



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA MOLECULAR

“Efecto de la administración de testosterona, estradiol y DHEA sobre la expresión del gen de TNF- $\alpha$  y su relación con la variación de peso y temperatura en un modelo experimental de malaria murina”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE DE:

QUIMICO FARMACÈUTICO BIOLOGO

PRESENTA:

LUIS ANTONIO CERVANTES CANDELAS

NÚMERO DE CUENTA: 30605017-4

DIRECTORA DE TESIS

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

- ❖ Éste proyecto recibió financiamiento de la DGAPA proyecto PAPIIT IN216914.
- ❖ A la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y al Laboratorio de Inmunología Molecular bajo la dirección de la Dra. Martha Legorreta Herrera, por ser las instituciones y lugares donde desarrollé el trabajo de investigación.
- ❖ A mis sinodales Q.F.B. María de las Mercedes Zamudio Durán, Dra. Martha Legorreta Herrera, Dra. María Isabel Soto Cruz, Dra. Juana Rosado Pérez y Q.F.B. Taide Laurita Arista Ugalde, por su aportaciones y correcciones durante la revisión de la Tesis.
- ❖ A la Dra. Martha Legorreta Herrera por su confianza, apoyo y paciencia a lo largo de todo el trabajo realizado dentro y fuera del laboratorio, su experiencia me permitió crecer como estudiante y como persona. De igual forma agradezco las pláticas que me impulsan día a día a continuar con mi formación como investigador.
- ❖ A mis padres Luis Cervantes Argueta y María de la Luz Candelas Ramírez, por todo el cariño que me han ofrecido a lo largo de toda mi vida. Por el apoyo incondicional que me brindaron y por el cual logré terminar la licenciatura. Además, por enseñarme con el ejemplo el significado de las palabras responsabilidad, honestidad, perseverancia, dedicación, lealtad y prudencia, ya que con ellas y sus consejos crecí como persona y como estudiante.
- ❖ A mis hermanas Angélica y Paola por el apoyo y cariño que me brindaron a lo largo de mi desarrollo como hermano y estudiante.

- ❖ A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Inmunología Molecular: Margarita Aguilar Sánchez, Rosa Angélica Maldonado Velázquez y Fidel Buendía Gonzales por enseñarme lo que representa el trabajo en equipo y por brindar su grandiosa amistad. Además a Jesús Aguilar Castro por que iniciamos juntos esta etapa en la vida y hemos crecido en el laboratorio como amigos y futuros investigadores. Y a todos ellos porque fue una experiencia divertida y muy agradable realizar mi servicio social y mi tesis.
- ❖ A Araceli Sosa Castillo y Azrael Estrada Sosa por brindar su amistad y apoyo dentro y fuera del laboratorio.
- ❖ A Karina Yetzú por compartir su tiempo y su cariño, además por comprender y apoyarme a lo largo de la carrera mis emociones y anhelos.
- ❖ A mi familia en general, que siempre ha visto por mi bienestar y mi salud, especialmente a mi Tío Alberto por sus palabras de apoyo en los momentos más necesarios.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
<b>1.-RESUMEN</b>	<b>7</b>
<b>2.- INTRODUCCIÓN</b>	<b>8</b>
<b>3.- MÁRCO TEÓRICO</b>	<b>9</b>
3.1 Malaria	9
3.2 Respuesta inmune en malaria	11
3.3 El factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ )	13
3.4 Peso y temperatura en malaria	15
3.5 Síntesis de las hormonas sexuales	15
3.6 Hormonas sexuales y el sistema inmune	18
3.7 Hormonas sexuales y malaria	19
3.8 Hormonas, su relación con el peso y la temperatura	20
<b>4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>22</b>
<b>5.- HIPÓTESIS</b>	<b>22</b>
<b>6.- OBJETIVO</b>	<b>23</b>
5.1 Objetivo general	23
5.2 Objetivos particulares	23
<b>7.- MATERIAL, EQUIPO Y MÉTODOS</b>	<b>24</b>
7.1 Población de estudio	24
7.2 Parásito	24
7.3 Variables	24

7.4 Material	25
7.5 Equipo	25
7.6 Reactivos	25
7.7 Diseño experimental	26
7.7.1 Administración de hormonas	26
7.7.2 Extracción de RNA y retrotranscripción	26
7.7.3 PCR en tiempo real	27
7.7.4 Análisis estadístico	28
<b>8.-RESULTADOS</b>	<b>30</b>
8.1.-Parasitemias	30
8.2.-Efecto de la administración de testosterona, estradiol y DHEA sobre el peso corporal	32
8.3.-Efecto de las hormonas sexuales sobre la temperatura corporal	34
8.4.- Efecto de la testosterona, el estradiol y DHEA sobre la expresión de TNF- $\alpha$ en sangre, bazo, hígado y cerebro de ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA	36
8.4.1 Expresión de TNF- $\alpha$ en sangre	36
8.4.2 Expresión de TNF- $\alpha$ en bazo	38
8.4.3 Expresión de TNF- $\alpha$ en hígado	39
8.4.4 Expresión de TNF- $\alpha$ en cerebro	40
<b>9.-DISCUSIÓN</b>	<b>41</b>
9.1 Efecto de administrar de testosterona, estradiol o DHEA sobre la parasitemia de ratones CBA/Ca infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.	41
9.2 Efecto de la administración de testosterona, estradiol y DHEA sobre el peso corporal	41
9.3 Efecto de las hormonas sexuales sobre la temperatura corporal	43

9.4 Efecto de la testosterona, el estradiol y DHEA sobre la expresión de TNF- $\alpha$ en sangre, bazo, hígado y cerebro de ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA	44
9.4.1 Efecto de las hormonas sexuales sobre la expresión de TNF- $\alpha$ en la sangre	44
9.4.2 Efecto de las hormonas sexuales sobre la expresión de TNF- $\alpha$ en el bazo	45
9.4.3 Efecto de las hormonas sexuales sobre la expresión de TNF- $\alpha$ en el hígado	45
9.4.4 Efecto de las hormonas sexuales sobre la expresión de TNF- $\alpha$ en el cerebro	46
<b>10.-CONCLUSIONES</b>	<b>46</b>
<b>11.-PERSPECTIVAS</b>	<b>49</b>
<b>12.-REFERENCIAS</b>	<b>50</b>

## 1. RESUMEN

La malaria o paludismo es una de las enfermedades infecciosas con mayor mortalidad en todo el mundo. En esta enfermedad se presenta dimorfismo sexual en el que los hombres presentan síntomas más severos como la pérdida de peso y variaciones en la temperatura corporal, además de una mayor mortalidad que las mujeres. La patogénesis no está del todo comprendida, sin embargo se conoce que las citocinas inflamatorias como TNF- $\alpha$  intervienen en el desarrollo y complicaciones de la enfermedad. Debido a que las principales diferencias entre los sexos dependen de la concentración de las hormonas sexuales, en el presente trabajo se estudiaron los efectos de administrar testosterona, estradiol y dehidroepiandrosterona (DHEA) sobre el peso, la variación de temperatura corporal, la parasitemia y la expresión del gen de TNF- $\alpha$  en sangre, bazo, hígado y cerebro, en un modelo experimental de malaria murina.

Se detectó que la administración de las tres hormonas sexuales modulan la parasitemia, la pérdida de peso, la variación de temperatura y la expresión del gen de TNF- $\alpha$ . Además, los resultados obtenidos explican parcialmente el dimorfismo sexual que se presenta en malaria, ya que la expresión de TNF- $\alpha$  fue diferente entre los sexos, las hembras fueron más susceptibles a los incrementos de los esteroides sexuales, puesto que incrementaron la expresión de TNF- $\alpha$  en la sangre y en el hígado en comparación con los machos. Por el contrario, en el bazo y en el cerebro los machos expresaron más TNF- $\alpha$  que las hembras.



## 2. INTRODUCCIÓN

La malaria o paludismo es una enfermedad parasitaria que constituye un problema de salud mundial, se calcula que cada año se presentan más de 600 mil muertes<sup>1</sup>. Se caracteriza por un marcado dimorfismo sexual que se polariza hacia los hombres quienes desarrollan síntomas más severos como la pérdida de peso, fiebres, anemia y mayor mortalidad que las mujeres. La infección con el parásito induce la activación de macrófagos y linfocitos T que generan una respuesta inflamatoria vía la secreción de citocinas como el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), esta citocina promueve la muerte del parásito, pero también contribuye al desarrollo de los síntomas más severos de la enfermedad<sup>2, 3</sup>.

El sistema endócrino y el inmune se conectan a través de redes de moléculas señalizadoras como las hormonas y las citocinas que actúan sobre receptores en común, como consecuencia las hormonas sexuales modulan el desarrollo y función de las células del sistema inmune, lo que origina una respuesta dimórfica en donde en general las mujeres desarrollan concentraciones más altas de anticuerpos y responden mejor a las infecciones que los hombres<sup>4</sup>, la malaria es un ejemplo de esas interacciones. Se sabe que las hormonas sexuales testosterona, estradiol y DHEA, además de ser responsables de las principales diferencias fenotípicas entre los sexos, también modulan la respuesta inmune. Sin embargo, en la malaria todavía no se conocen con precisión los mecanismos responsables de las diferencias en la respuesta inmune entre hombres y mujeres. Por lo anterior, en este trabajo se estudió el efecto de administrar testosterona, estradiol y DHEA sobre el peso, la temperatura, la parasitemia y la expresión de TNF- $\alpha$  en diferentes tejidos en un modelo experimental de malaria murina.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Malaria

La malaria o paludismo es una enfermedad tropical originada por el parásito del género *Plasmodium* y se transmite por la picadura de la hembra del mosquito *Anopheles*. Genera 207 millones de nuevos casos y alrededor de 600 mil muertes por año<sup>1</sup>. Las regiones endémicas de malaria son las zonas tropicales, principalmente el continente africano<sup>1</sup>. En México, la principal especie causal de malaria es *P. vivax*, con el riesgo de infección de 1 por cada 1000 personas (Figura 1)<sup>1</sup>.



**Figura 1** Zonas endémicas de malaria en México. Tomado y modificado de World Malaria Report 2013<sup>1</sup>.

Los síntomas asociados con la malaria incluyen, anemia, dificultad respiratoria, fiebre, hipotermia y pérdida de peso, además de problemas neurológicos como la ataxia, parálisis, coma y la muerte<sup>1, 5</sup>; estos síntomas junto con la mortalidad, son más severos en los hombres que en las mujeres, a este fenómeno se le conoce como dimorfismo sexual<sup>5</sup>. En la actualidad no se conocen del todo los mecanismos por los cuales se genera una mayor intensidad en los síntomas y un mayor número de muertes en los hombres que en las mujeres. Se ha documentado que las hormonas sexuales son las responsables de las principales diferencias entre los sexos, se producen en las gónadas y tienen una estrecha relación con la respuesta inmune<sup>6</sup>; puesto que el sistema inmune y las células que

lo componen está regido por la conexión entre el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas<sup>7</sup>. Las hembras tienen una mayor concentración de estradiol en comparación con los machos, que a su vez presentan concentraciones más elevadas de testosterona que las hembras. Estas diferencias, podrían al menos explicar parcialmente las diferencias que existen en la respuesta inmune entre los sexos ante la misma enfermedad<sup>8</sup>.

La eliminación del parásito en humanos y ratones se produce principalmente en el bazo y la sangre, a través de las células fagocíticas, la fijación de complemento y los anticuerpos que favorecen la fagocitosis y la citotoxicidad. Cuando el *Plasmodium* invade a los eritrocitos, metaboliza a la hemoglobina, lo que genera hemozoína e inflamación en el hígado<sup>9, 10</sup>. En el cerebro, las infecciones con *Plasmodium falciparum* en humanos y *Plasmodium berghei* ANKA en ratones, generan malaria cerebral<sup>11</sup>, proceso que se asocia con una elevada producción de citocinas pro-inflamatorias como el TNF- $\alpha$ <sup>12</sup>, por lo que evaluar el efecto de las hormonas esteroideas en la expresión de RNA mensajero (RNAm) para TNF- $\alpha$  y sus implicaciones en las características patológicas como la pérdida de peso y la variación de temperatura puede ayudar a comprender la patología.

Dado que la malaria es una enfermedad infecciosa con una alta mortalidad, que la patología es más severa en machos que en las hembras y que las hormonas estradiol, DHEA y testosterona modulan la respuesta inmune, en este trabajo se estudió el efecto de la administración de esos esteroides sobre el peso, la temperatura y la parasitemia en ratones CBA/Ca infectados con *Plasmodium berghei* ANKA. Además, se analizó el efecto de la testosterona, estradiol y DHEA sobre la expresión del RNAm que codifica para TNF- $\alpha$ , ya que esa citocina se ha asociado con la intensidad de los síntomas de la malaria<sup>13</sup>.

