



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

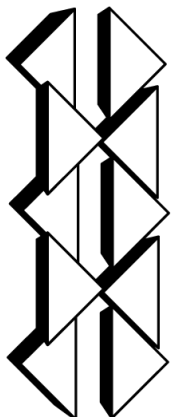
**Efecto del estradiol, la testosterona y la
dehidroepiandrosterona en el estrés oxidativo,
la actividad antioxidante y la expresión génica
de INF- γ en un modelo de malaria murina.**

T E S I S
QUÉ PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :
JESÚS AGUILAR CASTRO

Número de cuenta: 30614603-9

Directora: Dra. Martha Legorreta Herrera

Agosto 2015



México, D. F.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 recibió financiamiento de la DGAPA proyecto PAPIIT IN216914
- A la Universidad Nacional Autónoma de México, en particular a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y al Laboratorio de Inmunología Molecular bajo la dirección de la Dra. Martha Legorreta Herrera, por brindarme las herramientas y la oportunidad de desarrollar mi trabajo de investigación.
- A mis sinodales M. en C. Fernando Francisco Hernández Clemente, Dra. Martha Legorreta Herrera, Dra. María Isabel Soto Cruz, Dra. Raquel Retana Ugalde y M. en C. Rosa Elba Galván Durante por su aportaciones y correcciones durante la revisión de la Tesis.
- A mis padres Rosa María Castro y Juan Abraham Aguilar, porque con su apoyo, comprensión y consejos me apoyaron durante mi vida profesional; con su entrega y ejemplo me enseñaron como ser una persona capaz, responsable y sobretodo que me dieron las herramientas para demostrar lo que soy y como seguir adelante a pesar de las adversidades. En particular le agradezco a mi madre por mostrarme día a día que una convicción férrea y con carácter se puede lograr lo que sea. Y a mi padre por enseñarme que la perseverancia lleva al éxito, solo es necesario elegir un camino y nunca abandonarlo.
- A mi hermana Blanca Aguilar, porque con su juventud y energía me enseñó que no todo es trabajo y me enseñó a relajarme, con su paciencia y buenos consejos tome las mejores decisiones y con su alegría pude sentirme mejor en momentos difíciles.
- A la Doctora Martha Legorreta Herrera, porque con su ejemplo, guía y buen consejo me supere profesionalmente y me enseñó muchas cosas durante mi estancia en su laboratorio; que me volvieron una mejor persona y científico. Además me brindo muchas oportunidades de superación profesional y capacitación que no muchos investigadores brindan a sus alumnos.

- A mi amigo Fidel Buendía González, porque con sus consejos y su estilo muy particular de hacer las cosas me enseñó que la ciencia se vive intensamente y a un ritmo propio.
- A mi amigo Luis Cervantes Candelas, porque gracias a él tuve la oportunidad de desarrollar este proyecto y con su estilo único, encontré ayuda durante la elaboración de este proyecto.
- A Ana Rodríguez y Janeth Sotelo porque durante la elaboración de este trabajo me apoyaron y estuvieron conmigo aunque en muchas ocasiones no pude estar para ellas.
- A mis amigas Rosa Maldonado, Margarita Aguilar y Alitzel Vásquez, porque aunque conviví poco tiempo con ellas; fue muy enriquecedor y divertido, además que con sus enseñanzas pude volverme el científico que ahora soy.
- A mis compañeros Juan Montzi, Erick Alcántara, Mario Chávez, Abel, García, Christian Hernández y Alain Carlín que me apoyaron durante mi formación académica y compartieron conmigo éxitos y fracasos.
- A mis compañeros y amigos Vida Rosas, Omar Flores, Omar Fernández, Mildred Peralta, Beatriz Barragán, Miguel Gutiérrez, Aldair Mares, David Bustamante y Lilian Araujo que me permitieron compartirles el conocimiento que adquirí a lo largo de mi carrera y que con su alegría viví buenos momentos.
- A todas aquellas personas que a pesar de no tener una relación más cercana conmigo, con sus acciones de cada día me apoyaron durante mi formación profesional y durante el desarrollo de este proyecto.

ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. MARCO TEÓRICO.....	3
3.1. Malaria: Un problema de atención mundial	3
3.2. Ciclo vital de <i>Plasmodium</i>	3
3.3. Características principales de <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.....	5
3.4. Respuesta inmune y la malaria	5
3.4.1 Citocinas	7
3.4.1.1 Interferón Gamma (IFN- γ).....	7
3.5. Efecto de las hormonas sobre la respuesta inmune	9
3.5.1. Testosterona	9
3.5.2. Estradiol.....	10
3.5.3. Dehidroepiandrosterona (DHEA)	11
3.6. Estrés oxidativo	11
3.6.1. Estrés oxidativo: Una consecuencia de la activación de la respuesta inmune	12
3.6.2. Respuesta contra el estrés oxidativo: Enzimas antioxidantes	13
3.7. Reacción en cadena de la polimerasa y retrotranscripción (PCR-RT)	14
3.7.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	14
3.7.2 Retrotranscripción (RT)	16
3.7.3. Métodos de cuantificación de la expresión de un gen: método del $\Delta\Delta CT$	16
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
5. HIPÓTESIS.....	19
6. OBJETIVOS	20
7. DISEÑO EXPERIMENTAL	21
7.1 Materiales	21
7.1.1 Materiales biológicos	21
7.1.2 Reactivos	22
7.1.3 Materiales	23

7.1.4 Equipos	23
7.2. Métodos	24
7.2.1. Gonadectomía de los animales	24
7.2.2. Administración hormonal e infección con <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	24
7.2.3. Extracción de las muestras	25
7.2.4. Cuantificación de proteínas	25
7.2.5. Cuantificación del malondialdehído.....	26
7.2.6. Determinación de la actividad enzimática de GPx.....	26
7.2.7. Determinación de la actividad enzimática de SOD	27
7.2.8. Extracción de ARNm.....	27
7.2.9. Retrotranscripción.....	28
7.2.10. Amplificación del gen IFN- γ por qPCR.....	28
8. RESULTADOS	30
8.1 Efecto de la gonadectomía sobre la parasitemia con <i>P.berghei</i> ANKA en los ratones CBA/Ca	30
8.1.1 Efecto de la reconstitución con testosterona	31
8.1.2 Efecto de la reconstitución con estradiol.....	32
8.1.3 Efecto de reconstituir con dehidroepiandrosterona	33
8.2 Efecto de los esteroides sexuales sobre la expresión del gen IFN- γ en la sangre, bazo, hígado y cerebro de ratones CBA/Ca infectados con <i>P. berghei</i> ANKA	35
8.2.1 Efecto de reconstituir con testosterona sobre la expresión del gen IFN- γ	35
8.2.2 Efecto de reconstituir con estradiol sobre la expresión del gen IFN- γ	35
8.2.3 Efecto de reconstituir con DHEA sobre la expresión del gen IFN- γ	36
8.3 Efecto de la reconstitución de ratones gonadectomizados con esteroides sexuales sobre el estrés oxidativo que genera la infección con <i>P. berghei</i> ANKA	37
8.4 Efecto de reconstituir con esteroides sexuales a ratones CBA/Ca gonadectomizados sobre la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD)	37
8.4.1 Efecto de la testosterona sobre la actividad de la enzima SOD.....	38
8.4.2 Efecto del estradiol sobre la actividad de la enzima SOD	38
8.4.3 Efecto de la DHEA sobre la actividad de la enzima SOD	38

8.5 Efecto de la reconstitución de ratones gonadectomizados con esteroides sexuales sobre la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx)	39
8.5.1 Efecto de la testosterona sobre la actividad de GPx.....	40
8.5.2 Efecto de estradiol sobre la actividad de GPx.....	40
8.5.3 Efecto de la dehidroepiandrosterona sobre la actividad de GPx.....	41
8.6 Efecto de los esteroides sexuales sobre la concentración de malondialdehído (MDA) en ratones CBA/Ca infectados con <i>P. berghei</i> ANKA	41
8.6.1 Efecto de la testosterona sobre la concentración de malondialdehído (MDA).....	42
8.6.2 Efecto del estradiol sobre la concentración de malondialdehído (MDA)	42
8.6.3 Efecto de la DHEA sobre la concentración de malondialdehído (MDA)	43
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	45
10. CONCLUSIONES	48
11. PERSPECTIVAS	48
12. BIBLIOGRAFÍA.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Casos estimados de malaria en el mundo ¹	3
Figura 2. Ciclo vital de <i>Plasmodium</i> ¹²	4
Figura 3. Esquema general de la fagocitosis ¹⁵	6
Figura 4. Relación entre la respuesta inmune y la respuesta adaptativa en el estadio sanguíneo de la malaria ²¹	8
Figura 5. Actividad de los fagocitos ³⁴	13
Figura 6. Efecto de la gonadectomía sobre la parasitemia en ratones CBA/Ca machos y hembras.....	31
Figura 7. Efecto de la reconstitución de ratones gonadectomizados con testosterona sobre la parasitemia.....	32
Figura 8. Efecto de la reconstitución con estradiol a ratones gonadectomizados sobre la parasitemia.....	33
Figura 9. Efecto de la reconstitución de ratones gonadectomizados con dehidroepiandrosterona sobre la parasitemia.....	34
Figura 10. Efecto de la reconstitución de ratones gonadectomizados con testosterona, estradiol y DHEA sobre la expresión relativa de IFN- γ en ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.....	36
Figura 11. Efecto de la reconstitución de ratones gonadectomizados con testosterona, estradiol y DHEA sobre la actividad de la enzima SOD en ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.....	39
Figura 12. Efecto de la reconstitución de ratones gonadectomizados con testosterona, estradiol y DHEA sobre la actividad de la enzima GPx en ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.....	40
Figura 13. Efecto de la reconstitución de ratones gonadectomizados con testosterona, estradiol y DHEA sobre la concentración de MDA.....	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución de los ratones en los diferentes grupos experimentales	24
Tabla 2. Curva patrón de proteínas	26
Tabla 3. Curva control para la técnica de SOD	27
Tabla 4. Programa de ciclaje para la amplificación de los genes IFN- γ y β -actina.	29
Tabla 5. Comparación entre la hipótesis y los resultados experimentales en la reconstitución con testosterona.	43
Tabla 6. Comparación entre la hipótesis y los resultados experimentales en la reconstitución con estradiol.	44
Tabla 7. Comparación entre la hipótesis y los resultados experimentales en la reconstitución con DHEA.	44

1. RESUMEN

La malaria o paludismo es una enfermedad parasitaria causada por un protozoo del género *Plasmodium*, la cual representa un problema de salud pública mundial. Una característica de la enfermedad es el dimorfismo sexual, los machos desarrollan mayor severidad en síntomas y mortalidad que las hembras. Se ha descrito que las hormonas sexuales juegan un papel importante en la diferenciación sexual en roedores y también participan en la regulación de la respuesta inmune. La infección con *Plasmodium* genera un proceso inflamatorio intenso mediado por interferón γ (IFN- γ), citocina importante en la eliminación del parásito, así como en la activación de otras células de la respuesta inmune, como los macrófagos. Por otra parte, se ha demostrado que el estrés oxidativo es el principal mecanismo que utilizan las células de la respuesta inmune para eliminar al parásito. Hasta el momento, aún se desconocen los mecanismos por los cuales las hormonas sexuales pudieran modular la expresión de citocinas pro-inflamatorias y el estrés oxidativo en malaria. Por lo anterior, en este trabajo se estudió el efecto de la testosterona, el estradiol y la dehidroepiandrosterona (DHEA) en el estrés oxidativo y la expresión de IFN- γ en un modelo experimental de malaria murina.

Se utilizaron cuatro grupos de seis ratones hembra y cuatro grupos de seis ratones macho, de la cepa CBA/Ca, a las 4 semanas de edad se gonadectomizaron. A cada grupo de hembras y machos, se les administró testosterona o estradiol o DHEA o únicamente el vehículo (control); cada tercer día, por un periodo de 3 semanas. Posteriormente, todos los grupos de ratones se inocularon con 1×10^3 eritrocitos infectados con *Plasmodium berghei* ANKA y todos los ratones se sacrificaron al día 8 posterior a la infección. Diariamente se determinó la parasitemia. Además, se evaluó la actividad de las enzimas SOD y GPx y la concentración de MDA, así como parámetros del estrés oxidativo, la expresión génica de IFN- γ en sangre, bazo, hígado y cerebro.

La administración de testosterona incrementó la parasitemia, mientras que el estradiol la disminuyó y la DHEA no la modificó. Los tres esteroides disminuyeron la expresión relativa de IFN- γ en sangre. La testosterona incrementó el estrés oxidativo en ambos sexos al aumentar en la sangre la concentración de MDA. El estradiol indujo un efecto dimórfico; incrementó el estrés oxidativo en la sangre de las hembras y lo disminuyó en los machos, mientras que DHEA no modificó la concentración de MDA en ningún tejido.

2. INTRODUCCIÓN.

La malaria o paludismo es una enfermedad parasitaria ocasionada por diferentes especies del género *Plasmodium* y constituye un problema de salud pública mundial. En el 2012 ocurrieron 207 millones de nuevos casos y 627,000 muertes por su causa¹. Una de las características que presentan los pacientes con malaria es el dimorfismo sexual, en general los hombres desarrollan mayor severidad en los síntomas, así como mayor mortandad que las mujeres^{2, 3}. Los pacientes con malaria desarrollan anemia y fiebres intermitentes, que se han asociado con un proceso inflamatorio severo mediado por los radicales libres y el IFN- γ . Estas moléculas provienen de células encargadas de la respuesta inmune, activadas por la presencia del parásito y normalmente se encuentran en concentraciones bajas en el organismo. Si bien, estas moléculas son importantes para eliminar al parásito³⁻⁶, también están íntimamente relacionadas con la patología. En estudios anteriores se demostró que el estrés oxidativo y la respuesta inmune se incrementan durante la infección con *Plasmodium falciparum* o *Plasmodium berghei* ANKA, además este incremento está directamente relacionado con la severidad de la enfermedad^{3,6-8}.

A pesar de la intensa investigación en las últimas décadas, aún no se conocen con precisión los mecanismos que desencadenan el dimorfismo sexual en malaria. Es probable que las hormonas sexuales sean responsables de las diferencias en severidad de la malaria entre machos y hembras. Se ha demostrado que los esteroides sexuales son responsables de las diferencias biológicas entre machos y hembras y a su vez modulan la respuesta inmune⁹. Sin embargo, se desconoce si las hormonas sexuales regulan el estrés oxidativo y la expresión de IFN- γ en los individuos con malaria. En este trabajo se estudió el efecto de reconstituir a ratones gonadectomizados con estradiol, testosterona o DHEA sobre: a) la parasitemia; b) el estrés oxidativo y c) la expresión de IFN- γ en sangre, bazo, hígado y cerebro de ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA.

3. MARCO TEÓRICO.

3.1. Malaria: Un problema de atención mundial

La malaria es la enfermedad infecciosa que provoca el mayor número de muertes en el mundo, el responsable es un protozooario del género *Plasmodium sp.* La organización mundial de la salud¹⁰ reporta que alrededor de 3.4 billones de personas están en riesgo de contraer esta enfermedad. En el 2012 ocurrieron 207 millones de nuevos casos y 627,000 muertes por su causa (Figura 1)¹.

