



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Efecto de las hormonas estradiol, testosterona y DHEA sobre la actividad enzimática y la expresión génica de catalasa en ratones infectados con *Plasmodium berghei* ANKA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

BIOLOGO

PRESENTA:

Fidel Orlando Buendía González



Director de tesis: Dra. Martha Legorreta Herrera

Asesor interno: Dra. Maria Esther Cruz Beltrán

México, D.F.

Junio, 2015

Este trabajo recibió financiamiento del proyecto  
PAPIIT IN216914



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**

Este trabajo pudo llevarse a cabo gracias al apoyo de un gran número de personas de las cuales me permitiré nombrar a algunas. Primeramente agradeceré a mi familia la cual me ha acompañado a lo largo de mi vida a mi madre María Guadalupe González Valentino a la cual le agradezco el esfuerzo que ha hecho por sus hijos y su eterno optimismo del cual aun me maravillo, a mis hermanas María Goretti y Guadalupe Mariel que a su manera me han enseñado lecciones que me permitieron crecer como persona.

A mis tías María del Carmen, María Edith y María Verónica quienes siempre han apoyado a mi familia tanto en los buenos como en los malos momentos. A mi tío Isidro Arrieta quien ha sabido brindar un buen consejo, a mi primo Osvaldo Alonso quien me ha brindado su particular apoyo. Además del resto de mi familia.

Un agradecimiento especial a la Dra. Martha Legorreta Herrera a la quien agradezco la gran paciencia que me ha tenido, así como haberme impulsado a ser un mejor estudiante, a realizar un trabajo de calidad, mostrarme el valor de la perseverancia y sobretodo tiene mi gratitud.

A mis amigos de la preparatoria Alfredo, Miguel, Javier, Vladimir, Manuel, Sergio, Jesús, Daniel y Dieter por tantos años de amistad.

A mis amigos de la universidad: Abel del cual me mostro el valor de la humildad, a mi amigo Fidel con quien cuento de una palabra sincera, de mi amigo Erick quien siempre se esfuerza por dar lo mejor de él, a Laura quien me mostro el significado de la perseverancia, a Víctor que me ha brindado su sincera amistad, a Gabriela que siempre brinda su animoso carácter, a Ángel por brindarme su amistad, a Paola y a Yodelite por ser mis amigas por tantos años, a Cristian y su gran sentido del humor, a Mitzi y su buen carácter, a Andrea y su bonita forma de ver la vida, a Cesar por su generosidad y a Lalo y kat por sus divertidas pláticas.

A mis primeros compañeros de laboratorio a Néstor quien si empre ponía de buen humor al laboratorio, a Luis por su paciencia, a Ana Laura por sus enseñanzas y gran amistad. A mis compañeros con los que realice mi tesis: Margarita y sus divertidas ocurrencias, a Rosa por su amable personalidad, a Jesús por su incondicional ayuda, a Luis por su animado carácter y a Araceli por su buen consejo.

También a Adriana Altamirano Bautista y a Román Hernández Meza por su importante labor en el bioterio.

A mis sinodales

Dra. Patricia Rosa Saucedo

Dra. Martha Legorreta Herrera

Dra. María Esther Cruz Beltrán

Dra María Elena Ayala Escobar

M. en C. Catalina Machuca Rodríguez

# Índice

	Página
1-Resumen	1
2-Introducción	2
3-Antecedentes	3
3.1- Distribución mundial y situación en México de la malaria	3
3.2-Catalasa	4
3.3-Dimorfismo sexual por malaria	5
3.4- Testosterona y malaria	5
3.5- Estradiol y malaria	6
3.6- Dehidroepiandrosterona y malaria.	7
3.7-Sistemas antioxidantes en <i>Plasmodium</i>	8
3.8-Catalasa y malaria	9
3.9 Catalasa y hormonas sexuales	10
4- Planteamiento del problema	11
5- Hipótesis del trabajo	12
6- Objetivo general	12
6.1 - Objetivos específicos.	12
7- Diseño experimental	13
8 Materiales y reactivos	14
9- Métodos	15
9.1- Obtención de las muestras	15
9.2- Determinación de la actividad específica de catalasa	15
9.3- Extracción de ARN para sangre	16

<b>9.4- Extracción de ARN de bazo y su cuantificación</b>	<b>17</b>
<b>9.5- Secado y cuantificación de muestras de ARN</b>	<b>17</b>
<b>9.6-Retrotranscripción</b>	<b>18</b>
<b>9.7- Cuantificación de la expresión de catalasa por PCR en tiempo real</b>	<b>18</b>
<b>9.8 - Análisis estadístico</b>	<b>20</b>
<b>10 -Resultados</b>	<b>20</b>
<b>10.1-Efecto de la testosterona sobre la actividad enzimática y la expresión de catalasa en ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.</b>	<b>20</b>
<b>10.2- Efecto del estradiol sobre la actividad enzimática y la expresión de catalasa en ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.</b>	<b>24</b>
<b>10.3-Efecto del esteroide DHEA sobre la actividad enzimática y la expresión del gene de catalasa en ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.</b>	<b>26</b>
<b>11. Discusión de resultados</b>	<b>27</b>
<b>11.1 Efecto de la testosterona sobre la actividad enzimática y la expresión de catalasa</b>	<b>28</b>
<b>11.2 Efecto del estradiol sobre la actividad enzimática y la expresión de catalasa en ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.</b>	<b>29</b>
<b>11.3 Efecto de DHEA sobre la actividad enzimática y expresión del gene de CAT</b>	<b>30</b>
<b>12. Conclusiones</b>	<b>30</b>
<b>13-Referencias bibliográficas</b>	<b>31</b>
<b>14-Anexo</b>	<b>38</b>

## 1. RESUMEN

La malaria es una enfermedad parasitaria provocada por protozorios del género *Plasmodium*, una de las características de esta enfermedad es que aunque la incidencia es igual entre hembras y machos la mortandad es mayor en estos últimos, fenómeno que se conoce como dimorfismo sexual. Las hormonas sexuales son las responsables de las principales diferencias entre los sexos, sin embargo se desconoce si las hormonas sexuales regulan las diferencias en la severidad de la enfermedad con *Plasmodium*. Las hormonas sexuales regulan la actividad del sistema inmunológico y pueden regular la expresión génica en diferentes grupos celulares.

En este trabajo se evaluó el efecto de las hormonas sexuales testosterona, estradiol y DHEA sobre la actividad de la enzima catalasa (CAT) así como de su expresión génica en diferentes tejidos de ratones infectados con *Plasmodium berghei* ANKA. También se estudió la actividad de la enzima y la expresión génica de catalasa en ratones gonadectomizados (deficientes de hormonas) y en ratones gonadectomizados y reconstituidos con testosterona, o estradiol, o DHEA, o vehículo, se realizó el mismo análisis a diferentes grupos control (ratones infectados como no infectados: ratones a los que solo se les administro aceite de ajonjolí el cual se utilizó como vehículo para las distintas hormonas, ratones intactos sin ningún tratamiento, ratones que se abrieron y se volvieron a cerrar (Sham) para conocer el efecto de la cirugía). A los grupos control también se les cuantificó la actividad enzimática y la expresión génica de catalasa (CAT) en los tejidos de sangre y bazo.

Los resultados indican una mayor actividad enzimática en bazo al compararla con sangre. La gonadectomía en las hembras causó una disminución en la actividad enzimática de CAT lo que indica una modulación positiva de las hormonas sexuales femeninas en la actividad enzimática de CAT, además al administrar estradiol se promovió la actividad enzimática de CAT. La testosterona disminuyó la

actividad de catalasa en bazo, mientras que la administración de DHEA no causo ninguna diferencia. La expresión del gen mostro un claro dimorfismo sexual ya que la hembras mostraron una mayor expresión que los machos lo cual indica una mayor regulación por especies oxidantes por parte de las hembras.

## 2. INTRODUCCIÓN

La malaria o paludismo es una enfermedad infecciosa causada por parásitos del género *Plasmodium*, en el 2013 se informaron 198 millones de nuevos casos y 584,000 muertes (World Health Organization). La incidencia de la malaria es similar entre ambos sexos. Sin embargo, existe una mayor mortandad y patología en el sexo masculino, es decir se presenta dimorfismo sexual (1). Los esteroides sexuales son responsables de las principales diferencias entre los sexos y también pueden regular la actividad de las enzimas antioxidantes (2). En esta enfermedad la respuesta inmune induce la síntesis de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno para eliminar al *Plasmodium*. Sin embargo, el estrés oxidativo que se genera también puede dañar al hospedero por lo que se activan sistemas antioxidantes como la enzima catalasa (CAT). No obstante, se desconoce si las hormonas sexuales regulan la actividad y la expresión del gen de CAT en la infección con *Plasmodium*.

En malaria se presenta dimorfismo sexual, ya que los hombres desarrollan una patología más severa y (parasitemia, pérdida de peso y anemia) y mortandad más alta que las mujeres (3), este fenómeno se ha ligado a las hormonas sexuales (4).

Las hormonas esteroides tienen la capacidad de penetrar a las células por difusión, donde se unen a macromoléculas receptoras de forma específica y con gran afinidad, los receptores se encuentran tanto en el citoplasma como en el núcleo de la célula, en el núcleo la interacción ligando receptor modifica la expresión génica, lo que origina la transcripción del ácido ribonucleico mensajero (RNAm), su procesamiento y traducción a proteínas específicas (5).

Las hormonas sexuales se relacionan con el estrés oxidativo, ya que regulan la síntesis de las enzimas antioxidantes [2], las más importantes son: la glutatión peroxidasa (GPx), la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT) (6).

Una de las causas del estrés oxidativo en la malaria es que la infección con el *Plasmodium* desencadena una respuesta inmune innata donde intervienen diferentes células (monocitos, macrófagos y células dendríticas) que actúan directamente sobre el patógeno (7) y generan especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS) que permiten eliminar al parásito, pero también originan un desbalance entre la formación de especies oxidantes y la actividad de antioxidantes (estrés oxidativo) que puede dañar al hospedero (1).

La Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato Oxidasa (NADPH oxidasa) es uno de los más importantes sistemas generadores de estrés oxidativo, ya que genera al anión superóxido que posteriormente se transforma en peróxido de hidrógeno (8) que es el substrato de la enzima CAT.

En el presente trabajo se estudió el efecto de las hormonas sexuales estradiol, testosterona y DHEA sobre la actividad enzimática y la expresión génica de CAT en la sangre y el bazo de ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA.

### **3. ANTECEDENTES**

#### **3.1 Distribución mundial y situación en México**

La transmisión de la malaria ocurre en las 6 regiones que cubre la organización mundial de la salud, la mayor parte de carga de la enfermedad (78%) se localiza en África, en México la malaria se encuentra en la fase de eliminación 2 (2° fase) y aunque actualmente en nuestro país solo un 3 % de la población (9) está en riesgo es necesario la completa erradicación y en seguida evitar la reintroducción.

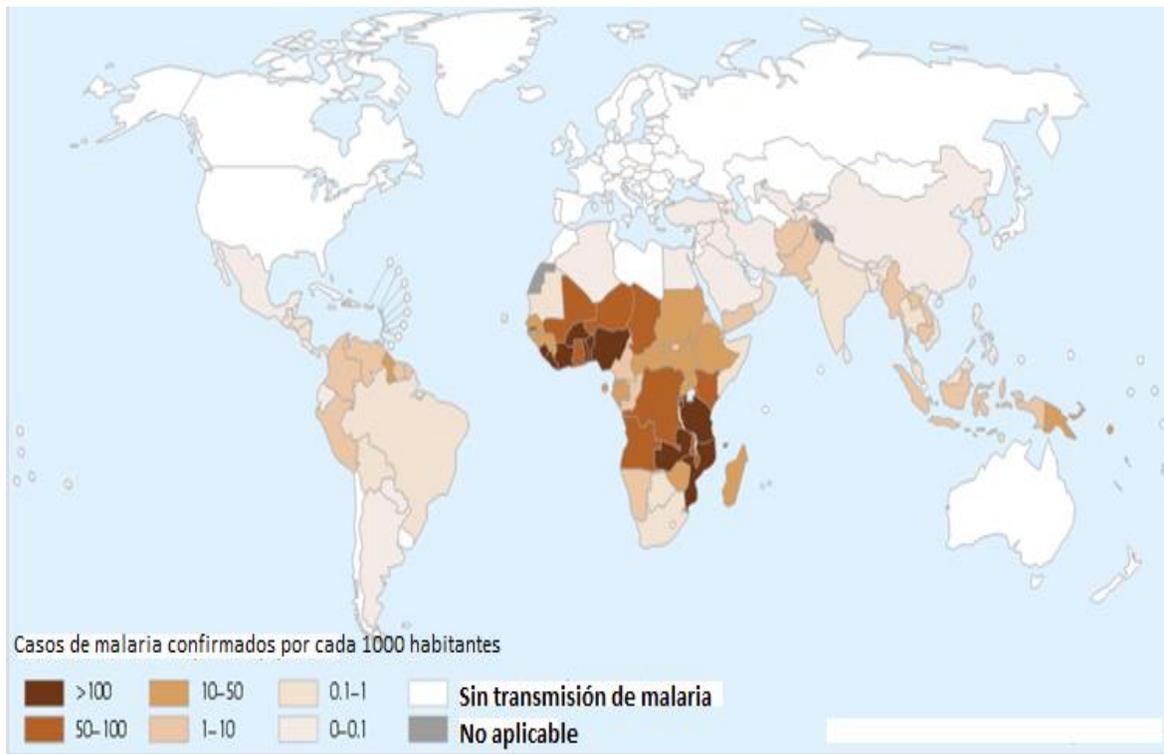


Figura 1. Países con transmisión de malaria 2013, Fuente: World Malaria Report 2014

### 3.2 Catalasa

El peróxido de hidrogeno es uno de las especies reactivas de oxígeno más frecuentes y es un compuesto altamente oxidante para casi todos los componentes celulares por lo que su remoción rápida y eficiente es de esencial importancia (10). Además, tiene una estrecha relación con la coenzima Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) (11) la cual ayuda a la enzima CAT a mantenerse activa en presencia de su sustrato (12). La CAT es de vital importancia ya que su mal funcionamiento desencadena un severo daño a moléculas como el ADN por parte del estrés oxidativo (13), su importancia en regular el estrés oxidativo se ha ligado a la expresión de otros genes de proteínas de carácter antioxidante (14)

### 3.3 Dimorfismo sexual por malaria

El dimorfismo sexual es un término que describe diferencias morfológicas entre los sexos, pero se ha extendido para incluir todas las diferencias que se observan entre mujeres y hombres (15). En general los machos son más susceptibles a las infecciones de diversos protozoarios que las hembras, ese incremento en la susceptibilidad se ha asociado con las hormonas esteroides circulantes (16). El *Plasmodium* es uno de los géneros de parásitos protozoarios que causa un dimorfismo sexual en humanos, la incidencia de la infección en ambos sexos es similar (17). Sin embargo, los hombres desarrollan parasitemias (presencia de parásitos en sangre) más altas que las mujeres (18). La cantidad de casos con infección por *P. falciparum* incrementa en la pubertad lo que sugiere que los esteroides sexuales podrían influir en este fenómeno (18). Los resultados de experimentos en ratones confirman que mueren más machos que las hembras cuando se infectan con *P. chabaudi* (19). Además, de la mortalidad, los machos se recuperan de forma más lenta que las hembras de las infecciones con *P. chabaudi* y sufren mayor pérdida de peso, anemia e hipotermia que las hembras (20). En estudios con *P. berghei* se ha demostrado la influencia de las hormonas sexuales sobre células del sistema inmune ya que afecta la producción de citocinas y anticuerpos (21).

### 3.4 Testosterona y malaria.

La testosterona es una hormona esteroide, que se sintetiza a partir del colesterol y se clasifica como andrógeno. Se presenta en mamíferos, reptiles, aves y otros vertebrados. En los mamíferos se produce en los testículos, en los ovarios y en pequeñas cantidades en las glándulas suprarrenales, es la principal hormona sexual masculina, juega un papel clave en el desarrollo de los testículos y la próstata y promueve la expresión de caracteres sexuales secundarios (22).

El efecto de la testosterona sobre los individuos infectados con *Plasmodium* no se ha entendido completamente. A partir del hallazgo que los machos infectados con *Plasmodium chabaudi* presentan mayor mortandad que las hembras, se ha estudiado como afectan las concentraciones de testosterona en la resistencia a la infección con *P. chabaudi* y han determinado que depende de genes del complejo principal de histocompatibilidad H-2, pero esa resistencia se pierde cuando se administra testosterona (23, 24). Sin embargo, también depende de la cepa de ratón ya que los ratones B10 y C57BL/6 castrados son sumamente susceptibles a la infección con *P. chabaudi* (23), (3). Se ha demostrado que la testosterona puede interferir en la expresión de citocinas tipo Th1/Th2 en ratones knockout para los receptores de IFN- $\gamma$  o para IL-4, en quienes la mortalidad resultó mayor en los ratones knockout y la testosterona modula la susceptibilidad o la resistencia (25) por lo cual es importante en la respuesta inmune, Finalmente, la administración de testosterona en ratones adultos reduce la síntesis de anticuerpos, disminuye la expresión de las moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad en el bazo, aumenta la cantidad de células TCD8<sup>+</sup> y reduce la expresión de genes en el hígado (25, 26). Sin embargo, aún no se ha estudiado si las hormonas sexuales modulan la expresión de los genes de las enzimas antioxidantes, en particular si modulan a la enzima CAT.

### 3.5 Estradiol y malaria.

El estradiol también conocido como E2 ó 17- $\beta$  estradiol es una hormona esteroide sexual femenina, se sintetiza a partir del colesterol, la mayoría del estradiol se produce en las células de la granulosa del folículo ovárico, por la aromatización de la androstenediona a estrona, después la enzima 3- $\beta$ hidroxiesteroide deshidrogenasa la transforma a 17- $\beta$  estradiol. En la corteza suprarrenal y en los testículos se sintetizan pequeñas cantidades.

El estradiol se obtiene a partir de la testosterona generada en ovarios y por acción de la enzima aromatasa la transforma en estradiol. El tejido adiposo es

particularmente activo en convertir a los precursores del estradiol y finalmente, el estradiol también se produce en el cerebro y en las paredes arteriales

Las investigaciones referentes al efecto del 17- $\beta$ estradiol en el curso de la infección con *Plasmodium* han generado resultados contradictorios. La infección con *P. chabaudi* o con *P. berghei* en ratones hembras y la infección en hembras de monos *Rhesus* han revelado que dosis suprafisiológicas de estradiol o de progesterona incrementan el pico de la parasitemia, aumentan las recrudescencias y reducen la supervivencia ([27](#), [28](#)). Durante el embarazo ocurren cambios hormonales importantes, aumentan las concentraciones de estrógenos, progestinas y glucocorticoides y a esos incrementos le han atribuido la mayor susceptibilidad a infecciones por *Plasmodium* en mujeres embarazadas ([29](#), [30](#)). La cantidad de estradiol es importante porque mientras las dosis altas incrementan la susceptibilidad a la infección, las dosis fisiológicas aumentan la inmunidad innata, la mediada por células y la humoral ([31](#), [32](#)).

La remoción de ovarios y por lo tanto de la principal fuente de estrógenos y progesterona en ratones hembras disminuye la síntesis de INF- $\gamma$ , lo que demuestra que las hormonas que se producen en los ovarios podrían modular la respuesta proinflamatoria contra malaria ([33](#)).