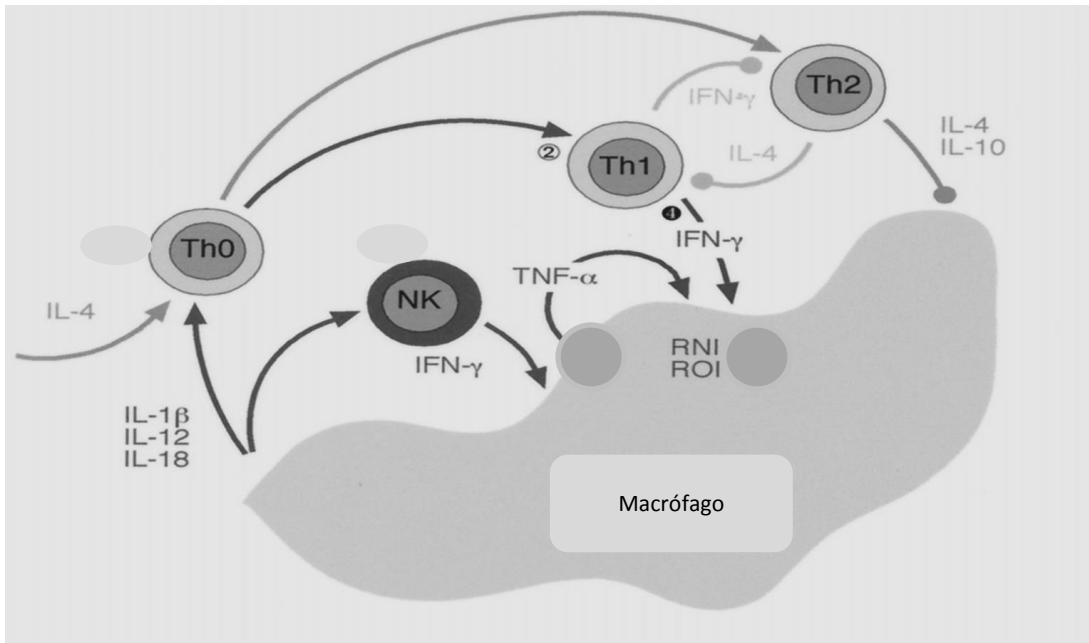
El estudio de los mecanismos de la respuesta inmune en malaria es complicado por razones técnicas y éticas. Sin embargo, los modelos experimentales de malaria en roedores, constituyen una estrategia que permite analizar a detalle los mecanismos de la respuesta inmune de la enfermedad; además poseen diversas ventajas como son: la facilidad de mantener al parásito en ambientes controlados,

así mismo, los ratones son organismos bien estudiados y de fácil mantención, sus ciclos de reproducción son cortos, existen cepas singénicas, es decir un ratón es genéticamente igual a otro, por lo que no existe variabilidad genética lo que conlleva a una respuesta inmunológica similar entre los ratones<sup>14-16</sup>. El modelo experimental que se utilizó en este proyecto es CBA/Ca-*P. berghei* ANKA, ya que es equiparable a la malaria generada por *Plasmodium falciparum* en humanos<sup>14, 15</sup>.

### 3.2 Respuesta inmune en malaria

La respuesta inmune contra el parásito, inicia cuando el mosquito hembra *Anopheles* inocula esporozoítos del *Plasmodium*, lo que induce un incremento en el número de monocitos presentes en sangre<sup>17</sup>. Posteriormente los esporozoítos migran hasta el hígado y activan a las células NK que inducen la fagocitosis en las células dendríticas y en los macrófagos<sup>18</sup>. La activación de esas células provoca la elevación de la secreción de citocinas inflamatorias como INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6<sup>19</sup>, que se asocian con la severidad de la patología<sup>13</sup>. Se ha reportado que la ausencia de citocinas en ratones knockout está relacionada con el desarrollo de la patología como se muestra en la tabla 1<sup>20</sup>. Las células dendríticas y los macrófagos presentan el antígeno procesado a los linfocitos T-virgenes mismos que maduran a células Th1 (CD4+), e incrementan nuevamente la expresión de citocinas pro-inflamatorias como el INF- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$ <sup>21</sup>, además de citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-8 e IL-12<sup>11</sup>.

Los macrófagos son células clave en la eliminación del parásito a lo largo de toda la enfermedad, lo hacen a través de la generación de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, además también producen citocinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )<sup>19</sup> (Figura 2).



**Figura 2 Regulación de la respuesta inmune por los macrófagos mediada por citocinas pro y anti-inflamatorias.** En la imagen se representan las diferentes citocinas como INF- $\gamma$  e IL-1 $\beta$ , involucradas en el proceso de inflamación y cómo es que éstas son capaces de estimular y activar a los macrófagos para generar TNF- $\alpha$  e intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno (RNI y ROI). Tomada y modificada de Alexander 2001<sup>20</sup>.

Citocina ausente.	Efecto en la parasitemia.
IL-12	↑
IFN- $\gamma$	↑↑
TNF- $\alpha$	↑

**Tabla 1 Efecto de la ausencia de algunas citocinas en ratones knockout (KO) sobre la parasitemia.** (↑) aumento, (↓) disminución. Tomado y modificado de Angulo 2002<sup>11</sup>.

### 3.3 El factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ )

El TNF- $\alpha$  es una citocina producida por los linfocitos Th1, monocitos y macrófagos activados<sup>22, 23</sup>. Pertenece a una familia de citocinas en las que destacan la caquexina o TNF- $\alpha$  y la linfoxina o TNF- $\beta$ . El TNF- $\alpha$  es una proteína que se origina por el corte de su precursor, un homotrímero (de 233 aminoácidos y 26 KDa) unido a la membrana con la enzima metaloproteasa (TACE), lo que origina una proteína de 157 aminoácidos con peso molecular de 17 KDa<sup>24</sup>. Las células diana del TNF- $\alpha$  presentan los receptores TNF-R1 y TNF-R2 que cuando interactúan con su ligando inducen diferentes funciones como la apoptosis, la proliferación celular y la síntesis de citocinas<sup>25</sup>. Además de funcionar como citocina pro inflamatoria, el TNF- $\alpha$  también es responsable de la activación de osteoclastos y de fibroblastos, de la inhibición de la adipogénesis; está involucrado en la liberación de las proteínas de fase aguda, además es capaz de inducir fiebre, caquexia y sueño<sup>26</sup>.

Durante la infección con *Plasmodium* en humanos y ratones, la respuesta inmune se caracteriza por la activación de células dendríticas, monocitos, células NK y macrófagos y por la secreción de citocinas pro-inflamatorias como el INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . En pacientes infectados con *Plasmodium* la secreción de TNF- $\alpha$  se incrementa a partir del día 7 u 8 post-infección<sup>13</sup>. Además esta citocina es un pirógeno endógeno que los monocitos liberan *in vitro* a partir de las 36-42 horas después de estar en contacto con eritrocitos infectados con *P. falciparum*<sup>27</sup>.

Además, el TNF- $\alpha$  estimula la citotoxicidad de los monocitos, incrementa la permeabilidad vascular, incrementa la concentración de IL-1 $\beta$ <sup>18</sup>, regula la síntesis de IL-12 y junto con el INF- $\gamma$  modulan la producción de citocinas por las células NK<sup>28</sup>.

Se ha demostrado que la hemozoina<sup>29, 30</sup> y el glucosilfosfatidilinositol<sup>28</sup> que provienen del *Plasmodium* inducen la síntesis de TNF- $\alpha$  vía la activación de los macrófagos, ambas moléculas son altamente pirógenas<sup>19</sup>. Además en los

pacientes con malaria, las concentraciones elevadas de TNF- $\alpha$  y de IL-1 $\beta$  se han asociado a un defecto en la regulación de la temperatura<sup>19</sup>, lo que al inicio de la infección conduce a fiebres altas<sup>31</sup>.

Los ratones KO para IL-10 infectados con *Plasmodium chabaudi*, desarrollan concentraciones elevadas de INF- $\gamma$  y de TNF- $\alpha$ , lo que aumenta la mortalidad; el neutralizar al TNF- $\alpha$  en estos ratones, aumenta la sobrevivencia porque disminuye la anemia junto con la pérdida de peso y la hipotermia no es tan severa<sup>32</sup>. De tal forma que las concentraciones elevadas de TNF- $\alpha$  y bajas de IL-10, se asocian con el desarrollo de anemia severa<sup>28</sup>. Además, la IL-10 es una citocina anti-inflamatoria que regula la síntesis de INF- $\gamma$  y de TNF- $\alpha$ , lo que disminuye las posibilidades de padecer malaria cerebral<sup>32</sup>.

La síntesis de TNF- $\alpha$  está regulada por hormonas como el estradiol de forma dosis dependiente; cuando se cultivan macrófagos peritoneales, con dosis de  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  ng/ml de estradiol, se incrementa la secreción de TNF- $\alpha$ , pero si los macrófagos se tratan con estradiol en dosis menores o con testosterona, disminuye la expresión de esta citocina<sup>23</sup>. Además, la testosterona disminuye las concentraciones de TNF- $\alpha$  y de IL-1 $\beta$  en la sangre de pacientes que presentan hipogonadismo<sup>33</sup>. Sin embargo, se desconoce si en malaria los esteroides sexuales modulan la síntesis de TNF- $\alpha$  en los órganos donde es evidente la interacción del sistema inmune con el parásito. Por lo anterior, en este trabajo se estudió si la administración de testosterona, estradiol o DHEA modulan la expresión de TNF- $\alpha$  en la sangre, el bazo, el hígado y el cerebro de ratones infectados con *Plasmodium berghei* ANKA. También se analizó el efecto de los esteroides sobre la parasitemia, el peso y la temperatura puesto que se ha demostrado que el TNF- $\alpha$  está involucrado en la eliminación del parásito, la pérdida de peso y la fiebre que caracterizan a la malaria. El conocimiento de los mecanismos que detonan la patología de la malaria, proporcionará información que ayudará a diseñar nuevas estrategias para su control.

### 3.4 Peso y temperatura en malaria

La disminución del peso y principalmente la fiebre son parámetros fisiológicos que se asocian con niveles elevados en suero de TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  e IL-6<sup>13, 34, 35</sup> y con la anemia durante la infección con *Plasmodium*<sup>1</sup>. Se ha documentado que la malaria genera cuadros febriles en ratones infectados con *P. berghei* ANKA durante la fase aguda de la infección<sup>15</sup>; posteriormente durante el día 4 ó 5 post-infección la temperatura y el peso disminuyen<sup>15, 36</sup>, y junto con la anemia conducen a la muerte<sup>35</sup>.

Nuestro grupo de investigación demostró que la disminución de hormonas sexuales por gonadectomía afecta más el peso en las hembras que en los machos infectados con *P. berghei* ANKA<sup>37</sup>; además se ha documentado que las hembras gonadectomizadas e infectadas con *Plasmodium chabaudi*, pierden peso y desarrollan una hipotermia más severa en comparación con las hembras intactas, pero al reconstituir con estradiol incrementan el peso y desarrollan una hipotermia menos severa<sup>38</sup>.

### 3.5 Síntesis de las hormonas sexuales

Las hormonas sexuales son de vital importancia en el desarrollo y a lo largo de la vida, regulan diversas funciones celulares y fisiológicas en los organismos, como la reproducción, la diferenciación sexual, el desarrollo, el crecimiento, el mantenimiento del ambiente interno, la regulación del metabolismo, el suministro de nutrientes e inclusive pueden regular la expresión génica<sup>5</sup>, además, guardan una estrecha relación con el sistema inmune así que es importante conocer el proceso de síntesis en el organismo.

Las principales hormonas sexuales son la testosterona y el estradiol, estas se producen principalmente en los testículos y los ovarios respectivamente<sup>18</sup> y en menor grado en las glándulas suprarrenales<sup>39, 40</sup>. La síntesis de estos esteroides sexuales se inicia en la pubertad cuando el hipotálamo secreta la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), que estimula a la hipófisis para liberar la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona leutinizante (LH), esta última



estimula a las células granulosas en los ovarios y a las células de Leydig en los testículos para que inicien la síntesis de testosterona y estradiol a partir del colesterol. El primer paso es la conversión de colesterol en pregnenolona y posteriormente progesterona (para la síntesis de cortisol, corticosterona o aldosterona), o 17- $\alpha$  hidroxipregnenolona, esto se realiza en el citoplasma y en el retículo endoplásmico liso. En la mitocondria, la 17- $\alpha$  hidroxipregnenolona se utiliza en la síntesis de la dehidroepiandrosterona (DHEA) precursor esencial en la síntesis de andostendiona y androstendiol que se convertirá posteriormente en testosterona y estradiol<sup>39-41</sup> (Figura 3).

La testosterona, el estradiol y el precursor hormonal DHEA ejercen la gran mayoría de estas funciones gracias a la interacción con su receptor citoplasmático o nuclear en las diferentes células<sup>41</sup>, una vez que los esteroides interaccionan con su receptor, se desencadena una cascada de señalización que tendrá como efecto estimular o inhibir la síntesis de RNAm que codificará para diferentes genes<sup>41</sup>; por lo que estudiar el efecto de la administración de estos tres esteroides en la síntesis de RNAm que codifica para TNF- $\alpha$  tiene implicaciones importantes para entender si el TNF- $\alpha$  está relacionado en el fenómeno de dimorfismo sexual en un modelo experimental de malaria murina.

