaudi AS infection*. *Infect Immun*, 2000. **68**(8): p. 4399-406.
126. Yoneto, T., et al., *A critical role of Fc receptor-mediated antibody-dependent phagocytosis in the host resistance to blood-stage Plasmodium berghei XAT infection*. *J Immunol*, 2001. **166**(10): p. 6236-41.
127. Su, Z., et al., *Opsonin-independent phagocytosis: an effector mechanism against acute blood-stage Plasmodium chabaudi AS infection*. *J Infect Dis*, 2002. **186**(9): p. 1321-9.
128. Naotunne, T.S., et al., *Cytokines kill malaria parasites during infection crisis: extracellular complementary factors are essential*. *J Exp Med*, 1991. **173**(3): p. 523-9.
129. McCall, M.B., et al., *Plasmodium falciparum infection causes proinflammatory priming of human TLR responses*. *J Immunol*, 2007. **179**(1): p. 162-71.
130. Adegnik, A.A., et al., *Pregnancy-associated malaria affects toll-like receptor ligand-induced cytokine responses in cord blood*. *J Infect Dis*, 2008. **198**(6): p. 928-36.
131. Hartgers, F.C., et al., *Enhanced Toll-like receptor responsiveness associated with mitogen-activated protein kinase activation in Plasmodium falciparum-infected children*. *Infect Immun*, 2008. **76**(11): p. 5149-57.
132. Franklin, B.S., et al., *Malaria primes the innate immune response due to interferon-gamma induced enhancement of toll-like receptor expression and function*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(14): p. 5789-94.
133. Brustoski, K., et al., *IFN-gamma and IL-10 mediate parasite-specific immune responses of cord blood cells induced by pregnancy-associated Plasmodium falciparum malaria*. *J Immunol*, 2005. **174**(3): p. 1738-45.

134. Bouharoun-Tayoun, H., et al., *Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of Plasmodium falciparum asexual blood stages*. J Exp Med, 1995. **182**(2): p. 409-18.
135. Winkler, S., et al., *Reciprocal regulation of Th1- and Th2-cytokine-producing T cells during clearance of parasitemia in Plasmodium falciparum malaria*. Infect Immun, 1998. **66**(12): p. 6040-4.
136. Tongren, J.E., et al., *Epitope-specific regulation of immunoglobulin class switching in mice immunized with malarial merozoite surface proteins*. Infect Immun, 2005. **73**(12): p. 8119-29.
137. Bejon, P., et al., *Early gamma interferon and interleukin-2 responses to vaccination predict the late resting memory in malaria-naive and malaria-exposed individuals*. Infect Immun, 2006. **74**(11): p. 6331-8.
138. Todryk, S.M., et al., *Multiple functions of human T cells generated by experimental malaria challenge*. Eur J Immunol, 2009. **39**(11): p. 3042-51.
139. Walther, M., et al., *Innate immune responses to human malaria: heterogeneous cytokine responses to blood-stage Plasmodium falciparum correlate with parasitological and clinical outcomes*. J Immunol, 2006. **177**(8): p. 5736-45.
140. Good, M.F., et al., *Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 69-99.
141. Urban, B.C., R. Ing, and M.M. Stevenson, *Early interactions between blood-stage plasmodium parasites and the immune system*. Curr Top Microbiol Immunol, 2005. **297**: p. 25-70.
142. van der Heyde, H.C., et al., *The time course of selected malarial infections in cytokine-deficient mice*. Exp Parasitol, 1997. **85**(2): p. 206-13.
143. Amani, V., et al., *Involvement of IFN-gamma receptor-mediated signaling in pathology and anti-malarial immunity induced by Plasmodium berghei infection*. Eur J Immunol, 2000. **30**(6): p. 1646-55.
144. Meding, S.J., et al., *Role of gamma interferon during infection with Plasmodium chabaudi chabaudi*. Infect Immun, 1990. **58**(11): p. 3671-8.
145. Stevenson, M.M., et al., *Role of endogenous gamma interferon in host response to infection with blood-stage Plasmodium chabaudi AS*. Infect Immun, 1990. **58**(10): p. 3225-32.
146. Yoneto, T., et al., *Gamma interferon production is critical for protective immunity to infection with blood-stage Plasmodium berghei XAT but neither NO production nor NK cell activation is critical*. Infect Immun, 1999. **67**(5): p. 2349-56.
147. Shaffer, N., et al., *Tumor necrosis factor and severe malaria*. J Infect Dis, 1991. **163**(1): p. 96-101.
148. Jakobsen, P.H., et al., *Increased concentrations of interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist and decreased concentrations of beta-2-glycoprotein I in Gambian children with cerebral malaria*. Infect Immun, 1994. **62**(10): p. 4374-9.
149. McGuire, W., et al., *Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria*. Nature, 1994. **371**(6497): p. 508-10.
150. Wenisch, C., et al., *Plasma levels of the interleukin-6 cytokine family in persons with severe Plasmodium falciparum malaria*. J Infect Dis, 1999. **179**(3): p. 747-50.
151. Lyke, K.E., et al., *Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1beta), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12(p70) in Malian children with*