### **3.6 Dehidroepiandrosterona y malaria**

La dehidroepiandrosterona (DHEA) es una prohormona endógena que se produce en las glándulas suprarrenales a partir de colesterol, es precursora de estrógenos y andrógenos. La secreción de DHEA y de su éster sulfatado, el sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS) disminuye con la edad.

Los efectos de la DHEA durante la infección con *Plasmodium* son controversiales, cuando se comparó el efecto de estradiol y los de DHEA en la infección con *P. berghei* ANKA, se detectó que únicamente el estradiol disminuye la parasitemia ([34](#)). Sin embargo, otro grupo de investigadores demostró que la concentración de

DHEAS correlaciona negativamente con la parasitemia en mujeres adolescentes y también correlaciona con concentraciones más elevadas de hemoglobina (35).

En los hombres, la concentración de DHEAS puede predecir la resistencia a *P. falciparum*, los hombres de entre 15 y 20 años presentaron niveles elevados de DHEAS y el 72% de ellos presentó parasitemias menores que los individuos con concentraciones bajas de DHEAS (36).

### 3.7 Sistemas Antioxidantes en *Plasmodium*

El estrés oxidativo ocurre en las células como resultado de la pérdida del equilibrio entre pro- y anti- oxidantes, es un factor que determina el tipo de desenlace en la infección con *Plasmodium* (37). En el paludismo, el estrés oxidativo es objeto de estudio porque tiene un efecto protector, pero también se relaciona con la patofisiología de la enfermedad. Eliminar las especies reactivas del oxígeno (ROS) es un reto para los eritrocitos infectados con *Plasmodium*, puesto que como consecuencia del metabolismo intenso del parásito que crece y se multiplica, se generan grandes cantidades de productos tóxicos, ejemplo es la degradación de la hemoglobina por el parásito, que produce ferroprotoporfirinas (FP) y ROS. Las FP se sequestran en su forma cristalina conocida como hemozoína y para eliminarla se utilizan diversos mecanismos, como degradar a las FP, o bien que la hemozoína reaccione con glutatión (38), o que se una a proteínas (39). Sin embargo, si pequeñas cantidades de FP escapan al proceso de neutralización se genera un daño redox en las proteínas de las membranas del hospedero que pueden inhibir a las enzimas del parásito y lisar a los eritrocitos.

Durante la degradación de la hemozoína se libera al grupo hemo, entonces el hierro que contiene y que generalmente existe en estado ferroso ( $2^+$ ) se oxida a su estado férrico ( $3^+$ ), como consecuencia los electrones que se liberan reaccionan con el oxígeno molecular para producir aniones superóxido ( $O_2^-$ ), radicales hidroxilo ( $OH^\cdot$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (40, 41). El parásito consume aproximadamente del 60 al 80% de la hemoglobina de los eritrocitos lo que genera especies reactivas del oxígeno que son responsables de la lipoperoxidación de las

membranas de los eritrocitos y de la hemólisis (6). La infección con el *Plasmodium* también se ha asociado con el desarrollo de estrés oxidativo en el hígado (42).

Aunado a esto la producción de ROS por el sistema inmune incrementa el estrés oxidativo puesto que genera citocinas como el TNF- $\alpha$  o el IFN- $\gamma$  que incrementan la síntesis de ROS (39). Las especies reactivas del oxígeno dañan a diferentes moléculas como a los lípidos de las membranas, a las proteínas y a los ácidos nucleicos y pueden ocasionar la muerte celular (43).

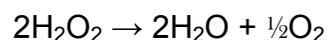
Los mecanismos contra el estrés oxidativo incluyen enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa (GPx), la superóxido dismutasa (SOD) y la CAT, todas ellas actúan eliminando la toxicidad de los radicales libres (6).

El parásito *Plasmodium* se desarrolla de forma intra como extracelular, por lo que para sobrevivir a los cambios en estrés oxidativo cuenta con diversos sistemas antioxidantes dependientes de NADPH (44), pero carece de las dos principales enzimas antioxidantes: la CAT y la GPx (45), su principal sistema antioxidante se basa en glutatión reducido y en un sistema de tioredoxina/tioredoxina reductasa (6), ambos degradan al peróxido de hidrógeno (39).

La infección con el parásito modifica el perfil de enzimas antioxidantes, algunas como glutatión reductasa aumentan su actividad para mantener la homeostasis en los eritrocitos infectados (46).

### 3.8 Catalasa y malaria

La enzima CAT (código de la comisión enzimática 1.11.1.6) es un tetrámero con cuatro subunidades de 60 kD idénticas, contiene un grupo ferriprotoporfirina por subunidad y tiene un peso molecular de 240 kD, la CAT reacciona eficientemente con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para formar agua y oxígeno molecular (47).



En los animales, el peróxido de hidrógeno se elimina gracias a la actividad de las enzimas CAT y la GPx. La CAT protege a las células del peróxido de hidrógeno,

aun cuando no es esencial para algunos tipos de células bajo condiciones normales, es importante en la adquisición de tolerancia al estrés oxidativo en la respuesta de adaptación de las células (48). La CAT evita el consumo de  $O_2$  para convertir al  $H_2O_2$  en oxígeno (49). Pequeñas modificaciones de la actividad fisiológica de las enzimas antioxidantes, incluida la CAT, generan efectos enormes en la resistencia de las células al daño inducido por oxidantes (48, 50). Además, la enzima CAT es inducible, el aumento en la concentración de  $H_2O_2$  causa un incremento en el ARN mensajero para CAT en cultivos *in vitro* (49).

En la infección con *P. berghei* ANKA el administrar SOD y CAT protege a los ratones CBA/H de sufrir malaria cerebral (51), lo que corrobora la estrecha relación que existe entre el estrés oxidativo y el daño en el cerebro.

Se ha descrito que en las infecciones con *P. vivax* disminuyen la actividad de CAT. Sin embargo, se incrementan las actividades de las enzimas superóxido dismutasa 1 (SOD1) y la concentración de Glutación-S transferasa (GST) (52). Junto con la peroxidación lipídica los niveles de CAT se han correlacionado con la parasitemia [28].

### 3.9 Catalasa y hormonas Sexuales

El estradiol es un esteroide que se encuentra en mayor concentración en las mujeres que en los hombres, su estructura química le confiere actividad antioxidante (53). Por el contrario, la testosterona es la hormona sexual masculina por excelencia, potencia el estrés oxidativo y regula la actividad de las enzimas SOD, GPx y CAT (44) y en ratones aunque la ganadectomía no haya tenido un cambio en la expresión del gen CAT, la administración de testosterona incrementa su expresión (54).

La dehidroepiandrosterona (DHEA) es un esteroide precursor de estradiol y de la testosterona, inhibe la respuesta Th1 y Th2 (53), potencia la actividad de la enzima Cu/Zn-SOD, la fosforilación de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y

modula la expresión de NADPH (55). Sin embargo no se conoce su efecto sobre la actividad de la CAT.

DHEA se considera un antioxidante (56), esa actividad depende de la concentración. Sin embargo, también puede ejercer un efecto prooxidante que depende de la dosis y del tejido específico (57, 58). La protección de DHEA contra el estrés oxidativo se explica mediante mecanismos genómicos y no genómicos (59).

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El parásito *Plasmodium* causa una mayor mortandad y patología en los individuos de sexo masculino (1) este fenómeno se denomina dimorfismo sexual, dado que las principales diferencias entre los sexos se deben, en gran medida a los esteroides sexuales es probable que el dimorfismo sexual que se presenta por la malaria se deba al menos en parte a la actividad de las hormonas sexuales.

Los mecanismos inmunológicos que conducen a la eliminación del parásito se basan en generar estrés oxidativo, porque el *Plasmodium* es sensible a los cambios redox. Paradójicamente, la infección con el *Plasmodium* induce estrés oxidativo y para protegerse del ambiente oxidante que el mismo parásito genera en el eritrocito y en las células infectadas aumenta sus defensas antioxidantes (60). Además, el hospedero modifica la actividad de sus enzimas antioxidantes durante las infecciones con el *Plasmodium* (61). Interesantemente, también se ha descrito que las hormonas sexuales regulan la actividad de las enzimas antioxidantes (44). Sin embargo, se desconoce si las hormonas sexuales regulan la actividad de la enzima CAT durante la infección con *Plasmodium* y también se desconoce si existe una expresión diferencial del gene de CAT entre los sexos. Por lo anterior, en este trabajo se estudiará si al modificar las concentraciones de las hormonas sexuales se afecta la actividad enzimática y la expresión génica de la enzima CAT en un modelo experimental de malaria.

## 5. HIPÓTESIS

Se ha descrito que el estradiol ocasiona un aumento en la actividad de CAT (62) y que puede aumentar la expresión del gen (63), por lo que se espera que la gonadectomía en las hembras disminuya la actividad y expresión del gen CAT y la administración de 17- $\beta$  estradiol aumente la actividad y la expresión del gen CAT.

En cambio la testosterona puede disminuir la actividad de la enzima CAT (64), por lo que se espera que la gonadectomía en machos aumente la actividad de CAT y su expresión génica y que la administración de testosterona disminuya la actividad y la expresión génica de CAT.

La DHEA tiene la capacidad de aumentar la enzima antioxidante SOD (44), por lo que su administración podría aumentar la actividad de CAT y su expresión génica.

## 6. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de las hormonas sexuales testosterona, estradiol y DHEA sobre la expresión del ARN mensajero que codifica para la enzima CAT, así como sobre su actividad enzimática.

### 6.1 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la testosterona sobre la actividad enzimática de CAT y la expresión del gene CAT en sangre y bazo de ratones CBA/Ca machos y hembras infectados con *P. berghei* ANKA.
- Evaluar el efecto del 17- $\beta$  estradiol sobre la actividad enzimática de CAT y la expresión del gene CAT en sangre y bazo de ratones CBA/Ca machos y hembras infectados con *P. berghei* ANKA.

