



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

**Efecto del sexo en el tratamiento antimalárico con
Curcuma longa y *Cymbopogon citratus* en ratones
CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA**

TESIS

Para obtener el título de:
Químico Farmacéutico Biólogo

Presenta:
Omar Fernández Rivera

Directora de tesis:
Dra. Martha Legorreta Herrera



Ciudad de México, 2017



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

En primer lugar, quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a la Doctora Martha Legorreta Herrera quien como tutora de tesis siempre me dio su apoyo y consejo durante el desarrollo de este proyecto. Así mismo estoy en deuda con la DGAPA que a través del programa PAPIIT IN216914 financió esta investigación.

Quiero agradecer a mis sinodales Dra. María Isabel Soto Cruz, Dra. Adriana Gutiérrez Hoya, Q.F.B. María de las Mercedes Zamudio Durán y Q.F.B. Manuel Orduña Sánchez por su tiempo y consejos durante la revisión de este trabajo.

Deseo expresar mi gratitud a los M.V.Z. Adriana Altamirano Bautista, Dolores Elizabeth Guzmán Andrade, y Román Hernández Meza, que gracias a su excelente trabajo en el bioterio de la FES Zaragoza los ratones se mantuvieron en condiciones óptimas.

Quiero agradecer también a mis compañeros de laboratorio, especialmente al Q.F.B. Luís Antonio Cervantes Candelas por su apoyo durante las administraciones de los tratamientos, al Q.F.B. Jesús Aguilar Castro por enseñarme a programar y utilizar a “termi”, al Biol. Fidel Orlando Buendía González por su apoyo durante la inoculación del parásito, y a los estudiantes María Sara del Río Pisula y Víctor Damián Duque Moreno por su apoyo durante adquisición de los datos relacionados con la severidad de la malaria y al Dr. Uchechukwu Chukwuocha por su amistad y consejos.

Estoy muy agradecido con mis padres y hermanos por creer en las segundas oportunidades y por todo el apoyo que me brindaron mientras cursaba la carrera y durante la realización de esta tesis, y a mis abuelos porque siempre fui bien recibido en su casa cada que salía tarde de la facultad.

Finalmente, un agradecimiento especial a mi tía la I.Q. Esther Rivera Romero por todas las historias que me contaba cuando era niño, ya que gracias a ella es que me enamoré de la química.

Tabla de contenido

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Resumen..... | 1 |
| 2. Introducción..... | 2 |
| 3. Antecedentes..... | 4 |
| 3.1. Dimorfismo sexual en malaria..... | 4 |
| 3.2. <i>Plasmodium</i> y la respuesta inmune..... | 5 |
| 3.3. Sintomatología de la malaria..... | 6 |
| 3.4. Tratamientos antimaláricos..... | 7 |
| 4. Planteamiento del problema | 10 |
| 5. Hipótesis | 10 |
| 6. Objetivo general | 10 |
| 7. Diseño experimental | 11 |
| 8. Variables | 11 |
| 9. Materiales y reactivos | 11 |
| 9.1. Material biológico..... | 11 |
| 9.2. Reactivos | 11 |
| 9.3. Material..... | 12 |
| 9.4. Equipo | 12 |
| 10. Métodos | 13 |
| 10.1. Activación del parásito..... | 13 |
| 10.2. Infección | 13 |
| 10.3. Tratamientos..... | 13 |
| 10.4. Peso..... | 13 |
| 10.5. Temperatura | 14 |
| 10.6. Parasitemia..... | 14 |
| 10.7. Hemoglobina..... | 14 |
| 10.8. Glucemia | 14 |
| 10.9. Sobrevida | 14 |
| 11. Resultados..... | 15 |
| 11.1. Efecto del sexo sobre el tratamiento profiláctico con <i>Curcuma longa</i> en ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA..... | 15 |
| 11.2. Efecto del sexo en el tratamiento profiláctico con <i>Cymbopogon citratus</i> en ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA..... | 21 |
| 12. Discusión | 28 |

| | | |
|-----|---------------------------------|----|
| 13. | Conclusión | 29 |
| 14. | Prospectiva | 29 |
| 15. | Referenciasbibliográficas | 30 |

1. Resumen

La malaria es un grave problema de salud pública principalmente porque el parásito que la ocasiona desarrolla resistencia a la mayoría de los fármacos, como la cloroquina, que se utilizan para su control (1). En este trabajo se estudió la influencia del sexo sobre el tratamiento antimalárico con *Curcuma longa* (500mg/Kg) o *Cymbopogon citratus* (1600mg/Kg), dos plantas con reconocidas propiedades antiparasitarias. Se analizó la parasitemia, sobrevivencia, pérdida de peso, temperatura, glicemia y concentración de hemoglobina como parámetros que permitieron evaluar la severidad de los síntomas que caracterizan a la malaria. La evaluación *In vivo* del potencial antimalárico de plantas medicinales se realizó en ratones infectados con *Plasmodium berghei* ANKA, porque el desarrollo de la enfermedad es similar a las infecciones con *Plasmodium falciparum* en humanos (2), se utilizaron grupos de ratones machos y hembras a quienes se les administraron las plantas y posteriormente se infectaron con el parásito *Plasmodium berghei* ANKA. Al analizar los resultados obtenidos detectamos diferencias entre los grupos de machos y hembras, esto sugiere que el sexo influye en la eficacia del tratamiento antimalárico.

2. Introducción

La malaria es una devastadora enfermedad febril aguda causada por el protozoo del género *Plasmodium*. En 2015 se reportaron 438 mil muertes y 214 millones de casos nuevos; los grupos más vulnerables son los niños menores de 5 años, mujeres embarazadas y personas que viajan desde zonas libres de malaria (3, 4).

Existen 5 especies de *Plasmodium* que pueden parasitar a los humanos (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi*), de los cuales *P. falciparum* y *P. vivax* son los más virulentos; aunque *P. vivax* tiene una distribución global mayor y predomina en muchos países no Africanos, es *P. falciparum* el responsable de la mayoría de las muertes globales por malaria (3, 5).