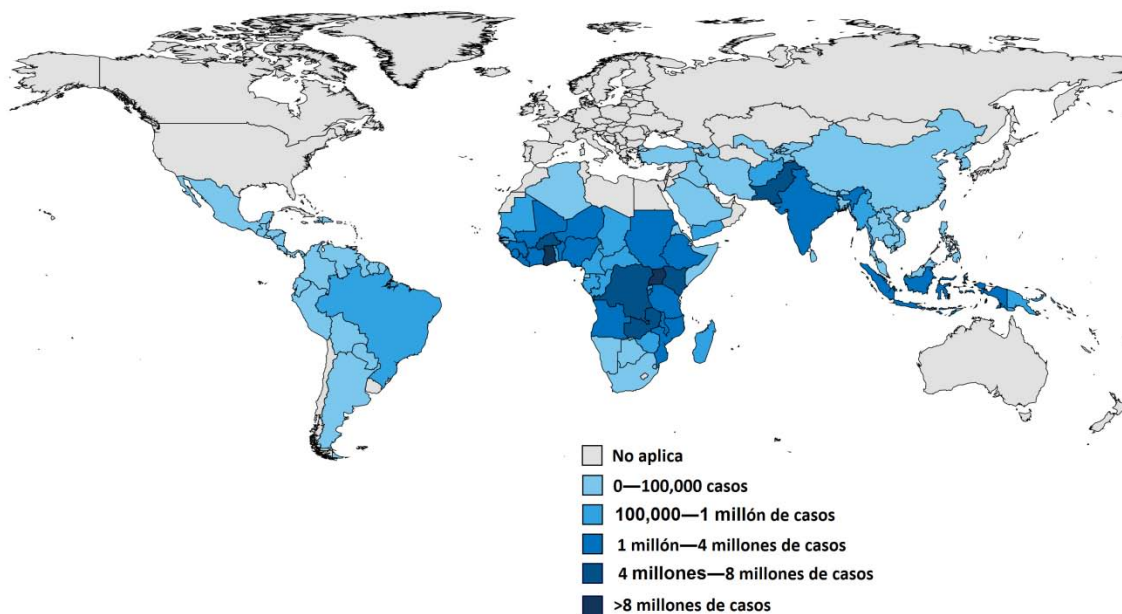


Figura 1. Casos estimados de malaria en el mundo¹.

3.2. Ciclo vital de *Plasmodium*.

El *Plasmodium* pertenece al subphylum *Apicomplexa* y se han identificado más de 100 especies de *Plasmodium* que pueden infectar a mamíferos, aves y reptiles, de las cuales 5 de ellos infectan al hombre: *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi*. Todos se transmiten por la picadura del mosquito hembra *Anopheles* infectado¹¹⁻¹³.

El ciclo vital se divide en dos fases: la fase sexual que tiene lugar en los mosquitos y la fase asexual que se realiza en el humano. El ciclo vital comienza con la introducción de esporozoítos desde la saliva del mosquito. Los esporozoítos atraviesan la piel y al cabo de 30 minutos invaden a los hepatocitos donde se multiplican y se diferencian a merozoítos

(Figura 2). Al llegar al hígado, algunos esporozoítos evaden a la respuesta inmune, otros son capturados por células de Kupffer y células NK (Natural Killer) que estimulan a los hepatocitos para la producción de especies reactivas de nitrógeno¹¹⁻¹³.

Los merozoítos entran a la circulación e invaden rápidamente a los eritrocitos; entonces los merozoítos se transforman en trofozoítos que dividen su núcleo y se transforman en esquizontes; a este proceso se le conoce como esquizogonia. Los esquizontes al madurar generan merozoítos, que nuevamente se multiplican en los eritrocitos. Algunos merozoítos, se diferencian sexualmente en microgametocitos masculinos y macrogametocitos femeninos (Figura 2)¹¹⁻¹³. Cuando el mosquito *Anopheles* se alimenta e ingiere junto con la sangre a los gametocitos; en su intestino se forman microgametos masculinos y macrogametos femeninos que posteriormente se fusionan y dan paso a la fertilización. A continuación se forma el cigoto diploide que se diferencia a un oocineto móvil que perfora la pared intestinal donde crece y se transforma en un oocisto, en su interior se producen numerosos esporozoítos que se liberan y migran a las glándulas salivales. El ciclo continúa cuando el mosquito se alimenta y transfiere a los esporozoítos al siguiente hospedero (Figura 2)¹¹⁻¹³.

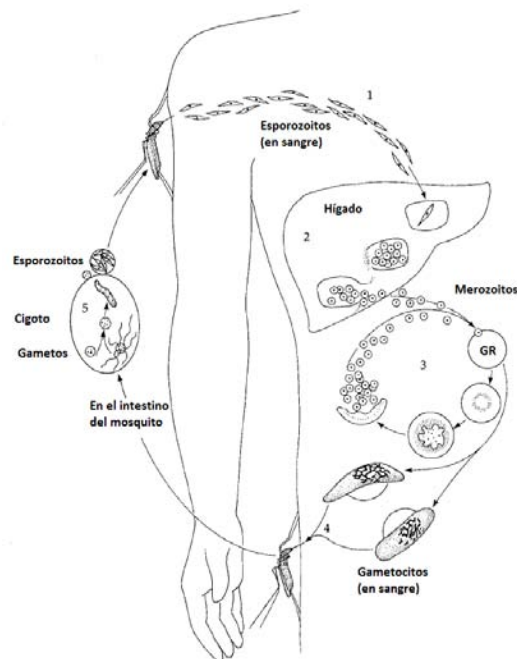


Figura 2. Ciclo vital de *Plasmodium*¹².

3.3. Características principales de *Plasmodium berghei* ANKA

Por problemas técnicos y éticos, es difícil analizar los mecanismos de la respuesta inmune que se generan contra el plasmodio en humanos, por lo que se utilizan modelos en animales para el análisis crítico de esos mecanismos. Los modelos murinos presentan características similares a la enfermedad en humanos. En particular, el modelo de infección en ratones CBA/Ca con *Plasmodium berghei* ANKA, es semejante a la malaria que se presenta en el humano cuando se infecta con *P. falciparum*². Ambos parásitos tienen preferencia por los reticulocitos, generan un número similar de merozoítos e inducen infecciones asincrónicas^{2,13}. *P. berghei* ANKA se aisló de su vector *Anopheles durenii*, por Vincke y Barfort, en la República Democrática del Congo; al Oeste de África, en el año de 1966².

Una de las principales características de *P. berghei* ANKA es su tasa de multiplicación, se reproduce 10 veces cada 24 horas. Además, una vez que el parásito infecta al hospedero, inicia su reproducción asexual de forma asincrónica^{2,3,13}. Tanto *P. berghei* como *P. falciparum*, generan en sus hospederos dimorfismo sexual, ya que la patología es más severa en los machos que en las hembras. Sin embargo, se desconoce la influencia que tienen las hormonas sexuales en las diferencias en susceptibilidad entre hombres y mujeres^{2,3}. En este trabajo se estudió el efecto de las hormonas sexuales sobre la parasitemia, el estrés oxidativo y la expresión de IFN- γ en CBA/Ca infectados con *P.berghei* ANKA.

3.4. Respuesta inmune y la malaria

La infección con *Plasmodium* induce dos clases de respuestas inmunes a) la celular y b) la humoral. La primera línea de defensa es la respuesta inmune celular, en ella los macrófagos y los neutrófilos, ingieren y degradan al parásito, a este proceso se le conoce como fagocitosis⁴. Inicia cuando los macrófagos entran en contacto con el parásito y se activan a través de receptores en la membrana. Esto induce cambios en el citoesqueleto que le permiten envolver al patógeno con estructuras parecidas a pseudópodos y encapsular al parásito (Figura 3)¹⁴.

A la estructura que introduce al parásito dentro de la célula se le denomina fagosoma. Después se induce el transporte de vacuolas que contienen enzimas digestivas y especies

altamente reactivas a través del citoplasma, denominadas lisosomas, que se fusionan con el fagosoma y forman el fagolisosoma que inactivan y degradan al parásito. Finalmente, se desechan los residuos al ambiente extracelular por exocitosis (Figura 3)¹⁴. La fagocitosis es la principal forma de eliminación del parásito durante la fase aguda de la enfermedad debido a que no se requiere un conocimiento previo del patógeno para que se active, además el parásito es susceptible a los radicales libres que se producen durante este proceso¹⁴.

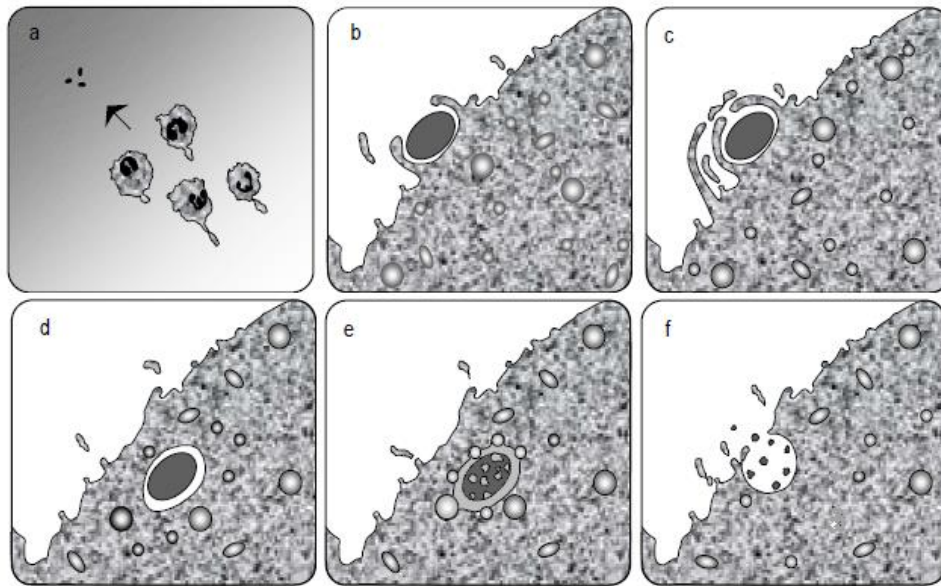


Figura 3. Esquema general de la fagocitosis¹⁵. Las etapas del proceso de la fagocitosis son: a) quimiotaxis, b) adherencia macrófago-parásito, c) endocitosis, d) formación del fagosoma, e) formación del fagolisosoma y degradación del parásito, f) eliminación de los desechos.

En la mayoría de las ocasiones la fagocitosis no es suficiente para eliminar completamente al parásito. Por esta razón, es necesario que las células produzcan sustancias capaces de magnificar la respuesta inmune y hacerla específica en contra el *Plasmodium*. Las células asesinas naturales del Inglés (natural killer NK) y las células dendríticas producen citocinas, que son moléculas con diferentes actividades biológicas como la de inducir la quimiotaxis, un proceso mediante el cual las células de la respuesta inmune presentes en el torrente sanguíneo migran al sitio donde se ubica el organismo invasor. En la respuesta inmune también participan las células T, las células B, y otros fagocitos profesionales (Figura 4)⁴.

Los linfocitos T son importantes en la respuesta inmune en contra del *Plasmodium*. Se clasifican en Th1 y Th2 y Th17. Se activan por macrófagos o células dendríticas que procesaron al parásito e interactúan con los linfocitos T y B para que se activen. La

principal función de los linfocitos T es la de regular y amplificar la respuesta inmune vía la secreción de citocinas. Los linfocitos Th1 producen citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el interferón gamma (IFN- γ) e interleucinas 1 y 2 (IL-1 e IL-2), para que se recluten más fagocitos profesionales^{16,17}. Además el TNF- α y el IFN- γ pueden activar a los macrófagos para que generen especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno que son tóxicas para el parásito (Figura 4)^{5,18}.

Las células Th2 secretan citocinas como: IL-4, IL-5, IL-6, e IL-10 que inducen la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas para que sinteticen anticuerpos IgM e IgG; y así responden de forma específica contra el parásito. Los anticuerpos etiquetan al parásito para que lo reconozcan los fagocitos profesionales. A las respuestas mediadas por anticuerpos se les conoce como humorales^{5, 18}. Durante la etapa aguda de la infección con *Plasmodium* predomina la respuesta tipo Th1 o pro-inflamatoria y la respuesta de tipo Th2 en la fase tardía de la infección⁶.

3.4.1 Citocinas

Las citocinas son moléculas de naturaleza proteica, polipéptidos o glucoproteínas hidrosolubles de tamaño entre 8 y 30 kDa. Se sintetizan por células del sistema inmunológico y se producen cuando la célula se activa. Una de sus principales características es la pleiotropía, esto es, una sola citocina puede actuar en diferentes tipos de células. Además las citocinas tienen una actividad redundante, por lo que diferentes citocinas pueden tener el mismo efecto¹⁹.

De acuerdo con su función se pueden dividir en dos categorías: pro-inflamatorias y anti-inflamatorias. La respuesta tipo Th1 es pro-inflamatoria. En esta clase de respuesta los linfocitos T secretan citocinas como: IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IFN- γ y TNF- α . Mientras que la respuesta anti-inflamatoria es de tipo Th2 y se caracteriza por el incremento de las citocinas: IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β ¹⁹.

3.4.1.1 Interferón Gamma (IFN- γ)

El IFN- γ es una proteína de 17.1 kDa y presenta tres formas que difieren entre ellas en el grado de glucosilación. La producción de IFN- γ se estimula por: patógenos, el entrecruzamiento de moléculas de superficie, antígenos específicos, la activación del

receptor de las células T, también se estimula por citocinas (IL-1, IL-2, IL-12 e IL-18), factores de crecimiento y por los estrógenos. La expresión del gen de IFN- γ se inhibe por glucocorticoides, TGF- β e IL-10²⁰. Durante la fase aguda de la infección por *Plasmodium*, el IFN- γ se incrementa de manera significativa (Figura 4).

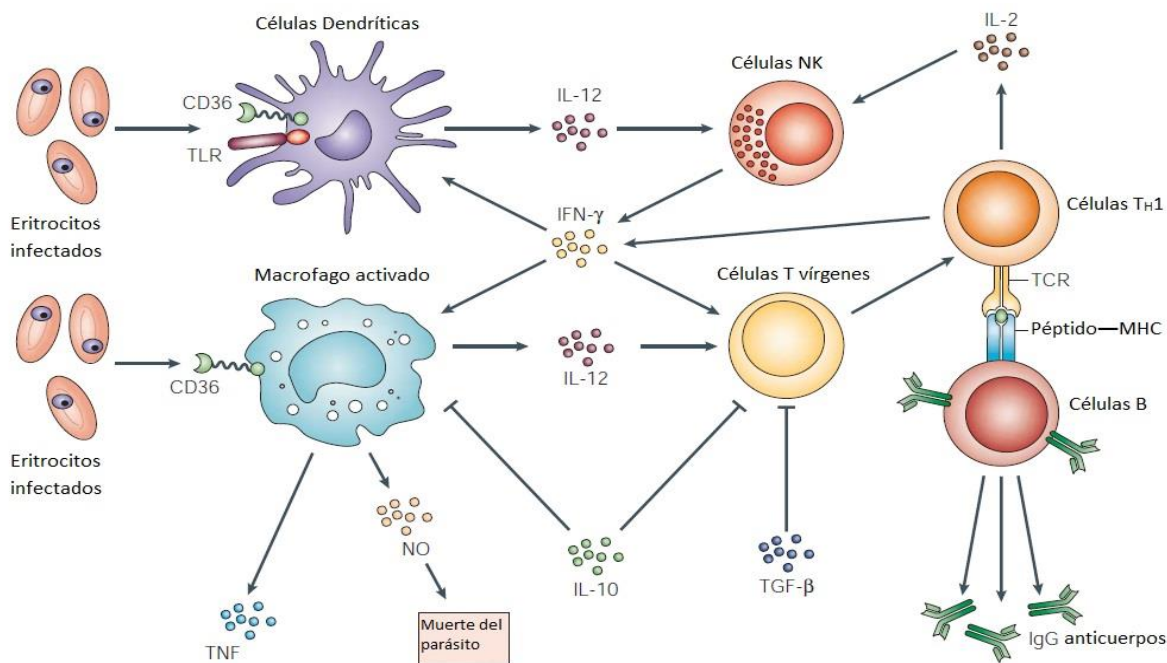


Figura 4. Relación entre la respuesta inmune y la respuesta adaptativa en el estadiosanguíneo de la malaria²¹. Posible regulación de la inmunidad adaptativa mediada por citocinas producidas por células de la respuesta inmune innata en la fase sanguínea del paludismo. Las células dendríticas interactúan con los eritrocitos parasitados vía los receptores CD36 y los receptores tipo Toll (TLR), además reciben estimulación vía citocinas inflamatorias, como el interferón- γ (IFN- γ), las células dendríticas (DCs) maduran y migran al bazo, el sitio primario de la respuesta inmune contra *Plasmodium* en el estadiosanguíneo. La maduración de las DCs incrementa la expresión de moléculas MHC de clase II, CD40, CD80, CD86, moléculas de adhesión y la producción de interleucina-12 (IL-12) que activa a las células asesinas naturales (NK) para producir IFN- γ e induce la diferenciación de células Th1. La producción de IFN- γ , por las células NK resulta en la maduración de las DC lo que facilita la expansión clonal de las células T CD4⁺ específicas de antígeno que producen IL-2 que activa más células NK para producir IFN- γ , lo que induce la maduración de las DC activa a los macrófagos y amplifica aún más la respuesta inmune adaptativa. La IL-10 y el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) regulan negativamente las respuestas innatas y las adaptativas.