- severe *Plasmodium falciparum* malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls. *Infect Immun*, 2004. **72**(10): p. 5630-7.
152. Assosian, R.K., et al., *Expression and secretion of type β transforming growth factor by activated human macrophages*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987. **84**: p. 6020–6024.
 153. Wahl, S.M., N. McCartney-Francis, and S.E. Mergenhagen, *Inflammatory and immunomodulatory roles of TGF- β* . *Immunol Today*, 1989. **10**(8): p. 258-61.
 154. Espevik, T., et al., *Inhibition of cytokine production by cyclosporin A and transforming growth factor β* . *J Exp Med*, 1987. **166**(2): p. 571-6.
 155. Ding, A., et al., *Macrophage deactivating factor and transforming growth factors- β 1 - β 2 and - β 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN- γ* . *J Immunol*, 1990. **145**(3): p. 940-4.
 156. Bellone, G., et al., *Regulation of NK cell functions by TGF- β 1*. *J Immunol*, 1995. **155**(3): p. 1066-73.
 157. Omer, F.M. and E.M. Riley, *Transforming growth factor β production is inversely correlated with severity of murine malaria infection*. *J Exp Med*, 1998. **188**(1): p. 39-48.
 158. Stumhofer, J.S., et al., *Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10*. *Nat Immunol*, 2007. **8**(12): p. 1363-71.
 159. Batten, M., et al., *Cutting edge: IL-27 is a potent inducer of IL-10 but not FoxP3 in murine T cells*. *J Immunol*, 2008. **180**(5): p. 2752-6.
 160. Murugaiyan, G., et al., *IL-27 is a key regulator of IL-10 and IL-17 production by human CD4+ T cells*. *J Immunol*, 2009. **183**(4): p. 2435-43.
 161. Maynard, C.L., et al., *Contrasting roles for all-trans retinoic acid in TGF- β -mediated induction of Foxp3 and Il10 genes in developing regulatory T cells*. *J Exp Med*, 2009. **206**(2): p. 343-57.
 162. Murai, M., et al., *Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis*. *Nat Immunol*, 2009. **10**(11): p. 1178-84.
 163. Seki, S., et al., *Role of liver NK cells and peritoneal macrophages in gamma interferon and interleukin-10 production in experimental bacterial peritonitis in mice*. *Infect Immun*, 1998. **66**(11): p. 5286-94.
 164. Roers, A., et al., *T cell-specific inactivation of the interleukin 10 gene in mice results in enhanced T cell responses but normal innate responses to lipopolysaccharide or skin irritation*. *J Exp Med*, 2004. **200**(10): p. 1289-97.
 165. Siewe, L., et al., *Interleukin-10 derived from macrophages and/or neutrophils regulates the inflammatory response to LPS but not the response to CpG DNA*. *Eur J Immunol*, 2006. **36**(12): p. 3248-55.
 166. Sabat, R., et al., *Biology of interleukin-10*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2010. **21**(5): p. 331-44.
 167. Fiorentino, D.F., et al., *IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages*. *J Immunol*, 1991. **147**(11): p. 3815-22.
 168. de Waal Malefyt, R., et al., *Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes*. *J Exp Med*, 1991. **174**(5): p. 1209-20.
 169. D'Andrea, A., et al., *Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells*. *J Exp Med*, 1993. **178**(3): p. 1041-8.