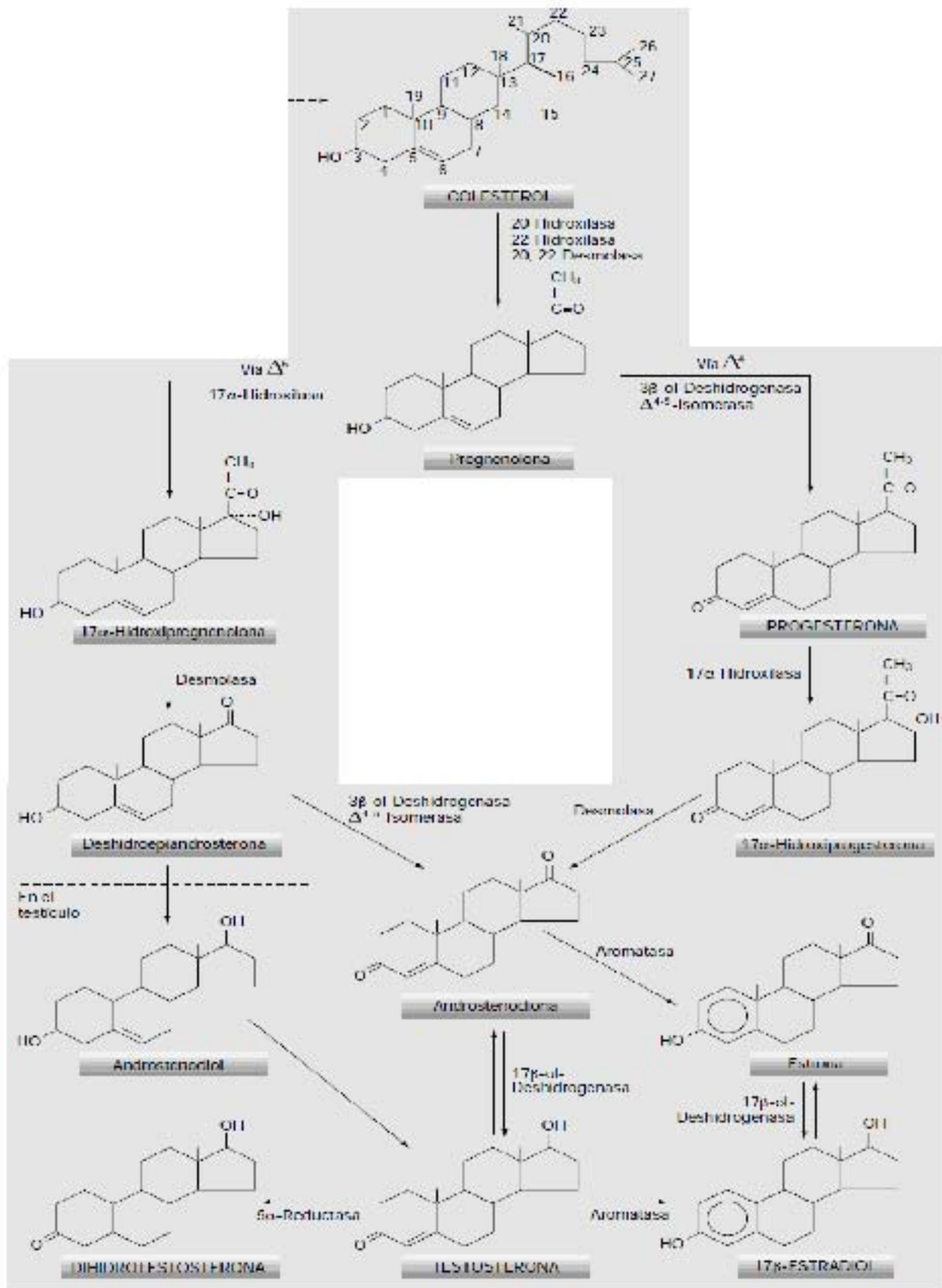


Figura 3 Síntesis de los esteroides sexuales. Tomado y modificado de J. Florez 1998<sup>41</sup>.

### 3.6 Hormonas sexuales y el sistema inmune

Las hormonas sexuales regulan la actividad de las células del sistema inmune como la de los linfocitos, macrófagos y células dendríticas<sup>4, 42</sup>, por lo que existe una relación directa entre los esteroides sexuales y la síntesis de citocinas en las células del sistema inmune<sup>4</sup>, como se muestra a continuación.

La testosterona, disminuye la concentración de citocinas como el INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e IL-12<sup>8</sup>, por lo que se considera una hormona inmunosupresora. Por el contrario, los estrógenos, activan a los linfocitos T reguladores, inducen la respuesta tipo Th2, por lo tanto estimulan la producción de anticuerpos y la actividad de los macrófagos, lo que aumenta la síntesis de especies reactivas del oxígeno, sin embargo, los estrógenos disminuyen la actividad de las células NK y la síntesis de IL-1 y TNF- $\alpha$ <sup>20, 22</sup>. Existen otros esteroides como la dehidroepiandrosterona (DHEA) que estimula la respuesta tipo Th1, la de los linfocitos T citotóxicos (CD8+) y reduce la población de células pre-B en la médula ósea<sup>22</sup>.

Tanto el estradiol como DHEA se han asociado con la protección contra infecciones parasitarias, pero también con una mayor susceptibilidad a padecer enfermedades autoinmunes<sup>4</sup>. Se ha demostrado que algunos helmintos poseen receptores de hormonas en su membrana y en el citosol<sup>5</sup>, lo que sugiere que las hormonas sexuales podrían activar diferentes cascadas de señalización y como consecuencia el encendido y apagado de diferentes genes en los parásitos.

### 3.7 Hormonas sexuales y malaria

Las hormonas sexuales son capaces de regular diversas funciones en el sistema inmune, sin embargo, en la malaria tienen un desempeño aún más específico: la testosterona aumenta la mortalidad en los ratones machos infectados con *P. berghei* ANKA o *P. chabaudi*, mientras que la gonadectomía estimula la producción de INF- $\gamma$  y promueve una mayor supervivencia<sup>42</sup>. La administración de testosterona en hembras disminuye la síntesis de anticuerpos y la expresión de moléculas MHC clase II en las células de bazo<sup>5</sup>, lo que sugiere que la testosterona suprime la respuesta inmune contra la malaria. Por el contrario, el estradiol activa y promueve la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas, disminuye la masa del timo y de la médula ósea, aumenta la cantidad de células productoras de IL-10 e IL-6, aumenta la fagocitosis, la secreción de serotonina e histamina pero disminuye la actividad de las células NK y la concentración de IL-2<sup>43</sup>; las hembras gonadectomizadas y reconstituidas con estradiol aumentan la concentración de INF- $\gamma$  e IL-10 durante el pico de la parasitemia (alrededor del día 7 pos infección)<sup>38</sup>. La ausencia de estradiol en las hembras gonadectomizadas, induce una mayor mortalidad en comparación con hembras intactas<sup>5</sup> y disminuye la población de linfocitos B<sup>4</sup>.

La administración del precursor DHEA-S *in vitro* inhibe la proliferación del parásito, por lo que las concentraciones altas de DHEA-S se han asociado con parasitemia baja, lo que correlaciona con el hallazgo en Kenia, donde personas infectadas con *Plasmodium falciparum* tenían una concentración alta de DHEA-S y una parasitemia baja<sup>5</sup>.

Como se ha descrito las hormonas sexuales tienen una fuerte implicación en el desarrollo de la patología, sin embargo, también afectan otras variables como el peso y la temperatura.

### 3.8 Hormonas, su relación con el peso y la temperatura

Las hormonas sexuales son responsables de las principales diferencias entre los hombres y las mujeres, por ejemplo la masa corporal y la temperatura, como se describe a continuación.

La concentración sanguínea de testosterona en los hombres aumenta en la mañana y en la noche, lo que se relaciona con el incremento de la temperatura en esas horas del día, es probable que la testosterona al promover el metabolismo<sup>44</sup>, eleve la temperatura, mientras que las mujeres, que presentan una concentración mayor de estradiol que de testosterona desarrollan temperaturas menores que los hombres<sup>39</sup>.

La testosterona favorece el aumento de peso a través de la conversión de la grasa del abdomen en masa muscular, regula la adipogénesis, inhibe la captación de triglicéridos e incrementa la actividad de la lipasa en el abdomen<sup>45, 46</sup>. Además las concentraciones bajas de testosterona se relacionan con el incremento en la resistencia a la insulina<sup>33</sup>. La administración de andrógenos como la testosterona<sup>47, 48</sup> o DHEA<sup>49</sup>, disminuye la resistencia a la insulina y mejora el control glucémico<sup>47</sup>. La administración de DHEA acelera la liberación y eliminación de triglicéridos del tejido adiposo<sup>49</sup>, también se ha descrito que el tratamiento con DHEA en ratones genéticamente obesos disminuye la ganancia de peso corporal, disminuye la grasa acumulada y aumenta la lipólisis<sup>50</sup> por lo que es probable que la testosterona y DHEA regulen el peso corporal.

La ausencia de estradiol en hembras sanas, aumenta la ingesta de comida por lo que se favorece la acumulación de grasa, sin embargo, cuando esta hormona se administra se reduce la obesidad al disminuir el apetito<sup>51</sup>; los mecanismos por los que sucede esto aún se están estudiando, pero se sugiere que los estrógenos tienen relación con la sensibilidad a la leptina<sup>51</sup>. Otros autores han documentado que la administración de estrógenos incrementa la concentración de triglicéridos hasta en un 15%, por lo tanto una mayor concentración de estrógenos se asocia con un aumento en la masa corporal<sup>39</sup>.

Es por esto que es importante conocer el efecto que tiene administrar la testosterona o el estradiol o la DHEA en el dimorfismo sexual de la malaria, particularmente en la síntesis de TNF- $\alpha$  y a su vez si existe una relación de los niveles de expresión de RNAm para TNF- $\alpha$  con la parasitemia, la variación de peso y la temperatura en la malaria.

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La malaria es la causante de la muerte de aproximadamente 670 000 personas al año; en esta enfermedad se presenta dimorfismo sexual en el que los hombres desarrollan mayor severidad en la patología reflejada en una pérdida de peso, fiebre, anemia más severa e inclusive mayor mortalidad que las mujeres. Además, se ha demostrado que las hormonas sexuales son responsables de las principales diferencias fenotípicas y fisiológicas entre los sexos porque regulan la expresión de diferentes genes. Sin embargo, no se ha descrito si los esteroides testosterona, estradiol y el precursor hormonal DHEA modulan la severidad de la enfermedad vía la regulación de la expresión de la citocina pro-inflamatoria TNF- $\alpha$ , que si bien se requiere para la activación de macrófagos y la eliminación del *Plasmodium*, también está involucrada en la pérdida de peso y la fiebre. Por lo anterior, en este trabajo las preguntas que se abordaron fueron si administrar testosterona, estradiol o DHEA a ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA modula: A) la expresión del RNA mensajero que codifica para TNF- $\alpha$  en la sangre, el bazo, el hígado y el cerebro; B) la pérdida de peso y C) la hipotermia.

#### 5. HIPÓTESIS

De acuerdo con los conocimientos científicos que muestran la relación entre la malaria, el sistema inmune y las hormonas sexuales, proponemos que si los esteroides sexuales son los responsables del dimorfismo sexual en malaria, entonces el administrar estradiol, testosterona o DHEA a ratones, previo a la infección con *P. berghei* ANKA, incrementará la expresión de citocinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$  y así mismo esta variación estará relacionada con la pérdida de peso y la variación de la temperatura.

## 6. OBJETIVO

### 6.1 General

Evaluar el efecto de la administración de los esteroides sexuales (testosterona, estradiol y DHEA) sobre la expresión de TNF- $\alpha$ , la pérdida de peso y la variación de temperatura en un modelo experimental de malaria murina.

### 6.2 Particulares

Evaluar el efecto de la administración de testosterona o estradiol o DHEA sobre la parasitemia en ratones CBA/Ca infectados con *Plasmodium berghei* ANKA.

Evaluar el efecto de la administración de testosterona o estradiol o DHEA sobre la pérdida de peso en ratones CBA/Ca infectados con *Plasmodium berghei* ANKA.

Evaluar el efecto de la administración de testosterona o estradiol o DHEA sobre la temperatura en ratones CBA/Ca infectados con *Plasmodium berghei* ANKA.

Evaluar el efecto de la administración de testosterona o estradiol o DHEA sobre la expresión del gen TNF- $\alpha$  en ratones CBA/Ca infectados con *Plasmodium berghei* ANKA.



## 7. MATERIAL Y MÉTODOS

### 7.1 Población de estudio

Este es un estudio experimental que consta de 4 grupos de ratones machos y 4 grupos de ratones hembras (5 ratones por grupo) de la cepa CBA/Ca, de 4 meses de edad.

### 7.2 Parásito

*Plasmodium berghei* ANKA, donando por el Doctor William Jarra del National Institute for Medical Research, Londres, Inglaterra.

### 7.3 Variables

Independientes:

Sexo

Tratamiento (testosterona, estradiol, DHEA y vehículo como control).

Infección

Dependientes:

Porcentaje de parasitemia

Variación de peso en gramos

Variación de temperatura en °C

Expresión del gen de TNF- $\alpha$

#### **7.4 Material**

Tubos Eppendorf de 1.5 mL, 500 y 200  $\mu$ L.

Puntas para pipetas de 1000, 200, 50 y 10 $\mu$ L.

Placas de 96 pozos fondo plano para ELISA marca Corning®.

Placas de 96 pozos para PCR marca AXYGEN®.

Porta objetos Corning®.

#### **7.5 Equipo**

Termómetro digital infrarrojo marca Thermofocus®.

Balanza granataria marca Sartorius-OHAUS®.

Microscopio óptico Zeiss®

Micropipetas marca Gilson y Eppendorf de 1000, 200, 50, 10 y 1 $\mu$ L.

Centrífugas Eppendorf.

Lector de placas Multiskan GO de ThermoScientific

Termociclador Eppendorf.