El ciclo de vida de *Plasmodium sp* es complejo, se transmite por mosquitos hembras del género *Anopheles*, que al alimentarse inoculan esporozoítos en el torrente sanguíneo del huésped, y migran al hígado en donde el parásito se transforma en merozoito (fase exo-eritrocítica), los procesos de multiplicación y diferenciación sexual se realizan en los eritrocitos (fase eritrocítica), finalmente las formas sexuales infectan al vector cuando este se alimenta de la sangre del huésped. Es gracias a la complejidad de este ciclo de vida que el género *Plasmodium* ha desarrollado diferentes estrategias de evasión inmunológica (5-7) (Figura 1).

Debido a la invasión y destrucción de los eritrocitos, las infecciones recurrentes pueden causar anemia severa y cuando la infección es con *P. falciparum*, puede generar malaria cerebral; en este tipo de malaria los capilares cerebrales se obstruyen con células sanguíneas infectadas, se produce inflamación localizada que puede provocar la muerte. Si el individuo sobrevive a la malaria cerebral presentará consecuencias neurológicas a largo plazo (3, 8).

El mecanismo por el cual *P. falciparum* causa malaria cerebral aun es motivo de debate; las principales teorías son la mecánica, fundamentada en la oxigenación deficiente y la de las citocinas, que se basa en la liberación excesiva de citocinas proinflamatorias como la principal causa de muerte (9).

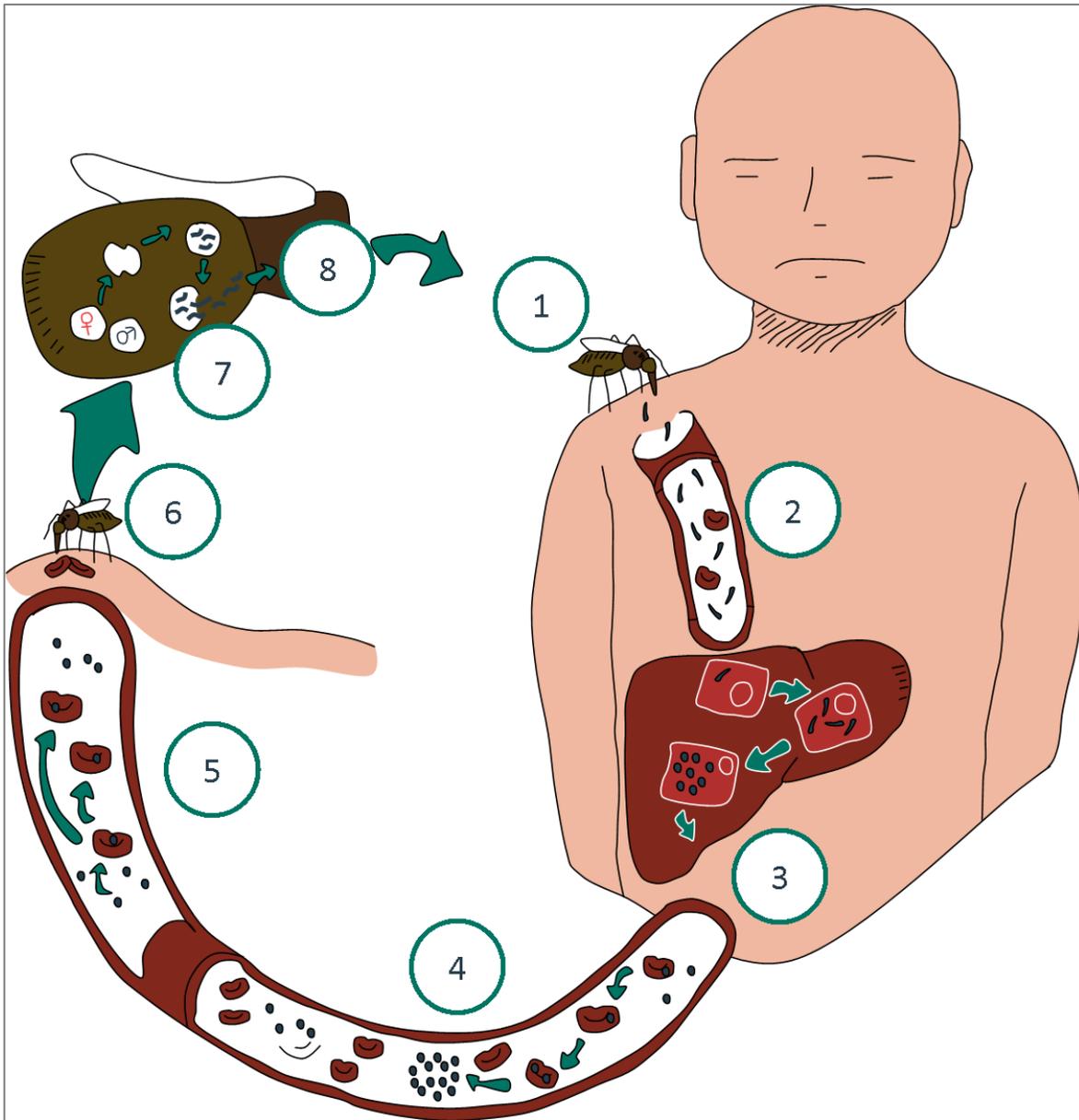


Figura 1. Ciclo de vida de *Plasmodium*. 1. La hembra del mosquito *Anopheles* infectada inocular el parásito mientras se alimenta, 2. Los esporozoítos viajan por el torrente sanguíneo hasta el hígado, 3. Dentro de los hepatocitos los esporozoítos se multiplican asexualmente y maduran en merozoítos que se liberan al torrente sanguíneo, 4. En la sangre los merozoítos invaden a los eritrocitos en donde se multiplican hasta que la célula explota, 5. Después de varios ciclos de reproducción asexual el parásito se transforma en gametocitos (forma sexual), 6. La hembra del mosquito *Anopheles* ingiere a los gametocitos cuando se alimenta, 7. En el estómago del vector el parásito se reproduce sexualmente para formar esporozoítos, 8. Los esporozoítos migran a las glándulas salivales del vector. Imagen elaborada con base en la información presentada por Gomes PS. 2016(6).