El IFN- γ es una citocina importante en la respuesta inmune en contra del parásito²¹. Se sintetiza en los linfocitos T CD4⁺, T CD8⁺, células T $\gamma\delta$, así como en las células NK, como respuesta a microorganismos. En los últimos años se ha demostrado que las células mieloides (células dendríticas, macrófagos y neutrófilos) también son capaces de producir IFN- γ a través de la estimulación con IL-12 e IL-18 (Figura 4)^{20,21}.

Sin embargo, la interacción de IL-12 e IL-18 no es suficiente para inducir la producción óptima de IFN- γ , puesto que las células NK también requieren del contacto directo con el eritrocito parasitado^{21,22}. De esta forma, el IFN- γ proveniente de las NK promueve la maduración de las células dendríticas y de los macrófagos; además estimula la proliferación y maduración de los linfocitos CD4+ (Th1) que sintetizan IL-2, ésta citocina a su vez, activa a las células NK para que generen más IFN- γ . Las células Th1 también promueven la diferenciación vía citocinas de las células Th2 que cooperan con los linfocitos B para que sintetizen anticuerpos citofílicos que en ratón son IgG1a e IgG2b (Figura 4)²¹.

3.5. Efecto de las hormonas sobre la respuesta inmune

Las hormonas sexuales son responsables de las principales diferencias entre machos y hembras⁹. Son de naturaleza lipídica y se clasifican en andrógenos y estrógenos. Se sintetizan en las gónadas (ovarios y testículos) y en muy poca proporción, alrededor del 10%, en las glándulas suprarrenales²³. El colesterol es el precursor de todas las hormonas esteroideas²⁴. Sufre una ruptura en una de sus cadenas laterales y se transforma en pregnenolona que es el precursor de los esteroides sexuales testosterona, estradiol y DHEA²⁴.

3.5.1. Testosterona

La testosterona es la principal hormona en los machos, es responsable de la formación de la masa muscular y de la aparición de los caracteres sexuales secundarios^{25,26}. Se sintetiza en las células de Leydig, en el testículo, a partir de la pregnenolona, que por acción de la enzima 17- α -hidroxilasa, se hidroxila en el carbono 17 y se transforma en 17- α -hidroxipregnenolona²⁴. A continuación, la 17- α -hidroxipregnenolona sufre una reducción en el carbono 17 por acción de la enzima 17,20-liasa y genera a la dehidroepiandrosterona [DHEA]²⁴. Luego por acción de la enzima 17- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17- β -HSD) se reduce el grupo ceto a un grupo alcohol y se forma el androstenediol²⁴. Por último, la enzima 3- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3- β -HSD) transforma al androstenediol en la testosterona que tiene actividad biológica²⁴. A esta vía se le conoce como la ruta Δ^5 . La testosterona puede modificar diversos aspectos de la respuesta inmune: Favorece la actividad citotóxica de las células NK y polariza la respuesta inmune celular al tipo Th2¹⁷; disminuye la respuesta de los linfocitos B a mitógenos, además reduce la síntesis de IL-1,

IL-6 y TNF- α , por lo que se le considera inmunosupresora¹⁸; La testosterona también induce un aumento en la cantidad de linfocitos T citotóxicos²⁷, *in vitro* reduce la linfopoyesis de las células B, así como la producción de anticuerpos; también reduce la función de las células T cooperadoras, daña la capacidad fagocítica de los macrófagos y disminuye la producción de citocinas pro-inflamatorias en los macrófagos²⁷.

En relación a su efecto en la malaria se ha documentado que adicionar testosterona a cultivos *in vitro* de *P. falciparum* favorece el crecimiento y reproducción de los merozoítos¹⁶. En los humanos, se asocia con un incremento en la parasitemia y además durante el curso de la enfermedad los niveles de esta hormona disminuyen en comparación a hombres con la misma edad no infectados con el parásito²⁷. Además, la testosterona suprime la respuesta inmune en el hígado lo que promueve la proliferación de las fases sanguíneas del parásito²⁸.

3.5.2. Estradiol

El estradiol es una hormona que se presenta en mayor concentración en las hembras, genera la acumulación de grasa en sitios específicos y la aparición de los caracteres sexuales secundarios en las hembras^{25,26}. La síntesis de estradiol se lleva a cabo en el ovario mediante la ruta Δ^5 al igual que la testosterona, sin embargo la testosterona sufre un proceso de aromatización y pierde el carbono 19 por acción de la aromatasa y se transforma en 17- β estradiol²⁴. Esta hormona tiene efectos sobre la respuesta inmune; a bajas concentraciones promueve la respuesta de tipo Th1, causa una mayor síntesis de TNF- α e IFN- γ ¹⁸. Además ocasiona una disminución en las citocinas IL-4 e IL-10, propias de la respuesta tipo Th2¹⁷. Por el contrario, a altas concentraciones, induce un aumento en las interleucinas 5, 6 y 10, lo que favorece la respuesta de tipo Th2 y por lo tanto, una disminución en la respuesta de tipo Th1^{18,29}. Además, el estradiol es capaz de activar a las células B y promover su diferenciación a células plasmáticas, incrementa la fagocitosis de los macrófagos, disminuye la síntesis de citocinas como IFN- γ e IL-2 y regula negativamente la actividad de las células NK¹⁸. Asimismo, la administración de esta hormona en cultivos de *P. falciparum in vitro* promueve el crecimiento del parásito así como su reproducción¹⁶. Finalmente, disminuye la anemia pero incrementa la incidencia de síntomas neurológicos durante la enfermedad³⁰.

3.5.3. Dehidroepiandrosterona (DHEA)

La dehidroepiandrosterona es un precursor del estradiol y de la testosterona, su administración en machos o en hembras induce la producción de testosterona³¹. Para su síntesis, el DHEA sigue la ruta de Δ^5 , al igual que la testosterona y el estradiol, solo que en la formación del DHEA se interrumpe la vía y no culmina en la formación de testosterona o estradiol²⁴. Se considera como un andrógeno y se incrementa entre los 20 y 30 años de edad en los humanos. Se relaciona con envejecimiento de mejor calidad³¹. A continuación se enuncian algunos de los efectos más estudiados en el sistema inmune. La administración de DHEA en las hembras incrementa la actividad citotóxica de las células NK, inhibe la respuesta mitogénica de las células T, disminuye el número de células CD4 sin afectar la concentración de IL-2 e IL-6. En contraste, en los machos incrementa la actividad de las células NK y la población de linfocitos T, además aumenta la síntesis de IL-2³². Asimismo, la administración de DHEA puede inhibir el crecimiento del parásito²⁶. Aparte de los efectos ya descritos, la testosterona, el estradiol y el DHEA, también pueden interactuar con sus receptores, (el de membrana y el citoplasmático) que están presentes en la mayoría de las células²⁶, lo que puede modificar la transcripción de genes, ya sea aumentándola o disminuyéndola, y por lo tanto afectar la concentración de proteínas necesarias en el funcionamiento de las células.

3.6. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se presenta cuando la cantidad de radicales libres y de moléculas oxidantes superan la capacidad de las células para neutralizar su efecto oxidante o reparar el daño producido³³⁻³⁵. Los radicales libres se presentan de manera normal en el organismo. Se generan normalmente por la actividad de la mitocondria. Esta estructura es la fuente de energía de la célula y requiere de los radicales libres para la producción de especies con alto contenido energético que se utilizan en los diferentes procesos de la célula^{34,35}. Los radicales libres pueden interactuar con las diferentes partes de la mitocondria y generar estrés oxidativo. Otras causas del estrés oxidativo son procesos como el estrés, la ansiedad y la depresión; los cuales elevan los niveles de radicales libres lo que ocasiona daño en diferentes tejidos^{34,35}.

Los radicales libres pueden oxidar diferentes moléculas como proteínas, material genético, carbohidratos y lípidos. Por ejemplo, los radicales libres interactúan con el grupo

carbonilo de las proteínas oxidándolas principalmente en los aminoácidos arginina y lisina^{34,36}, lo que ocasiona la pérdida de la función de la proteína. En el DNA, los radicales libres y las moléculas oxidantes dañan regiones susceptibles en la molécula, lo que provoca fraccionamiento en las cadenas y por lo tanto pérdida de la funcionalidad del material genético^{34,36}. Los radicales libres, en conjunto con metales de transición, oxidan a los carbohidratos y forman compuestos dicarbonílicos altamente reactivos que son capaces de alterar la función de proteínas, lípidos y DNA a través de un proceso denominado glucación auto-oxidativa³⁷. Además pueden degradar sustancias como el ácido hialurónico y la condroitina, que son glucosaminoglucanos; encargados de funciones como la fijación celular y el recubrimiento de las articulaciones lo que ocasiona procesos inflamatorios severos³⁸.

Los radicales libres también oxidan a los lípidos, principalmente a los ácidos grasos poli-insaturados y los fosfolípidos, al sustraer átomos de hidrógeno lo que forma un radical lipídico, que puede interactuar con el oxígeno de los alrededores formando el radical peroxilo, que en presencia de iones metálicos, incrementa el daño en la membrana al robar protones a más fosfolípidos. En cambio en ausencia de los iones metálicos se tienen dos lípidos oxidados que reaccionan entre ellos y forman aldehídos, de los cuales el más estudiado es el malondialdehído (MDA)^{34,38,39}.

3.6.1. Estrés oxidativo: Una consecuencia de la activación de la respuesta inmune

Durante el proceso de fagocitosis se generan moléculas cuya función es degradar al patógeno ejemplo son las enzimas digestivas y los radicales libres-que son moléculas de naturaleza inorgánica, altamente reactivas y oxidantes debido a que tienen un electrón desapareado en su última orbita, lo que también las vuelve inestables y altamente reactivas^{33,40}. Los radicales libres pueden provenir de las especies reactivas de oxígeno (ERO) y de las especies reactivas del nitrógeno (ERN) y se encargan de oxidar a las moléculas del parásito e inactivarlo. El óxido nítrico (NO) es una de las especies reactivas del nitrógeno, puede actuar como neurotransmisor en el cerebro, dilata los vasos sanguíneos, es un regulador parácrino e induce la producción de GMPc^{33,40}.

Otras moléculas importantes para la destrucción del parásito son: el ion hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), el ion superóxido ($\cdot\text{O}_2$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que son sumamente oxidantes^{33,40}, se encuentran en los lisosomas de los macrófagos y durante el proceso de exocitosis

pueden salir del macrófago al ambiente extracelular y oxidar a otras células del hospedero lo que ocasiona el estrés oxidativo.

El daño en la membrana tiene consecuencias severas en la célula, incluso puede llegar a la lisis celular. Derivado de esto se producen moléculas que pueden evidenciar la oxidación de lípidos en la célula, un ejemplo es el malondialdehído (MDA), el cual se utiliza como marcador de estrés oxidativo³⁹.

3.6.2. Respuesta contra el estrés oxidativo: Enzimas antioxidantes

A pesar de lo tóxicos y dañinos que son, los radicales libres se requieren para el funcionamiento normal de la célula. Existen mecanismos que regulan el proceso de oxidación por medio de enzimas antioxidantes que catalizan la conversión de las especies reactivas del oxígeno en moléculas menos reactivas como el H₂O. La enzima SOD inactiva al radical O_2^- y lo transforma en H₂O₂. La enzima glutatión peroxidasa (GPx) utiliza como sustrato al H₂O₂ y lo transforma en H₂O. Estas enzimas en conjunto con otras, como la catalasa, protegen a la célula de los efectos dañinos de las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (Figura 5)^{40,41}.

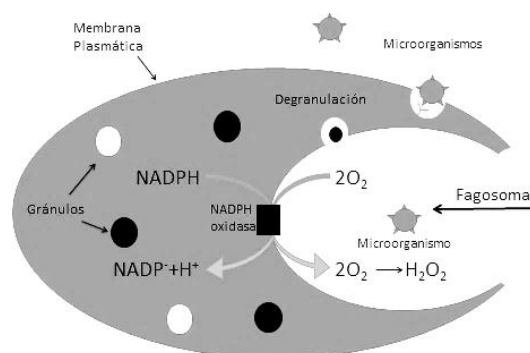


Figura 5. Actividad de los fagocitos³⁴

Durante la infección con *Plasmodium*, en los pacientes aumenta el estrés oxidativo^{40,42,43}. Este incremento de especies reactivas se ha asociado con concentraciones altas en plasma de TNF- α y de IFN- γ ^{42, 43} que si bien coadyuvan en la eliminación del parásito, también pueden afectar al hospedero al causar los síntomas característicos de la enfermedad como la fiebre, la inflamación, la anemia y en los casos más graves falla multiorgánica^{42,43}.

Por estos motivos es importante estudiar los mecanismos que regulan la respuesta inmune en contra del *Plasmodium* y una vertiente que tiene mucho auge es la hormonal ya que, la malaria presenta el fenómeno de dimorfismo sexual. A pesar de varias décadas de investigación se desconoce si las hormonas sexuales modulan el estrés oxidativo y la actividad de enzimas antioxidantes así como la expresión génica de citocinas como IFN- γ en tejidos clave durante la infección con *Plasmodium* como son: la sangre, el bazo, el hígado y el cerebro.

3.7. Reacción en cadena de la polimerasa y retrotranscripción (PCR-RT)

3.7.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa por sus siglas en inglés; PCR (polymerase chain reaction), es una técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis. Este procedimiento tiene tres reactivos principales: la cadena molde, los oligonucleótidos que delimitan el gen a amplificar y la enzima ADN polimerasa. Su objetivo es el de producir un gran número de copias de un fragmento en particular de (ácido desoxirribonucleico) ADN. A pesar de que ya existían ideas anteriores a su trabajo, una de las innovaciones de Mullis fue el uso de dos oligonucleótidos o primers durante la reacción para unirse a las dos cadenas de las cuales se conforma el ADN y que delimitaran la región que se desea amplificar. Con esta modificación, la PCR es capaz de producir 2 copias del gen delimitado al mismo tiempo⁴⁴.

Esta técnica se fundamenta en la actividad de la enzima ADN polimerasa, que es capaz de generar réplicas de las cadenas sencillas del ADN. Sin embargo, el obtener cadenas sencillas es algo complicado debido a que a temperatura ambiente tienden a unirse y forman hélices constituidas por 2 cadenas sencillas, por lo tanto el material genético debe calentarse hasta una temperatura en la cual las cadenas se separen esto ocurre a 95°C. El proceso de desnaturalización del ADN alentaba a la PCR debido a que la ADN polimerasa normal es una proteína que no soporta temperaturas tan altas. Sin embargo, la ADN polimerasa extraída de la bacteria *Thermus aquaticus* (*Taq*) soporta la temperatura de desnaturalización debido a que este microorganismo habita en zonas donde la temperatura es elevada y a la enzima extraída de este microorganismo se le denomina *Taq* polimerasa.

Otro componente importante de la PCR es el termociclador. Es un instrumento que tiene la función de regular la temperatura de forma precisa durante tiempos predeterminados. Para que la PCR amplifique la muestra y produzca nuevas cadenas de ADN es necesario que se lleven a cabo diferentes ciclos de temperatura. Las temperaturas importantes durante este proceso son tres: la de desnaturalización del ADN que es a 95°C, la temperatura de elongación a la que la enzima *Taq* polimerasa presenta su actividad óptima que es a 72°C (temperatura de elongación), y la temperatura a la que los oligonucleótidos se unen con la cadena molde o temperatura de alineación y depende de la longitud y secuencia de los oligonucleótidos⁴⁴. Además la reacción de PCR requiere de otros reactivos para llevarse a cabo. Primero están los desoxiribonucleótidos trifosfato (dNTP's) que funcionan como bloques para que con ellos se construyan las nuevas cadenas de ADN, el ion magnesio (Mg^{2+}) que funciona como cofactor de la *Taq* polimerasa y una solución amortiguadora que se encarga de generar el ambiente propicio para la función de la enzima⁴⁴.