Termociclador Applied Biosystems 7500.

#### **7.6 Reactivos**

Testosterona (Sostenon 250®) Contiene: Propionato de testosterona 30mg/1mL, Fenilproipionato de testosterona 60mg/1mL, Isocaproato de testosterona 60mg/1mL y Decanoato de testosterona 100mg/1mL.

17- $\beta$ Estradiol Sigma Aldrich®.

Dehidroepiandrosterona Sigma Aldrich®.

Aceite de ajonjolí (Vehículo).

Colorante de Giemsa Merck®.

PBS

PBS/Heparina

TriPure®

Cloroformo/alcoholisoamílico (49:1)

Alcohol isopropílico Merck®

Agua con dietilpirocarbonato al 10% (Agua DEPC)

Etanol al 80% en agua DEPC

Amortiguador First Strand de Promega®

Inhibidor RNAsin de Promega®

dNTP's 200 µM Invitrogen®

Enzima MMLV-RT 20,000 U/mL Promega®

Ditiotreitol (dT) Promega®

Cloruro de potasio 50mM Sigma Aldrich®.

Gelatina 200 µM

Tris/HCl 20 mM

Cloruro de magnesio 100mM Sigma Aldrich®

Taq polimerasa 5U/µL Promega®

ROX 50x (Referencia pasiva) Invitrogen®

Oligonucleótidos para el gen de β-actina y para TNF-α Stock (10 mM).

## **7.7 Diseño experimental**

### **7.7.1 Administración de hormonas**

Se usaron 6 grupos de ratones CBA/Ca (3 grupos de hembras y 3 grupos de machos) a los que se les administró: testosterona (0.9µg/50µL) o estradiol (12µg/50 µL) o DHEA (200 µg/50µL) además se utilizó un grupo control de cada sexo al que se le administró solamente el vehículo (50µL). La administración de la testosterona, estradiol y vehículo fue 2 veces por semana durante 3 semanas, para DHEA se aplicó 5 días seguidos antes de la infección. Al día siguiente de la última administración se inocularon  $1 \times 10^3$  glóbulos rojos infectados con *Plasmodium berghei* ANKA vía intravenosa. Diariamente se tomó y registró el peso y la temperatura a la misma hora, además se tomaron muestras de sangre para evaluar la parasitemia a partir del día 3 pos-infección. Para realizar los frotis sanguíneos se usaron portaobjetos limpios y desengrasados con alcohol al 70%, se colocó una gota de sangre de la cola del ratón en un extremo del porta objetos y con el extremo de otro porta objetos colocado en 45° se extendió la muestra, posteriormente se fijaron con metanol y se tiñeron con colorante de Giemsa al 10% durante 30 minutos. Los ratones se sacrificaron el día 9 pos-infección para extraer RNAm a partir de la sangre, el bazo, el hígado y el cerebro.

### **7.7.2 Extracción de RNA y retrotranscripción**

Los tejidos se maceraron sobre una malla de nylon y PBS estéril se extrajo el RNA con 500 µL del reactivo TriPure® y 100 µL de la mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico 40:1. Se centrifugó y se separó la fase acuosa, el RNA soluble en la fase acuosa se precipitó con un volumen de 250 µL de isopropanol frío. Posteriormente se centrifugó y se eliminó el sobrenadante, se adicionó etanol frío al 80% en agua DEPC, el RNA se hidrató con agua DEPC y se cuantificó la concentración por espectrofotometría UV a 260 nm.

Fórmula de cuantificación de RNA:

$$[RNA] = Abs_{260\text{ nm}} \times \left( \frac{40\mu\text{g}}{1000\mu\text{L}} \right) \times 200$$

$$[RNA] = \mu\text{g}/\mu\text{L}$$

Para realizar la retrotranscripción se adicionaron 1.5 µg de RNA y 1µL de Oligo dT y se incubaron en el termociclador durante 10 minutos a 60°C, posteriormente se adicionó la mezcla de reacción que contiene: agua destilada estéril, amortiguador First strand, inhibidor de RNAsa, dNTP's (200 µM) y la enzima MMLV-RT y se incubó nuevamente en el termociclador a 37°C durante una hora y 95°C durante 10 minutos. Se adicionaron 80 µL de agua DEPC para obtener la concentración de 15 ng/µL de DNAc.

### 7.7.3 PCR en tiempo real

Se preparó la mezcla de reacción que contiene: amortiguador para PCR, cloruro de magnesio, Taq polimerasa, dNTP's (200 µM), los oligonucleótidos para cada gen (10 µM) y ROX (como referencia pasiva) (1X).

La secuencia de los iniciadores es la siguiente:

GEN	Sentido	Antisentido
β-Actina:	CGG GTC AGG TAG TCT GTC AGG TCC [JOE] G	CTA TGC TCT CCC TCA CGC CAT C
TNF-α	CGG CTG TCT TTG AGA TCC ATG C [FAM] G	CGT CGT AGC AAA CCA CCA AGT G

Para cada gen es necesario preparar la mezcla de reacción por separado ya que los volúmenes de reacción son diferentes para cada gen.

El programa de amplificación que se utilizó fue el siguiente:

Para  $\beta$ -Actina:

- 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 de los pasos 3 al 5 por 45 veces. Para TNF- $\alpha$  sólo cambia la temperatura de alineación a 65°C por 45 segundos.

La curva de fusión para ambos gens se realizó con las siguientes temperaturas:

- 95°C 15 segundos
- 60°C 1 minuto
- 95°C 30 segundos
- 60°C 1 minuto

La fórmula utilizada para la cuantificación (la fórmula no refleja unidades solo expresión relativa a un gen constitutivo) es la siguiente:

$$\begin{aligned} & \textit{Expresión relativa} \\ & = \frac{(1 + \textit{eficiencia TNF}\alpha)^{ct \textit{TNF}\alpha (\textit{grupo control}) - ct \textit{TNF}\alpha (\textit{grupo de investigación})}}{(1 + \textit{eficiencia } \beta\textit{actina})^{ct \beta\textit{actina}(\textit{grupo control}) - ct \beta\textit{actina}(\textit{grupo de investigación})}} \end{aligned}$$

Nota: El valor de la eficiencia se representa en porcentaje, para ése cálculo se utiliza la siguiente fórmula:

$$\textit{Eficiencia} = \frac{(\textit{Eficiencia de cada placa} * 1)}{100\%}$$

#### 7.7.4 Análisis estadístico

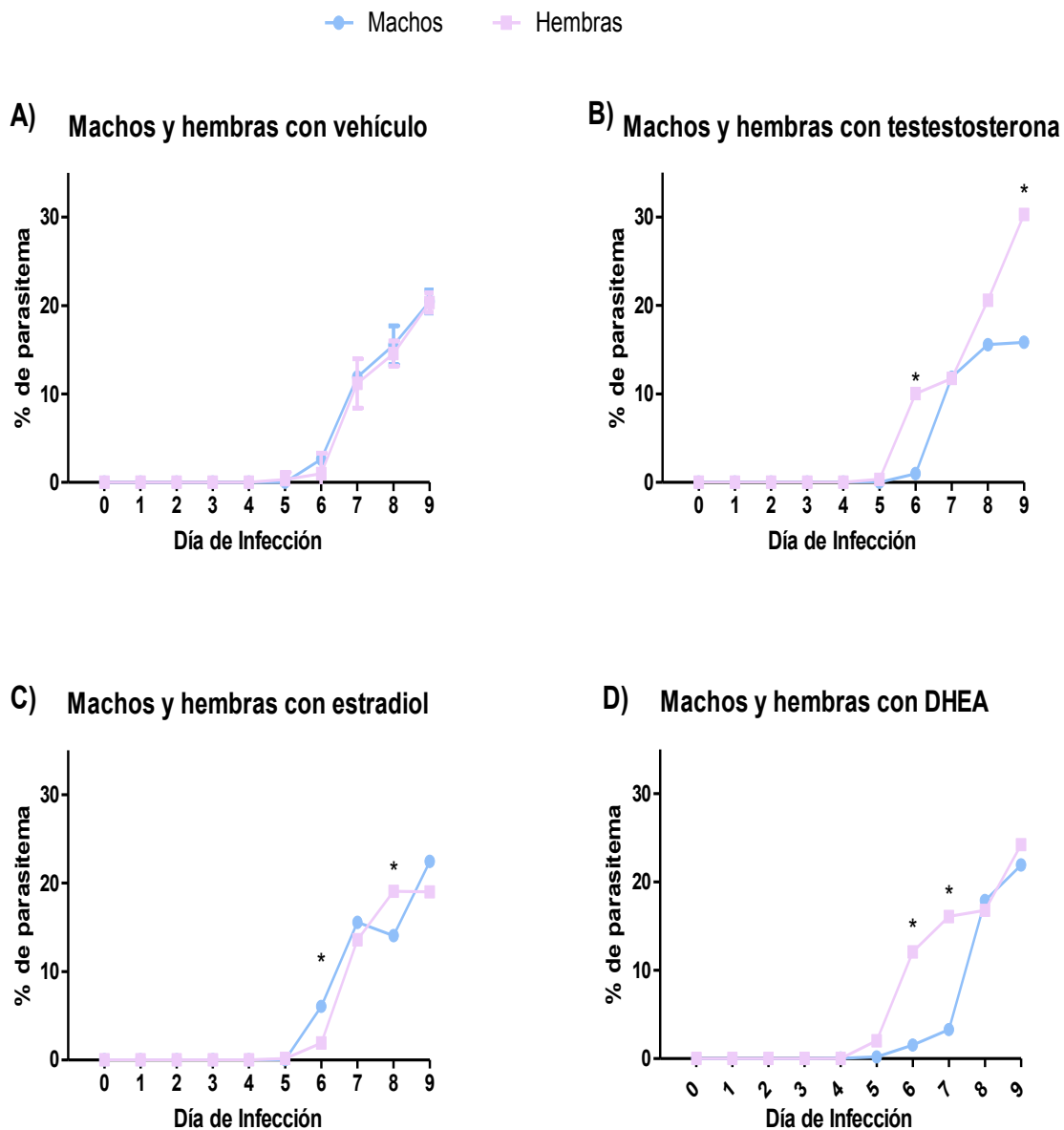
Se realizó ANOVA de dos vías para analizar los cambios en la parasitemia, el peso y la temperatura, para la expresión relativa del gen de TNF- $\alpha$  se usó ANOVA de una vía. En ambos casos se usó una  $p \leq 0.05$ .

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Parasitemias

Dado que la intensidad de la patología está estrechamente relacionada con la parasitemia, diariamente, a los ratones tratados con esteroides sexuales e infectados con *P. berghei* ANKA, se les tomaron frotis sanguíneos que se tiñeron con Giemsa para evaluar la parasitemia por microscopía óptica.

La parasitemia de machos y hembras tratados con el vehículo fue similar, por lo que no se detectó dimorfismo sexual en la parasitemia, sin embargo, la administración de los esteroides sexuales previos a la infección, modificó la tendencia de la parasitemia (Figura 4A). La testosterona provocó que las hembras desarrollaron una mayor parasitemia que los machos, principalmente los días 6, 8 y 9 pos-infección (Figura 4B). Administrar estradiol provocó diferencia al día 6 en el cual los machos desarrollaron una mayor parasitemia y en el día 8, donde las hembras presentaron una mayor parasitemia en relación al otro sexo; sin embargo, en ninguno de los sexos se elevó la parasitemia más del 25% (Figura 4C). Interesantemente, DHEA protegió a los machos de altas parasitemias hasta el día 7 pos-infección y posteriormente incrementó la parasitemia como en el grupo de machos control, mientras que en las hembras tratadas con DHEA se incrementó la parasitemia los días 6 y 7 pos-infección en comparación con los machos (Figura 4D).