3. Antecedentes

3.1. Dimorfismo sexual en malaria

Los sistemas inmune y endócrino poseen características específicas para cada sexo (Tabla 1); mientras que el cromosoma X expresa varios genes implicados en procesos inmunológicos (receptores tipo Toll, múltiples receptores de citocinas, genes involucrados en la actividad de linfocitos T y B, y factores reguladores de la transcripción y traducción), el cromosoma Y codifica para genes de vías inflamatorias que se expresan únicamente en hombres; Se han documentado infecciones y tasas de mortalidad que varían en función del sexo; debido a que la testosterona regula negativamente la respuesta inmune, se sugiere que los hombres son más susceptibles a infecciones y a enfermedades causadas por vectores (10).

Tabla 1. Efecto del sexo sobre la respuesta inmune

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Efecto del sexo en la susceptibilidad a enfermedades</p> <ul style="list-style-type: none"> • La tasa de infección/mortalidad de varias enfermedades infecciosas es mayor en los hombres • Algunas infecciones tienen la misma incidencia pero mayor severidad (toxoplasmosis y dengue en mujeres, malaria y tuberculosis en los hombres) | <p>Inmunomodulación por los esteroides sexuales</p> <ul style="list-style-type: none"> • Los estrógenos tienen propiedades inmunopromotoras • Los andrógenos y la progesterona son principalmente inmunosupresores • Efecto sobre las células de la respuesta innata (NK, macrófagos) y adaptativa (LcTCD4+, LcB) • Afectación en la secreción de citocinas • Los estrógenos promueven la producción de inmunoglobulinas de alta afinidad |
| <p>Dimorfismo sexual en la inmunosenescencia</p> <ul style="list-style-type: none"> • Los sistemas inmune y endócrino cambian en función de la edad • La inmunosenescencia difiere entre hombres y mujeres • La menopausia tiene un fuerte impacto en el sistema inmune femenino | <p>Efecto del sexo en las vacunas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Generalmente la respuesta humoral es mayor en las mujeres (influenza, hepatitis B) |

Modificada de Giefing-Kroll 2015 (10)

En la malaria la incidencia de la infección es similar en ambos sexos, pero la severidad de los síntomas, la parasitemia y la tasa de mortalidad son mayores en los hombres que en las mujeres, en los modelos animales las hembras se recuperan más rápido de la pérdida de peso y la anemia causadas por la infección con el género *Plasmodium*. El efecto inmunosupresor de la testosterona puede ser la razón de la elevada susceptibilidad al parásito que presentan los machos en comparación con las hembras (11, 12).

Las dosis altas de testosterona en ratones hembras reducen tanto la síntesis de anticuerpos como la expresión de genes que responden contra la malaria, mientras que la producción de citocinas no se afecta (12).

3.2. *Plasmodium* y la respuesta inmune

El trayecto de los esporozoítos a través del torrente sanguíneo hasta el hígado es asintomático, sin embargo, se ha descrito que la respuesta inmune inicia en esta fase, algunas de las respuestas inmunológicas descritas en la etapa exo-eritrocítica son la apoptosis de las células infectadas, aislamiento y marcaje de parásitos en compartimientos específicos para su eliminación, inducción en la producción de interferón tipo I por RNA del parásito y autofagia mediada por LC3 (cadena ligera 3 de la proteína 1 asociada al microtúbulo); Para poder invadir los hepatocitos, los esporozoítos deben cruzar la barrera constituida por células endoteliales y los fagocitos hepáticos (células de Kupffer), utilizando un modelo murino se logró describir que los esporozoítos, para asegurar el paso a través de las células de Kupffer (KCs), regulan negativamente a TNF- α , IL-6 y MCP-1, y regulan positivamente a IL-10; En un estudio realizado con suero de mujeres y niños infectados con *P. falciparum*, se encontró una elevación en las concentraciones de IL-10 e IP10 en mujeres y un incremento de MCP-1, MIG, IP-10 en niños (13, 14). Adicionalmente, *Plasmodium* puede prevenir la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales pueden causar daño celular y matar al parásito, se ha reportado que el parásito puede inducir apoptosis en las KCs, finalmente pueden afectar negativamente la capacidad para presentar antígeno de las KCs (6).

Después de este primer ataque inmunológico, los parásitos sobrevivientes se replican exponencialmente dentro de los eritrocitos, se liberan a torrente sanguíneo cientos de miles de merozoítos; la fase eritrocítica, es responsable de la sintomatología asociada a la malaria. Cuando los merozoítos liberados del hígado invaden a los eritrocitos desarrollan una forma en anillo, que posteriormente madura en trofozoítos y finalmente en esquizontes, que al estallar libera al torrente sanguíneo entre 6 y 32 clonas que invadirán más eritrocitos; en esta fase los anticuerpos y los linfocitos T son componentes clave para la eliminación del parásito, los anticuerpos se unen a los eritrocitos parasitados para que los macrófagos circulantes los eliminen ya que los opsonizan, también previenen la infección de los eritrocitos sanos al unirse a los merozoítos circulantes lo que promueve su lisis vía complemento. Los linfocitos T participan directamente en la respuesta contra *Plasmodium* al producir citocinas pro-inflamatorias (IFN- γ y TNF- α) que activan a los macrófagos para responder contra el parásito, e indirectamente al activar clonas de linfocitos B específicos contra *Plasmodium*; Entre otros componentes claves en esta respuesta inmune se encuentran los linfocitos NK, las células T $\gamma\delta$, la microbiota del huésped y los anticuerpos naturales (6) (Figura 2).

En la malaria severa, tanto los eritrocitos infectados como los sanos se vuelven rígidos, lo que obstruye el flujo sanguíneo cuando el diámetro de los capilares es menor al de los eritrocitos, al no haber un correcto flujo sanguíneo se impide la libre circulación del parásito pero favorece la formación de rosetas y la producción de citocinas que modulan la expresión, en las células endoteliales, de receptores para las adhesinas del parásito, lo que promueve una respuesta inmune exacerbada y los ciclos febriles asociados a la malaria (6, 15, 16).

Los eritrocitos infectados se destruyen en el bazo, sin embargo el parásito ha desarrollado mecanismos para evadir la destrucción, un ejemplo es la inhibición del complejo de ataque a la membrana (MAC) en infecciones con *P. falciparum*; otro ejemplo de la evasión a la

respuesta inmune es la formación de rosetas entre los eritrocitos sanos y parasitados (6, 15, 17).