Las principales características de la PCR son: sensibilidad y especificidad. La sensibilidad se refiere a que la técnica es capaz de amplificar una secuencia con cantidades mínimas de ADN molde y la especificidad se refiere a que el procedimiento es capaz de amplificar un solo gen siempre que este delimitado por los oligonucleótidos⁴⁴.

La técnica de PCR tiene dos variantes: en punto final y en tiempo real. En la primera es necesario un procedimiento secundario para evaluar la cantidad de gen amplificado y solo se puede evaluar al final de la PCR. En la segunda variante se utilizan oligonucleótidos marcados con un fluorocromo y un termociclador que, acoplado a un detector de fluorescencia cuantifica la cantidad de fluorocromo emitido en cada amplificación. La cantidad de fluorescencia que detecta el equipo es proporcional al número de copias que están presentes en la muestra. Existen diversas variaciones para generar la fluorescencia que detecta el termociclador en PCR en tiempo real, el que se utilizó en este trabajo emplea un primer que hibrida con él mismo.

El primer presenta una cola de ADN adicional complementaria al mismo primer acoplada a un apagador de la fluorescencia y en el otro extremo el fluorocromo, lo que forma una estructura de doble cadena con fluorescencia baja por la cercanía del apagador y el fluorocromo. Cuando el oligonucleótido y el ADN molde se alinean la cola del oligonucleótido se desnaturaliza y permite que el fluorocromo emita fluorescencia que

detecta el equipo y en así se determina el número de copias que están presentes en la muestra⁴⁴.

Esta técnica tiene diversas aplicaciones como: la amplificación de regiones específicas de la cadena molde para estudios sobre la secuencia amplificada, obtención de mayor cantidad de muestra para estudios del ADN y evaluación del nivel de expresión de los genes. En particular, para esta última aplicación se requiere de un proceso previo conocida como retrotranscripción.

3.7.2 Retrotranscripción (RT)

La retrotranscripción es un procedimiento que se fundamenta en la acción de la enzima transcriptasa reversa, la cual usa una cadena de ácido ribonucleico (ARN) como molde y sintetiza una cadena de ADN. A diferencia de la PCR, la retrotranscripción no requiere de varios ciclos de temperatura debido a que solo se necesita que se produzca una cadena de ADN y no varias como en la PCR. Además la transcriptasa reversa no proviene de una bacteria termófila, se obtiene a partir de un retrovirus; debido a que solo estos organismos tienen la capacidad de utilizar como almacén de la información genética al ARN⁴⁵.

Entre sus similitudes están la necesidad de los dNTP's, debido a que estos son los bloques con los que se formara la nueva cadena de ADN. Además, la enzima requiere de una solución amortiguadora para darle el ambiente necesario para su correcto funcionamiento⁴⁵.

3.7.3. Métodos de cuantificación de la expresión de un gen: método del $\Delta\Delta CT$

Para evaluar la expresión de genes existen diferentes métodos, pero de los más usados se encuentra el método de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-RT). En este método se requiere de una retrotranscripción para transformar al ARN mensajero (ARNm) en ADN complementario (ADN_c). Posteriormente la molécula de ADN_c se amplifica con oligonucleótidos específicos para el gen de interés⁴⁵.

Para evaluar la cantidad de ARNm presente en la muestra existen dos métodos: el método absoluto y la evaluación de la expresión relativa del ARNm. En el primero se cuantifica la cantidad total de ARNm presente en la muestra, por medio de una curva estándar,

mientras que en el segundo se estudian los cambios relativos en la expresión del gen de interés en relación a un gen constitutivo y requiere de ecuaciones matemáticas y ciertas suposiciones.

En este último método es necesario que el termociclador detecte los cambios en la fluorescencia de los fluorocromos y que además del gen de interés se amplifique un segundo gen el cual va a funcionar como referencia para evaluar la expresión relativa. La principal característica del segundo gen es que se exprese de forma constante siempre en la célula. La comparación entre ambos genes permite conocer la expresión relativa del gen de interés en la muestra analizada⁴⁵.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La malaria es la enfermedad infecciosa que ocasiona el mayor número de muertes en el mundo. En general los hombres desarrollan mayor severidad de los síntomas y mortalidad que las mujeres. Debido a que las hormonas sexuales son responsables de las principales diferencias entre los sexos, es probable que también influyeran las diferencias en mortalidad y severidad entre los hombres y mujeres que sufren de malaria.

La infección con el *Plasmodium* genera un proceso inflamatorio intenso mediado por IFN- γ , que es una citocina importante en la eliminación del parásito y en la activación de otras células de la respuesta inmune. Además, el IFN- γ también se ha asociado a la patología que caracteriza a la malaria como la fiebre, la anemia o la pérdida de peso. Asimismo, se ha demostrado que el estrés oxidativo es el principal mecanismo que utiliza la respuesta inmune para eliminar al *Plasmodium*, pero a pesar de todo el conocimiento sobre la enfermedad, aún se desconoce si las hormonas sexuales modulan la expresión de IFN- γ y el estrés oxidativo en malaria. Por lo anterior, en este trabajo se estudió el efecto de los esteroides testosterona, estradiol y DHEA sobre la parasitemia, la expresión de IFN- γ y el estrés oxidativo en un modelo experimental de malaria murina.

5. HIPÓTESIS

La testosterona disminuirá la respuesta inflamatoria y la síntesis de radicales libres, por lo tanto, disminuirán la concentración de malondialdehído, así como la actividad enzimática de SOD y GPx, también disminuirá la expresión génica de IFN- γ . La administración de estradiol aumentará el estrés oxidativo y como consecuencia se incrementará la concentración de MDA así como la actividad enzimática de SOD y GPx. Además, favorecerá la expresión génica de IFN- γ . La administración de DHEA ocasionará un aumento en la expresión génica de IFN- γ y por lo tanto un aumento en la respuesta inmune así como incrementos en la actividad de SOD y GPx y disminución en la concentración de MDA.

6. OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar el efecto de la administración de testosterona o de 17- β estradiol y de la dehidroepiandrosterona sobre el estrés oxidativo y la expresión de IFN- γ en sangre, bazo, hígado y cerebro de ratones CBA/Ca gonadectomizados e infectados con *P. berghei* ANKA.

Objetivos específicos:

- Determinar el efecto de la administración de testosterona, o estradiol, o DHEA sobre la parasitemia en ratones CBA/Ca gonadectomizados e infectados con *P. berghei* ANKA.
- Determinar el efecto de la administración de testosterona, estradiol y DHEA sobre la expresión de IFN- γ en ratones CBA/Ca, gonadectomizados e infectados con *P. berghei* ANKA.
- Determinar el efecto de la administración de testosterona, o estradiol, o DHEA sobre el estrés oxidativo al evaluar la actividad enzimática de SOD, GPx y la concentración de malondialdehído en sangre, bazo, hígado y cerebro de ratones CBA/Ca gonadectomizados e infectados con *P. berghei* ANKA.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL

Tipo de estudio

Analítico experimental, ya que se evaluó el efecto de administrar diferentes hormonas en ratones de la cepa CBA/Ca, machos y hembras, sin gónadas que se infectaron con *P. berghei* ANKA y se comparó con controles de la misma cepa tratados con vehículo.

Población:

Ratones machos y hembras de la cepa CBA/Ca de 4 semanas de edad a los cuales se les extrajeron las gónadas al mes de nacidos.

Variables dependientes:

Actividad de las enzimas GPx y SOD, concentración de MDA y expresión génica de IFN- γ

Variables independientes:

Gonadectomía, sexo, concentración de hormona administrada e infección con *P. berghei* ANKA.

Diseño estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa Graph Pad Prism 5 y las diferencias significativas se evaluaron por medio de la prueba de ANOVA de una vía con prueba Pos Hoc de Tukey, se consideró un valor de $p < 0.05$ como significativo.

7.1 Materiales

7.1.1 Materiales biológicos

Ratones singénicos CBA/Ca machos y hembras de 4 semanas de edad a los cuales se les extrajeron las gónadas.

Plasmodium berghei ANKA, donado por el Dr. William Jarra del National Institute for Medical Research, Londres, Inglaterra.

7.1.2 Reactivos

Isodine	Reactivo BIO-RAD para determinación de proteínas.
Jabón quirúrgico	Albumina Sérica Bovina, Sigma
Alcohol al 70%	Butilhidroxitolueno 12.6mM, Sigma
Hidrocloruro de Xilacina al 2%	Ácido ortofosfórico 0.2M
Ketamina base al 10%	Ácido tiobarbiturico 0.11M Sigma
Cloruro de sodio al 0.09%	Solución saturada de cloruro de sodio
Meloxicam 5%	Butanol Merck
Enrofloxacin 2.5%	Agua con dietilpirocarbonato al 0.01% (Agua DEPC)
Aceite de almendras	Etanol al 80% con Agua DEPC
Propionato de testosterona 30mg/mL	Amortiguador First Strand Promega
Fenilpropionato de testosterona 60mg/mL	Inhibidor de RNAsa RNAsin Promega
Isocaproato de testosterona 60mg/mL	dNTP's 200 µM Invitrogen
Decanoato de testosterona 100mg/mL	Enzima MMLV-RT 5mM Promega
17-βestradiol, Sigma	Ditioeritritol (dTT)-Promega
Dehidroepiandrosterona, Sigma	Cloruro de potasio 50mM, Sigma
Heparina, Sigma	Gelatina 200 µM
PBS 10X	TRIS HCl 20 mM
Tripure® (Roche)	Cloruro de Magnesio 100 mM
Cloroformo/alcohol isoamílico 49:1	Taq Polimerasa 5U/µL Invitrogen
Alcohol isopropílico, Sigma	Referencia Pasiva ROX 50X Invitrogen
Kit RANSEL marca RANDOX	
Kit RANSOD marca RANDOX	

Oligonucleótidos para el gen de β-Actina

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

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

Oligonucleótidos para el gen de IFN-γ

Secuencia del oligonucleótido antisentido: **TCT CCT TCA GGA CAA TGT CAA ACA**

Secuencia del oligonucleótido sentido: **CGG TGA GAA GAT GTT CCA TGC CAC [FAM]G**

7.1.3 Materiales

Tubos Eppendorf de 250, 600 y 1500 μL estériles y libres de nucleasas

Puntas para micropipetas estériles y libres de nucleasas

Placas de 96 pozos para ELISA marca Corning

Placas de 96 pozos para PCR en tiempo real marca Applied Biosystems

7.1.4 Equipos

Espectrofotómetro de luz UV/Visible para placas de 96 pocillos Multiskan GO Termofisher

Termociclador de 96 pocillos Eppendorf

Termociclador en tiempo real 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 .

7.2. Métodos

Se utilizó un lote de 28 ratones CBA/Ca machos y un lote de 26 hembras. Cada lote se dividió en 4 grupos tal como se muestra en Tabla 1 y a cada uno se les extrajeron las gónadas y se les administró: testosterona o estradiol o DHEA o vehículo, un día después de la última administración todos los ratones se infectaron con *P. berghei* ANKA.

Tabla 1. Distribución de los ratones en los diferentes grupos experimentales

	Testosterona	Estradiol	DHEA	Vehículo
Machos	8 ratones	8 ratones	6 ratones	6 ratones
Hembras	7 ratones	7 ratones	6 ratones	6 ratones

7.2.1. Gonadectomía de los animales

Los animales, de un mes de edad, se anestesiaron con ketamina (100mg/Kg de peso corporal) y xilacina (15 mg/Kg de peso corporal), se les rasuró la zona abdominal (hembras) o de la bolsa escrotal (machos) y se retiraron las gónadas por medio de una cirugía. Después se suturó la herida y se les administró meloxicam para prevenir infecciones a causa de la cirugía. Después de 1 mes de recuperación se administraron los esteroides testosterona, estradiol o DHEA.

7.2.2. Administración hormonal e infección con *Plasmodium berghei* ANKA

Administración de las hormonas:

Testosterona: A cada ratón se le administraron por vía subcutánea 0.9 mg de testosterona resuspendidos en 50 μ L de aceite de almendras como vehículo, dos veces por semana durante 3 semanas

Estradiol: A cada ratón se le administraron por vía subcutánea 12 μ g de estradiol resuspendidos en 50 μ L de aceite de ajonjolí dos veces por semana durante 3 semanas.

DHEA: A cada ratón se le administraron 200 μ g de DHEA resuspendidos en 50 μ L de aceite de almendras vía subcutánea, cinco veces durante la semana anterior a su infección.

Vehículo: A cada ratón se le administraron 50 μ L de aceite de almendras vía subcutánea.

Al día siguiente de la última inyección con el esteroide o vehículo los ratones se inocularon por vía intravenosa con 1×10^3 eritrocitos parasitados suspendidos en una solución de PBS-heparina y 10% de suero normal de ratón. A partir del día 3 post infección se evaluó la parasitemia en frotis sanguíneos teñidos con Giemsa.

7.2.3. Extracción de las muestras

Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical al octavo día post-infección, se extrajo la sangre de corazón, el bazo, hígado y cerebro.

Procesamiento de las muestras de bazo e hígado. Los tejidos (bazo e hígado) se maceraron haciéndolos pasar a través de una malla o tela de Nylon estéril con el embolo de una jeringa y PBS. Las muestras de tejido se centrifugaron a 3500 rpm a 4°C durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante. El botón se resuspendió con agitación vigorosa y se adicionaron 500 μL de PBS estéril. Se separaron alícuotas de 30 μL para cada cuantificar la actividad de SOD, GPx y malondialdehído. Para la cuantificación de MDA se adicionaron 10 μL de BHT 12.6 mM y se congeló hasta su cuantificación.

Cerebro. A las muestras de cerebro se les agregaron 200 μL de PBS, se sonicaron y se prepararon alícuotas de 50 μL para evaluar la actividad de las enzimas GPx, SOD y para cuantificar MDA, para ello a esta alícuota se le adicionaron 10 μL de BHT.

Sangre. Se extrajo la sangre de corazón y se adicionaron 200 μL de PBS con heparina para evitar la coagulación. Se separaron alícuotas de 20 μL para cuantificar la actividad de SOD y GPx. A la alícuota de sangre para la determinación de MDA se le adicionaron 10 μL de BHT (12.6 mM). El resto de la muestra de sangre se centrifugó a 3500 rpm durante 5 minutos para separar el suero.

7.2.4. Cuantificación de proteínas

Se utilizó el reactivo de BIO-RAD que se basa en el método de Bradford y utiliza una curva estándar de albúmina. Se agregaron 0.5 μL de muestra en 100 μL de H₂O destilada, se adicionaron 25 μL de reactivo de Bio-Rad, se mezcló por agitación y se leyó la absorbancia

a 595 nm. Para calcular la concentración de las muestras se utilizó una curva patrón de albúmina descrita a continuación (Tabla 2).

Tabla 2. Curva patrón de proteínas

Tubo	μL de albumina	μL de H_2O destilada	Concentración $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
1	0	100 μL	0
2	0.25	100 μL	2
3	0.5	100 μL	4
4	1	99 μL	8
5	2	98 μL	16
6	4	96 μL	32
7	8	92 μL	64

A cada tubo de la curva estándar se le adicionaron 25 μL del reactivo de BIO-RAD se mezcló y se leyó la absorbancia a 595 nm.

7.2.5. Cuantificación del malondialdehído

Se utilizó la reacción de Jentzsch⁴⁶ en la que los lípidos peroxidados reaccionan con el ácido tiobarbitúrico a pH bajo lo que genera un complejo colorido que se detecta por espectrofotometría a 535 nm.

Se adicionaron 20 μL de muestra y 80 μL de agua destilada estéril. Se agregaron 12.5 μL de BHT 12.6 mM y 100 μL de ácido orto-fosfórico 0.2M. Se agitó y se adicionaron 12.5 μL de ácido tiobarbitúrico 0.11M. Se incubó a 95°C durante 45 minutos, posteriormente se adicionaron 250 μL de butanol y 25 μL de una solución saturada de NaCl. Se separó la fase orgánica y se midió la absorbancia a 535nm. La concentración de MDA se calculó por medio de una curva estándar de 1, 1, 2, 3-tetrametoxipropano.