- Evaluar el efecto del DHEA sobre la actividad enzimática de CAT y la expresión del gene catalasa en sangre y bazo de ratones CBA/Ca machos y hembras infectados con *P. berghei* ANKA.

## 7. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para evaluar el efecto de la testosterona se utilizaron 3 grupos de ratones CBA/Ca.

El primer grupo constituido por 30 ratones machos, diez de los cuales se gonadectomizaron (Gx), otros diez ratones se abrieron y cerraron sin extraer las gónadas (sham) y los últimos diez ratones de este grupo se dejaron intactos. Cinco ratones de cada subgrupo se infectaron con  $1 \times 10^3$  eritrocitos parasitados con *P. berghei* ANKA y el resto de los ratones de cada subgrupo se utilizó como control.

El segundo grupo constituido de 10 ratones machos y 10 ratones hembras. A todos los ratones se les administró testosterona a una dosis de 0.9 mg por vía subcutánea dos veces por semana durante 3 semanas (65). Al término del tratamiento hormonal 5 ratones machos y a 5 ratones hembras se les infectó con *P. berghei* ANKA y los restantes se utilizaron como controles.

El tercer grupo constituido de 10 ratones (5 machos y 5 hembras) a los cuales se les gonadectomizó a las 4 semanas de edad y se les permitió que se recuperaran de la cirugía por 28 días. Se les administró testosterona como se describió anteriormente y al día siguiente de la última inyección se infectaron con *P. berghei* ANKA.

Para evaluar el efecto del 17- $\beta$  estradiol se procedió de igual forma que para testosterona, solo que en el primer grupo se utilizaron ratones hembras en lugar

de machos y también se modificó la dosis que fue de 12 µg de estradiol administrado por vía subcutánea dos veces por semana durante 3 semanas (66).

Para evaluar el efecto de DHEA, a 10 ratones machos y a 10 hembras se les administraron 200 µg del esteroide diariamente (5 veces) (67); a 5 ratones machos y a 5 hembras se les infectó con *P. berghei* ANKA. Los restantes 5 machos y hembras se utilizaron como controles.

En el día 9 post infección todos los ratones se sacrificaron y se les extrajo la sangre y el bazo para determinar la actividad enzimática de CAT y la expresión de ARN mensajero del gen que codifica para CAT.

## 8. MATERIALES Y REACTIVOS.

### Equipo

- Lector de placas Multiskan GO Termofisher
- Termociclador Eppendorf
- Termociclador Applied Biosystems 7500
- Balanza analítica Sartorius
- Campana de flujo laminar Veco
- Micropipetas Gilson y Eppendorf de 1 µL, 10 µL, 20 µL, 50 µL, 200 µL y 1000 µL.

### Vehículo para administrar esteroides

Aceite de ajonjolí.

### Primers usados para el gen catalasa.

Secuencia del oligonucleotido sentido: (DNA) CGG ATG GCT TGC TCA GGA  
AGA TC [FAM] G

Secuencia del oligonucleotido antisentido: (DNA) CAT TGG CGA TGG CAT TGA AA [AA]

Primer usados para el gen de  $\beta$ -Actina.

Secuencia del oligonucleotido sentido: CGG-GTC-AGG-TAG-TCT-GTC-AGG-TCC [JOE]G

Secuencia del oligonucleotido antisentido: CTA-TGC-TCT-CCC-TCA-CGC-CAT-C

## 9. MÉTODOS

### 9.1 Obtención de las muestras

En el día 9 post infección se sacrificaron los ratones por dislocación cervical. Se extrajo la sangre de corazón y se colocó en un tubo Eppendorf con 200  $\mu$ L de PBS/heparina. Se prepararon 2 alícuotas una para cuantificar la actividad enzimática y otra para evaluar la expresión del gen CAT. Además, se extrajo el bazo que se maceró en una malla de nylon con el embolo de una jeringa y PBS estéril.

### 9.2 Determinación de la actividad específica de catalasa

Se cuantificó el sustrato (peróxido de hidrógeno). Se adicionaron 50  $\mu$ L de peróxido de hidrógeno y se aforó a 50 mL con agua, destilada estéril. Se midió la absorbancia a 240 nm. El cálculo se realizó con la siguiente fórmula:

$$\frac{DO_{240nm}}{37.76} \times 1000 = (M) \quad \text{donde DO= densidad óptica o absorbancia}$$

Se prepararon 10 mL a una concentración de 30 mM

A cada muestra de sangre se le cuantificó la concentración de hemoglobina con la técnica de Drabkin y se diluyó a una concentración de 5 g/dL.

Se adicionó 1  $\mu\text{L}$  de sangre diluida a una concentración de 5 g/dL y se virió en 499  $\mu\text{L}$  de PBS estéril. Inmediatamente se adicionaron 250  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrógeno 30 mM. Se leyó la absorbancia a 240 nm, al tiempo cero y a los 60 segundos.

Para realizar los cálculos se utilizó la siguiente fórmula

$$\text{Actividad} = (1/\Delta T) \ln(A_0/A_f) (\text{vol total/vol de la muestra})$$

Donde:  $\Delta T$  corresponde al intervalo de tiempo en segundos de las dos mediciones (60 segundos),  $A_0$  y  $A_f$  corresponden a la absorbancia en el tiempo cero y la absorbancia a los 60 segundos.

Para obtener la actividad específica se dividió la actividad entre la concentración de Hb (sangre) y proteínas (bazo) en mg.

### **9.3 Extracción de ARN de sangre**

Se extrajo la sangre y se colocó en 200  $\mu\text{L}$  de PBS con heparina. Se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos, se separó el suero y al paquete de eritrocitos se le adicionaron 2  $\mu\text{L}$  de saponina al 10 % y 1 mL de agua destilada estéril y se mezcló suavemente durante 1 minuto. Se centrifugó a 3500 rpm durante 1 minuto y se eliminó el sobrenadante. Se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de Trizol y se mezcló en el vortex durante 5 minutos. Se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de una mezcla de cloroformo: alcohol isoamilico y se mezcló durante 5 minutos. Se centrifugó a 8000 rpm durante 15 minutos y se recuperó la fase acuosa en otro tubo estéril. Se adicionó un volumen igual de alcohol isopropílico y se almacenó a  $-70^\circ\text{C}$ .

#### 9.4 Extracción de ARN de bazo y su cuantificación

Se extrajo el bazo, se colocó en tubos cubiertos con una malla de nylon, se maceró con el embolo de una jeringa estéril, se agregaron 4 mL de PBS estéril, se centrifugó a 3500 rpm a 4°C durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante.

El botón se resuspendió con agitación vigorosa en 500 µL de PBS estéril, se adicionaron 400 µL de Trizol y 150 µL de la mezcla cloroformo: alcohol isoamílico y se agitó durante 15 minutos en el vortex.

Se centrifugó a 14000 rpm durante 15 minutos a 4°C. y se recuperó la fase acuosa, se adicionó un volumen de alcohol isopropílico igual al volumen de la fase acuosa y se almacenó a -70°C.

#### 9.5 Secado y cuantificación de muestras de ARN

Para recuperar el ARN precipitado, se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 400 µL de etanol al 80 % en agua DEPC y se centrifugó a 14,000 rpm durante a 15 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante con una micropipeta y se cubrieron los tubos con papel Parafilm, se les realizaron pequeños orificios con una aguja (estéril), se colocaron los tubos en un lugar limpio a temperatura ambiente.

Las muestras se hidrataron con 80 µL de agua DEPC al 0.1% estéril y se agitaron durante 5 minutos, se incubaron a 60 °C por 5 minutos y se centrifugaron a 14 000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se realizó una dilución 1:200, se midió la absorbancia a 260 nm y se calculó la concentración de ARN en µg/µL de acuerdo con la siguiente formula:

$$[\text{ARN}] = \text{Abs } 260\text{nm} \times (40 \mu\text{g}/1000 \mu\text{L}) \times 200 = \mu\text{g}/\text{mL}$$

Donde:

Abs 260 nm = Absorbancia de la disolución a 260 nm .

40 µg/1000 µL = Concentración de ARN cuando la absorbancia a 260 nm es 1  
200 factor de dilución.

### 9.6 Retrotranscripción

Se adicionaron 1.5 µg de ARN y se ajustó el volumen a 10 µL con los siguientes reactivos: Agua DEPC + 1.0 µL oligo dT (0.5 µg/µl) + 1.5 µg de ARN= 10 µL

Se incubó a 65°C por 10 minutos en el termociclador e inmediatamente se colocó en hielo por 5 minutos, se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 segundos y se incubó en hielo. Se adicionaron 10 µL de la mezcla de retrotranscripción (4 µL de amortiguador first strand, 0.1 µL de inhibidor de RNAasa, 2 µL de dNTP's 5 mM y 0.2 µL de enzima MMLV-RT. La mezcla se incubó a 37°C por una hora en el termociclador y se colocó en hielo durante 5 minutos, se centrifugó a 14, 000 rpm durante 5 segundos y se adicionaron 80 µL de agua DEPC y los DNAc así obtenidos se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

### 9.7 Cuantificación de la expresión de catalasa por PCR en tiempo real.

Se preparó la mezcla de reacción de la siguiente forma:

Stock	[]/reacción	Volumen por reacción	Volumen total (para 96 pozos) con un exceso de 1.18
Agua MQ	-	3.62 µL	412.68 µL
Mezcla 10 X	1X	0.5 µL	57 µL
MgCl <sub>2</sub> 100 mM	3 Mm	0.15 µL	17.1 µL
<i>Taq</i> 5 U/µl	0.03 U/µL	0.03 µL	3.42 µL
Oligo F y R 10µM	200 nM	0.1 µL	11.4 µL
ROX 50X	1x	0.1 µL	11.4 µL

**ROX:** Fluorocromo de referencia pasiva

**Oligo F y R:** Oligo sentido y antisentido

**U:** Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima requerida para incorporar 10 nmoles de dNTP's en fracciones de DNA en 30 minutos a 72 ° C.