La malaria severa causada por *P. falciparum* puede complicarse en malaria cerebral, lo que deriva en epilepsia, coma y muerte, el mecanismo por el cual este parásito intravascular puede causar tal daño cerebral sigue en discusión, pero se cree que las células endoteliales tienen un papel clave, la adhesión de los eritrocitos parasitados a estas células causa su activación, lo que desencadena una fuerte respuesta inmune y posiblemente la ruptura de la barrera hematoencefálica (8, 17).

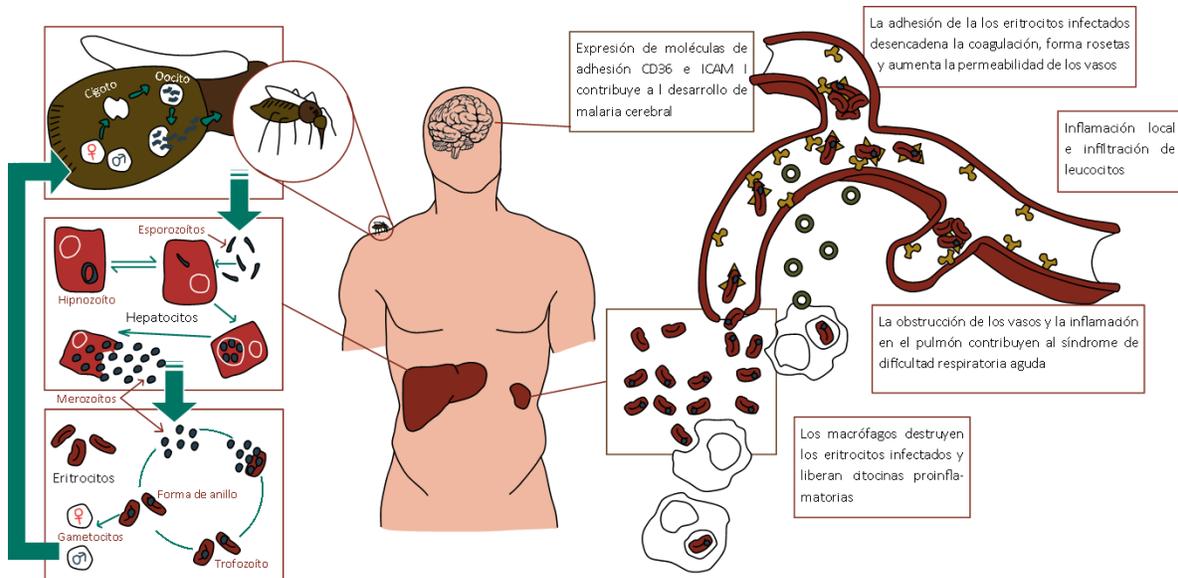


Figura 2. Fisiopatología de la malaria. La liberación de citocinas proinflamatorias favorece la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular y los eritrocitos infectados, esto deriva en la formación de rosetas y la obstrucción de los capilares, produciendo una inflamación generalizada. Imagen elaborada con base en la información presentada por Gomes PS. 2016

3.3. Sintomatología de la malaria

Uno de los principales síntomas en la malaria es la fiebre, la cual coincide con la ruptura de los esquizontes cada 48-72 horas, sin embargo, existen complicaciones en la fase eritrocítica que pueden desencadenar en la muerte (16).

La pérdida de peso (caquexia) es un síntoma que permite pronosticar la supervivencia en enfermedades crónicas como la malaria, la relación entre la malaria y la caquexia es compleja, algunos investigadores las asocian con factores socioeconómicos y malnutrición, mientras que otros la relacionan con la anemia, sin embargo, no se encontraron estudios sobre el efecto de los tratamientos antimaláricos sobre la caquexia (18).

La anemia es uno de los desórdenes más comunes asociados a la malaria, en la fase eritrocítica *Plasmodium* desarrolla esquizogonias que culminan en la lisis de los eritrocitos, sin embargo existe evidencia de la eliminación de eritrocitos por fagocitos, además los macrófagos pueden intervenir en la eritropoyesis al limitar la biodisponibilidad del hierro reciclado (19).

Durante la fase eritrocítica *Plasmodium* depende de la glucólisis como su principal fuente de energía, durante la infección con *P. berghei* las células infectadas utilizan significativamente más glucosa que las células no infectadas, lo que resulta en un decremento en la glucosa circulante (20).

3.4. Tratamientos antimaláricos

La mayoría de los antimaláricos disponibles tienen actividad sobre la fase eritrocítica ya que la fase exo-eritrocítica es asintomática; los derivados de quinolina (cloroquina, quinina, amodiaquina) inhiben la actividad de la hemo polimerasa, lo que ocasiona citotoxicidad por la acumulación de hemo-libre; los antifolatos (pirimetamina/sulfadoxina, atovaquona/proguanil) actúan como inhibidores competitivos de la dihidrofolato reductasa; los derivados de la artemisina (artesunato, dihidroartemisina) generan radicales libres que se unen selectivamente a proteínas de membrana, lo que causa peroxidación lipídica, daño al retículo endoplasmático, inhibición en la síntesis de proteínas y, finalmente, la lisis del parásito; los antimicrobianos (tetraciclina, clindamicina) actúan sobre los ribosomas 70s de las mitocondrias del parásito (21).

Pese a la gran cantidad de fármacos antimaláricos disponibles, la malaria se considera como un grave problema de salud debido a la toxicidad y alto costo de los tratamientos, así como a la resistencia a la mayoría de los fármacos que han desarrollado las diferentes cepas de *Plasmodium* (21, 22).

Un ejemplo de antimaláricos a los que se presenta resistencia es la cloroquina; el bajo costo, así como la seguridad y la eficacia, rápidamente convirtió a este fármaco en el tratamiento más importante para combatir la fase eritrocítica del parásito, además una de las ventajas del tratamiento es que puede utilizarse en mujeres embarazadas y niños. Sin embargo, la resistencia al fármaco se reportó por primera vez en 1957, se ha esparcido tanto que el tratamiento con cloroquina que actualmente es prácticamente ineficaz (23).

Desde la antigüedad, las plantas son una fuente de tratamientos contra las enfermedades, ejemplo de ello son plantas como la *Curcuma longa*(cúrcuma) y *Cymbopogon citratus*(té de limón), ambas plantas, por sus diferentes propiedades, se utilizan ampliamente en la medicina tradicional asiática para tratar diversos padecimientos; la ventaja de utilizar tratamientos basados en plantas es la interacción sinérgica de sus componentes así como su afinidad innata a los receptores biológicos (24-29).