170. Kobayashi, F., et al., *Effects of in vivo administration of anti-IL-10 or anti-IFN-gamma monoclonal antibody on the host defense mechanism against Plasmodium yoelii yoelii infection*. J Vet Med Sci, 2000. **62**(6): p. 583-7.
171. Couper, K.N., et al., *IL-10 from CD4CD25Foxp3CD127 adaptive regulatory T cells modulates parasite clearance and pathology during malaria infection*. PLoS Pathog, 2008. **4**(2): p. e1000004.
172. Omer, F.M., J.B. de Souza, and E.M. Riley, *Differential induction of TGF-beta regulates proinflammatory cytokine production and determines the outcome of lethal and nonlethal Plasmodium yoelii infections*. J Immunol, 2003. **171**(10): p. 5430-6.
173. Clark, I.A. and L.S. Jacobson, *Do babesiosis and malaria share a common disease process?* Ann Trop Med Parasitol, 1998. **92**(4): p. 483-8.
174. Niikura, M., et al., *Coinfection with nonlethal murine malaria parasites suppresses pathogenesis caused by Plasmodium berghei NK65*. J Immunol, 2008. **180**(10): p. 6877-84.
175. Findlay, E.G., et al., *Essential role for IL-27 receptor signaling in prevention of Th1-mediated immunopathology during malaria infection*. J Immunol, 2010. **185**(4): p. 2482-92.
176. Sanni, L.A., et al., *Cerebral edema and cerebral hemorrhages in interleukin-10-deficient mice infected with Plasmodium chabaudi*. Infect Immun, 2004. **72**(5): p. 3054-8.
177. Niikura, M., et al., *IL-10 plays a crucial role for the protection of experimental cerebral malaria by co-infection with non-lethal malaria parasites*. Int J Parasitol, 2010. **40**(1): p. 101-8.
178. Benten, W.P., et al., *Functional testosterone receptors in plasma membranes of T cells*. FASEB J, 1999. **13**(1): p. 123-33.
179. McMurray, R.W., et al., *Differential effects of sex steroids on T and B cells: modulation of cell cycle phase distribution, apoptosis and bcl-2 protein levels*. Pathobiology, 2001. **69**(1): p. 44-58.
180. Kanda, N., T. Tsuchida, and K. Tamaki, *Testosterone inhibits immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells*. Clin Exp Immunol, 1996. **106**(2): p. 410-5.
181. Burger, D. and J.M. Dayer, *Cytokines, acute-phase proteins, and hormones: IL-1 and TNF-alpha production in contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **966**: p. 464-73.
182. Giltay, E.J., et al., *In vivo effects of sex steroids on lymphocyte responsiveness and immunoglobulin levels in humans*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(4): p. 1648-57.
183. Gomez, E., et al., *Hormonal regulation of the secretory IgA (sIgA) system: estradiol- and progesterone-induced changes in sIgA in parotid saliva along the menstrual cycle*. Am J Reprod Immunol, 1993. **29**(4): p. 219-23.
184. Nutik, G. and R.L. Cruess, *Estrogen receptors in bone. An evaluation of the uptake of estrogen into bone cells*. Proc Soc Exp Biol Med, 1974. **146**(1): p. 265-8.
185. Hong, M. and Q. Zhu, *Macrophages are activated by 17beta-estradiol: possible permission role in endometriosis*. Exp Toxicol Pathol, 2004. **55**(5): p. 385-91.
186. Polan, M.L., A. Daniele, and A. Kuo, *Gonadal steroids modulate human monocyte interleukin-1 (IL-1) activity*. Fertil Steril, 1988. **49**(6): p. 964-8.
187. Chiang, K., S. Parthasarathy, and N. Santanam, *Estrogen, neutrophils and oxidation*. Life Sci, 2004. **75**(20): p. 2425-38.
188. Molloy, E.J., et al., *Sex-specific alterations in neutrophil apoptosis: the role of estradiol and progesterone*. Blood, 2003. **102**(7): p. 2653-9.
189. Hou, J. and W.F. Zheng, *Effect of sex hormones on NK and ADCC activity of mice*. Int J Immunopharmacol, 1988. **10**(1): p. 15-22.