7.2.6. Determinación de la actividad enzimática de GPx

Se utilizó el estuche comercial de la marca RANDOX, cuyo método se basa en la formación de glutatión oxidado a partir de glutatión reducido e hidropéroxido de cumeno. Esta reacción se evidencia con ayuda de la enzima glutatión reductasa que utiliza el glutatión

oxidado, generado en la reacción anterior y NADPH para formar glutatión reducido y NADP⁺. Durante la reacción se cuantificó la disminución de NADPH a 340 nm.

Se tomaron 5 µL de la muestra y se adicionaron 300 µL del diluyente (RANSEL). Después se agregaron 2.5 µL de la dilución y se mezclaron con 125 µL del reactivo 1 (RANSEL) y al final se adicionaron 5 µL de hidropéroxido de cumeno. La reacción se llevó a 37°C y se leyó la absorbancia a 340 nm al minuto y a los 2 minutos.

7.2.7. Determinación de la actividad enzimática de SOD

Para cuantificar SOD se empleó la reacción de la xantina oxidasa que utiliza a la xantina para producir ácido úrico y el radical superóxido (O₂⁻). Este radical reacciona con el colorante I.N.T. [2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazolio] para producir el compuesto formazán de color rojo que absorbe luz a 505 nm. La actividad de SOD se cuantificó como el grado de inhibición de esta reacción, ya que la enzima SOD degrada el radical O₂⁻ y evita que reaccione con el I.N.T.

Durante el procedimiento experimental se usaron 3 µL de muestra y se mezclaron con 100 µL de reactivo 1 (RANSOD) y al final, se adicionarán 15 µL de la enzima xantina oxidasa. La reacción se llevó a cabo a 37°C y las lecturas se realizaron a los 30 segundos y a los 3 minutos con 30 segundos. La actividad se determinó con una curva control (RANSOD) con el mismo tratamiento que las muestras y se detalla a continuación (Tabla 3).

Tabla 3. Curva control para la técnica de SOD

Tubo	Volumen del STD	Volumen del Diluyente	Concentración
S6	31 µL	-----	4.63 U/µL
S5	25 µL de S6	25 µL	2.31 U/µL
S4	25 µL de S5	25 µL	1.15 U/µL
S3	25 µL de S4	25 µL	0.57U/µL
S2	30 µL de S3	30 µL	0.26 U/µL

7.2.8. Extracción de ARNm

El mismo día de la extracción de los tejidos a analizar, se extrajo el ARN. Todos los tejidos se lisaron. La sangre se trató con 50 µL de saponina al 10% en agua destilada estéril. Los

tejidos de bazo e hígado se maceraron en una malla de nylon. Después se sonicó durante tres segundos a una amplitud de 20%. Las muestras de cerebro se homogenizaron en el ultrasonicador. Se adicionaron 200 μL del reactivo Tripure y 150 μL de una solución de cloroformo-alcohol isoamílico (49:1). Se agito y se separaron las fases por centrifugación a 14,000 rpm durante 15 minutos. Se separó la fase acuosa y se adicionó un volumen igual de alcohol isopropílico. Finalmente, los tubos se almacenaron a -70°C .

Los tubos que contenían RNA se centrifugaron a 14,000 rpm durante 15 minutos y se eliminó el sobrenadante. El botón se lavó con 400 μL de etanol al 80% en agua DEPC. Se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar durante 12 horas a temperatura ambiente dentro de un desecador.

7.2.9. Retrotranscripción

Las muestras de RNA se rehidrataron con agua DEPC, se cuantificaron por espectrofotometría UV a 260 nm. Se adicionaron 1.5 μg de ARN y 1 μL de oligo dT a una concentración de 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ se incubó a 65°C durante 10 minutos. Se le agregó la mezcla de reacción con los siguientes reactivos: Enzima MMLV-RT, dNTP's, dTT, amortiguador de retrotranscripción e inhibidor de ARNsa. Se incubó a 37°C durante 1 hora a 37°C . Se ajustó el volumen a 100 μL con agua DEPC y se almacenó a -70°C hasta su uso.

7.2.10. Amplificación del gen IFN- γ por qPCR

Se preparó la mezcla de reacción específica para el gen con los siguientes componentes: agua calidad MilliQ estéril, cloruro de magnesio, *Taq* polimerasa, oligonucleótidos sentido y antisentido específicos para el gen de INF- γ , referencia pasiva (ROX) y una mezcla preparada con los dNTP's(200 μM), KCl(50 mM) y gelatina(200 μM) Después se adicionó la muestra de DNA_c, se colocó en el termociclador de tiempo real (Applied Biosystems 7500 PCR) y se programó con las temperaturas de amplificación determinadas en una previa estandarización (Tabla 4).

Tabla 4. Programa de ciclaje para la amplificación de los genes IFN- γ y β -actina.

Paso	Temperatura	Duración
1	50°C	2 minutos
2	95°C	2 minutos
3	95°C	30 segundos
4	60°C	45 segundos
5	72°C	45 segundos
Repetir del paso 3 al 5 durante 45 ciclos.		
6	95°C	15 segundos
7	60°C	1 minuto
8	95°C	30 segundos
9	60°C	1 minuto

Se exportaron los datos obtenidos a Excel y se analizó la expresión relativa del gen con respecto a β -actina para cada tejido analizado con la siguiente ecuación:

$$\text{Expresión relativa} = \frac{(\text{Eficiencia de IFN} - \gamma + 1)^{CT_{\text{IFN} - \gamma}}}{(\text{Eficiencia de } \beta - \text{actina} + 1)^{CT_{\beta - \text{actina}}}}$$

En donde cada término significa:

Eficiencia de IFN- γ +1: Eficiencia obtenida para el gen de IFN- γ en el corrimiento de la placa más 1.

Eficiencia de β -actina +1: Eficiencia obtenida para el gen de β -actina en el corrimiento de la placa más 1

$\Delta CT_{\text{IFN} - \gamma}$: Diferencia entre el CT de las muestras de los grupos tratados contra el CT de las muestras del grupo control.

$\Delta CT_{\beta - \text{actina}}$: Diferencia entre el CT de las muestras de los grupos tratados contra el CT de las muestras del grupo control.

8. RESULTADOS

Para estudiar el efecto de las hormonas sexuales sobre la expresión de IFN- γ y sobre el estrés oxidativo en malaria, se gonadectomizaron ratones CBA/Ca de ambos sexos, a los 21 días después de la cirugía se dividieron en grupos y se reconstituyeron de la siguiente forma: a) 50 μ L de vehículo; b) 20 μ g de estradiol; c) 0.9 mg de testosterona ó d) 200 μ g de DHEA. Al día siguiente de la última administración se infectaron con *P. berghei* ANKA. A todos los grupos de ratones se les evaluó la parasitemia, el estrés oxidativo (MDA, actividad de las enzimas GPx y SOD) y la expresión de IFN- γ en sangre, bazo hígado y cerebro.

8.1 Efecto de la gonadectomía sobre la parasitemia con *P.berghei* ANKA en los ratones CBA/Ca

Para evaluar la parasitemia se tomaron muestras de sangre diariamente y se extendieron en portaobjetos se fijaron con metanol absoluto y se tiñeron con Giemsa. Cada punto en la gráfica representa la media geométrica de los resultados obtenidos por día en cada grupo. En los grupos de ratones machos y hembras intactos a los que se les administró vehículo y se les infectó se detectó que desarrollaron parasitemias similares hasta el día 7 post infección (P. I.), pero en el día 8 la parasitemia fue significativamente mayor en los machos en comparación con las hembras (Figura 6). La gonadectomía generó un incremento en la parasitemia de las hembras. En contraste, los machos gonadectomizados desarrollaron parasitemias más altas en relación a su grupo control intacto (Figura 6).

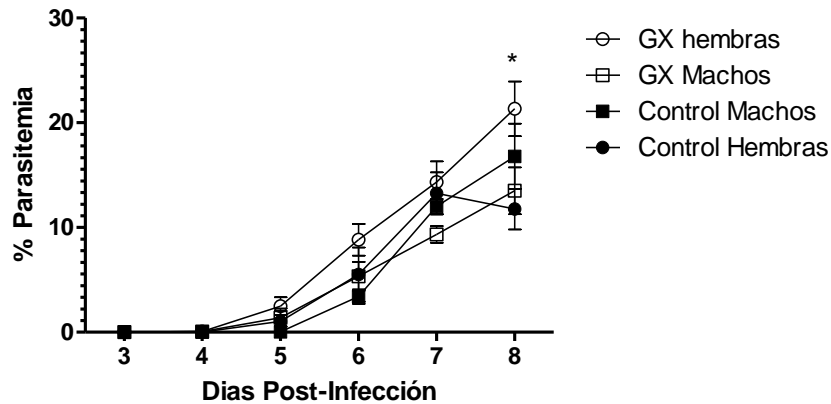


Figura 6. Efecto de la gonadectomía sobre la parasitemia en ratones CBA/Ca machos y hembras. Grupos de ratones machos y hembras se gonadectomizaron (Gx), 28 días post cirugía, se trataron con vehículo (aceite de almendras) y se infectaron con *P. berghei* ANKA. A partir del día 3 post infección se tomaron frotis sanguíneos que se tiñeron con Giemsa, se determinó el porcentaje de eritrocitos parasitados en relación a los no infectados. Cada punto en la gráfica representa la media \pm el error estándar de la media (SEM). El * indica diferencias significativas entre los grupos con un valor de $P < 0.05$.

Este hallazgo corrobora que las hormonas sexuales femeninas modulan negativamente la proliferación del parásito, mientras que en los machos se presentó el fenómeno opuesto, la disminución de testosterona debida a la gonadectomía disminuyó la parasitemia, este hallazgo concuerda con lo que se ha descrito relativo a que los machos desarrollan parasitemias más elevadas que las hembras⁷

8.1.1 Efecto de la reconstitución con testosterona

Los ratones gonadectomizados (machos y hembras) se reconstituyeron con testosterona y un día después de la última administración del esteroide se infectaron con *P. berghei* ANKA, la parasitemia se evaluó diariamente en frotis sanguíneos teñidos con Giemsa. La administración de testosterona en los machos gonadectomizados retrasó el incremento en la parasitemia hasta el día 6 post infección (P.I.). Después de este día, la parasitemia se incrementó rápidamente, alcanzó e incluso rebasó el número de parásitos que en el grupo control (Figura 7).

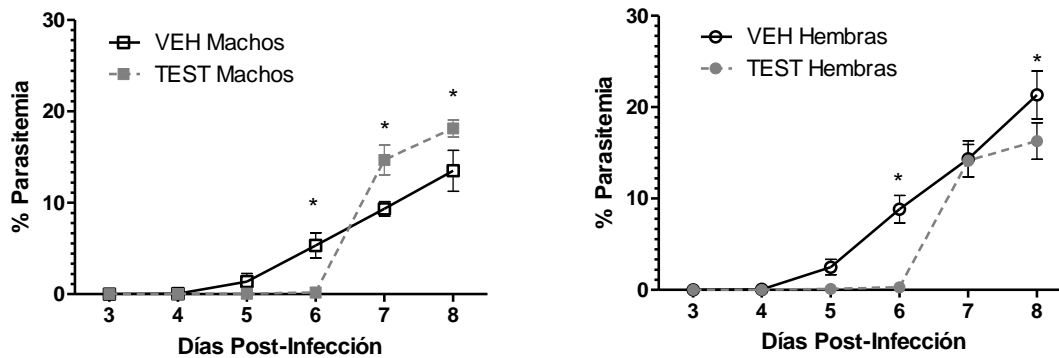


Figura 7. Efecto de la reconstitución de ratones gonadectomizados con testosterona sobre la parasitemia. Grupos de ratones hembras y machos se gonadectomizaron, 4 semanas después de la cirugía a la mitad de los grupos se les administró testosterona y se infectaron con *P. berghei* ANKA. La parasitemia se evaluó en frotis sanguíneos teñidos con Giemsa. Cada punto en la gráfica representa la media geométrica \pm el error estándar de la media (SEM). El * indica diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos con un valor de $P < 0.05$.

Los machos tratados con testosterona desarrollaron parasitemias más altas que el grupo control en los días 7 y 8 P.I. Mientras que en las hembras la administración de testosterona disminuyó la parasitemia en los días 6 y 8 P.I. Reconstituir con testosterona a los machos incrementó la parasitemia, por el contrario en las hembras se presentó menor parasitemia en comparación con el grupo que recibió el vehículo. (Figura 7). La administración de testosterona afectó de forma diferencial a los machos y a las hembras gonadectomizadas, lo que indica que la regulación por esteroides de la parasitemia es un fenómeno sumamente complejo que probablemente también depende de la interacción de cada hormona con sus receptores.

8.1.2 Efecto de la reconstitución con estradiol

Los ratones gonadectomizados se reconstituyeron con estradiol y un día después de la última administración del esteroide se infectaron con *P. berghei* ANKA, a partir del día 3 se evaluó la parasitemia. El estradiol no modificó significativamente la parasitemia en los machos (Figura 8A). Por el contrario, administrar estradiol a las hembras abatió la parasitemia durante toda la infección y particularmente en los días 6 y 8 P.I. (Figura 8B). En general, las hembras tratadas con estradiol desarrollaron parasitemias menores que los machos a excepción del día 8 P.I. cuando las hembras presentaron parasitemias mayores que los machos (Figura 8C).

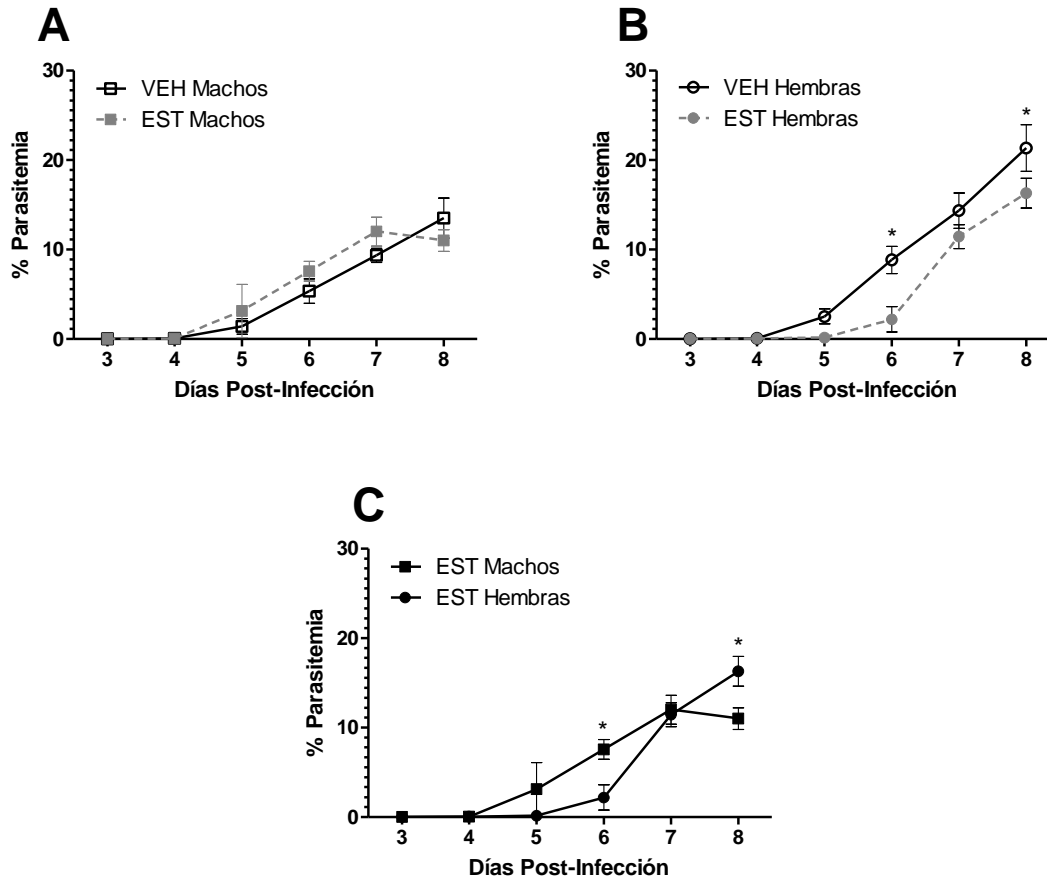


Figura 8. Efecto de la reconstitución con estradiol a ratones gonadectomizados sobre la parasitemia. Grupos de ratones hembras (A) y machos (B) se gonadectomizaron, 4 semanas después de la cirugía a la mitad de los grupos se les administró estradiol y a la otra mitad vehículo. Todos los grupos se infectaron con *P. berghei* ANKA. La parasitemia se evaluó en frotis sanguíneos teñidos con Giemsa. Cada punto en la gráfica representa la media geométrica \pm el error estándar de la media (SEM). El * indica diferencias estadísticamente significativas con un valor de $P < 0.05$.