3.4.1. *Curcuma longa*

Curcuma longa es una planta perenne herbácea de la familia de las zingiberáceas, alcanza una altura de 90 a 150 cm y se cultiva principalmente en India, China, y países con clima tropical. El rizoma (tallo horizontal y subterráneo) de la planta se hierva y seca para obtener un polvo amarillo (cúrcuma) que se utiliza con fines medicinales y culinarios, el color amarillo lo otorgan principalmente pigmentos polifenólicos conocidos como curcuminoides (24, 27, 28).

En la medicina tradicional de China e India, la cúrcuma se utiliza principalmente como antiinflamatorio y analgésico, también se utiliza para ayudar a cerrar heridas y desvanecer

cicatrices, en afecciones hepáticas y estomacales, para purificar y regenerarla sangre, sin embargo, existe poca evidencia científica que respalde estos tratamientos (24).

Los compuestos químicos presentes en la cúrcuma son muy diversos, su concentración puede variar en función de la especie, la ubicación y las condiciones de cultivo; a la fecha se han identificado aproximadamente 235 compuestos, entre ellos el más abundante es la curcumina (2-5%), mientras que los aceites esenciales pueden alcanzar concentraciones de 1.5-5% en los rizomas secos (24).

La curcumina y los aceites volátiles de la cúrcuma tienen un potente efecto antiinflamatorio, la administración oral de la cúrcuma es equiparable al efecto de la cortisona o la fenilbutazona en procesos inflamatorios agudos, en un estudio realizado en monos se demostró que la curcumina inhibe la agregación neutrofílica asociada a inflamación, además la curcumina también se puede aplicar de manera tópica para contrarrestar la inflamación e irritación cutánea asociadas a alergias (24, 27).

La propiedad antiinflamatoria de *Curcuma longa* se puede atribuir a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas a partir de ácido araquidónico, a la inhibición de la agregación neutrofílica durante los episodios inflamatorios, y a la modulación negativa de la expresión de RNAm para interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) y Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) (24, 27).

Aunque se ha reportado que *in vitro* la curcumina inhibe el crecimiento de *P. falciparum* e *in vivo* reduce la parasitemia en ratones infectados con *P. berghei*(30), no existen trabajos que reporten si esta reducción de la parasitemia puede ser a su vez influida por el sexo.

En la mayoría de los estudios realizados en humanos se ha descrito que la administración de cúrcuma es segura; sin embargo, entre los principales problemas para su uso como tratamiento son la limitada absorción, la baja biodisponibilidad y la inestabilidad química de sus componentes (24, 31).

3.4.2. *Cymbopogon citratus*

Cymbopogon citratus (té de limón) es una hierba que crece principalmente en climas tropicales y subtropicales, pertenece a la familia de las poáceas, se utiliza ampliamente en la medicina asiática posee actividad antiespasmódica, analgésica y antiinflamatoria, resulta eficaz en el tratamiento de infecciones, desordenes digestivos y nerviosos, así como dolores de cabeza y reumáticos (26, 32), además en ratones la administración de *C. citratus* redujo hasta en un 95% la pirexia inducida por el método de Brewer (33).

In vitro los extractos de *Cymbopogon citratus* tienen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, por ejemplo: la reducción de IL-1 β y la producción de IL-6 en macrófagos, y la inhibición de la producción de óxido nítrico (NO) y la expresión de la óxido nítrico sintetasa (34).

Los extractos de *Cymbopogon citratus* también se utilizan como tratamiento contra elefantiasis, tos, gingivitis, lepra, oftalmía, afecciones vasculares y neumonía, se ha reportado que el tratamiento con los aceites esenciales de *C. citratus* suprimen en 86.6% el crecimiento

de *P. berghei* (26), mientras que cuando se administró la planta completa el crecimiento de *P. berghei* ANKA se suprimió hasta en un 99.89% (35).

4. Planteamiento del problema

La frecuencia de infección por el género *Plasmodium* es la misma para ambos sexos, sin embargo, los hombres presentan mayor mortandad y sintomatología más severa que las mujeres, es decir se presenta dimorfismo sexual. Debido a que el *Plasmodium* ha desarrollado resistencia a prácticamente todos los fármacos disponibles, consideramos importante estudiar tratamientos alternativos contra la malaria y determinar si el sexo influye en la eficacia de los mismos. Por lo tanto, en este proyecto se estudió la influencia del sexo sobre la eficacia de la utilización de las plantas completas de *Curcuma longa* y *Cymbopogon citratus* en ratones infectados con *P. berghei* ANKA. Los resultados obtenidos proporcionarán información útil sobre la influencia del sexo en la administración de nuevas terapias antimaláricas.

5. Hipótesis

Si el sexo influye en la respuesta inmune contra *Plasmodium*, entonces la eficacia de los tratamientos antimaláricos puede variar en función del sexo.

6. Objetivo general

Determinar la influencia del sexo sobre la actividad antimalárica de *Curcuma longa* y *Cymbopogon citratus* en un modelo experimental de malaria cerebral.

6.1.1. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la administración de *Cymbopogon citratus* sobre la sobrevida, parasitemia, peso, temperatura, la concentración de hemoglobina y la glucemia en ratones CBA/Ca machos y hembras infectados con *Plasmodium berghei* ANKA.
- Evaluar el efecto de la administración de *Curcuma longa* sobre la sobrevida, parasitemia, peso, temperatura, la concentración de hemoglobina y la glucemia en ratones CBA/Ca machos y hembras infectados con *Plasmodium berghei* ANKA

7. Diseño experimental



Se estudiaron 4 grupos de cinco ratones CBA/Ca machos y 4 grupos de 5 ratones CBA/Ca hembras, todos de dos meses de edad. A cada grupo de ratones se le administró solo un tratamiento. Un grupo de ratones de cada sexo recibió: a) agua potable estéril (vehículo), b) cloroquina a la dosis, c) *Cymbopogon citratus* 1600mg/Kg o d) *Curcuma longa* 500 mg/Kg; vía intravenosa se infectaron con 1×10^3 eritrocitos parasitados con *P. berghei* ANKA, y diariamente se evaluó: la sobrevivencia, la parasitemia, la pérdida de peso, la variación de la temperatura, la concentración de hemoglobina y cada tercer día se evaluó la glucemia.