Se separaron alícuotas de 9.99  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción en tubos Eppendorf de 250  $\mu\text{L}$ . A cada tubo se le adicionaron 1.11  $\mu\text{L}$  del DNAc de cada muestra, y se adicionaron 5  $\mu\text{L}$  por pozo en la placa.

Como negativo se utilizó agua destilada. La placa se cubrió con un plástico óptico, se centrifugó a 2500 rpm por 5 minutos y se colocó en el termociclador 7500 de Applied Biosystems. La amplificación se realizó a una temperatura de alineación de 55°C y se utilizaron 45 ciclos.

### **Programa de ciclaje**

1-90°C (2 min)

2-95°C (30 seg)

3-55°C (45 seg)

4-72°C (45 seg)

Repetir el paso 2 al 4 (45 ciclos)

### **Programa para la curva de fusión**

1-95°C (15 seg)

2-55°C (1 min)

3-95°C (30 seg)

4-55°C (15 seg)

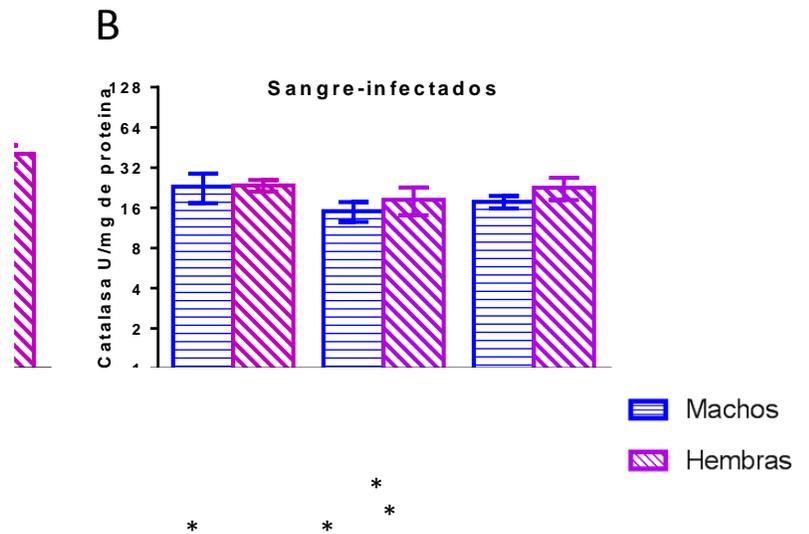
## 9.8 Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism 6 para realizar las gráficas y su correspondiente análisis estadístico la cual consistió en una prueba de Anova de una vía para saber si existían diferencias significativas, posteriormente se realizó el análisis de varianza con la prueba de Tukey, las pruebas tuvieron una significancia del 5% ( $p \leq 0.05$ ).

## 10 RESULTADOS.

### 10.1 Efecto de la testosterona sobre la actividad enzimática y la expresión de catalasa en ratones infectados con *P. berghei* ANKA.

La gonadectomía (Gx) no modificó la actividad de la enzima CAT en la sangre de los machos y las hembras (Figura 2A y 2B). Únicamente en el bazo de ratones infectados se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los machos y las hembras intactas (Figura 2D), en este tejido, la gonadectomía disminuyó significativamente la actividad de CAT únicamente en las hembras. La infección con *P. berghei* ANKA incrementó la actividad de la enzima en bazo de las hembras intactas (Figura 2C y 2D).



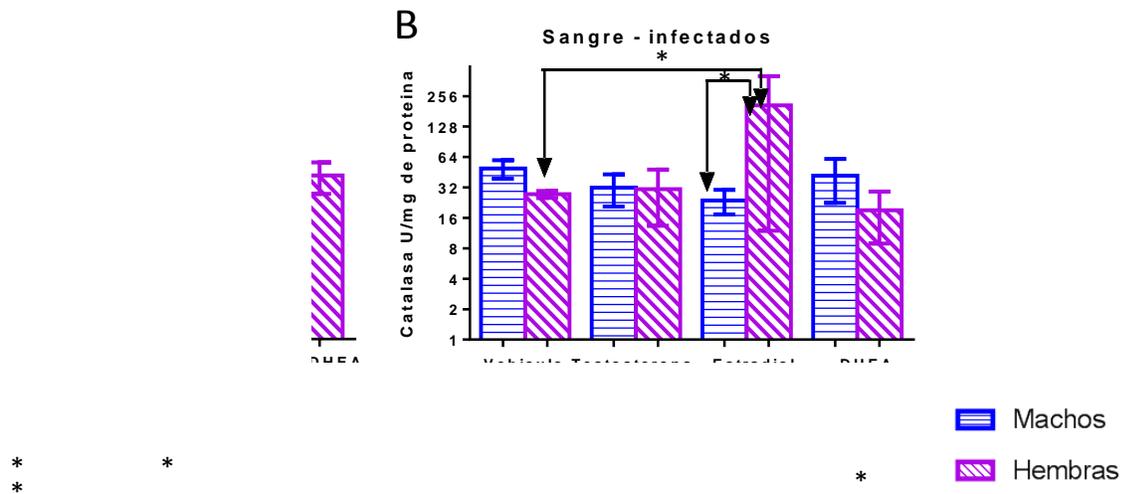
**Figura 2. Efecto de la gonadectomía sobre la actividad de catalasa en la sangre y el bazo de ratones infectados con *P. berghei* ANKA y no infectados.** El color azul denota a los grupos de ratones machos y el morado corresponde a los grupos de ratones hembras, las flechas y líneas representan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $p \leq 0.05\%$ ). Cada histograma representa el promedio con su respectiva desviación estándar.

El reemplazo con testosterona a ratones machos y hembras gonadectomizados no cambio la actividad de CAT en sangre (Figura 3A). Sin embargo, en el bazo la testosterona disminuyó significativamente la actividad de CAT en las hembras (Figura 3B).



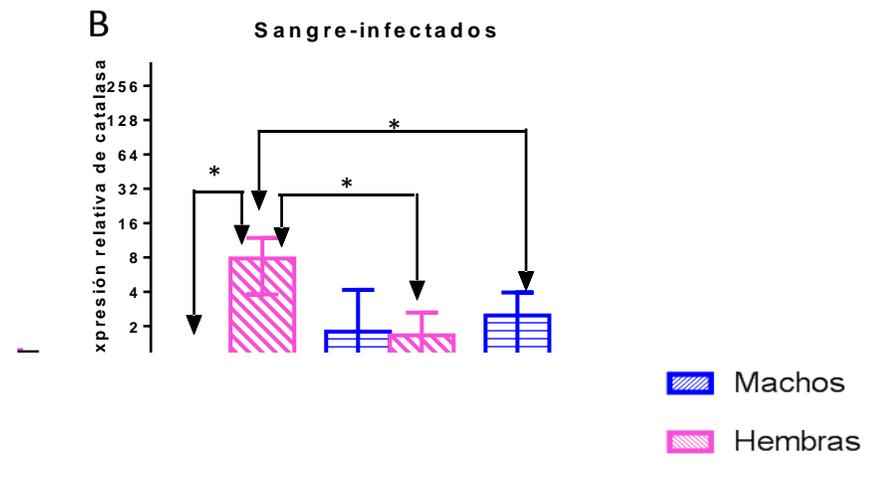
**Figura 3. Efecto de la testosterona, estradiol y DHEA en ratones gonadectomizados sobre la actividad específica de catalasa en sangre y bazo de ratones infectados con *P. berghei* ANKA.** El color azul denota a los grupos de ratones machos y el color morado corresponde a los grupos de ratones hembras, las flechas y líneas representan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $p=0.05\%$ ). Cada histograma representa el promedio con su respectiva desviación estándar.

Cuando se evaluó la actividad de la enzima CAT en ratones intactos a los que se les administró testosterona y se infectaron con *P. berghei* ANKA. No se detectaron diferencias significativas en la actividad de CAT en la sangre de ratones machos o hembras de los grupos control que no se infectaron con *P. berghei* ANKA (Figura 4A). Sin embargo, en el bazo, el administrar testosterona incrementó significativamente la actividad de la enzima en las hembras no infectadas, mientras que no se observaron cambios de la actividad enzimática en los machos (Figura 4C). La administración de testosterona en los grupos de machos o hembras que se infectaron con el parásito no modificó significativamente la actividad de la enzima en la sangre (Figura 4B) ni en el bazo (Figura 4D).



**Figura 4. Efecto de la administración de testosterona, estradiol ó DHEA sobre la actividad específica de catalasa en sangre y bazo de ratones infectados con *P. berghei* ANKA y no infectados.** El color azul denota a los grupos de ratones machos y el color morado corresponde a los grupos de ratones hembras, las flechas y líneas representan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $p=0.05\%$ ). Cada histograma representa el promedio con su respectiva desviación estándar.

También se evaluó la expresión del gene catalasa en relación al gene constitutivo  $\beta$ -actina. Se detectó que la expresión relativa de CAT en los ratones Gx infectados con *P. berghei* ANKA y en los no infectados fue mayor en bazo (Figura 5C y 5D) que en la sangre (Figura 5A y 5B). La gonadectomía no modificó la expresión del gene en la sangre o en el bazo en los ratones de ambos sexos no infectados (Figura 5A y 5C). La infección incrementó la expresión del gene CAT en ambos tejidos. Interesantemente la gonadectomía disminuyó significativamente la expresión de CAT en la sangre de las hembras infectadas, pero no generó cambios en los machos infectados (Figura 5B).



**Figura 5. Efecto de la gonadectomía sobre la expresión relativa de catalasa en sangre y bazo de ratones infectados con *P. berghei* ANKA y no infectados.** El color azul denota a los grupos de ratones machos y el color morado corresponde a los grupos de ratones hembras, las flechas y líneas representan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $p=0.05\%$ ). Cada histograma representa el promedio con su respectiva desviación estándar.