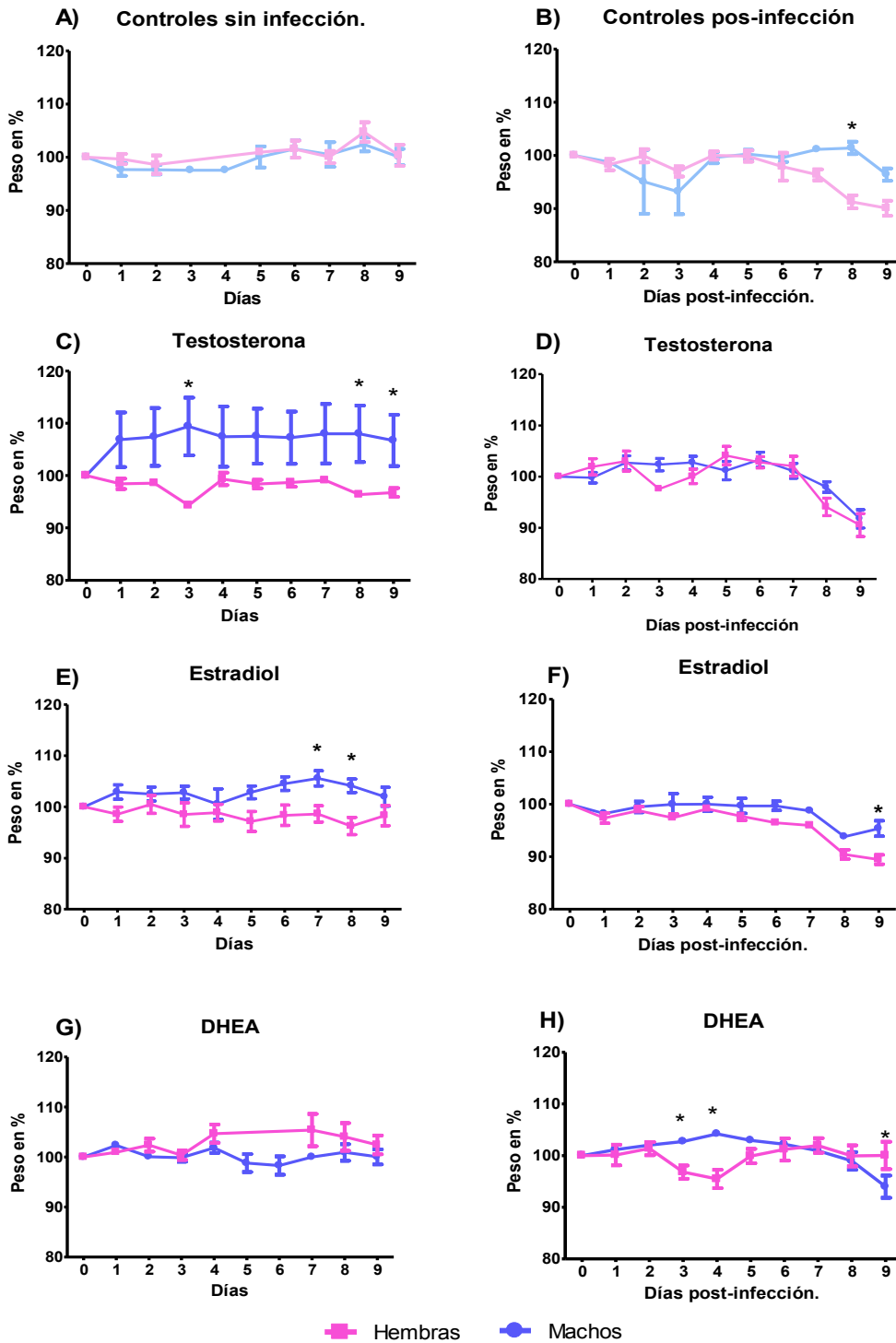
**Figura 4. Porcentaje de parasitemia de ratones machos (azul) y hembras (rosa) tratados con vehículo (A) o testosterona (B) o estradiol (C) o DHEA (D).** Para determinar la parasitemia se prepararon frotis sanguíneos en un portaobjetos, se fijaron y tiñeron con Giemsa y se contaron al microscopio 50 campos por muestra del día 3 al día 5 y 200 eritrocitos totales del día 6 al día 9 pos-infección. El día 0 equivale al día de infección. \* Señala la diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ) se usó ANOVA de dos vías. Cada punto representa la media del grupo  $\pm$  el error estándar medio (SEM).



## **8.2 Efecto de la administración de testosterona, estradiol y DHEA sobre el peso corporal.**

Para determinar el efecto de los esteroides sexuales sobre la pérdida de peso, se administró vehículo o testosterona o estradiol o DHEA a grupos de ratones machos y hembras de la forma descrita en los métodos. El peso corporal que presentaron los ratones el día antes de la infección se consideró como el 100% (día cero). Diariamente, los ratones se pesaron y se calculó el porcentaje del peso corporal en relación al día cero.

La administración de vehículo (aceite de ajonjolí) en los grupos controles (machos y hembras) sanos, no modificó el peso durante los días 0-9 pos-infección (Figura 5A). La administración de testosterona incrementó el peso en los ratones machos sin infección (Figura 5C) en comparación con las hembras, administrar testosterona en el grupo de las hembras no infectadas, no modificó el peso corporal. Sin embargo, durante la infección tanto los machos como las hembras presentaron la misma tendencia. La administración de estradiol en los machos sin infección generó mayor aumento de peso que en las hembras (Figuras 5E y 5F). La administración de DHEA, no modificó el peso de los ratones machos o hembras (Figura 5G). Sin embargo durante la infección el peso de los ratones hembras resultó menor al de los ratones machos hasta el día 4, posteriormente ambos grupos se comportaron de forma similar (Figura 5H).



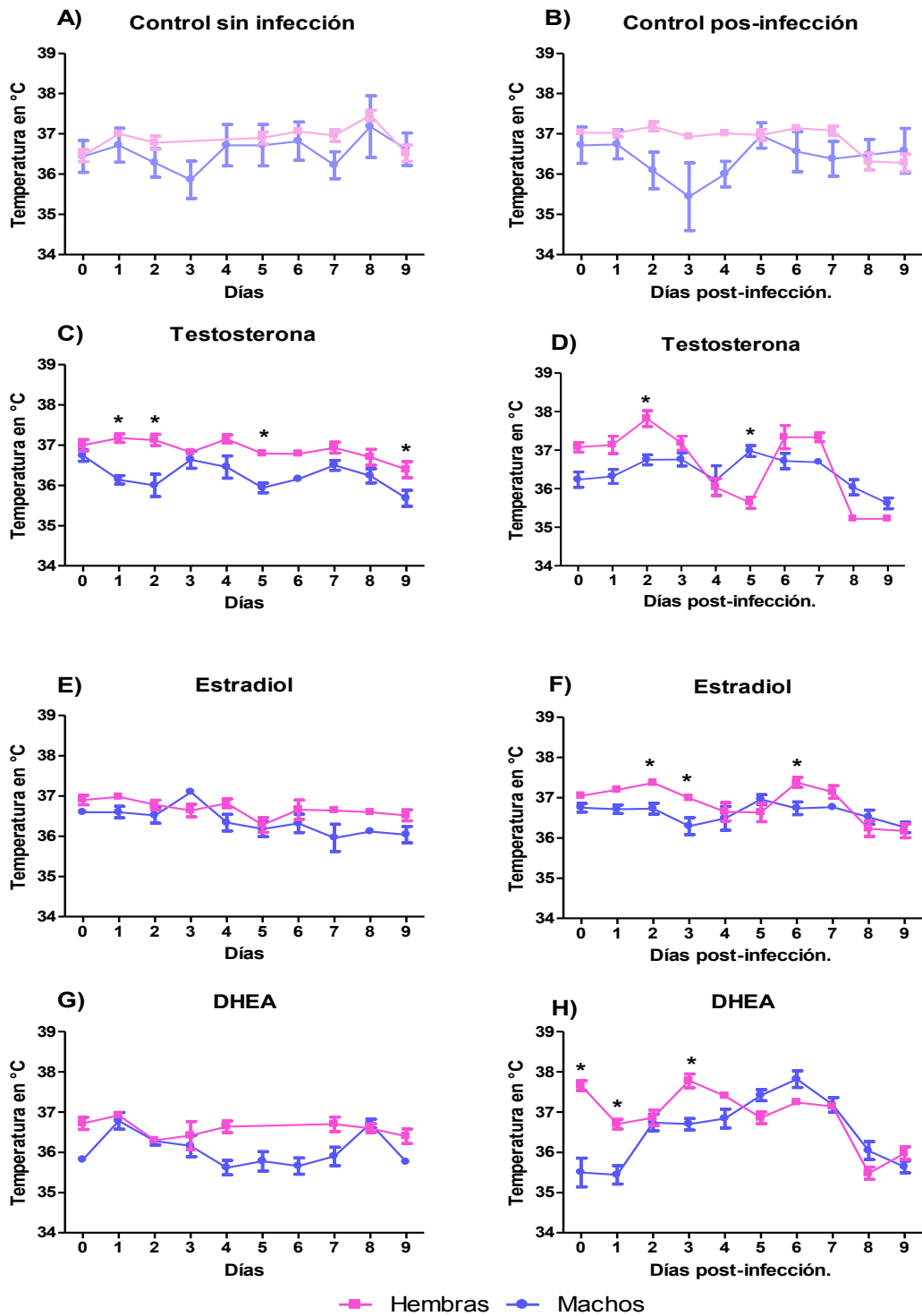
**Figura 5: Efecto de la administración de la testosterona, el estradiol y DHEA sobre la variación de peso en ratones CBA/Ca.** Grupos de ratones machos o hembras se trataron con testosterona (C, D) o estradiol (E, F) o DHEA (G, H). A los grupos controles se le administró vehículo (A, B). A la mitad de los grupos se les dejó sin infección (A, C, E y G) y a la otra mitad se les infectó con *P. berghei* ANKA (B, D, F y H). El peso corporal se registró diariamente y se consideró el 100% al peso corporal en el día previo a la infección. \*Representa la diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) se utilizó ANOVA de dos vías. Cada punto representa la media del grupo  $\pm$  el error estándar medio (SEM).

### **8.3 Efecto de las hormonas sexuales sobre la temperatura corporal.**

Para evaluar el efecto de la administración de la testosterona, el estradiol o DHEA sobre la temperatura de los ratones infectados con *P. beghei* ANKA se midió y registró la temperatura diariamente en cada grupo de ratones tratados con los esteroides sexuales así como los tratados con el vehículo.

En general las hembras desarrollaron temperaturas más altas que los machos (Figuras 6A y 6B). La administración de testosterona no modificó la temperatura de las hembras sanas. En las hembras infectadas se detectó un incremento significativo de la temperatura en el día 2 pos-infección y una disminución significativa el día 5 en relación al grupo de machos tratados con la misma hormona e infectados (Figura 6C y 6D). La administración de estradiol no modificó significativamente la temperatura en los grupos control sin infección, sin embargo, las hembras que recibieron estradiol y se infectaron, desarrollaron temperaturas significativamente mayores que los machos en la misma condición los días 2, 3 y 6 pos-infección (Figura 6E y 6F).

Administrar DHEA disminuyó la temperatura en los ratones machos no infectados en relación a las hembras. Durante la infección se detectaron temperaturas significativamente más altas en las hembras en comparación con los machos durante los días 0, 1 y 3 pos-infección (Figura 6G y 6H).



**Figura 6: Efecto de la administración de testosterona, estradiol y testosterona sobre la temperatura corporal en ratones CBA/Ca.** Grupos de ratones machos o hembras, se trataron con testosterona (C, D) o estradiol (E, F) o DHEA (G, H). Al grupo control se le administró vehículo (A, B). A la mitad de los grupos se les dejó sin infección (A, C, E y G) y a la otra mitad de los grupos se les infectó con *P. berghei* ANKA (B, D, F y H). La temperatura del día cero equivale a la temperatura de ratones sanos. \*Representa la diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) usando ANOVA de dos vías. Cada punto representa la media del grupo  $\pm$  el error estándar medio (SEM).

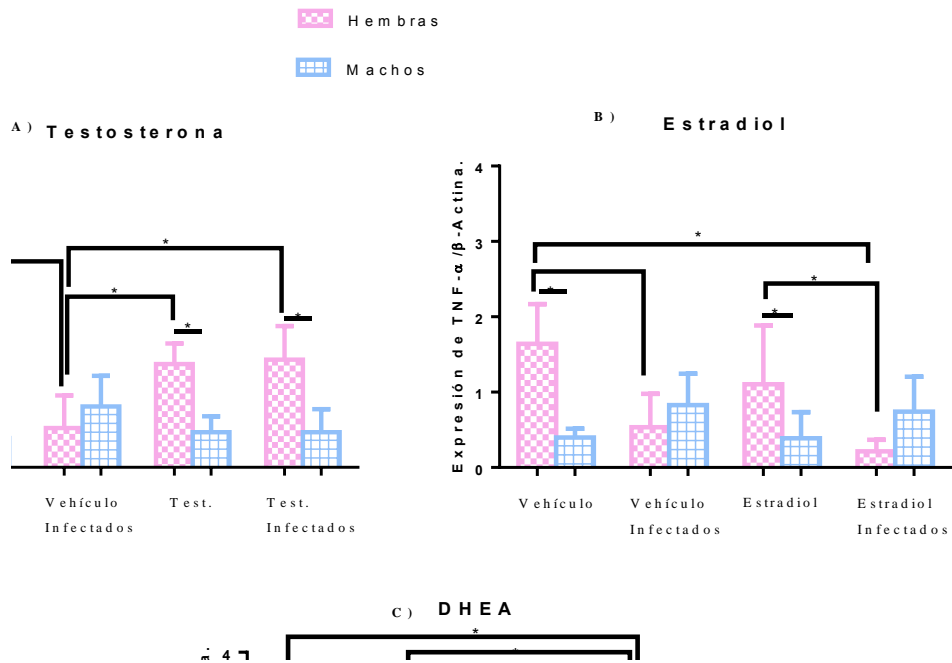
#### **8.4 Efecto de la testosterona, el estradiol y DHEA sobre la expresión de TNF- $\alpha$ en sangre, bazo, hígado y cerebro de ratones infectados con *P. berghei* ANKA.**

Dado que la pérdida de peso y las variaciones de la temperatura son variables en las que influye directamente el TNF- $\alpha$ , en este trabajo se evaluó si la administración de testosterona, estradiol o DHEA modifica la expresión de TNF- $\alpha$  en sangre, bazo, hígado y cerebro de ratones infectados con *P.berghei* ANKA.

**8.4.1 Expresión de TNF- $\alpha$  en sangre.** Las hembras control (no infectadas y que recibieron vehículo) expresaron más el gen de TNF- $\alpha$  que los machos sanos, sin embargo, en el día 9 pos-infección se detectó una disminución significativa en la expresión de TNF- $\alpha$  en las hembras, mientras que en los machos, la infección no modificó la expresión de TNF- $\alpha$  (Figura 7).