190. Hao, S., et al., *Modulation of 17beta-estradiol on the number and cytotoxicity of NK cells in vivo related to MCM and activating receptors*. *Int Immunopharmacol*, 2007. **7**(13): p. 1765-75.
191. Faas, M., et al., *The immune response during the luteal phase of the ovarian cycle: a Th2-type response?* *Fertil Steril*, 2000. **74**(5): p. 1008-13.
192. Agarwal, S.K. and G.D. Marshall, Jr., *Perimenstrual alterations in type-1/type-2 cytokine balance of normal women*. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 1999. **83**(3): p. 222-8.
193. McMurray, R.W., et al., *17-beta-estradiol suppresses IL-2 and IL-2 receptor*. *Cytokine*, 2001. **14**(6): p. 324-33.
194. Le, N., et al., *The effect of beta-estradiol, progesterone and testosterone on the production of human leukocyte derived interferons*. *J Biol Regul Homeost Agents*, 1988. **2**(4): p. 199-204.
195. Giron-Gonzalez, J.A., et al., *Consistent production of a higher TH1:TH2 cytokine ratio by stimulated T cells in men compared with women*. *Eur J Endocrinol*, 2000. **143**(1): p. 31-6.
196. Molineaux, L., et al., *Assessment of insecticidal impact on the malaria mosquito's vectorial capacity, from data on the man-biting rate and age-composition*. *Bull World Health Organ*, 1979. **57**(2): p. 265-74.
197. Benten, W.P., et al., *Testosterone-induced susceptibility to Plasmodium chabaudi malaria: persistence after withdrawal of testosterone*. *J Endocrinol*, 1997. **153**(2): p. 275-81.
198. Wunderlich, F., et al., *Testosterone impairs efficacy of protective vaccination against P. chabaudi malaria*. *Vaccine*, 1993. **11**(11): p. 1097-9.
199. Krucken, J., et al., *Testosterone suppresses protective responses of the liver to blood-stage malaria*. *Infect Immun*, 2005. **73**(1): p. 436-43.
200. Cutolo, M., et al., *Androgen and estrogen receptors are present in primary cultures of human synovial macrophages*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996. **81**(2): p. 820-7.
201. Roberts, C.W., W. Walker, and J. Alexander, *Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites*. *Clin Microbiol Rev*, 2001. **14**(3): p. 476-88.
202. Sapino, A., et al., *Estrogen receptor alpha is a novel marker expressed by follicular dendritic cells in lymph nodes and tumor-associated lymphoid infiltrates*. *Am J Pathol*, 2003. **163**(4): p. 1313-20.
203. Wunderlich, F., et al., *Testosterone signaling in T cells and macrophages*. *Steroids*, 2002. **67**(6): p. 535-8.
204. McKay, L.I. and J.A. Cidlowski, *Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways*. *Endocr Rev*, 1999. **20**(4): p. 435-59.
205. Li, C., et al., *Pathology of Plasmodium chabaudi chabaudi infection and mortality in interleukin-10-deficient mice are ameliorated by anti-tumor necrosis factor alpha and exacerbated by anti-transforming growth factor beta antibodies*. *Infect Immun*, 2003. **71**(9): p. 4850-6.
206. Mackay, I.M., K.E. Arden, and A. Nitsche, *Real-time PCR in virology*. *Nucleic Acids Res*, 2002. **30**(6): p. 1292-305.
207. Innis, M. and D. Gelfand, *PCR protocols. A guide to methods and applications*. USA: Academic Press, Inc., , 1990: p. 3-12.
208. Barrera, S.H., et al., *Reacción en cadena de la polimerasa*. *Ciencia y desarrollo*, 1993. **18**: p. 50-60.
209. Valasek, M.A. and J.J. Repa, *The power of real-time PCR*. *Adv Physiol Educ*, 2005. **29**(3): p. 151-9.