## 10.2 Efecto del estradiol sobre la actividad enzimática y la expresión de catalasa en ratones infectados con *P. berghei* ANKA.

En las hembras gonadectomizadas tratadas con estradiol la actividad enzimática de CAT en la sangre aumento significativamente con respecto al grupo control (vehículo) (Figura 3A). Mientras que en el bazo la actividad específica de CAT disminuyó cuando se administró estradiol en relación al grupo tratado con vehículo (Figura 3B).

La administración de estradiol en las hembras infectadas incrementó la actividad de CAT en relación a las hembras tratados con el vehículo (Figura 4B). Sin

embargo, en el bazo la administración de estradiol en conjunto con la infección no modificó significativamente la actividad de la enzima CAT (Figura 4D).

Las hembras expresaron más CAT que los machos en sangre y la administración de estradiol no modificó la expresión del gene de CAT (Figura 6A).



**Figura 6. Efecto de la testosterona, estradiol y DHEA en ratones gonadectomizados sobre la expresión relativa de catalasa en sangre y bazo de ratones infectados con *P. berghei* ANKA.** El color azul denota a los grupos de ratones machos y el color morado corresponde a los grupos de ratones hembras, las flechas y líneas representan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $p=0.05\%$ ). Cada histograma representa el promedio con su respectiva desviación estándar.

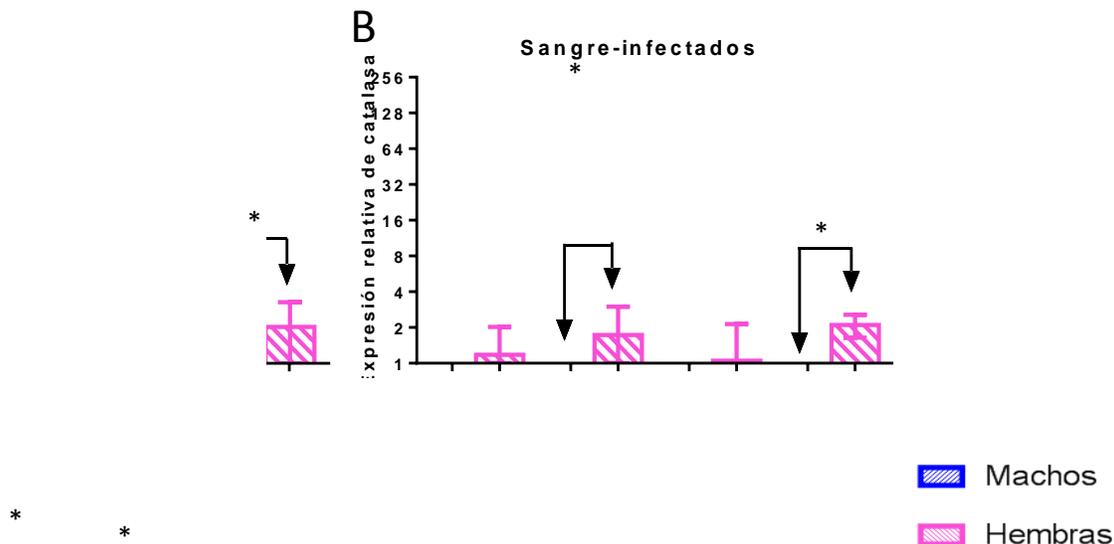
Ni la infección ni la administración de estradiol modificó la expresión del gen CAT en sangre o bazo (Figura 7B y 7D). A pesar de que se detectó una tendencia al incremento de la expresión del gene, la variabilidad tan grande de los resultados impidió demostrar un efecto estadísticamente significativo.

### **10.3 Efecto del esteroide DHEA sobre la actividad enzimática y la expresión del gene de catalasa en ratones infectados con *P: berghei* ANKA.**

La administración de DHEA a los ratones machos o hembras gonadectomizados e infectados con el parásito no modificó la actividad de CAT en la sangre o en el bazo en relación a los grupos control que recibieron vehículo (Figura 3A y 3B).

La administración de DHEA en ratones machos y hembras intactos y sin infección no modificó la actividad de la enzima en sangre (Figura 4A y 4B). Sin embargo, en el bazo de las hembras infectadas la administración de DHEA incremento la actividad de CAT en el bazo (Figura 4D).

Las hembras tratadas con DHEA (Figura 6A, 7A y 7B) presentaron expresión génica significativamente mayor en sangre que los machos tratados con DHEA, sin embargo este resultado no correlacionó con la actividad enzimática específica (Figura 4A y 4B).



**Figura 7. Efecto de la testosterona, estradiol y DHEA en ratones sobre la expresión relativa de catalasa en sangre y bazo de ratones infectados con *P. berghei* ANKA e no infectados.** El color azul denota a los grupos de ratones machos y el color morado corresponde a los grupos de ratones hembras, las flechas y líneas representan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $p=0.05\%$ ). Cada histograma representa el promedio con su respectiva desviación estándar.

## 11 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Como se esperaba la administración de la hormona estradiol aumento la actividad enzimática y la expresión del gen CAT, mientras que la gonadectomía en hembras causó el efecto opuesto. Este hallazgo sugiere que el estradiol regula la actividad y la expresión de catalasa. Nuestros resultados corroboran que las hormonas regulan la homeostasis oxidativa (68).

La gonadectomía en machos no generó cambios significativos en la actividad y expresión de catalasa, lo que contrasta con la actividad oxidante previamente descrita de la testosterona (69). Sin embargo, la administración de disminuyó la actividad enzimática de CAT en las hembras. Se ha descrito que las hormonas son responsables de la diferencia en la susceptibilidad ante malaria (67) y con estos resultados demostramos que una misma hormona puede tener efectos diferentes en cada sexo.

DHEA no afectó la actividad enzimática ni la expresión de CAT.

Otro aspecto interesante es que la actividad enzimática y la expresión de CAT fueron mayores en bazo que en sangre, esto puede deberse a que el bazo es uno de los principales órganos (junto al hígado) que median la respuesta inmune contra la fase sanguínea de la malaria (70)

### **11.1 Efecto de la testosterona sobre la actividad enzimática y la expresión de catalasa**

La testosterona moduló negativamente la actividad de la enzima CAT en el bazo, ya se conocía que a concentraciones altas de testosterona podía causar un incremento de las ROS (71) probablemente ligada a la disminución de la actividad de CAT. Lo anterior indicaría por que los adultos del género masculino desarrollan síntomas de la enfermedad más graves (67).

La infección incrementó la expresión del gene CAT lo que corrobora que la infección con el *Plasmodium* induce estrés oxidativo y como consecuencia en un intento para neutralizarlo, se incrementa la expresión de la enzima antioxidante CAT. Este resultado es interesante particularmente en los machos, ya que se ha descrito que la presencia de hormonas masculinas disminuye la expresión de genes relacionados a la resistencia a la malaria (70). Sin embargo en este trabajo ocurrió lo contrario.

La expresión dimórfica del gene depende del sexo del ratón. Los machos gonadectomizados e infectados expresaron mayor CAT que las hembras, pero la

diferencia no resultó estadísticamente significativa, este aparente aumento en catalasa puede deberse a que las concentraciones bajas de testosterona incrementan la concentración de citocinas proinflamatorias (72), las cuales se relacionan con el incremento de las ROS (73).

La administración de testosterona disminuyó la actividad de CAT. Sin embargo, la gonadectomía no modificó la actividad de la enzima. Estos resultados son similares a los descritos previamente (54). Además de que la testosterona participa en regulación de la homeostasis celular oxidativa (74).

### **11.2 Efecto del estradiol sobre la actividad enzimática y la expresión de catalasa en ratones infectados con *P. berghei* ANKA.**

Los resultados sugieren que las hormonas sexuales que se producen en las gónadas de las hembras (estradiol y progesterona) modulan positivamente la actividad de la enzima CAT. La misma dosis de estradiol puede modular la actividad de CAT de forma diferente en los distintos tejidos ya que hubo un mayor efecto en sangre. De lo anterior el 17- $\beta$  estradiol puede influenciar en el estrés oxidativo de diferente forma, por ejemplo en el músculo esquelético modifica la expresión de genes antioxidantes tales como GPx (75) mientras que en la superficie del epitelio ovárico puede causar daño al ADN (76), además de que el estradiol tienen la capacidad de aumentar la respuesta de células dendríticas (77). La ausencia de hormonas sexuales femeninas también se ha asociado a una mayor parasitemia (78) y ya que CAT también disminuye con la ausencia de las hormonas femeninas es posible la CAT ayude a mantener una menor parasitemia.

Otro aspecto interesante fue que el estradiol puede aumentar la actividad de CAT en las hembras no infectadas mientras que la combinación de la administración de estradiol con la infección con *P. berghei* no generó este efecto, puede deberse a la capacidad del parásito de mantener un adecuado balance redox dentro del

eritrocito (46). Algo a destacar es que la actividad enzimática de CAT no coincide con su expresión génica por lo que podemos deducir que ambos fenómenos están desfasados en el tiempo y la influencia de las hormonas puede darse tanto en la expresión del gen así como en la actividad de la enzima.

### **11.3 Efecto de DHEA sobre la actividad enzimática y expresión del gene de CAT**

Se ha descrito que DHEA favorece la actividad de las enzimas antioxidantes como SOD (44), además que las concentraciones más elevadas de DHEA que ocurren en los individuos de 25 a 35 años de edad correlacionaron con parasitemias bajas. (36).

Los resultados indican que la expresión del ARN mensajero es un fenómeno que ocurre desfasado en el tiempo en relación a la síntesis de la proteína y a la actividad enzimática (Figura 3D) ya que las hembras tienen una mayor actividad de CAT en bazo que los machos.

Es relativamente poco lo que se conoce acerca de DHEA comparado con hormonas como testosterona y estradiol sin embargo este estudio demuestra que a pesar de que DHEA tiene una relación con el control del estrés oxidativo, no detectamos que modificara la actividad o la expresión de la enzima CAT en ratones infectados con *P. berghei* ANKA, por lo que es probable que no intervenga en la modulación de la actividad de catalasa.