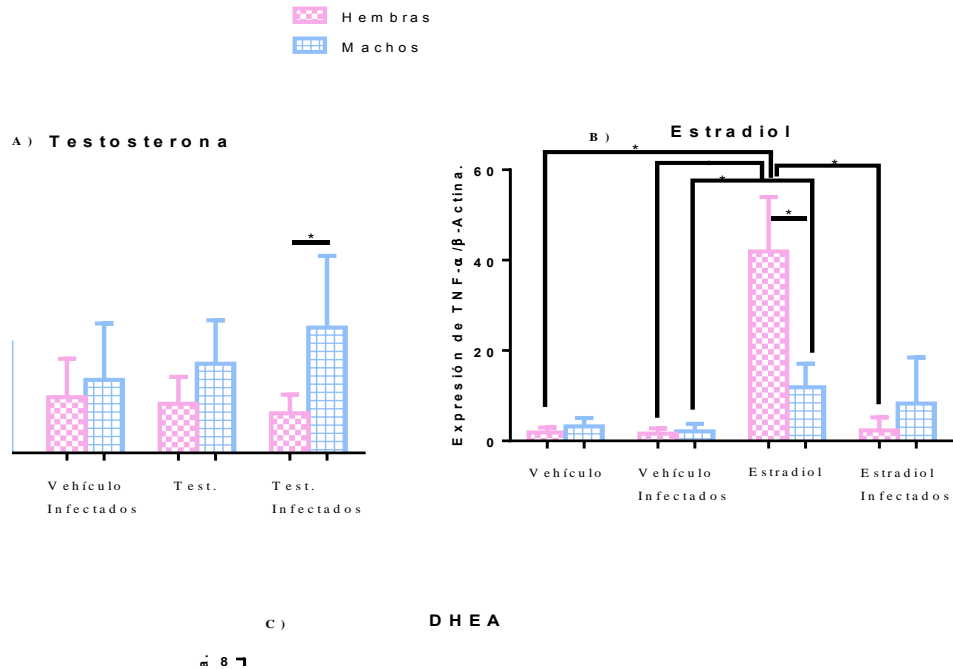
El tratamiento con testosterona, estradiol o DHEA no modificó la expresión de TNF- $\alpha$  en los ratones sin infección de ambos sexos con relación a los grupos tratados con vehículo. Interesantemente, las hembras expresaron más TNF- $\alpha$  que los machos.

El tratamiento de testosterona o DHEA en el grupo de hembras infectadas incrementó la expresión de TNF- $\alpha$  en comparación con las hembras infectadas y que se les administró vehículo (Figura 7C), lo que se relaciona con una patología más severa. Por el contrario, en las hembras el tratamiento con estradiol junto con la infección, disminuyó la expresión de TNF- $\alpha$  en comparación con las hembras tratadas con estradiol pero sin infección y con las hembras tratadas con vehículo e infectadas (Figura 7A, B y C), este resultado indica que administrar estradiol en las hembras regula negativamente la expresión de TNF- $\alpha$ .



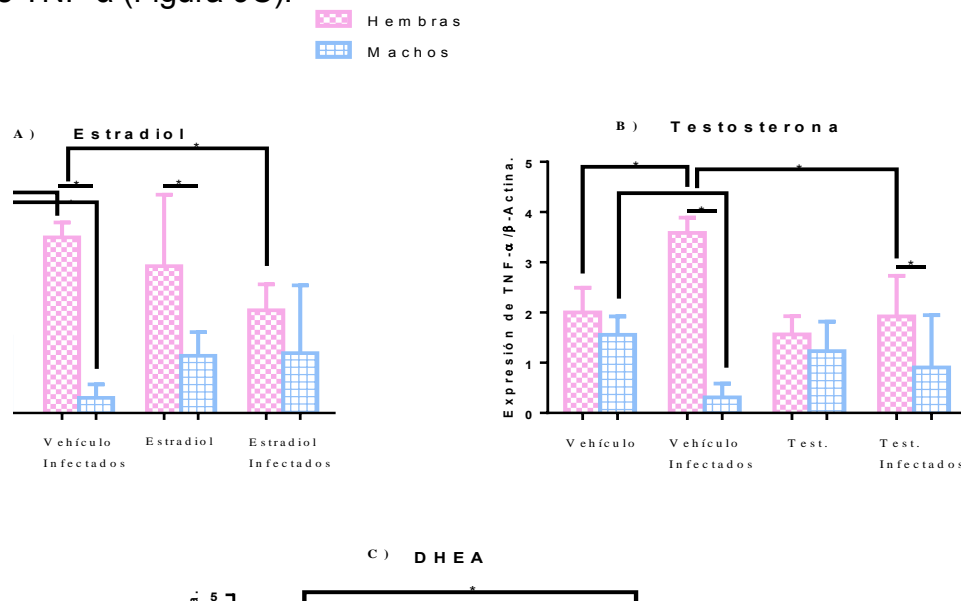
**Figura 7: Efecto de la administración de testosterona, estradiol o DHEA sobre la expresión de RNAm para TNF- $\alpha$  en la sangre de ratones CBA/Ca sanos e infectados con *P. berghei* ANKA.** Grupos de ratones machos y hembras se trataron con testosterona (A), estradiol (B) o DHEA (C), al siguiente día de la última administración se infectaron con *P. berghei* ANKA, en el día 9 post-infección se tomaron muestras de sangre de corazón, se extrajo el RNA que se retrotranscribió y los DNAc así obtenidos se amplificaron para el gen de TNF- $\alpha$  por medio de PCR en tiempo real. \* Representa la diferencia estadística significativa ( $p \leq 0.05$ ). Se usó ANOVA de una vía. Cada punto representa la media del grupo  $\pm$  el error estándar medio (SEM).

**8.4.2 Expresión de TNF- $\alpha$  en bazo.** La expresión de TNF- $\alpha$  en el bazo de ratones machos sanos e infectados fue mayor que en las hembras (Figura 8). La administración de testosterona y DHEA en machos y hembras no modificó la expresión del TNF- $\alpha$  (Figura 8A y 8C). Administrar estradiol en ratones sin infección de ambos sexos aumentó significativamente la expresión del gen, pero al conjuntar el tratamiento con la infección la expresión del gen disminuyó (Figura 8B).



**Figura 8: Efecto de la administración de testosterona, estradiol o DHEA sobre la expresión de RNAm de TNF- $\alpha$  en el bazo de ratones CBA/Ca sanos e infectados con *P. berghei* ANKA.** Grupos de ratones machos y hembras se trataron con testosterona (A), estradiol (B) o DHEA (C), al día siguiente de la última administración se infectaron con *P. berghei* ANKA, en el día 9 pos-infección se extrajo el bazo para obtener RNAm que se retrotranscribió y los DNAc obtenidos se amplificaron para el gen de TNF- $\alpha$  por medio de PCR en tiempo real. \* Representa la diferencia estadística significativa (p  $\leq$  0.05). Se usó ANOVA de una vía. Cada punto representa la media del grupo  $\pm$  el error estándar medio (SEM).

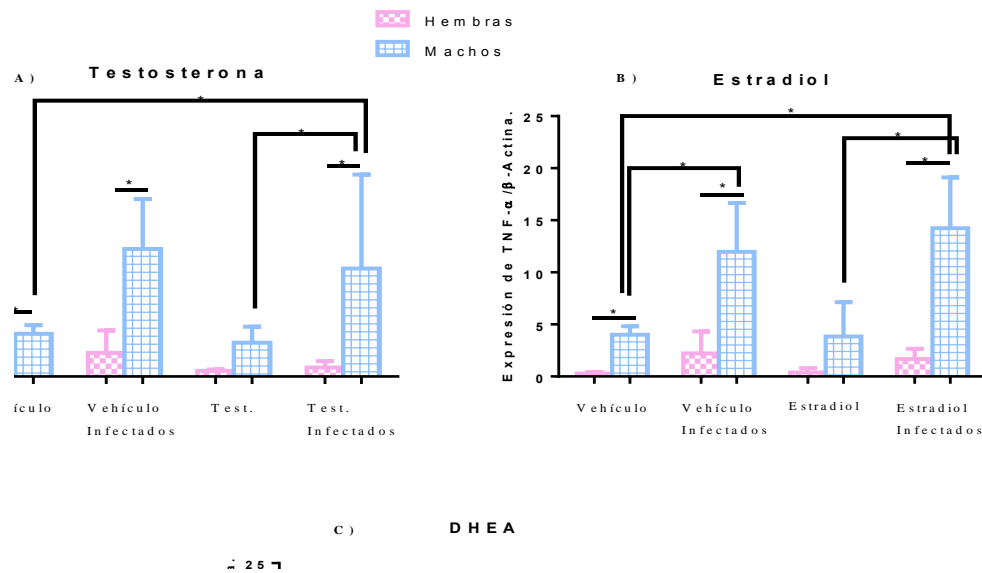
**8.4.3 Expresión de TNF- $\alpha$  en hígado.** La expresión de TNF- $\alpha$  fue mayor en hembras sanas en comparación con los machos sanos. En los machos infectados disminuyó la expresión de TNF- $\alpha$  (Figura 9). Administrar testosterona o estradiol o DHEA no modificó la expresión del gen en los ratones sanos. Al combinar el tratamiento con cualquiera de los tres esteroides sexuales y la infección en ratones hembras infectadas, disminuyó la expresión de RNAm para TNF- $\alpha$  (Figura 9A, B, C). La administración de DHEA en machos infectados disminuyó la expresión de TNF- $\alpha$  (Figura 9C).



**Figura 9: Efecto de la administración de testosterona, estradiol o DHEA sobre la expresión de RNAm de TNF- $\alpha$  en el hígado de ratones CBA/Ca sanos e infectados con *P. berghei* ANKA.** Grupos de ratones machos y hembras se trataron con testosterona (A), estradiol (B) o DHEA (C), al siguiente día de la última administración se infectaron con *P. berghei* ANKA, en el día 9 post-infección se extrajo el hígado, para obtener RNAm que se retrotranscribió y los DNAc así obtenidos se amplificaron para el gen de TNF- $\alpha$  por medio de PCR en tiempo real. \* Representa la diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ). Se usó ANOVA de una vía. Cada punto representa la media del grupo  $\pm$  el error estándar medio (SEM).



**8.4.4 Expresión de TNF- $\alpha$  en cerebro:** En general los machos desarrollaron mayor expresión de TNF- $\alpha$  que las hembras. La infección aumentó significativamente la expresión del gen en ambos sexos, sin embargo, en los ratones machos el incremento fue significativamente mayor (Figura 10). La administración de testosterona o estradiol en ratones machos y hembras sanas, no modificó la expresión de TNF- $\alpha$ , mientras que el tratamiento con testosterona o estradiol en combinación con la infección aumentó la síntesis de RNAm (Figura 10A y 10B). La infección también incrementó la expresión del gen al mismo nivel que DHEA, la combinación de administrar la hormona con la infección no tuvo efecto sinérgico en la expresión del TNF- $\alpha$  (Figura 10C).



**Figura 10: Efecto de la administración de testosterona, estradiol o DHEA sobre la expresión de RNAm de INF- $\gamma$  en el cerebro de ratones CBA/Ca sanos e infectados con *P. berghei* ANKA.** Grupos de ratones machos y hembras se trataron con testosterona (A), estradiol (B) o DHEA (C), al siguiente día de la última administración se infectaron con *P. berghei* ANKA, en el día 9 post-infección se extrajo el cerebro, para obtener RNAm que se retrotranscribió y los DNAc así obtenidos se amplificaron para el gen de TNF- $\alpha$  por medio de PCR en tiempo real. \* Representa las diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ). Se usó ANOVA de una vía. Cada punto representa la media del grupo  $\pm$  el error estándar medio (SEM).

## 9. DISCUSIÓN

### 9.1 Efecto de administrar testosterona, estradiol o DHEA sobre la parasitemia de ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA.

La parasitemia refleja la intensidad de la infección por lo que una mayor parasitemia en general corresponde a mayor severidad de la patología<sup>32, 52</sup>, como en el grupo de hembras tratadas con testosterona o en el grupo de machos tratados con DHEA (Figura 3). En el primer grupo se detectó un incremento en la parasitemia los días 6, 8 y 9 pos-infección, esto podría deberse a la acción inmunosupresora de la testosterona y por lo tanto favorece el desarrollo de parasitemias más elevadas<sup>53</sup>. La administración de DHEA aumentó la parasitemia en las hembras, mientras que en el grupo de machos mantuvo las parasitemias bajas hasta el día 7 pos-infección, éste hallazgo contrasta con lo descrito por Leenstra y colaboradores en 2003 quienes informaron que la administración de DHEA se asoció con parasitemias bajas en mujeres de Kenya<sup>54</sup>. Es probable que DHEA tenga actividad diferente dependiendo de la especie de mamífero o del parásito, o bien que en la actividad de DHEA sobre la parasitemia intervengan otros factores distintos a los que se abordaron en este trabajo. Interesantemente, la administración de estradiol incrementó ligeramente la parasitemia tanto en machos como en hembras. Una probable explicación a este hallazgo es que a la dosis utilizada, el estradiol puede funcionar como inmunosupresor<sup>23</sup> y promover la proliferación del parásito.