210. Bustin, S.A., *Real-Time Reverse Transcription PCR*. University of London, London, U.K. Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics, 2005: p. 1131-1135.
211. Wong, M.L. and J.F. Medrano, *Real-time PCR for mRNA quantitation*. Biotechniques, 2005. **39**(1): p. 75-85.
212. Davidsohn, I. and J. Bernardo-Henry, *Diagnóstico clínico por el laboratorio*. Salvat, 1981. **6 edición**: p. 107-113.
213. Hemingway, J. and H. Ranson, *Insecticide resistance in insect vectors of human disease*. Annu Rev Entomol, 2000. **45**: p. 371-91.
214. Bull, P.C. and K. Marsh, *The role of antibodies to Plasmodium falciparum-infected erythrocyte surface antigens in naturally acquired immunity to malaria*. Trends Microbiol, 2002. **10**(2): p. 55-8.
215. De León-Nava, M.A. and M.-M. J., *Dimorfismo sexual inmunitario: ¿pueden los esteroides sexuales polarizar el perfil de citocinas Th1/Th2?* Revista de Investigación Clínica 2006. **58**: p. 161-169.
216. Cernetich, A., et al., *Involvement of gonadal steroids and gamma interferon in sex differences in response to blood-stage malaria infection*. Infect Immun, 2006. **74**(6): p. 3190-203.
217. Sirois, M., *Laboratory Animal Medicine*. Principales and Procedures, 2005. Elsevier(Mosby): p. 87-114.
218. C., D., *Plumb's Veterinary Drug Handbook*. Plumb Blackwell Publishing, 2005. **Fifth edition**.
219. Sauders, *Quesenberry carpenter-ferrets, rabbits, and rodents-Clinical medicine and surgery*. Elsevier., 2004. **Second edition**.
220. Wunderlich, F., et al., *Resistance to Plasmodium chabaudi in B10 mice: influence of the H-2 complex and testosterone*. Infect Immun, 1988. **56**(9): p. 2400-6.
221. Spindler, K.D., *Parasites and hormones*. Parasitology in focus, 1988: p. 465-476.
222. Llanos, C., et al., *Mecanismos de generación de anemia en malaria*. Colombia Médica, 2004. **35**: p. 205-214.
223. Arthur C. Guyton, M.D.J.E.H., Ph.D., *"Tratado de fisiología médica"*. Elsevier., 2006. **Decimoprimer edición**: p. 1115 pps.
224. Benten, W.P., et al., *Testosterone-induced abrogation of self-healing of Plasmodium chabaudi malaria in B10 mice: mediation by spleen cells*. Infect Immun, 1991. **59**(12): p. 4486-90.
225. Solomon, G.B., *Host hormones and parasitic infection*. Int Rev Trop Med, 1969. **3**: p. 101-58.
226. Riley, E.M., et al., *Regulating immunity to malaria*. Parasite Immunol, 2006. **28**(1-2): p. 35-49.
227. Viau, V., *Functional cross-talk between the hypothalamic-pituitary-gonadal and -adrenal axes*. J Neuroendocrinol, 2002. **14**(6): p. 506-13.
228. Chua, C.L., et al., *Monocytes and macrophages in malaria: protection or pathology?* Trends Parasitol, 2013. **29**(1): p. 26-34.
229. Gilmore, W., L.P. Weiner, and J. Correale, *Effect of estradiol on cytokine secretion by proteolipid protein-specific T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects*. J Immunol, 1997. **158**(1): p. 446-51.
230. Cutolo, M., *Estrogen metabolites: increasing evidence for their role in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus*. J Rheumatol, 2004. **31**(3): p. 419-21.
231. D' Agostino, P., et al., *Sex hormones modulate inflammatory mediators produced by macrophages*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **876**.

232. Remoue, F., et al., *Gender-dependent specific immune response during chronic human Schistosomiasis haematobia*. Clin Exp Immunol, 2001. **124**(1): p. 62-8.
233. Olsen, N.J., et al., *Testosterone induces expression of transforming growth factor-beta 1 in the murine thymus*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1993. **45**(5): p. 327-32.
234. Chakhtoura, N., et al., *Estrogen inhibits vaginal tropoelastin and TGF-beta1 production*. Int Urogynecol J, 2012. **23**(12): p. 1791-5.
235. Ashcroft, G.S., et al., *Estrogen accelerates cutaneous wound healing associated with an increase in TGF-beta1 levels*. Nat Med, 1997. **3**(11): p. 1209-15.
236. Grau, G.E., et al., *Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria*. Science, 1987. **237**(4819): p. 1210-2.
237. Rudin, W., et al., *Interferon-gamma is essential for the development of cerebral malaria*. Eur J Immunol, 1997. **27**(4): p. 810-5.
238. Correale, J., M. Arias, and W. Gilmore, *Steroid hormone regulation of cytokine secretion by proteolipid protein-specific CD4+ T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects*. J Immunol, 1998. **161**(7): p. 3365-74.
239. Salem, M.L., et al., *beta-estradiol suppresses T cell-mediated delayed-type hypersensitivity through suppression of antigen-presenting cell function and Th1 induction*. Int Arch Allergy Immunol, 2000. **121**(2): p. 161-9.
240. Karpuzoglu-Sahin, E., et al., *Effects of long-term estrogen treatment on IFN-gamma, IL-2 and IL-4 gene expression and protein synthesis in spleen and thymus of normal C57BL/6 mice*. Cytokine, 2001. **14**(4): p. 208-17.
241. Chao, T.C., et al., *Steroid sex hormones regulate the release of tumor necrosis factor by macrophages*. Cell Immunol, 1995. **160**(1): p. 43-9.
242. Miller, L. and J.S. Hunt, *Regulation of TNF-alpha production in activated mouse macrophages by progesterone*. J Immunol, 1998. **160**(10): p. 5098-104.
243. Onwuamaegbu, M.E., M. Henein, and A.J. Coats, *Cachexia in malaria and heart failure: therapeutic considerations in clinical practice*. Postgrad Med J, 2004. **80**(949): p. 642-9.
244. Taverne, J., et al., *Anaemia and resistance to malaria in transgenic mice expressing human tumour necrosis factor*. Immunology, 1994. **82**(3): p. 397-403.