8. Variables

- ❖ Dependientes: Sobrevivencia, parasitemia, pérdida de peso, temperatura, concentración de hemoglobina, glicemia
- ❖ Independientes: Sexo

11

9. Materiales y reactivos

9.1. Material biológico

Los ratones CBA/Ca originalmente donados por el Doctor William Jarra (National Institute for Medical Research, Londres, Inglaterra), se alimentaron y mantuvieron en condiciones libres de patógenos específicos en el bioterio de ratones de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

El parásito *Plasmodium berghei* ANKA, fue también una donación del Doctor William Jarra.

- ❖ *Cymbopogon citratus*, recolectado e identificado por el Doctor Eloy Solano Camacho (Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, México)

9.2. Reactivos

- ❖ Colorante Giemsa marca Merck
- ❖ PBS/Heparina
- ❖ Etanol al 70%
- ❖ Metanol absoluto

- ❖ Reactivo de Drabkin
- ❖ Cloroquina (Sigma Aldrich)
- ❖ Cápsulas comerciales de *Curcuma longa*

9.3. Material

- ❖ Tubos Eppendorf de 1.5mL
- ❖ Puntas para pipetas de 1000, 200, 50 y 10 μ L
- ❖ Placas de 96 pozos fondo plano para ELISA marca Corning
- ❖ Portaobjetos marca MADESA
- ❖ Hematocitómetro
- ❖ Jeringas para insulina B&D
- ❖ Catéteres 16G
- ❖ Tiras para glucómetro marca Accu-Chek

9.4. Equipo

- ❖ Termómetro digital infrarrojo marca Thermofocus
- ❖ Balanza granataria marca OHAUS
- ❖ Glucómetro marca Accu-Chek
- ❖ Microscopio óptico Zeiss
- ❖ Micropipetas Gilson y Eppendorf de volúmenes varios
- ❖ Centrifuga refrigerada Eppendorf
- ❖ Lector de placas Multiskan Go Thermo Scientific

10. Métodos

10.1. Activación del parásito

Se sacó un vial del tanque de nitrógeno líquido con 300µL de sangre parasitada y se colocó en un baño de hielo, el contenido del vial se administró vía intraperitoneal en dos ratones (100 y 200µL respectivamente), a partir del tercer día se evaluó la parasitemia; cuando alcanzó el 23% se preparó una suspensión con 10×10^3 eritrocitos parasitados/mL

10.2. Infección

Los ratones se infectaron vía intravenosa con 1×10^3 eritrocitos parasitados con *Plasmodium berghei* ANKA

10.3. Tratamientos

El polvo de la planta completa se mezcló con agua potable estéril y se administró dos veces (4 días antes de infectar y el día de la infección) vía oral por medio de una cánula y una jeringa para insulina.

El *Cymbopogon citratus* se secó a temperatura ambiente durante 10 días, posteriormente se molió con un procesador de alimentos, finalmente el polvo obtenido se pasó a través de tamices con diferente número para obtener un tamaño de partículas de 0.3mm. El polvo se almacenó en bolsas dentro de un desecador. El polvo se pesó y se resuspendió con agua potable estéril, la suspensión se sonicó (amplitud de 20% y frecuencia de 0.5) durante 5 minutos, la cantidad de *C. citratus* administrada fue de 1600mg/Kg (35).

El polvo de *Curcuma longa* se obtuvo de cápsulas comerciales, las cápsulas se almacenaron en frascos dentro de un desecador. El polvo se resuspendió en agua potable estéril, posteriormente la suspensión se sonicó durante 5 minutos (amplitud de 20% y frecuencia de 0.5), la concentración de cúrcuma administrada fue de 500 mg/Kg (equivalente a 40 mg de curcumina/Kg) (36).

Para evaluar la actividad antimalárica de *C. citratus* y *C. longa* se utilizó cloroquina como control positivo en una concentración de 25mg/Kg de peso, y agua potable estéril como control negativo.

10.4. Peso

Los ratones se pesaron diariamente con una balanza electrónica, para evaluar el porcentaje en el cambio de peso corporal se consideró el peso del día cero (antes de iniciar el experimento) como el 100% del peso corporal y diariamente se calculó el porcentaje ganado o perdido de acuerdo al peso del día del análisis.

10.5. Temperatura

Diariamente y a la misma hora se midió la temperatura corporal de los ratones con un termómetro infrarrojo a una distancia de aproximadamente 5 cm entre el termómetro y el vientre del ratón.

10.6. Parasitemia

A partir del 3 día postinfección, diariamente se extrajo una gota de sangre de la cola de cada ratón y se realizó un frotis sanguíneo el cual se fijó con metanol absoluto, se tiñó durante 30 minutos con Giemsa (dilución 1:20), se lavó con agua corriente, se permitió que secará y en un microscopio óptico con el objetivo 100X se determinó el porcentaje de eritrocitos parasitados en 200 eritrocitos (cuando la parasitemia excedía a 2 eritrocitos parasitados por campo) o en 50 campos cuando la parasitemia era menor a 2 eritrocitos por campo.

10.7. Hemoglobina

Se adicionaron 2 μ L de sangre de cada ratón en 498 μ L de reactivo de Drabkin, se mezcló y la concentración de hemoglobina se evaluó espectrofotométricamente a 540 nm, se utilizó una curva estándar de hemoglobina.

10.8. Glucemia

Cada tercer día se determinó la concentración de glucosa en una gota de sangre de la cola del ratón con un glucómetro.

10.9. Sobrevida

Diariamente se registró la sobrevida en cada grupo y se calculó el porcentaje de sobrevida con el programa Graphpad Prism 5 se utilizó la prueba estadística de Kaplan-Meier.

11. Resultados

11.1. Efecto del sexo sobre el tratamiento profiláctico con *Curcuma longa* en ratones infectados con *P. berghei* ANKA.

Para determinar si el tratamiento preventivo con *Curcuma longa* presenta diferente efectividad entre los sexos, previo a la infección con *P. berghei* ANKA se administraron 2 dosis de *C. longa* en ratones machos o hembras, como grupos controles se utilizaron ratones tratados con vehículo (control negativo) y cloroquina (control positivo).