### 9.2 Efecto de la administración de testosterona, estradiol y DHEA sobre el peso corporal.

Las hormonas sexuales modulan en ambos sexos la variación de peso<sup>47, 51</sup>, por lo que determinar el efecto de la administración de esteroides sexuales sobre la pérdida de peso es en un modelo de malaria cerebral, es importante para comprender la patología.

La administración de vehículo, no modificó el peso durante los días 0-9 pos-infección (Figura 5A), este hallazgo verifica lo inocuo que resulta el aceite de

ajonjolí (vehículo que se utilizó para administrar los esteroides) en la variación del peso corporal. La infección disminuyó el peso corporal, particularmente en las hembras después del día 6 pos-infección (Figura 5B). Este hallazgo correlaciona con el incremento en la parasitemia observado en la Figura 4A.

La administración de testosterona incrementó el peso corporal en los ratones machos sin infección (Figura 5C), esto se esperaba ya que se ha descrito que la testosterona genera ganancia de peso y la conversión de grasa en masa muscular, sobre todo en los machos<sup>46</sup>. Interesantemente, la testosterona administrada en el grupo de las hembras sanas, no modificó el peso corporal. Durante la infección, tanto machos como hembras presentaron la misma cinética, este resultado indica que la testosterona incrementó el peso de los machos, lo que probablemente los protegió de mayor pérdida de peso y por lo tanto de una patología más severa que las hembras (Figura 5C y 5D), lo que podría relacionarse con la parasitemia de este grupo de machos tratados con testosterona (Figura 4B).

Administrar estradiol en los machos sin infección generó mayor aumento de peso que en las hembras (Figuras 5E y 5F), una probable explicación de este resultado es que en los ratones machos los receptores para estradiol podrían estar saturados con su ligando o que el número de receptores sea menor que en las hembras y que se estimule la hiperfagia y eso resulte en un incremento del peso, dado que la interacción ligando-receptor regula la ingesta de alimentos, el gasto de energía y la distribución de grasa<sup>55</sup>.

El efecto más notorio de la administración de DHEA, fue durante la infección, en donde el peso de los ratones hembras resultó menor al de los ratones machos hasta el día 4, posteriormente ambos grupos se comportaron con la misma tendencia (Figura 5H); esto podría deberse a que DHEA es una hormona que en concentraciones elevadas disminuye el peso<sup>50, 56</sup>.

### 9.3 Efecto de las hormonas sexuales sobre la temperatura corporal.

La temperatura puede ayudar a conocer la intensidad de la enfermedad, detectar hipotermia en algún grupo de ratones, implicaría una mayor severidad en la enfermedad<sup>19, 31</sup>, sin embargo, los esteroides sexuales también modulan la temperatura corporal<sup>39, 44</sup>, por lo que administrar testosterona, estradiol y DHEA a ratones infectados con *P. berghei* ANKA es de vital importancia ya que si suponemos que las hormonas sexuales modulan la expresión de TNF- $\alpha$  y esta citocina a su vez es responsable de la fiebre, entonces para comprobar la hipótesis, a los ratones administrados con hormonas se les midió la temperatura. En los diferentes grupos de ratones, las hembras desarrollaron temperaturas más altas que los machos (Figuras 6A y 6B). Este resultado fue del todo inesperado ya que se ha descrito que en general los mamíferos machos desarrollan temperaturas mayores que las hembras<sup>57</sup>. Es probable que sea una característica propia de la especie de ratón que se utilizó, o bien que se deba a que las hembras desarrollan la tendencia de permanecer unidas en la jaula y pierdan menos temperatura que los machos quienes tienden a ser más independientes, por lo que se realizó un experimento para investigar este efecto, y se demostró que aun si las hembras se mantenían aisladas (una por jaula), presentaron temperaturas mayores que los machos.

La administración de testosterona y estradiol no modificó la temperatura de las hembras sanas. Sin embargo, la infección en las hembras incrementó la temperatura en el día 2 pos-infección, posteriormente, la temperatura disminuyó significativamente el día 5 en relación al grupo de machos infectados y tratados con las misma hormona (Figura 6C y 6D). La tendencia a incrementar y disminuir la temperatura podría explicarse porque la infección con el *Plasmodium* induce fiebre y al tratar de alcanzar el equilibrio se inducen mecanismos reguladores como la sudoración que disminuye la temperatura<sup>58</sup>. Las hembras infectadas que recibieron estradiol, desarrollaron temperaturas significativamente mayores que los machos en la misma condición los días 2, 3 y 6 pos-infección (Figura 6E y 6F). Es posible que el administrar estradiol en machos no esté relacionado con los periodos febriles o la hipotermia durante la infección.

La administración de DHEA generó resultados similares en el grupo de machos sanos e infectados al disminuir la temperatura, sin embargo durante la infección ésta disminución solo se detectó los días 0, 1 y 3 pos-infección (Figura 6G y 6H).

#### **9.4 Efecto de la testosterona, el estradiol y DHEA sobre la expresión de TNF- $\alpha$ en sangre, bazo, hígado y cerebro de ratones infectados con *P. berghei* ANKA.**

Aun no se han descrito si las hormonas sexuales modulan la expresión de TNF- $\alpha$  en los diferentes tejidos de individuos infectados con *Plasmodium*, por lo tanto es difícil contrastar los resultados obtenidos, sin embargo, se ha demostrado que las concentraciones altas o muy bajas de TNF- $\alpha$  favorecen una sintomatología más severa<sup>19, 28, 31, 32</sup>.

**9.4.1 Efecto de las hormonas sexuales sobre la expresión de TNF- $\alpha$  en la sangre.** La sangre es el medio de transporte de los eritrocitos infectados y de las citocinas como el TNF- $\alpha$  secretado por los monocitos y los macrófagos de los tejidos periféricos, además comunica todos los tejidos, así mismo en la sangre es donde circulan los eritrocitos parasitados con *Plasmodium* y por lo tanto refleja lo que sucede a nivel sistémico, por lo anterior, se evaluó la expresión de RNAm que codifica para TNF- $\alpha$  en la sangre de los ratones tratados con esteroides sexuales e infectados con *P. berghei* ANKA.

Las hembras control expresaron más el gen de TNF- $\alpha$  que los machos sanos, sin embargo, las hembras infectadas disminuyeron significativamente la expresión de TNF- $\alpha$ , mientras que en los machos, la infección no modificó la expresión de TNF- $\alpha$  (Figura 7). Es probable que esta expresión de RNAm de TNF- $\alpha$  se encuentre asociada con la parasitemia Figura 4A. Interesantemente, detectamos que la expresión de TNF- $\alpha$  es dimórfica porque, en general sin importar el tratamiento, las hembras expresaron más TNF- $\alpha$  que los machos.

El tratamiento con testosterona, estradiol o DHEA no modificó la expresión de TNF- $\alpha$  en los ratones sin infección de ambos sexos con relación a los grupos tratados con vehículo. El tratamiento de testosterona o DHEA en las hembras

previo a la infección, incrementó la expresión de TNF- $\alpha$  en comparación con las hembras que sólo fueron infectadas (Figura 7C). Por el contrario, administrar estradiol previo a la infección, disminuyó la expresión de TNF- $\alpha$  en comparación con las hembras no infectadas y con las hembras infectadas tratadas con el vehículo (Figura 7A, B y C), este resultado indica que administrar estradiol en las hembras regula negativamente la expresión de TNF- $\alpha$ .

**9.4.2 Efecto de las hormonas sexuales sobre la expresión de TNF- $\alpha$  en el bazo.** El bazo es el principal tejido de eliminación de los glóbulos rojos infectados por el parásito. La expresión de TNF- $\alpha$  en el bazo de ratones machos sanos e infectados fue mayor que en las hembras (Figura 8). La administración de testosterona y DHEA en machos y hembras no tuvo efecto sobre la expresión del TNF- $\alpha$  (Figura 8A y 8C). Interesantemente, administrar estradiol en ratones sin infección de ambos sexos aumentó significativamente la expresión del gen, principalmente en las hembras; este hallazgo indica que el estradiol promueve la expresión de TNF- $\alpha$  en el bazo de ratones sanos, pero al conjuntar el tratamiento con la infección la expresión disminuye igual que en los ratones control sin infección (Figura 8B), este resultado es similar al de la sangre de las ratones hembras tratados con estradiol (Figura 7B) y podría, al menos parcialmente explicarse porque el estradiol promueve que aumente la cantidad de células productoras de IL-10, citocina que regula negativamente la expresión de TNF- $\alpha$ <sup>32</sup>. Además este resultado podría explicar, al menos en parte, las bajas parasitemias obtenidas en éstas hembras (Figura 4C), ya que se ha demostrado que el estradiol activa y promueve la diferenciación de los linfocitos B, lo que podría facilitar la eliminación del parásito<sup>43</sup> vía la participación de anticuerpos.

**9.4.3 Efecto de las hormonas sexuales sobre la expresión de TNF- $\alpha$  en el hígado.** El hígado es el tejido por excelencia dedicado a la inactivación de metabolitos tóxicos en el organismo, sin embargo, durante la infección con *Plasmodium*, no solo metaboliza los productos de degradación natural de la hemoglobina, también promueve la degradación natural de los metabolitos de la hemoglobina generados por el parásito como la hemozoina<sup>29, 30</sup>. La expresión de

TNF- $\alpha$  fue mayor en hembras sanas en comparación con los machos en la misma condición y se incrementó en los ratones infectados, de forma muy similar a la observada en el bazo en la Figura 7. En los machos, la infección disminuyó la expresión de TNF- $\alpha$ , lo que genera un claro dimorfismo en el día 9 de la infección (Figura 9). Administrar testosterona o estradiol o DHEA no modificó la expresión del gen en los ratones sanos. Interesantemente al combinar el tratamiento de testosterona o estradiol o DHEA en ratones hembras con la infección, disminuyó la expresión de RNAm para TNF- $\alpha$  (Figura 9A, B, C). Nuevamente el estradiol disminuyó la expresión de TNF- $\alpha$  tanto en la sangre como en el bazo; este hallazgo contrasta con lo previamente descrito referente al estradiol como inmunoestimulante<sup>18, 59</sup>. Sin embargo, también se ha demostrado que el estradiol funciona como inmunosupresor, lo que depende de la concentración como lo demostraron Tzu y colaboradores 1995<sup>23</sup>, en sus experimentos muestran que el estradiol en concentración alta y sostenida actúa como inmunosupresor. La administración de DHEA en machos infectados disminuyó la expresión de TNF- $\alpha$  (Figura 9C). El efecto de DHEA de disminuir la secreción de TNF- $\alpha$  durante la infección podría aminorar la sintomatología, ya que disminuiría la inflamación del hígado (hepatomegalia) y por lo tanto la ictericia, la hipoglucemia y la anemia podrían también ser menos severas<sup>13</sup>.

**9.4.4 Efecto de las hormonas sexuales sobre la expresión de TNF- $\alpha$  en el cerebro.** Usar un modelo experimental de malaria cerebral, permite analizar si el parásito es capaz de generar un desequilibrio en la producción de citocinas pro-inflamatorias en el cerebro, por lo que evaluar la expresión de RNAm que codifica para TNF- $\alpha$  en éste tejido es importante para comprender la patogenia de la enfermedad. Además, es una herramienta para estudiar si el dimorfismo sexual que se presenta en esta enfermedad<sup>1, 5</sup> es consecuencia de las hormonas sexuales.

La expresión de TNF- $\alpha$  en los machos resultó mayor que en las hembras. La infección aumentó significativamente la expresión del gen en ambos sexos. Sin embargo, en los ratones machos el incremento fue significativamente mayor

(Figura 10), este hallazgo podría ser consecuencia de la activación de las células microgliales que se activan entre 48 y 72 horas después de la inoculación con *P. berghei* ANKA<sup>12</sup>. Sin embargo, la mayor expresión de TNF- $\alpha$  en el cerebro también conduce a un mayor riesgo de padecer malaria cerebral<sup>12</sup>. La administración de testosterona o estradiol en ratones machos y hembras sanas, no modificó la expresión de TNF- $\alpha$ , mientras que el tratamiento con testosterona o estradiol en combinación con la infección aumentó la expresión de RNAm (Figura 10A y 10B); dado que el estradiol es una hormona que estimula la respuesta inmune, el incremento en la expresión de TNF- $\alpha$  se esperaba<sup>23</sup>. Sin embargo, una mayor expresión de TNF- $\alpha$  podría incrementar el riesgo de padecer malaria cerebral<sup>11, 12</sup>. El tratamiento con DHEA incrementó la expresión de TNF- $\alpha$  en ratones machos sanos. La infección también incrementó la expresión del gen al mismo nivel que DHEA, la combinación de administrar la hormona con la infección no tuvo efecto sinérgico en la expresión del TNF- $\alpha$ , lo que indica que la expresión del gen es un fenómeno sumamente regulado (Figura 10C).



## 10. CONCLUSIONES

Los tres esteroides sexuales modularon la pérdida de peso y la variación de temperatura durante la infección con *P. berghei* ANKA. La administración de estradiol evitó que los machos tuvieran una pérdida de peso severa, incluso más que la testosterona. La administración de DHEA no modificó la pérdida de peso, pero al parecer se relaciona con los niveles de TNF- $\alpha$  durante la infección. Al evaluar la temperatura, las hormonas testosterona y DHEA fueron los esteroides que más impactaron sobre la patología, al disminuir la temperatura en machos y hembras durante la infección.