## **12. CONCLUSIONES**

- La actividad enzimática de catalasa y su expresión génica es mayor en bazo que en la sangre y se incrementa cuando existe infección con el *Plasmodium*.

- La gonadectomía disminuyó la actividad de catalasa en hembras pero no afectó a los machos, lo que sugiere que los esteroides gonadales en las hembras aumentan la actividad de catalasa en el bazo.
- Reconstituir con testosterona a los ratones gonadectomizados no modificó la actividad de la enzima en sangre pero en el bazo disminuyó significativamente la actividad de catalasa.
- Reconstituir con estradiol promueve la actividad enzimática en sangre pero la disminuyó en el bazo lo que sugiere que el estradiol interactúa con sus posibles receptores de forma diferencial lo que depende del tejido blanco y también del sexo del ratón.
- La reconstitución con DHEA no modificó la actividad de catalasa en los machos pero la incrementó en el bazo de las hembras.
- La expresión del gene de catalasa en ratones intactos es mayor en la sangre de las hembras que en la de los machos y la administración de esteroides sexuales en ratones intactos no modificó la expresión del gene.
- Los mecanismos que rigen la expresión del gene catalasa y su actividad son diversos y complejos, si bien están bajo la regulación de los esteroides sexuales, también existen otros mecanismos reguladores independientes de los esteroides sexuales que operan simultáneamente.

### **13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Roberts CW, Walker W, Alexander J. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clinical microbiology reviews*. 2001;14(3):476-88.
2. Vina J, Borrás C, Gambini J, Sastre J, Pallardo FV. Why females live longer than males? Importance of the upregulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds. *FEBS letters*. 2005;579(12):2541-5.
3. Cernetich A, Garver LS, Jedlicka AE, Klein PW, Kumar N, Scott AL, et al. Involvement of gonadal steroids and gamma interferon in sex differences in

response to blood-stage malaria infection. *Infection and immunity*. 2006;74(6):3190-203.

4. Martinez Sanchis, S. Hormonas estado de ánimo y función cognitiva. 1° Ed. Delta: Madrid. 2007. 196 p.

5. Kehr S, Sturm N, Rahlfs S, Przyborski JM, Becker K. Compartmentation of redox metabolism in malaria parasites. *PLOS Pathogens*. 2010;6(12):e1001242.

6. Percario S, Moreira DR, Gomes BA, Ferreira ME, Goncalves AC, Laurindo PS, et al. Oxidative stress in malaria. *International journal of molecular sciences*. 2012;13(12):16346-72.

7. Pierce SK, Miller LH. World Malaria Day 2009: What Malaria Knows about the Immune System That Immunologists Still Do Not. *Journal of immunology*. 2009;182(9):5171-7.

8. Carrillo-Esper R C. Inmunidad innata receptores Toll y Sepsis. *Cirugía y Cirujanos*. 2003(71):252:8.

9. Organization WH. World malaria report. Geneva, Switzerland: 2014.

10. Zamocky M, Furtmuller PG, Obinger C. Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxidants & redox signaling*. 2008;10(9):1527-48.

11. Kirkman HN, Gaetani GF. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1984;81(14):4343-7.

12. Kirkman HN, Galiano S, Gaetani GF. The function of catalase-bound NADPH. *The Journal of biological chemistry*. 1987;262(2):660-6.

13. Hong Y, Wang G, Maier RJ. A *Helicobacter hepaticus* catalase mutant is hypersensitive to oxidative stress and suffers increased DNA damage. *Journal of medical microbiology*. 2007;56(Pt 4):557-62.

14. Wang Z, Yang H, Ramesh A, Roberts LJ, 2nd, Zhou L, Lin X, et al. Overexpression of Cu/Zn-superoxide dismutase and/or catalase accelerates benzo(a)pyrene detoxification by upregulation of the aryl hydrocarbon receptor in mouse endothelial cells. *Free radical biology & medicine*. 2009;47(8):1221-9.

15. Soder O. Sexual dimorphism of gonadal development. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2007;21(3):381-91.

16. Klein SL. The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2000;24(6):627-38.

17. Wildling E, Winkler S, Kreamsner PG, Brandts C, Jenne L, Wernsdorfer WH. Malaria epidemiology in the province of Moyen Ogoov, Gabon. *Tropical medicine and parasitology* : official organ of Deutsche Tropenmedizinische Gesellschaft and of Deutsche Gesellschaft fur Technische Zusammenarbeit. 1995;46(2):77-82.
18. Landgraf B, Kollaritsch H, Wiedermann G, Wernsdorfer WH. Parasite density of *Plasmodium falciparum* malaria in Ghanaian schoolchildren: evidence for influence of sex hormones? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1994;88(1):73-4.
19. Benten WP, Ulrich P, Kuhn-Velten WN, Vohr HW, Wunderlich F. Testosterone-induced susceptibility to *Plasmodium chabaudi* malaria: persistence after withdrawal of testosterone. *The Journal of endocrinology*. 1997;153(2):275-81.
20. Sanni LA, Fonseca LF, Langhorne J. Mouse models for erythrocytic-stage malaria. *Methods in molecular medicine*. 2002;72:57-76.
21. Legorreta-Herrera M, Mosqueda-Romo NA, Nava-Castro KE, Morales-Rodriguez AL, Buendia-Gonzalez FO, Morales-Montor J. Sex hormones modulate the immune response to *Plasmodium berghei* ANKA in CBA/Ca mice. *Parasitology research*. 2015.
22. Lyssenko V, Groop L. Genome-wide association study for type 2 diabetes: clinical applications. *Current opinion in lipidology*. 2009;20(2):87-91.
23. Wunderlich F, Marinovski P, Benten WP, Schmitt-Wrede HP, Mossmann H. Testosterone and other gonadal factor(s) restrict the efficacy of genes controlling resistance to *Plasmodium chabaudi* malaria. *Parasite immunology*. 1991;13(4):357-67.
24. Wunderlich F, Maurin W, Benten WP, Schmitt-Wrede HP. Testosterone impairs efficacy of protective vaccination against *P. chabaudi* malaria. *Vaccine*. 1993;11(11):1097-9.
25. Zhang Z, Chen L, Saito S, Kanagawa O, Sendo F. Possible modulation by male sex hormone of Th1/Th2 function in protection against *Plasmodium chabaudi* chabaudi AS infection in mice. *Experimental parasitology*. 2000;96(3):121-9.
26. Yoshimoto T, Takahama Y, Wang CR, Yoneto T, Waki S, Nariuchi H. A pathogenic role of IL-12 in blood-stage murine malaria lethal strain *Plasmodium berghei* NK65 infection. *Journal of Immunology*. 1998;160(11):5500-5.
27. Benten WP, Wunderlich F, Herrmann R, Kuhn-Velten WN. Testosterone-induced compared with oestradiol-induced immunosuppression against *Plasmodium chabaudi* malaria. *The Journal of endocrinology*. 1993;139(3):487-94.

28. Dutta GP, Kamboj KK. Influence of progesterone and estrogen administration on the recrudescence patterns of *Plasmodium knowlesi* infection in female rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following initial subcurative chloroquine therapy. *Indian journal of malariology*. 1984;21(2):79-88.
29. Vleugels MP, Brabin B, Eling WM, de Graaf R. Cortisol and *Plasmodium falciparum* infection in pregnant women in Kenya. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1989;83(2):173-7.
30. Van Zon AA, Eling WM, Hermsen CC, Van de Wiel TJ, Duives ME. Malarial immunity in pregnant mice, in relation to total and unbound plasma corticosterone. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique et de ses filiales*. 1983;76(5):493-502.
31. Saleheen D, Nazir A, Khanum S, Haider SR, Frossard PM. R1615P: a novel mutation in ABCA1 associated with low levels of HDL and type II diabetes mellitus. *International journal of cardiology*. 2006;110(2):259-60.
32. Villarreal-Molina MT, Flores-Dorantes MT, Arellano-Campos O, Villalobos-Comparan M, Rodriguez-Cruz M, Miliar-Garcia A, et al. Association of the ATP-binding cassette transporter A1 R230C variant with early-onset type 2 diabetes in a Mexican population. *Diabetes*. 2008;57(2):509-13.
33. Klein PW, Easterbrook JD, Lalime EN, Klein SL. Estrogen and progesterone affect responses to malaria infection in female C57BL/6 mice. *Gender medicine*. 2008;5(4):423-33.
34. Randall LM, Engwerda CR. TNF family members and malaria: old observations, new insights and future directions. *Experimental parasitology*. 2010;126(3):326-31.
35. Stecina K, Jankowska E, Cabaj A, Pettersson LG, Bannatyne BA, Maxwell DJ. Premotor interneurons contributing to actions of feline pyramidal tract neurones on ipsilateral hindlimb motoneurons. *The Journal of physiology*. 2008;586(2):557-74.
36. Kurtis JD, Mtalib R, Onyango FK, Duffy PE. Human resistance to *Plasmodium falciparum* increases during puberty and is predicted by dehydroepiandrosterone sulfate levels. *Infection and immunity*. 2001;69(1):123-8.
37. Fernandes RC, Hasan M, Gupta H, Geetha K, Rai PS, Hande MH, et al. Host genetic variations in glutathione-S-transferases, superoxide dismutases and catalase genes influence susceptibility to malaria infection in an Indian population. *Molecular genetics and genomics : MGG*. 2015.
38. Ginsburg H, Famin O, Zhang J, Krugliak M. Inhibition of glutathione-dependent degradation of heme by chloroquine and amodiaquine as a possible

basis for their antimalarial mode of action. *Biochemical pharmacology*. 1998;56(10):1305-13.

39. Becker K, Tilley L, Vennerstrom JL, Roberts D, Rogerson S, Ginsburg H. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *International journal for parasitology*. 2004;34(2):163-89.