8.1.3 Efecto de reconstituir con dehidroepiandrosterona

Grupos de ratones machos y hembras se gonadectomizaron, se reconstituyeron con dehidroepiandrosterona y se infectaron con *P. berghei* ANKA, la parasitemia se evaluó diariamente a partir del día 3 P.I. La reconstitución con DHEA en general disminuyó la parasitemia en machos y hembras durante la infección a excepción del día 6 P.I. cuando se detectó un pico de parasitemia mayor que en el grupo control (Figura 9A y 9B). Cuando se comparó la parasitemia entre los machos y las hembras gonadectomizadas tratados con DHEA se detectó mayor parasitemia en las hembras en relación a los machos, sin embargo esta diferencia no resultó estadísticamente significativa (Figura 9C).

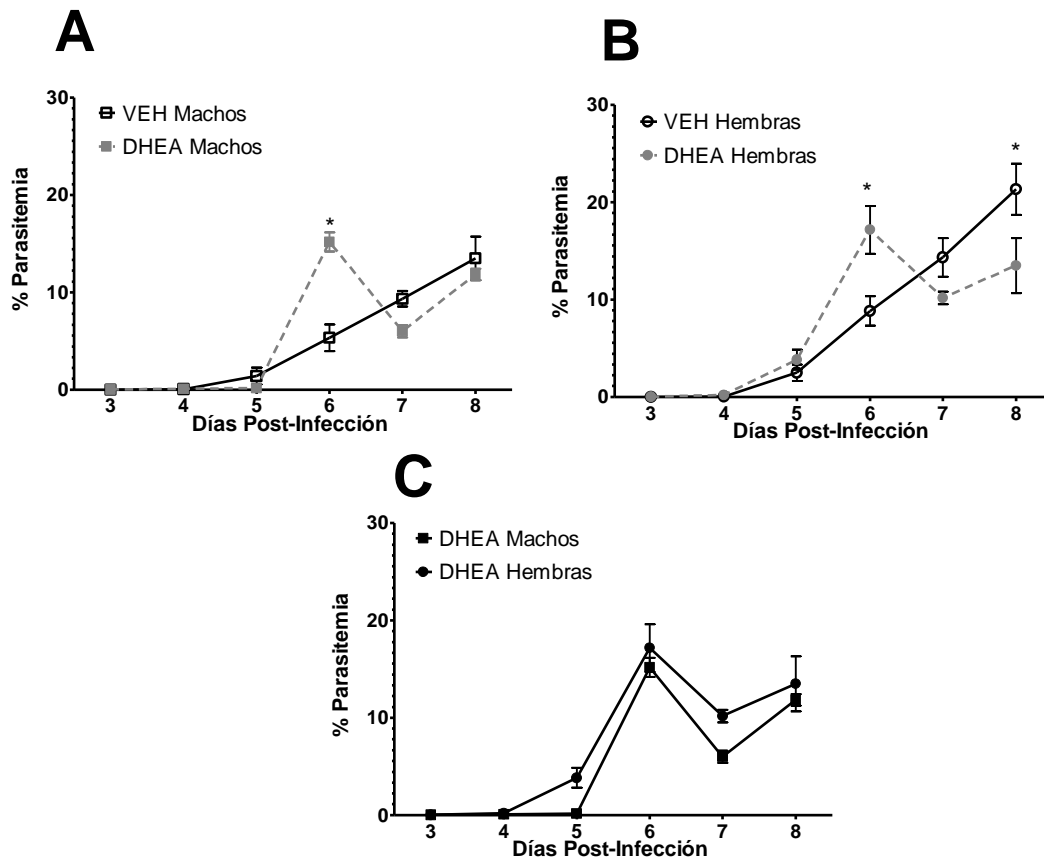


Figura 9. Efecto de la reconstitución de ratones gonadectomizados con dehidroepiandrosterona sobre la parasitemia. Grupos de ratones hembras y machos se gonadectomizaron, 4 semanas después de la cirugía a la mitad de los grupos se les administró DHEA y se infectaron con *P. berghei* ANKA. La parasitemia se evaluó en frotis sanguíneos teñidos con Giemsa. Cada punto en la gráfica representa la media geométrica \pm el error estándar (SEM). El * indica diferencias estadísticamente significativas con un valor de $P < 0.05$.

En general, las hembras, reconstituidas con estradiol o testosterona o DHEA desarrollaron parasitemias menores al octavo día post-infección, en comparación con el grupo de hembras tratadas con vehículo. Por el contrario, la reconstitución de los ratones machos gonadectomizados con testosterona incrementó la parasitemia al octavo día post-infección en relación con su grupo control.

8.2 Efecto de los esteroides sexuales sobre la expresión del gen IFN- γ en la sangre, bazo, hígado y cerebro de ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA

El IFN- γ es una citocina sumamente importante para controlar la infección con *Plasmodium*, se produce en los macrófagos y en las células involucradas en la generación de estrés oxidativo. Por lo tanto, en este trabajo determinamos la expresión de este gen en los diferentes tejidos y analizamos si los esteroides sexuales modulan la expresión de IFN- γ . Para lograr lo anterior, se gonadectomizaron grupos de ratones machos y hembras, después de 4 semanas reconstituimos a los ratones con testosterona, estradiol, DHEA o vehículo y los infectamos con *P. berghei* ANKA. En el día 8 P.I. los ratones se sacrificaron y se extrajo el RNA de sangre, bazo, hígado y cerebro. El ARN se retrotranscribió y el ADN complementario obtenido se utilizó para amplificar el gen de IFN- γ por medio de la técnica de PCR en tiempo real. Para determinar la expresión relativa se comparó la expresión IFN- γ con la del gen constitutivo β -actina.

8.2.1 Efecto de reconstituir con testosterona sobre la expresión del gen IFN- γ

La administración de testosterona en los grupos de machos y de hembras, disminuyó la expresión de IFN- γ en la sangre en comparación con los controles (Figura 10A). En el bazo incrementó la expresión de IFN- γ únicamente en los machos (Figura 10B). En el hígado, los machos desarrollaron una expresión de IFN- γ significativamente mayor que las hembras (Figura 10C). La administración de testosterona incrementó la expresión de IFN- γ en el cerebro de las hembras con respecto a los machos y a las hembras control lo que evidenció dimorfismo sexual en la expresión de IFN- γ en bazo, hígado y cerebro (Figura 10).

8.2.2 Efecto de reconstituir con estradiol sobre la expresión del gen IFN- γ

La administración de estradiol, disminuyó la expresión génica de IFN- γ en la sangre de los grupos de ratones machos y hembras en comparación a su grupo control tratado con el vehículo (Figura 10A). En el bazo, la administración de estradiol también disminuyó la expresión de IFN- γ en los machos, con respecto al grupo control pero la diferencia no resultó significativa. En el hígado, la administración de estradiol disminuyó la expresión de IFN- γ en ambos sexos pero solo resultó estadísticamente significativa en las hembras

(Figura 10C). Por último, en el cerebro se disminuyó la expresión del gen en los machos pero se incrementó significativamente en las hembras (Figura 10D).

8.2.3 Efecto de reconstituir con DHEA sobre la expresión del gen IFN- γ

El tratamiento con DHEA en ratones gonadectomizados disminuyó significativamente la expresión de IFN- γ en la sangre de los ratones de ambos sexos (Figura 10A). En el bazo, la administración de DHEA disminuyó significativamente la expresión de IFN- γ únicamente en las hembras (Figura 10B). En el hígado, la reconstitución con DHEA incrementó significativamente la expresión de IFN- γ en los machos con respecto al grupo control tratados con el vehículo y al grupo de hembras tratadas con DHEA (Figura 10C). Por último, en el cerebro la administración de DHEA incrementó la expresión de IFN- γ únicamente en las hembras en comparación al grupo de machos tratados con la hormona y al grupo control de hembras control (Figura 10D).

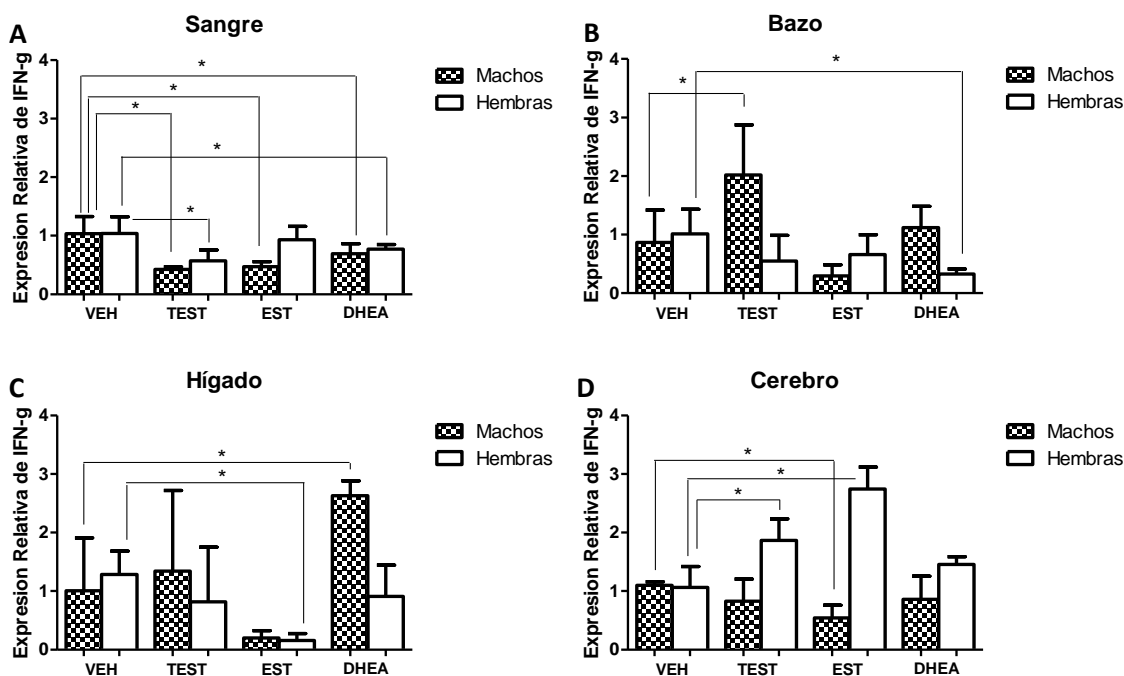


Figura 10. Efecto de la reconstitución de ratones gonadectomizados con testosterona, estradiol y DHEA sobre la expresión relativa de IFN- γ en ratones infectados con *P. berghei* ANKA. Grupos de ratones machos y hembras gonadectomizados se trataron con testosterona (TEST), estradiol (EST), DHEA o vehículo (VEH). Se infectaron con *P. berghei* ANKA y a los 8 días post infección se sacrificaron y se determinó la expresión relativa de IFN- γ en sangre, bazo, hígado y cerebro. Cada barra en la gráfica representa la media \pm la desviación estándar (SD). El * indica diferencias estadísticamente significativas con un valor de P < 0.05.

8.3 Efecto de la reconstitución de ratones gonadectomizados con esteroides sexuales sobre el estrés oxidativo que genera la infección con *P. berghei* ANKA

Dado que la eliminación del *Plasmodium* depende del estrés oxidativo que genera la respuesta inmune contra el parásito y que en malaria se presenta dimorfismo sexual, en este trabajo se estudió si los esteroides sexuales modifican el estrés oxidativo durante la infección con *P. berghei* ANKA y si el dimorfismo sexual se puede explicar por diferencias en el estrés oxidativo. Para lograr lo anterior, se gonadectomizaron grupos de ratones CBA/Ca machos y hembras; cuatro semanas después se reconstituyeron con testosterona o estradiol o con dehidroepiandrosterona. Al día siguiente de la última administración se infectaron con *P. berghei* ANKA. Para evaluar el estrés oxidativo se midió la concentración de malondialdehído (MDA) y las actividades de las enzimas GPx y SOD en el día 8 P.I. cuando se alcanzaron las parasitemias más altas.

8.4 Efecto de reconstituir con esteroides sexuales a ratones CBA/Ca gonadectomizados sobre la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD)

Para evaluar si la testosterona, el estradiol o la DHEA modifican la actividad de la enzima superóxido dismutasa, se gonadectomizaron ratones machos y hembras, se reconstituyeron con testosterona, o estradiol o DHEA o vehículo y se infectaron con *P. berghei* ANKA. A los 8 días post infección se sacrificaron y se evaluó en sangre, bazo, hígado y cerebro la actividad de la enzima SOD. Los resultados obtenidos se dividieron entre la cantidad de proteína para obtener la actividad específica en U/L/mg de proteína en cada tejido analizado. Las hembras tratadas con vehículo presentaron mayor actividad de SOD que los machos en todos los tejidos a excepción del cerebro donde la tendencia fue que los machos presentaron mayor actividad de SOD que las hembras. Sin embargo, tanto en hígado como en cerebro no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. El tejido que presentó la mayor actividad de SOD fue la sangre en donde se generó alrededor de 10 veces mayor actividad en relación a los demás tejidos (Figura 11A).

8.4.1 Efecto de la testosterona sobre la actividad de la enzima SOD

La administración de testosterona en las hembras incremento la actividad de SOD en la sangre en relación al grupo control que recibió vehículo, en los machos y hembras la administración de testosterona disminuyó la actividad de SOD de forma significativa en el bazo (Figura 11B). Sin embargo, en hígado y cerebro la testosterona no modificó la actividad de la enzima. No detectamos diferencias significativas en la actividad de SOD entre machos y hembras en ningún tejido (Figura 11).

8.4.2 Efecto del estradiol sobre la actividad de la enzima SOD

La administración de estradiol incrementó la actividad enzimática de SOD en la sangre de los ratones de ambos sexos (Figura 11A). La reconstitución con estradiol disminuyó significativamente la actividad de la SOD en el bazo de machos y hembras con respecto al grupo control que recibió el vehículo (Figura 11B). Además en este tejido se detectó dimorfismo sexual ya que la actividad de SOD en las hembras fue mayor que en los machos. La administración de estradiol no modificó la actividad enzimática en hígado y cerebro (Figura 11C y 11D).

8.4.3 Efecto de la DHEA sobre la actividad de la enzima SOD

La administración de DHEA en ratones gonadectomizados machos y hembras únicamente disminuyó la actividad de SOD en el bazo (Figura 11B). En los demás tejidos no se presentaron diferencias con relación al grupo control tratado con el vehículo ni detectamos diferencias entre los sexos (Figura 11A, 11C y 11D).