En este estudio también demostramos que las hormonas sexuales modulan la expresión del gen de TNF- $\alpha$  en ratones CBA/Ca infectados con *Plasmodium berghei* ANKA. Las hembras son más susceptibles a los incrementos de los esteroides sexuales puesto que incrementan significativamente la expresión de RNAm para TNF- $\alpha$  en la sangre y en el hígado en comparación con los machos. Por el contrario, en el bazo y en el cerebro los machos expresan más TNF- $\alpha$  que las hembras. La hormona sexual que más impactó en la expresión de TNF- $\alpha$  fue el estradiol. Interesantemente, en el bazo la expresión de TNF- $\alpha$  no se modificó con la administración de los esteroides sexuales. Nuestros resultados sugieren que los esteroides sexuales están fuertemente implicados en el dimorfismo sexual que se presenta durante la malaria y son responsables, al menos en parte, de la disminución de peso y la variación en la temperatura. Además, también regulan la expresión de genes de la respuesta inmune como el TNF- $\alpha$ , lo que podría explicar, al menos en parte el dimorfismo sexual en la malaria.

## 11. PERSPECTIVAS

Con el fin de completar y poder realizar un análisis más complejo es necesario cuantificar la concentración de las citocinas en suero, además de la concentración de cada uno de los esteroides sexuales para relacionar cada uno de los resultados obtenidos y obtener una mejor idea del efecto de las hormonas sexuales. Por otra parte, el trabajo permite seguir con el análisis de los genes para diferentes citocinas pro y anti-inflamatorias en cada tejido, para generar un perfil de respuesta inmune en malaria. Posteriormente, se pueden analizar los mecanismos por los cuales los esteroides sexuales modulan la expresión de los genes durante la infección.

## 12. REFERENCIAS

1. WHO. World Malaria Report. Suiza: WHO Library Cataloguing; 2013. p. 286.
2. Randall LM, Engwerda CR. TNF family members and malaria: Old observations, new insights and future directions. *Exp Parasitol*. 2016;126:326-31.
3. Clark IA. How TNF was recognized as a key mechanism of disease. *Cytokine Growth F R*. 2007;18:335-43.
4. Verthely D. Sex hormones as immunomodulators in health and disease. *Int Immunopharmacol*. 2001;1:983-93.
5. Cervantes Rebolledo C, Carrero Sánchez JC. Hormonas y la susceptibilidad a las infecciones parasitarias. *Rev Med Portuguesa*. 2008;2:77-88.
6. Hernández Cervantes R, Sánchez Acosta AG, Ramírez Nieto R, Morales Montor J. Regulación neuroendocrinológica de la función inmunitaria: El papel de la hipófisis y los esteroides sexuales. *Rev Esp en Ciencias Químico-Biológicas*. 2010;13:103-12.
7. Escobedo G, Craig W R, C. Carrero J, Morales Montor J. Parasite regulation by host hormones: an old mechanism of host exploitation? *Trends in Parasitol*. 2005.
8. De León-Nava MA, Morales-Montor J. Dimorfismo sexual inmunitario: ¿Pueden los esteroides sexuales polarizar el perfil de citocinas Th1/Th2? *Rev Invest Clin*. 2006;58:161-9.
9. Deroost K, Lays N, Pham T-T, Baci D, Van den Eynde K, Komuta M, et al. Hemozoin induces hepatic inflammation in mice and is differentially associated with liver pathology depending on the *Plasmodium* strain. *PLoS*. 2014;9:0-23.
10. Cortina AdM, Tobón A. Ictericia y hepatopatía en el paciente con malaria. *Infect Immun*. 2010;14:277-85.
11. Angulo I, Fresno M. Cytokines in the pathogenesis of and protection against malaria. *Clin Diagn Lab Immun*. 2002;9:1145-52.
12. Hunt NH, Grau GE. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends in Immunol*. 2003;24:491-9.
13. Kinra P, Dutta V. Serum TNF alpha levels: a prognostic marker for assessment of severity of malaria. *Tropical Biomedicine*. 2013;30:645-53.
14. Hansen DS. Inflammatory responses associated with the induction of cerebral malaria: Lessons from experimental murine models. *PLoS Pathogens*. 2012;8.
15. Basir R, Fazalul Rahiman SS, Hasballah K, Chong WC, Talib H, Yam MF, et al. *Plasmodium berghei* ANKA infection in icr mice as a model of cerebral malaria. *Iranian Journal Parasitol*. 2012;7:62-74.
16. Monge Wilfredo EdJ. El ratón como base de modelos de cáncer humano: Una valiosa herramienta en la investigación oncológica. *Galenus*. 2012;17.
17. Legorreta Herrera M, Sánchez Cruz P. La respuesta inmune celular contra el *Plasmodium*: Agente etiológico de la malaria. *Revista Especializada en Ciencias de la Salud*. 1999;2:3-8.
18. Peakman M, Vergani D. *Inmunología Básica y Clínica*. Edición d, editor: El Sevier; 2011.
19. Olivier M, Van Den Ham K, Tiemi Shio M, Aberra Kassa F, Fougerey S. Malarial pigment hemozoin and the innate inflammatory response. *Frontiers in Immunology*. 2014;5:1-10.
20. Craig WR, Walker W, Alexander J. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14:476-88.
21. Legorreta Herrera M, Rivas Contreras S, Ventura Gallegos JL, Zentella Dehesa A. Nitric Oxide is Involved in the Upregulation of IFN-g and IL-10 mRNA Expression by CD8+ T Cells During the Blood Stages of *P. chabaudi* AS Infection in CBA/Ca Mice. *Int J Biol Sci*. 2011;7:1401-11.
22. Barañao RI. Hormonas sexuales y respuesta inmunológica. *Saegre*. 2009;16:20-30.

23. Tzu-Chieh C, J. Van alten P, A. Greager J, J. Walter R. Steroid sex hormones regulate the release of tumor necrosis factor by macrophages. *Cell Immunol.* 1995;160:43-9.
24. Fragoso Lona JM, Sierra Martínez M, Vargas Alarcón G, Barrios Rodas A, Ramírez Bello J. El factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) en las enfermedades cardiovasculares: biología molecular y genética. *Gac Med Mex.* 2013;149:521-30.
25. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S-i, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF-a: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology.* 2010;49:1215–28.
26. Anaya JM. Descripción Molecular del TNF- $\alpha$ . *Reumatología.* 2003;19:112-20.
27. Kwiatkowski D, Cannon JG, Manogue KR, Cerami A, Dinarello CA, Greenwood BM. Tumour necrosis factor production in *Falciparum* malaria and its association with schizont rupture. 1989;77:361-6.
28. Sarangia A, Dalaic M. Serum cytokine TNF-alpha and hemoglobin levels in *Plasmodium falciparum* malariae. A correlative study in coastal districts of Odisha. *Apollo Medicine.* 2012;9:292e6.
29. Castro W, Navarro M. Complejos metálicos como potenciales antimaláricos con blanco de acción: hemozoína. *Avances en Química.* 2012;7:135-44.
30. Lamikanra AA, Theron M, W. A. Kooij T, J. Roberts D. Hemozoin (Malarial Pigment) Directly Promotes Apoptosis of Erythroid Precursors. *PloS.* 2009;4:1-12.
31. Esamai F, Mining S, Forsberg P, H. Lewis D. A comparison of brain, core and skin temperature in children with complicated and uncomplicated malaria. *J Trop Pediatr.* 2001;47:170-5.
32. Li C, A. Sanni L, Omer F, Riley E, Langhorne J. Pathology of *Plasmodium chabaudi chabaudi* Infection and Mortality in Interleukin-10-Deficient Mice Are Ameliorated by Anti-Tumor Necrosis Factor Alpha and Exacerbated by Anti-Transforming Growth Factor Antibodies. *Infect Immun.* 2003;71:4850–6.
33. Malkin CJ, Pugh PJ, Jones RD, Kapoor D, Channer KS, Hugh JT. The Effect of Testosterone Replacement on Endogenous Inflammatory Cytokines and Lipid Profiles in Hypogonadal Men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:3313-8.
34. Dirgahayu P, Fukumoto S, Tademoto S, Hirai K. Regulation of *tnf- $\alpha$* , *il-1 $\beta$*  and *icam-1* gene expression in *thp-1* monocytes stimulated with *plasmodium falciparum*-cultured medium by excretory/secretory products from *spirometra erinaceieuropaei* plerocercoids. *Yonago Acta medica.* 2004;47:7-15.
35. Poluga J, Dopsaj V, Veljković M, N. Maksić, Stojaković S, Dunjić R, et al. Increased tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 serum levels and their correlation with laboratory parameters in patients with imported malaria. *Arch Biol Sci.* 2012;64:1577-83.
36. Billker O, Shaw MK, Margos G, Sinden RE. The roles of temperature, pH and mosquito factors as triggers of male and female gametogenesis of *Plasmodium berghei* in vitro. *Parasitology.* 1996;114:1-7.
37. 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 R International.* 2014:1-10.
38. Klein PW, Easterbrook JD, Lalime EN, Klein SL. Estrogen and progesterone affect responses to malaria infection in female C57Bl/6 mice. *Gend Med.* 2008:423–33.
39. Gardner DG, Dolores S. *Endocrinología básica y clínica de Greenspan: Lange;* 2012.
40. Dorantes Cuellar AY, Martínez Sibaja C, Guzmán Blanno A. *Endocrinología Clínica.* Edición r, editor: Manual Moderno; 2003.
41. Flórez J, Armijo JA, Mediavilla Á. *Farmacología Humana.* Edición r, editor: Masson, S.A.; 1998.

42. Cernetich A, S. Garver L, E. Jedlicka A, W. Klein P, Kumar N, L. Scott A, et al. Involvement of gonadal steroids and gamma interferon in sex differences in response to blood-stage malaria infection. *Infect Immun*. 2006;74:3190–203.
43. Zhang Z-H, Chen L, Saito S, Kanagawa O, Sendo F. Possible Modulation by Male Sex Hormone of Th1/Th2 Function in Protection against *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS Infection in Mice. *Exp Parasitol*. 2000;96:121–9.
44. Hayes LD, Bickerstaff GF, Baker JS. Interactions of cortisol, testosterone, and resistance training: Influence of circadian rhythms. *Chronobiol Int*. 2010;27:675-705.
45. Saad F, Aversa A, M. Isidori A, J. Gooren L. Testosterone as potential effective therapy in treatment of obesity in men with testosterone deficiency: A review. *Current Diabetes*. 2012;8:131-43.
46. Traish AM. Testosterone and weight loss: the evidence. *Obesity and nutrition*. 2014;21:313–22.
47. Kapoor D, Goodwin E, Channer KS, Jones TH. Testosterone replacement therapy improves insulin resistance, glycaemic control, visceral adiposity and hypercholesterolaemia in hypogonadal men with type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol*. 2006;154:899–906.
48. Rubinow KB, Snyder CN, Amory JK, Hoofnagle AN, Page ST. Acute testosterone deprivation reduces insulin sensitivity in men. *Clin Endocrinol*. 2012;76:281-8.
49. Fukui M, Kitagawa Y, Ose H, Hasegawa G, Yoshikawa T, Nakamura N. Role of endogenous androgen against insulin resistance and atherosclerosis in men with type 2 diabetes. *Current Diabetes*. 2007;3:25-31.
50. Berdanier CD, Parente JA, Mcjntosht MK. Is dehydroepiandrosterone an antiobesity agent? *FASEB*. 1993;7:414-9.
51. Litwak SA, Wilson JL, Khaksari M, Chen W, Cowley MA, Garcia C. Estradiol prevents fat accumulation and overcomes leptin resistance in female high fat diet mice. *Neuroendocrinology*. 2014:1-14.
52. Maketa V, Muhindo Mavoko H, Inocência da Luz R, Zanga J, Lubiba J, Kalonji A, et al. The relationship between *Plasmodium* infection, anaemia and nutritional status in asymptomatic children aged under five years living in stable transmission zones in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *Malaria Journal*. 2015;14:1-9.
53. Benten M, Peter W, Bettenhaeuser U, Wunderlich F, Els VV, Mossmann H. Testosterone-induced abrogation of self-healing of *Plasmodium chabaudi* malaria in blo mice: Mediation by spleen cellst. *Infect Immun*. 1991;59:4486-90.
54. Leenstra T, O. ter Kuile F, D. Kurtis J, A. Kager P, K. Kariuki S, P. Nixon C, et al. Dehydroepiandrosterone sulfate levels associated with decreased malaria parasite density and increased hemoglobin concentration in pubertal girls from western Kenya. *JID*. 2003;188:297–304.
55. Xu Y, Thekkethil PN, Liangru Zhu, Nasim Sobhani, Boman G. Irani, Kathryn E. Davis, et al. Distinct hypothalamic neurons mediate estrogenic effects on energy homeostasis and reproduction. 2011;14:453–65.
56. Sato K, Iemitsu M, Aizawa K, Mesaki N, Ajisaka R, Fujita S. DHEA administration and exercise training improves insulin resistance in obese rats. *Nutrition & Metabolism*. 2012;9:1-7.
57. Steffensen CH, Roepstorff C, Madsen M, Kiens B. Myocellular triacylglycerol breakdown in females but not in males during exercise. *Am Philos Quart*. 2001:1-33.
58. Mekjavic IB, Eiken O. Contribution of thermal and nonthermal factors to the regulation of body temperature in humans. *J Appl Physiol*. 2006;100:2065-72.
59. Abbas AK, Lichtman AH, Peber J. *Inmunología Celular y Molecular*. Elsevier. ; 2004.