13. Anexo

13.1 Materiales

13.1.1 Reactivos y soluciones.

TRIS-HCl 100 mM.
Aceite mineral ®Sigma.
Acrilamida ®Sigma.
Albumina sérica bovina ®Sigma.
Amortiguador de retrotranscripción First Strand ®Invitrogen.
Algodón.
Alcohol 80%.
Sutura absorbible de ácido poliglicólico 4-0 ®Atramat.
Clorhidrato de Ketamina®Anesket Pisa.
Clorhidrato de Xilacina ®Procin Pisa.
Meloxicam ®Metacam 0.5% Boehringer Ingelheim.
Cloruro de Sodio 0.9% ®Solución CS Pisa.
Enrofloxacin ®Enroxil 5%.
Yodopovidona Solución ®Germisin.
Jabón quirúrgico ®Antibenzil.
Bisacrilamida ®USB.
Bromuro de etidio ®Sigma.
Cloroformo: alcohol isoamilico 49:1.
Cloroformo ®Burdick&Jackson.
dNTP's ®Invitrogen.
dTT 0.1M ®Invitrogen.
EDTA 5mM ®Sigma.
Enzima MMLV-RT ®Invitrogen.
Etanol ®MERCK.
Fluorocromo ROX 5 X ®Invitrogen.
Heparina ®USB.
Inhibidor de RNAsa 40U/µL ®Promega.
Isopropanol ®Sigma.
MgCl₂ 50mM ®Sigma.
Oligo dT 500µg/µL ®Promega PBS 1X.
Reactivo de BIO-RAD® para cuantificar proteínas.
Reactivo de Drabkin.
Taq polimerasa 5U/µL ®Applied Biosystems.
TBE 10X.
TEMED ®Sigma.

TriPure ®Roche.

Oligos F* y R 10µM ®Invitrogen para

β-actina: 5´ DNA-CGG-GTC-AGG-TAG-TCT-GTC-AGG-TCC[JOE]G 3´
5´ DNA-CTA-TGC-TCT-CCC-TCA-CGC-CAT-C 3´

INF-γ: 5´ DNA-CGG-TGA-GAA-GAT-GTT-CCA-TGC-CAC[FAM]G 3´
5´ DNA-TCT-CCT-TCA-GGA-CAA-TGT-CAA-ACA 3´

TNF-α: 5´ DNA-CGG-CTG-CTG-TCT-TTG-AGA-TCC-ATC-C[FAM]G 3´
5´ DNA-CGT-CGT-AGC-AAA-CCA-CCA-AGT-G 3´

TGF-β 5´ DNA-CGG-GAA-ATA-CAC-CAC-CAG-TCC[FAM]G 3´
5´ DNA-AGG-CTG-ACA-CCC-GTC-ACT-TG 3´

IL-10 5´ DNA-CGG-TTC-TGG-ACA-ACA-TAC-TGC-TAA-C[FAM]G 3´
5´ DNA-TGG-ATC-ATT-TCC-GAT-AAG-GCT-TG 3´

13.1.2. Equipo de laboratorio.

Cámara para electroforesis ®BIORAD.

Campana de flujo laminar ®VECO.

Centrifuga y microcentrífuga ®Eppendorf.

Émbolos de jeringas estériles.

Espectrofotómetro para luz UV ®WPA.

Estuche de disección.

Film óptico ®Platemax

Parafilm.

Autocalve marca.

Termociclador Master Cycler ®Eppendorf.

Termociclador ®Applied Biosystems 7500.

Tubos Eppendorf de 0.5 µL, 1.5 mL.

Tubos Falcon 50 mL estériles.

Vortex Daigger.

Pipetas ®Eppendorf de 2 µL, 10 µL, 50 µL, 100 µL, 200 µL y 1000 µL.

Puntas estériles ®Axygen libres de DNAsas y RNAsas para tomar volúmenes de 2 µL, 10µL, 50µL, 100µL, 200µL y 1000µL estériles.

Placa para PCR en tiempo real ®Axygen

13.1.3. Material biológico.

Ratones singénicos de la cepa CBA/Ca.

Plasmodium berghei ANKA