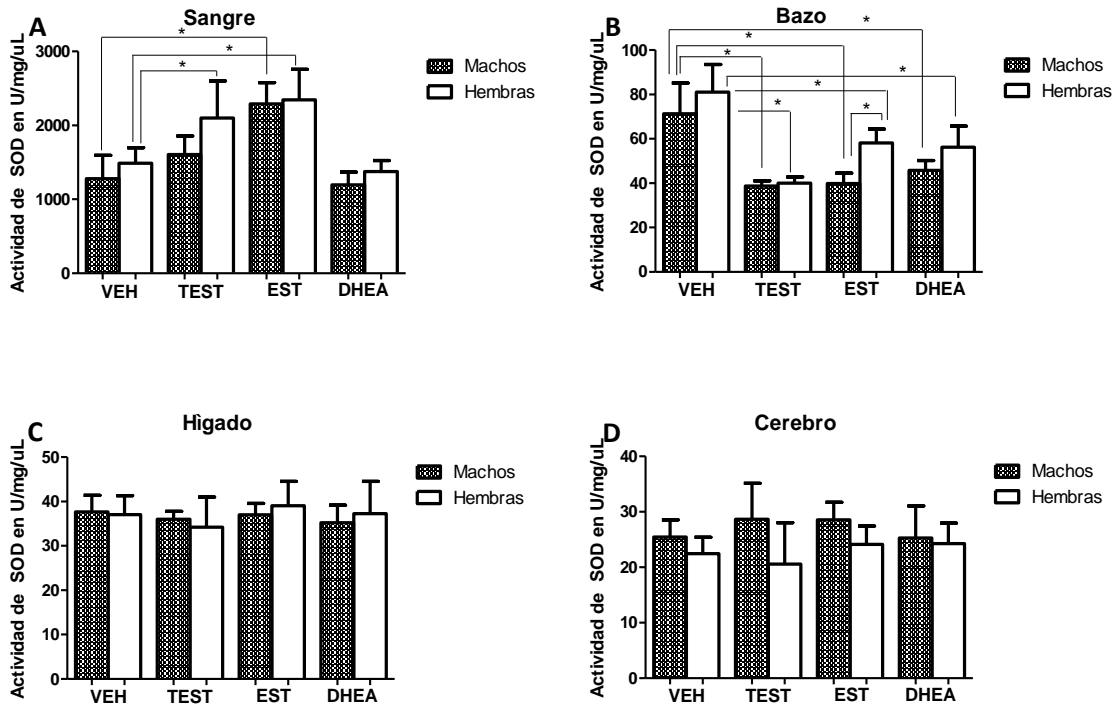


Figura 11. Efecto de la reconstitución de ratones gonadectomizados con testosterona, estradiol y DHEA sobre la actividad de la enzima SOD en ratones infectados con *P. berghei* ANKA. Grupos de ratones machos y hembras gonadectomizados se trataron con testosterona (TEST), estradiol (EST), DHEA o vehículo (VEH). Se infectaron con *P. berghei* ANKA y a los 8 días post infección se sacrificaron y se determinó la actividad de SOD en sangre, bazo, hígado y cerebro. Cada barra en la gráfica representa la media \pm la desviación estándar (SD). El * indica diferencias estadísticamente significativas con un valor de $P < 0.05$.

8.5 Efecto de la reconstitución de ratones gonadectomizados con esteroides sexuales sobre la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx)

Se evaluó la actividad específica de GPx en sangre, bazo, hígado y cerebro ya que son los órganos en donde se ha descrito la mayor severidad del daño en la malaria. Los tejidos en donde se detectó la mayor actividad de la enzima fueron el bazo y el hígado (Figura 12B y 10C). No detectamos diferencias significativas entre los machos y las hembras tratados con el vehículo en ninguno de los tejidos analizados (Figura 12).

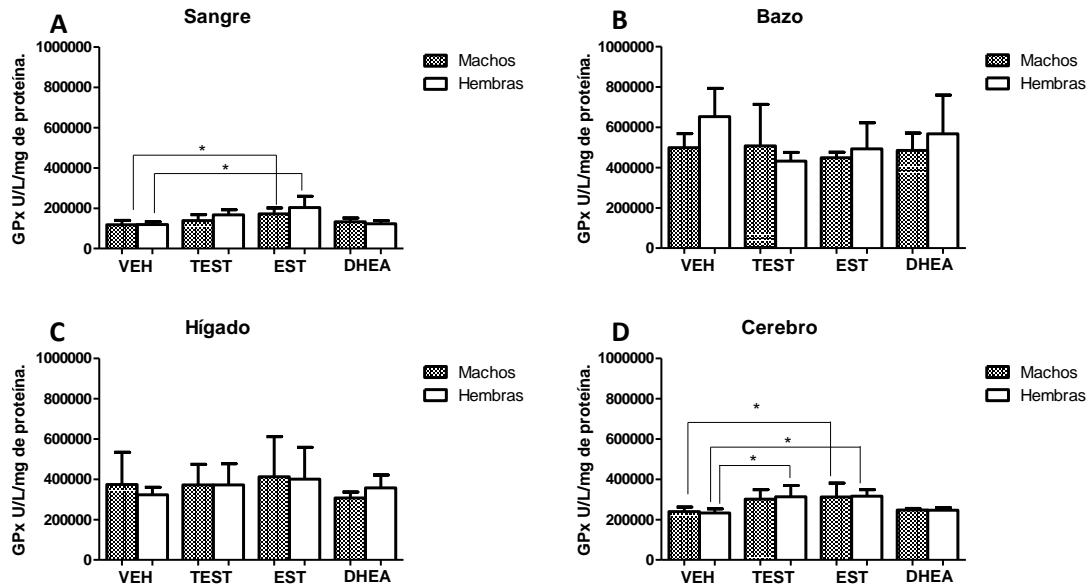


Figura 12. Efecto de la reconstitución de ratones gonadectomizados con testosterona, estradiol y DHEA sobre la actividad de la enzima GPx en ratones infectados con *P. berghei* ANKA. Grupos de ratones machos y hembras gonadectomizados se trataron con testosterona (TEST), estradiol (EST) o DHEA o vehículo. Se infectaron con *P. berghei* ANKA y a los 8 días post infección se sacrificaron y se determinó la actividad de GPx en sangre, bazo, hígado y cerebro. Cada barra en la gráfica representa la media \pm la desviación estándar (SD). El * indica diferencias estadísticamente significativas con un valor de $P < 0.05$.

8.5.1 Efecto de la testosterona sobre la actividad de GPx

La administración de testosterona únicamente incremento la actividad enzimática de GPx en el cerebro de las hembras (Figura 12D), en los demás tejidos no se modificó la actividad de la enzima, con excepción del cerebro en el que las hembras reconstituidas con testosterona incrementaron la actividad de GPx (Figura 12D).

8.5.2 Efecto de estradiol sobre la actividad de GPx

La reconstitución con estradiol incrementó la actividad de GPx en sangre y cerebro, tanto en machos como en hembras, con respecto a su respectivo grupo control tratado con vehículo (Figura 12A y 10D). No detectamos diferencia significativa en la actividad enzimática entre los sexos en los tejidos analizados (Figura 12).

8.5.3 Efecto de la dehidroepiandrosterona sobre la actividad de GPx

La administración de DHEA no modificó la actividad de GPx en ninguno de los tejidos analizados. No detectamos diferencias significativas en la actividad de la enzima entre los sexos (Figura 12). Los resultados indican que la concentración de DHEA que se administró no afecta la actividad enzimática de GPx.

8.6 Efecto de los esteroides sexuales sobre la concentración de malondialdehído (MDA) en ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA

Para determinar si la testosterona, el estradiol y la DHEA modulan el estrés oxidativo en malaria, se gonadectomizaron grupos de ratones machos y hembras y un mes después de la cirugía se reconstituyeron con: testosterona, o estradiol o DHEA. Los ratones se infectaron con *P. berghei* ANKA y en el día 8 post infección se sacrificaron y se cuantificó la concentración de MDA en sangre, bazo, hígado y cerebro. En general, las hembras presentaron concentraciones más altas de MDA que los machos. Sin embargo, esta diferencia no siempre resultó estadísticamente significativa. Los tejidos en los que se detectó mayor estrés fueron el bazo y el cerebro (Figura 13B y 12D). Esto sugiere que estos tejidos son los que están más expuestos al daño en la membrana por los radicales libres que se generan en la infección con *P. berghei* ANKA.

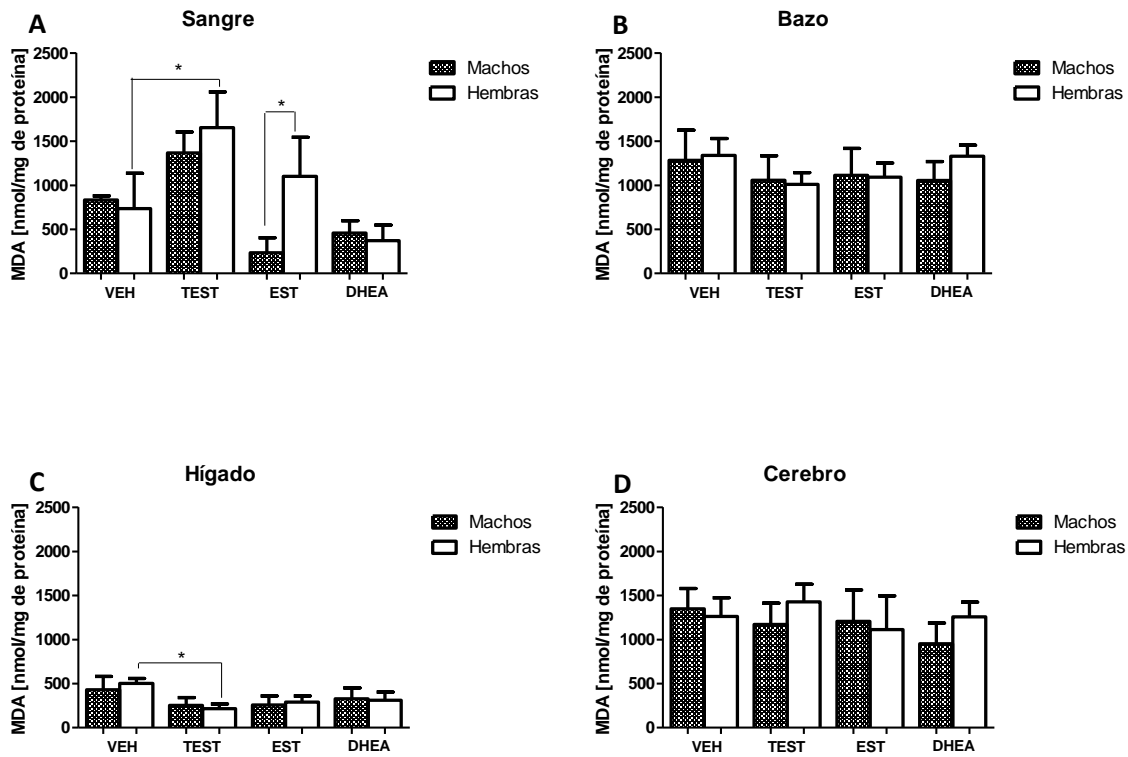


Figura 13. Efecto de la reconstitución de ratones gonadectomizados con testosterona, estradiol y DHEA sobre la concentración de MDA. Grupos de ratones machos y hembras gonadectomizados se trataron con testosterona (TEST), estradiol (EST), DHEA o vehículo (VEH). Se infectaron con *P. berghei* ANKA y a los 8 días post infección se sacrificaron y se determinó la concentración de MDA en sangre, bazo, hígado y cerebro. Cada barra en la gráfica representa la media \pm la desviación estándar (SD). El * indica diferencias estadísticamente significativas con un valor de $P < 0.05$.

8.6.1 Efecto de la testosterona sobre la concentración de malondialdehído (MDA)

El reconstituir con testosterona a los ratones gonadectomizados incrementó significativamente la concentración de MDA en sangre tanto en los machos como en las hembras en relación con el grupo control reconstituido con el vehículo (Figura 13A). En el hígado las concentraciones de MDA disminuyeron en ambos sexos pero la diferencia solo fue significativa en las hembras (Figura 13C). En los otros dos tejidos no se observaron cambios significativos (Figura 13).

8.6.2 Efecto del estradiol sobre la concentración de malondialdehído (MDA)

La reconstitución de los ratones gonadectomizados con estradiol generó una mayor concentración de MDA en la sangre de las hembras en relación con su grupo control

(Figura 13A). Por el contrario, administrar estradiol a los machos disminuyó el estrés oxidativo (Figura 13A). En los demás tejidos, no se detectaron diferencias significativas pero si una tendencia a que la administración de estradiol disminuyó la concentración de MDA. Este hallazgo sugiere un efecto protector del estradiol sobre el estrés oxidativo principalmente en la sangre (Figura 13).

8.6.3 Efecto de la DHEA sobre la concentración de malondialdehído (MDA)

La administración de DHEA disminuyó la concentración de MDA en la sangre con respecto a los grupos control tratados con vehículo pero la diferencia no resultó estadísticamente significativa. En el bazo, el hígado y el cerebro la administración de DHEA no modificó la concentración de MDA, lo que demuestra que DHEA no modificó el estrés oxidativo en bazo, hígado y cerebro (Figura 13B, 12C y 12D).

A manera de resumen, se crearon 3 tablas cuyo objetivo es comparar los resultados obtenidos contra los resultados esperados, para visualizar los efectos que tiene reconstituir con testosterona o estradiol o DHEA a los ratones gonadectomizados sobre la parasitemia, la expresión de IFN- γ y el estrés oxidativo en los ratones infectados con *P. berghei* ANKA.

Tabla 5. Comparación entre la hipótesis y los resultados experimentales en la reconstitución con testosterona.

	Hipótesis		Resultados Experimentales	
	Machos	Hembras	Machos	Hembras
Parasitemia	↑	↑	↑	↑
Expresión relativa de IFN- γ	↓	↓	↑ bazo ↓ sangre	↑ cerebro ↓ sangre
Actividad de GPx	↓	↓	Sin efecto	↑ cerebro
Actividad de SOD	↓	↓	↓ bazo	↑ sangre ↓ bazo
Concentración de MDA	↑	↑	↑ sangre ↓ hígado	↑ sangre ↓ hígado

Tabla 6. Comparación entre la hipótesis y los resultados experimentales en la reconstitución con estradiol.

	Hipótesis		Resultados Experimentales	
	Machos	Hembras	Machos	Hembras
Parasitemia	↓	↓	↓	↓
Expresión relativa de IFN- γ	↑	↑	↓ en sangre, hígado y cerebro	↑ cerebro ↓ hígado
Actividad de GPx	↑	↑	↑ en sangre y cerebro	↑ en sangre y cerebro
Actividad de SOD	↑	↑	↑ sangre ↓ bazo	↑ sangre ↓ bazo
Concentración de MDA	↓	↓	↓ sangre	↑ sangre

Tabla 7. Comparación entre la hipótesis y los resultados experimentales en la reconstitución con DHEA.

	Hipótesis		Resultados Experimentales	
	Machos	Hembras	Machos	Hembras
Parasitemia	↓	↓	Pico de parasitemia al día 6 post-infección	Pico de parasitemia al día 6 post-infección
Expresión Relativa de IFN- γ	↑	↑	↑ hígado ↓ sangre	↓ bazo y sangre
Actividad de GPx	↑	↑	Sin efecto	Sin efecto
Actividad de SOD	↑	↑	↓ bazo	↓ bazo
Concentración de MDA	↑	↑	Sin efecto	Sin efecto

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La gonadectomía incrementó la parasitemia en las hembras en relación con los machos, lo que indica que las hormonas sexuales que se producen en las gónadas de las hembras modulan la proliferación del parásito (Figura 6). El reconstituir a los machos con testosterona incrementó la parasitemia particularmente los días 7 y 8 después de la infección (Figura 7), este hallazgo es acorde con lo descrito por nuestro grupo de investigación y por otros grupos^{7,47,48}, quienes han informado que la testosterona induce inmunosupresión. Sin embargo, la actividad supresora de la testosterona solo explicaría el incremento en la parasitemia en los machos, porque las hembras reconstituidas con testosterona desarrollaron parasitemias menores que el grupo control que recibió vehículo (Figura 7), es posible que en las hembras la testosterona se haya utilizado para sintetizar estradiol⁴⁹. Por otro lado, la administración de estradiol en los ratones machos gonadectomizados no modificó significativamente la parasitemia, sin embargo la administración de estradiol en las hembras gonadectomizadas disminuyó la parasitemia desde el día 5 al 8 P.I. (Figura 8). Este resultado demuestra que el estradiol si influye en la eliminación del parásito particularmente en las hembras. Sin embargo, el desarrollo del parásito no depende únicamente de las hormonas presentes en el hospedero, es un fenómeno en el que participan otras variables y podría estar en función de la interacción de las hormonas con su receptor y de diversos mecanismos de regulación de la expresión genética. La administración de DHEA estimuló la proliferación del parásito en el día 6 en ambos sexos, no obstante en los días 7 y 8 se detectó una tendencia a disminuir la parasitemia tanto en machos como en las hembras (Figura 9). El resultado de DHEA corresponde con lo descrito por otros grupos de investigación^{50, 51} en donde se le atribuye a esta hormona una actividad antipalúdica.