40. Atamna H, Ginsburg H. Origin of reactive oxygen species in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology*. 1993;61(2):231-41.

41. Francis SE, Sullivan DJ, Jr., Goldberg DE. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annual review of microbiology*. 1997;51:97-123.

42. Siddiqi NJ, Pandey VC. Studies on hepatic oxidative stress and antioxidant defence systems during arteether treatment of *Plasmodium yoelii nigeriensis* infected mice. *Molecular and cellular biochemistry*. 1999;196(1-2):169-73.

43. Bergamini CM, Gambetti S, Dondi A, Cervellati C. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. *Current pharmaceutical design*. 2004;10(14):1611-26.

44. Camporez JP, Akamine EH, Davel AP, Franci CR, Rossoni LV, Carvalho CR. Dehydroepiandrosterone protects against oxidative stress-induced endothelial dysfunction in ovariectomized rats. *The Journal of physiology*. 2011;589(Pt 10):2585-96.

45. Torrentino-Madamet M, Almeras L, Desplans J, Le Priol Y, Belghazi M, Pophillat M, et al. Global response of *Plasmodium falciparum* to hyperoxia: a combined transcriptomic and proteomic approach. *Malaria journal*. 2011;10:4.

46. Kapoor G, Banyal HS. Glutathione reductase and thioredoxin reductase: novel antioxidant enzymes from *Plasmodium berghei*. *The Korean journal of parasitology*. 2009;47(4):421-4.

47. Mueller S, Riedel HD, Stremmel W. Direct evidence for catalase as the predominant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -removing enzyme in human erythrocytes. *Blood*. 1997;90(12):4973-8.

48. Turrens JF, Crapo JD, Freeman BA. Protection against oxygen toxicity by intravenous injection of liposome-entrapped catalase and superoxide dismutase. *The Journal of clinical investigation*. 1984;73(1):87-95.

49. Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical biochemistry*. 1999;32(8):595-603.

50. Speranza MJ, Bagley AC, Lynch RE. Cells enriched for catalase are sensitized to the toxicities of bleomycin, adriamycin, and paraquat. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(25):19039-43.
51. Thumwood CM, Hunt NH, Cowden WB, Clark IA. Antioxidants can prevent cerebral malaria in *Plasmodium berghei*-infected mice. *British journal of experimental pathology*. 1989;70(3):293-303.
52. Ayres SM, Grenvik A, Holbrook PR, Shoemaker WC. *Tratado de medicina crítica y terapia intensiva*. 4a ed ed. Buenos Aires etc.: Médica Panamericana; 2002. XXXI, 2216 p., 16 p. de lám. p.
53. William CS SM, Ake GG. *Tratado de medicina critica y tratado de terapia intensiva*. 4° ed 2000.
54. Tam NN, Gao Y, Leung YK, Ho SM. Androgenic regulation of oxidative stress in the rat prostate: involvement of NAD(P)H oxidases and antioxidant defense machinery during prostatic involution and regrowth. *The American journal of pathology*. 2003;163(6):2513-22.
55. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Inmunología celular y molecular*. 6a ed. Barcelona etc.: Elsevier; 2008. viii, 566 p. p.
56. Yoshimura M. [Cardiac aldosterone]. *Nihon rinsho Japanese journal of clinical medicine*. 2006;64(5):837-42.
57. Goldfarb AH, McIntosh MK, Boyer BT. Vitamin E attenuates myocardial oxidative stress induced by DHEA in rested and exercised rats. *Journal of applied physiology*. 1996;80(2):486-90.
58. Mastrocola R, Aragno M, Betteto S, Brignardello E, Catalano MG, Danni O, et al. Pro-oxidant effect of dehydroepiandrosterone in rats is mediated by PPAR activation. *Life sciences*. 2003;73(3):289-99.
59. Simoncini T, Genazzani AR. Non-genomic actions of sex steroid hormones. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2003;148(3):281-92.
60. Akide-Ndunge OB, Tambini E, Giribaldi G, McMillan PJ, Muller S, Arese P, et al. Co-ordinated stage-dependent enhancement of *Plasmodium falciparum* antioxidant enzymes and heat shock protein expression in parasites growing in oxidatively stressed or G6PD-deficient red blood cells. *Malaria journal*. 2009;8:113.
61. Fabbri C, de Cassia Mascarenhas-Netto R, Lalwani P, Melo GC, Magalhaes BM, Alexandre MA, et al. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in *Plasmodium vivax* malaria patients evolving with cholestatic jaundice. *Malaria journal*. 2013;12:315.

62. Campos C, Casali KR, Baraldi D, Conzatti A, Araujo AS, Khaper N, et al. Efficacy of a low dose of estrogen on antioxidant defenses and heart rate variability. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2014;2014:218749.
63. Itagaki T, Shimizu I, Cheng X, Yuan Y, Oshio A, Tamaki K, et al. Opposing effects of oestradiol and progesterone on intracellular pathways and activation processes in the oxidative stress induced activation of cultured rat hepatic stellate cells. *Gut*. 2005;54(12):1782-9.
64. Chainy GB, Samantaray S, Samanta L. Testosterone-induced changes in testicular antioxidant system. *Andrologia*. 1997;29(6):343-9.
65. Vina J, Sastre J, Pallardo FV, Gambini J, Borras C. Role of mitochondrial oxidative stress to explain the different longevity between genders: protective effect of estrogens. *Free radical research*. 2006;40(12):1359-65.
66. Campbell CS, Caperuto LC, Hirata AE, Araujo EP, Velloso LA, Saad MJ, et al. The phosphatidylinositol/AKT/atypical PKC pathway is involved in the improved insulin sensitivity by DHEA in muscle and liver of rats in vivo. *Life sciences*. 2004;76(1):57-70.
67. Pathak S, Rege M, Gogtay NJ, Aigal U, Sharma SK, Valecha N, et al. Age-dependent sex bias in clinical malarial disease in hypoendemic regions. *PIOS one*. 2012;7(4):e35592.
68. Pinto RE, Bartley W. The nature of the sex-linked differences in glutathione peroxidase activity and aerobic oxidation of glutathione in male and female rat liver. *The Biochemical journal*. 1969;115(3):449-56.
69. Sadowska-Krepa E, Klapcinska B, Jagsz S, Sobczak A, Chrapusta SJ, Chalimoniuk M, et al. High-dose testosterone propionate treatment reverses the effects of endurance training on myocardial antioxidant defenses in adolescent male rats. *Cardiovascular toxicology*. 2011;11(2):118-27.
70. Krucken J, Dkhil MA, Braun JV, Schroetel RM, El-Khadragy M, Carmeliet P, et al. Testosterone suppresses protective responses of the liver to blood-stage malaria. *Infection and immunity*. 2005;73(1):436-43.
71. Hwang TI, Liao TL, Lin JF, Lin YC, Lee SY, Lai YC, et al. Low-dose testosterone treatment decreases oxidative damage in TM3 Leydig cells. *Asian journal of andrology*. 2011;13(3):432-7.
72. Bobjer J, Katrinaki M, Tsatsanis C, Lundberg Giwercman Y, Giwercman A. Negative Association between Testosterone Concentration and Inflammatory Markers in Young Men: A Nested Cross-Sectional Study. *PIOS one*. 2013;8(4):e61466.

73. Rahman I, MacNee W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *The European respiratory journal*. 2000;16(3):534-54.
74. Pinthus JH, Bryskin I, Trachtenberg J, Lu JP, Singh G, Fridman E, et al. Androgen induces adaptation to oxidative stress in prostate cancer: implications for treatment with radiation therapy. *Neoplasia*. 2007;9(1):68-80.
75. Baltgalvis KA, Greising SM, Warren GL, Lowe DA. Estrogen regulates estrogen receptors and antioxidant gene expression in mouse skeletal muscle. *PLoS one*. 2010;5(4):e10164.
76. Symonds DA, Merchenthaler I, Flaws JA. Methoxychlor and estradiol induce oxidative stress DNA damage in the mouse ovarian surface epithelium. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2008;105(1):182-7.
77. Li X, Xu Y, Ma L, Sun L, Fu G, Hou Y. 17 $\beta$ -Estradiol Enhances the Response of Plasmacytoid Dendritic Cell to CpG. *PLoS one*. 2009;4(12):e8412.
78. Mosqueda-Romo NA, Rodriguez-Morales AL, Buendia-Gonzalez FO, Aguilar-Sanchez M, Morales-Montor J, Legorreta-Herrera M. Gonadal steroids negatively modulate oxidative stress in CBA/Ca female mice infected with *P. berghei* ANKA. *BioMed research international*. 2014;2014:805495.

## **14-Anexo**

### **Reactivos**

- Alcohol al 70%
- Aceite de almendras
- Propionato de testosterona 30mg/1mL
- Fenilpropionato de testosterona 60mg/1mL
- Isocaproato de testosterona 60mg/1mL
- Decanoato de testosterona 100mg/1mL
- 17- $\beta$ -estradiol (Sigma)
- Dehidroepiandrosterona (Sigma)
- Heparina
- PBS 10X

- Tripure® (Roche)
- Cloroformo/alcohol isoamílico 49:1
- Alcohol isopropílico (Sigma)
- Reactivo BIO-RAD para determinación de proteína.
- Albumina sérica bovina
- Agua con dietilpirocarbonato al 0.001% (Agua DEPC)
- Etanol al 80% con Agua DEPC
- Amortiguador First Strand (Promega)
- Inhibidor de RNAsa RNAsin (Promega)
- dNTP's 200  $\mu$ M
- Enzima MMLV-RT 5mM (Promega)
- Ditioneitol (dTT) [Promega]
- Cloruro de Potasio 50mM
- Gelatina 200  $\mu$ M
- TRIS HCl 20 mM
- Cloruro de Magnesio 100 mM
- Taq Polimerasa 5U/ $\mu$ L (Promega)
- Referencia Pasiva ROX 50X (Invitrogen)