Diariamente se registró la supervivencia y no se detectó diferencia estadísticamente significativa entre machos y hembras tratados con el vehículo, cloroquina o con *C. longa* (Figura 3).

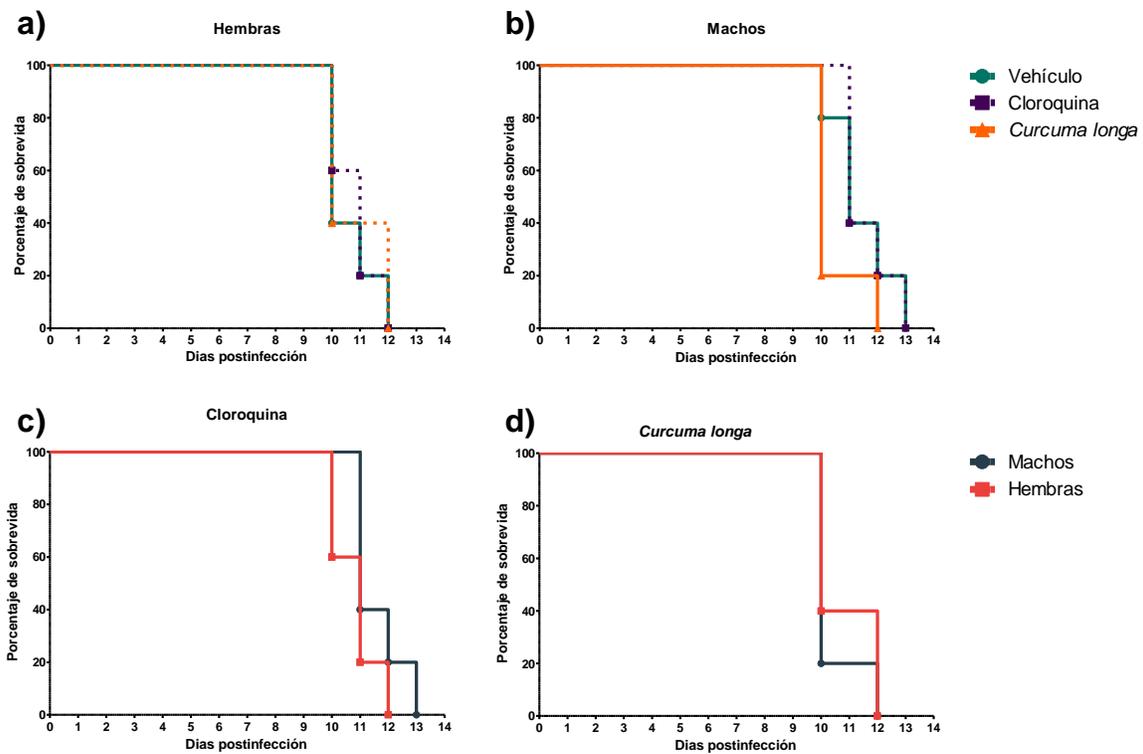


Figura 3 Efecto del sexo en la supervivencia de ratones infectados con *P. berghei* ANKA tratados profilácticamente con *C. longa*. Grupos de ratones CBA/Ca de ambos sexos se trataron dos veces con *C. longa*, cloroquina o vehículo y posteriormente se infectaron con *P. berghei* ANKA. a) Ratones hembras tratadas con *C. longa*, b) Ratones machos tratados con *C. longa*, c) Comparación de la supervivencia de ratones machos y hembras tratados con cloroquina, d) Comparación de la supervivencia de ratones machos y hembras tratados con *C. longa*, el análisis estadístico se realizó con el programa GraphPadPrism 5 (n= 5) se utilizó la prueba de Kaplan-Meier.

La parasitemia en las hembras tratadas con *C. longa* fue similar al control positivo (cloroquina) (Figura 4a), mientras que en los machos tratados con cúrcuma la parasitemia resultó mayor que en los ratones tratados con cloroquina, pero menor al grupo tratado con el vehículo (Figura 4b). Sin embargo, no detectamos diferencias significativas al comparar la parasitemia de machos contra hembras (Figura 4c), es decir, no detectamos dimorfismo sexual en la respuesta antimalárica de la *Cúrcuma longa*. Esto podría deberse a que no se utilizó la dosis adecuada, por lo que es necesario realizar una curva de dosis respuesta para determinar la dosis antimalárica óptima de *Curcuma longa*.