Para estudiar si las diferencias en las parasitemias entre machos y hembras inducidas por los esteroides sexuales se debían a un incremento en el estrés oxidativo, ya que es el principal mecanismo de eliminación del *Plasmodium*, evaluamos el efecto de reconstituir a los ratones gonadectomizados con los esteroides sexuales sobre el estrés oxidativo. Los resultados demuestran que la administración de testosterona incrementó la actividad enzimática de GPx en cerebro. El reconstituir a los ratones con estradiol incrementó la actividad de la enzima GPx en la sangre y en el cerebro de ratones machos y hembras (Figura 12). Sin embargo, no se modificó la actividad en bazo o hígado. La administración de estradiol también incrementó la actividad de SOD en la sangre de machos y hembras;

en contraste disminuyó la actividad de SOD en bazo; una probable explicación es que se generó un fuerte estrés oxidativo en bazo y la enzima se utilizó para neutralizar el efecto de los radicales superóxido y por lo tanto detectamos esa disminución. La reconstitución con testosterona aumentó la actividad en sangre pero la disminuyó en el bazo (Figura 11), lo que muestra un efecto diferencial de los esteroides que depende del tejido analizado. Nuestros resultados demuestran que los esteroides sexuales pueden actuar de diferente forma en los distintos tejidos e inclusive el mismo esteroide puede inducir efectos opuestos dependiendo del tejido blanco que se analice.

Debido que la actividad de las enzimas antioxidantes varía en cada tejido y además GPx y SOD son enzimas inducibles, los incrementos o disminuciones solo reflejan el esfuerzo del organismo en tratar de alcanzar un equilibrio redox. Por lo tanto, en este trabajo analizamos el estrés oxidativo medido como lipoperoxidación, este fenómeno se produce por la oxidación de las membranas de las células cuando los radicales libres oxidan a los lípidos, la concentración de malondialdehído es una medida reconocida para evaluar este fenómeno^{7,46}. La administración de testosterona incrementó el estrés oxidativo en la sangre de los grupos de ambos sexos, pero la diferencia no resultó estadísticamente significativa.

Para estudiar si las hormonas sexuales regulan factores que promuevan la respuesta inmune se estudió el efecto que su administración tiene sobre la expresión génica de IFN- γ . Uno de los principales hallazgos, fue que la administración de andrógenos (testosterona y DHEA) disminuyó significativamente la expresión de IFN- γ relativa en sangre, lo que sugiere que ambas hormonas tienen actividad inmunosupresora en este tejido, este resultado es acorde con lo descrito en la literatura^{47,48}. Otra posible explicación puede ser que estos esteroides indujeron un rápido incremento en la transcripción, y por lo tanto en la producción, de IFN- γ en etapas más tempranas de la enfermedad, lo que correlaciona con las parasitemias observadas durante la administración de testosterona y DHEA, para evitar la proliferación del parásito, en el caso de testosterona; y para regular un pico muy elevado de la parasitemia, en el caso de DHEA, sin embargo sería necesario determinar la expresión relativa en días anteriores para corroborar esta teoría.

En el hígado, la administración de estradiol disminuyó la expresión relativa de IFN- γ . Este resultado corrobora el efecto inmunoregulador del estradiol que ya se había descrito anteriormente en la literatura³⁰. Por el contrario la administración de testosterona generó

un marcado incremento en la expresión relativa de IFN- γ en el bazo en comparación con su control y contra las hembras del mismo tratamiento. En conjunto con los demás parámetros de estrés oxidativo podrían indicar una activación retrasada de la respuesta inmune en este tejido. Sin embargo esto no se puede probar sin un estudio a diferentes tiempos para analizar la progresión de la enfermedad.

Por último, en el cerebro se demostró que la administración de testosterona o estradiol incrementaron la expresión génica de IFN- γ en las hembras y no en los machos, resultado que resalta el dimorfismo sexual de la enfermedad. Se ha descrito que niveles altos de citocinas como IFN- γ y TNF- α en el cerebro correlacionan con una gran probabilidad de padecer malaria cerebral, y si las tanto el estradiol como la testosterona incrementaron la expresión de IFN- γ es probable que éstas hormonas estén involucradas en el desarrollo de malaria cerebral³⁰.

En un panorama general, la testosterona parece que funciona como un inmunosupresor ya que disminuye la expresión relativa de interferón γ y se acompaña de un incremento en los niveles de MDA en sangre. Esto indica una disminución en la respuesta inmune en el tejido con más contacto con el parásito y si relaciona con la baja en la actividad de las enzimas antioxidantes, en especial SOD, en el bazo podría indicar una disminución en la respuesta inmune como se reportó anteriormente^{16-18,27,28}.

En cuanto el tratamiento con estradiol, parece ser inmuno-estimulante en general, ya que incrementa la actividad de las enzimas antioxidantes y disminuye la cantidad de MDA en sangre aunque solo en los machos^{16,18}. En las hembras el incremento de la expresión relativa de IFN- γ en el cerebro y el incremento de MDA en sangre reafirman la teoría de que esta hormona contribuye con la proliferación del parásito y el desarrollo de malaria cerebral³⁰.

Por último la administración de DHEA afectó el desarrollo de la parasitemia y ocasiono un incremento al día 6 post infección, lo que acompañado con una disminución en la expresión relativa de IFN- γ , podría sugerir un efecto inmunosupresor. Sin embargo, se tendría que confirmar este fenómeno a que las demás variables analizadas no revelaron ninguna tendencia ni apoyaron esta teoría.

10. CONCLUSIONES

La administración de los esteroides modificó de forma diferencial la parasitemia, la testosterona la incrementó, mientras que el estradiol la disminuyó. La testosterona el estradiol y la DHEA disminuyeron la expresión relativa de IFN- γ en sangre. Los tres esteroides modificaron el estrés oxidativo de forma dependiente de tejido y del sexo; la testosterona incrementó la concentración de MDA en sangre y la disminuyó en hígado en las hembras, mientras que administrar estradiol incrementó el MDA en la sangre de las hembras y la disminuyó en los machos. En este trabajo evidenciamos que las hormonas sexuales regulan diversos aspectos de la respuesta inmune; en particular el estradiol promovió la eliminación del parásito y disminuyó el proceso inflamatorio al modular positivamente la actividad antioxidante de SOD Y GPx en sangre de las hembras

Es evidente que los mecanismos involucrados en la regulación de la respuesta inmune y del estrés oxidativo son sumamente complejos y los esteroides sexuales constituyen tan solo una de las distintas variables involucradas en la modulación de la respuesta inmune.

11. PERSPECTIVAS

Este trabajo contribuye a entender los efectos de los esteroides sexuales sobre el estrés oxidativo, ya que a pesar de su relevancia en la respuesta inmune no se conocen con precisión los mecanismos por los cuales los esteroides sexuales regulan la susceptibilidad o resistencia a enfermedades infecciosas en particular en la malaria. Además, genera nuevas áreas de estudio como el análisis de los receptores de esteroides en cada uno de los tejidos blanco en malaria, así como de la evaluación de otros genes involucrados en los procesos inflamatorios o la expresión de los genes que codifican para las enzimas antioxidantes.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. WHO Malaria Report. Suiza: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data; 2013. p. 286.
2. Landau I, Chabaud A. *Plasmodium* species infecting *Thamnomys rutilans*: a zoological study. *Advances in Parasitology*. 1994;33:50-90.
3. Klein SL. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. *Parasite Immunology*. 2004;26:247-64.
4. Castellanos Martínez R, Guevara Rosales M. Respuestas inmunes Innata y Adaptativa. *MEDISAN*. 2000;4(2):64-74.
5. Artavanis-Tsakonas K, Riley EM. Innate Immune Response to Malaria: Rapid Induction of IFN-gamma from Human NK Cells by Live *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes. *The Journal of Immunology*. 2002;169:2956-63.
6. Clark IA, Al Yamad FM, Jacobson LS. The Biological Basis of Malarial Disease. *International Journal of Parasitology*. 1997;27(10):1237-49.
7. Mosqueda-Romo NA, Rodríguez-Morales AL, Buendía-González FO, Aguilar-Sánchez M, Morales-Montor J, Legorreta-Herrera M. Gonadal steroids negatively modulate oxidative stress in CBA/Ca female mice infected with *P. berghei* ANKA. *Biomed Res Int*. 2014;2014:805495. PubMed PMID: 25243182. Pubmed Central PMCID: PMC4163401. eng.
8. Percário S, Moreira DR, Gomes BAQ, Ferreira MES, Gonçalves ACM, Laurindo PSOC, et al. Oxidative Stress in Malaria. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012;13:27.
9. Ahmed SA, Penhale WJ, Talal N. Sex hormones, Immune response and Autoimmune disease. *American Journal of Pathology*. 1985;121(3):531-51.
10. Chotivanich K, Udomsangpetch R, McGready R, Proux S, Newton P, Pukrittayakamee S, et al. Central Role of the Spleen in Malaria Parasite Clearance. *Journal of Infectious Diseases*. 2002;185:1538-41.
11. Romero Cabello R. *Microbiología y Parasitología Humana, Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. 3a ed. México: Editorial Médica Panamericana; 2007. 1003 p.
12. Brusca R, Brusca G. *Invertebrados* 2a ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates; 2003. 895 p.
13. Killick-Kendrick R. *Taxonomy, Zoography and Evolution*. In: *Rodent Malaria*. London: Academic Press; 1978. p. 1-52.
14. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual Reviews of Immunology*. 1999;17:593-623.
15. Rojas Espinosa O, Arce Paredes P. Fagocitosis: mecanismos y consecuencias primera parte. *Bioquímica*. 2003;28(4):19-28.
16. Escobedo G, Roberts CW, Carrero JC, Morales-Montor J. Parasite regulation by host hormones: an old mechanism of host exploitation? México: Elsevier; 2005. p. 1-5.
17. Barañao RI. Hormonas sexuales y respuesta inmunológica. *SAEGRE*. 2009;19(2):20-30.

18. De León Nava M, Morales Montor J. Dimorfismo sexual inmunitario: ¿Pueden los esteroides sexuales polarizar el perfil de citocinas Th1/Th2? Revista de Investigación Clínica. 2006;58(2):161-9.
19. de Oliveira CMB, Sataka RK, Issy AM. Citocinas y Dolor. Revista Brasileira de Anestesiología. 2011;61(2):137-41.
20. Mata-Espinosa DM, Hernández-Pando R. Interferón gamma: aspectos básicos, importancia clínica y usos terapéuticos. Revista de Investigación Clínica. 2008;60(5):421-31.
21. Stevenson MM, Riley EM. Innate Immunity to Malaria. Nature Reviews/Immunology. 2004;4:169-80.
22. Su Z, Stevenson MM. IL-12 Is Required for Antibody-Mediated Protective Immunity Against Blood-Stage *Plasmodium chabaudi* AS Malaria Infection in Mice. Journal of Immunology. 2002;168:1348-55.
23. Heffner LJ, Schust DJ. The reproductive system at a glance: John Wiley & Sons; 2010.
24. Amado JA, Flórez J. Hormonas sexuales: estrógenos, gestágenos, andrógenos y anticonceptivos hormonales. Farmacología humana.
25. De Leon-Nava M, Morales-Montor J. ¿Pueden los esteroides sexuales polarizar el perfil de citocinas Th1 y Th2? Revista investigación clínica. 2006;58 (2):161-9.
26. Cervantes Rebolledo C, Carrero Sánchez JC. Hormonas y la susceptibilidad a las infecciones parasitarias. Revista Médica de la Extensión Portuguesa. 2008;2(2):77-88.
27. Muehlenbein MP, Bribiescas RG. Testosterone-Mediated Immune Functions and Male Life Histories. American Journal of Human Biology. 2005;17:527-58.
28. Krücken J, Dkhil MA. Testosterone Suppresses Protective Responses of the Liver to Blood-Stage Malaria. Infection and Immunity. 2005;73(1):436-43.
29. Hernández-Cervantes R, Sánchez-Acosta AG, Ramírez-Nieto R, Morales-Montor J. Regulación Neuroendocrínica de la Función Inmunitaria: El Papel de la Hipofisis y los Esteroides Sexuales. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. 2010;13(2):103-12.
30. Libonati RMF, Cunha MG, Souza JM, Santos MVN, Oliveira SG, Daniel-Ribeiro CT, et al. Estradiol, but Not Dehydroepiandrosterone, Decreases Parasitemia and Increases the Incidence of Cerebral Malaria and the Mortality in *Plasmodium berghei* ANKA-Infected CBA Mice. Neuroimmunomodulation. Brazil: Karger; 2006. p. 28-35.
31. Krobath PD, Salek FS, Pittenger AL. DHEA and DHEA-S: A review. Journal of Clinical Pharmacology. 1999;39:327-48.
32. Khorram O, Vu L, Yen SSC. Activation of Immune Function by Dehydroepiandrosterone in Age-Advanced Men. Journal of Gerontology. 1997;52(1):M1-M7.
33. Venereo Gutiérrez JR. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Revista Cubana de medicina militar. 2002;31(2):126-33.
34. Camps D. Bioquímica del estrés Oxidativo: Lulu Enterprises Incorporated; 2010.
35. Rodríguez Perón JM, Menéndez López JR, Trujillo López Y. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. Revista Cubana de Medicina Militar. 2001;30:15-20.

36. Díaz-Costa AE, Membrillo Hernández J. Consecuencias biológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos. TIP Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas. 2006;9(1):34-44.
37. Méndez JD. Productos finales de glicación avanzada y complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. Gac Med Mex. 2003;139(1):49-55.
38. González-Torres MC, Betancourt-Rule M, Ortiz-Muñiz R. Daño Oxidativo y Antioxidantes. Bioquímica. 2000;25(1):3-9.
39. Céspedes-Miranda E, Castillo-Herrera J. La peroxidación lipídica en el diagnóstico del estrés oxidativo del paciente hipertenso: Realidad o mito. 2008 [updated Junio 2008; cited 27]. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002008000200003&lng=es.
40. 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;34:163-89.
41. Turrens JF. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. Molecular Aspects of Medicine. 2004;25:211-20.
42. Vásquez AM, Tobón A. Mecanismos de patogenia en la malaria por *Plasmodium falciparum*. Biomedica. 2012;32(Supl.):106-20.
43. Percário S, Moreira DR, Gomes BAQ, Ferreira MES, Gonçalves ACM, Laurindo PS, et al. Oxidative Stress in Malaria. International Journal of Molecular Sciences. 2012;13:27.
44. Bartlett JMS, Stirling D. PCR protocols. 2° ed. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2003.
45. Livak K, Schmittgen T. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-DDCT Method. Methods. 2001;25:402-8.
46. Jentzch AM, Bachmann H, Fürst P, Biesalski HK. Improved Analysis of Malondialdehyde. Radical Biology & Medicine. USA: Elsevier; 1996. p. 251-6.
47. Wunderlich F, Peter W, Benten M, Bettenhauser U, Schmitt-Wrede H-P, Mossmann H. Testosterone-unresponsiveness of existing immunity against *Plasmodium chabaudi* malaria. Parasite Immunology. 1992;14:307-20.
48. Wunderlich F, Marinovski P, Peter W, Benten M, Schmitt-Wrede H-P, Mossmann H. Testosterone and other gonadal factor(s) restrict the efficacy of genes controlling resistance to *Plasmodium chabaudi* malaria. Parasite Immunology. 1991;13:357-67.
49. Simpson ER. Aromatization of androgens in women: current concepts and findings. Fertility and Sterility. 2002;77(4 Supl. 4):S6-S10.
50. Freilich D, Ferris S, Wallace M, Leach L, Kallen A, Frincke J, et al. 16-Bromoepiandrosterone, a dehydroepiandrosterone (DHEA) analogue, inhibits *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei* growth. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2000;63(5, 6):280-3.
51. Safeukui I, Mangou F, Malvy D, Vincendeau P, Mossalayi D, Haumont G, et al. *Plasmodium berghei*: dehydroepiandrosterone sulfate reverses chloroquino-resistance in experimental malaria infection; correlation with glucose 6-phosphate dehydrogenase and glutathione synthesis pathway. Biochemical Pharmacology. 2004;68:1903-10.