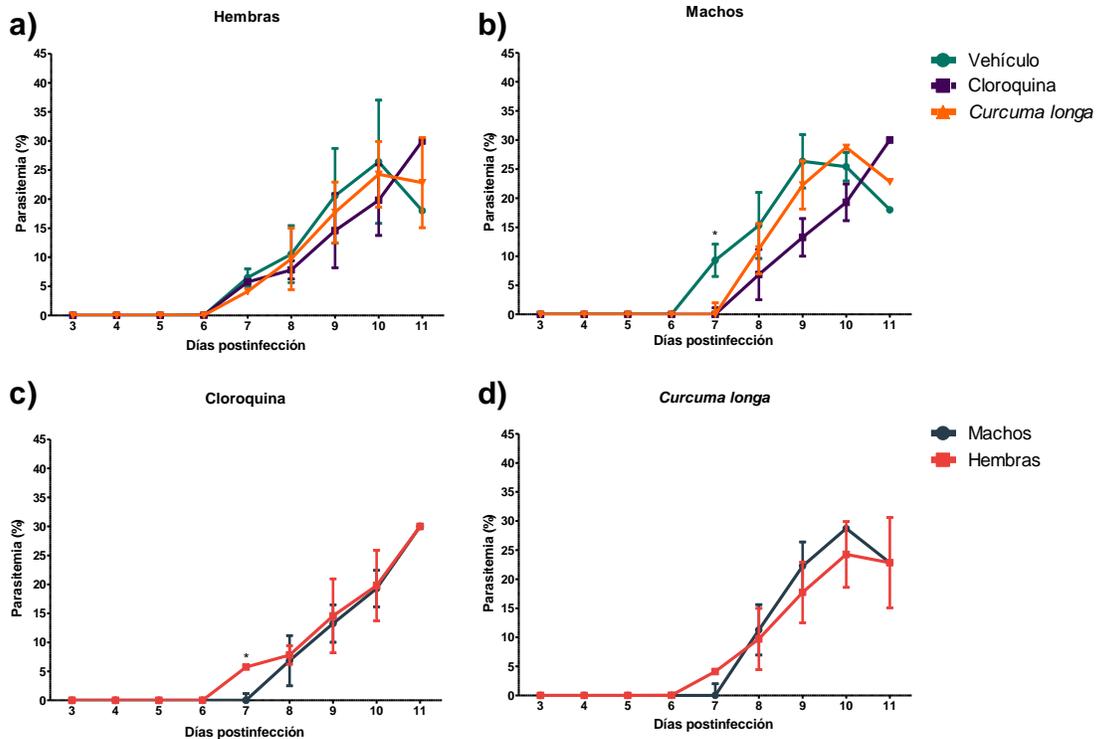


Figura 4 Efecto del sexo en la parasitemia de ratones infectados con *P. berghei* ANKA tratados profilácticamente con *C. longa*. Grupos de ratones CBA/Ca de ambos sexos se trataron dos veces con *C. longa*, cloroquina o vehículo y posteriormente se infectaron con *P. berghei* ANKA. a) Parasitemia en ratones hembras tratadas con *C. longa*, cloroquina o vehículo, b) Parasitemia de ratones machos tratados con *C. longa*, cloroquina o vehículo, c) Comparación de la parasitemia en ratones machos y hembras tratados con cloroquina; d) Comparación de la parasitemia en ratones machos y hembras tratados con *C. longa*. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPadPrism 5 (n= 5) se utilizó la prueba ANOVA de dos vías y Bonferroni, * indica diferencia estadísticamente significativa.

Uno de los síntomas que presentan los individuos que padecen malaria es la fiebre(9), el registro diario de la temperatura permitió detectar que los ratones tratados con *C. longa* y cloroquina desarrollaron temperaturas similares durante la infección (Figura 5a y 5b), al comparar la temperatura diaria entre los sexos detectamos que la temperatura fue más constante durante los primeros días de la infección en los ratones machos que recibieron *C. longa*(Figura 5d). Sin embargo, después del día 8 post infección se detectó hipotermia severa en todos los grupos que coincidió con el incremento de la parasitemia, sin embargo, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos (Figura 5).

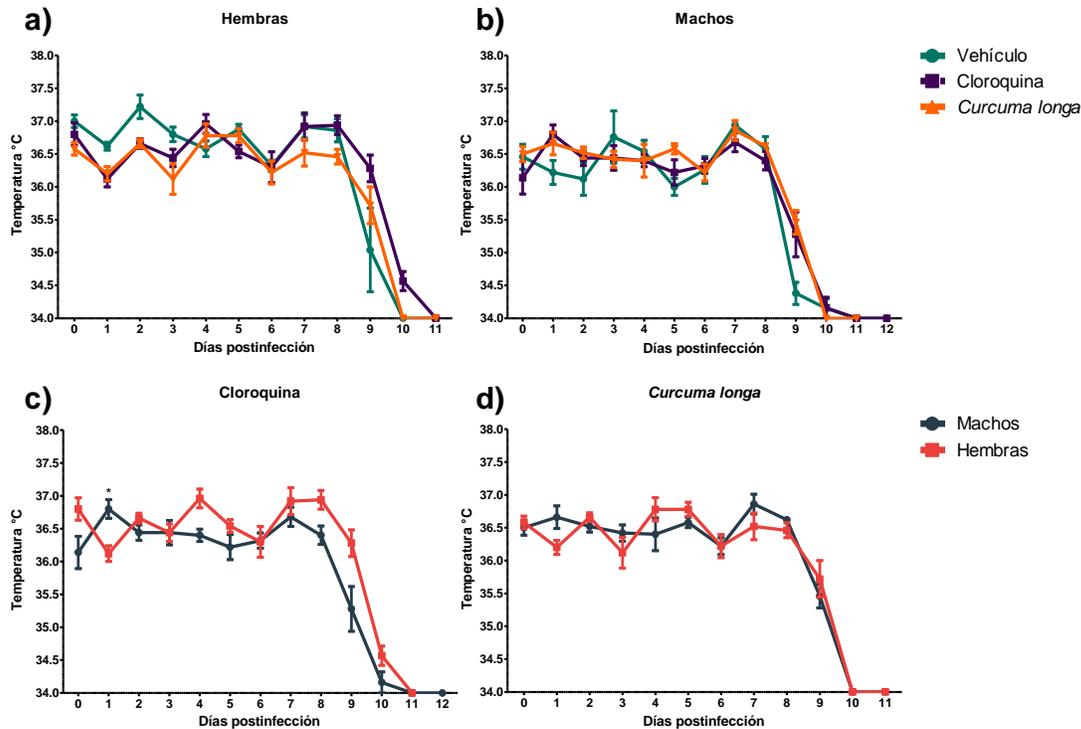


Figura 5 Efecto del sexo sobre el cambio de la temperatura corporal de ratones infectados con *P. berghei* ANKA tratados profilácticamente con *C. longa*. Grupos de ratones CBA/Ca de ambos sexos se trataron dos veces con *C. longa*, cloroquina o vehículo y posteriormente se infectaron con *P. berghei* ANKA. a) Temperatura en ratones hembras tratadas con *C. longa*, cloroquina o vehículo, b) Temperatura de ratones machos tratados con *C. longa*, cloroquina o vehículo, c) Comparación de la temperatura en ratones machos y hembras tratados con cloroquina; d) Comparación de la temperatura en ratones machos y hembras tratados con *C. longa*. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPadPrism 5 (n= 5) se utilizó la prueba ANOVA de dos vías y Bonferroni, * indica diferencia estadísticamente significativa.

Se ha documentado que la infección con *Plasmodium* genera pérdida de peso que conduce a caquexia(18). En este trabajo no detectamos diferencias estadísticamente significativas debidas al tratamiento con *C. longa* o que dependieran del sexo de los ratones. Sin embargo, en todos los ratones se presentó una disminución en el peso corporal sumamente marcada después del día 8 post infección (Figura 6), que también coincide con el incremento en el número de parásitos en sangre. Lo anterior indica que tanto la dosis de cloroquina como la de *C. longa* no fueron las adecuadas para eliminar completamente al parásito.

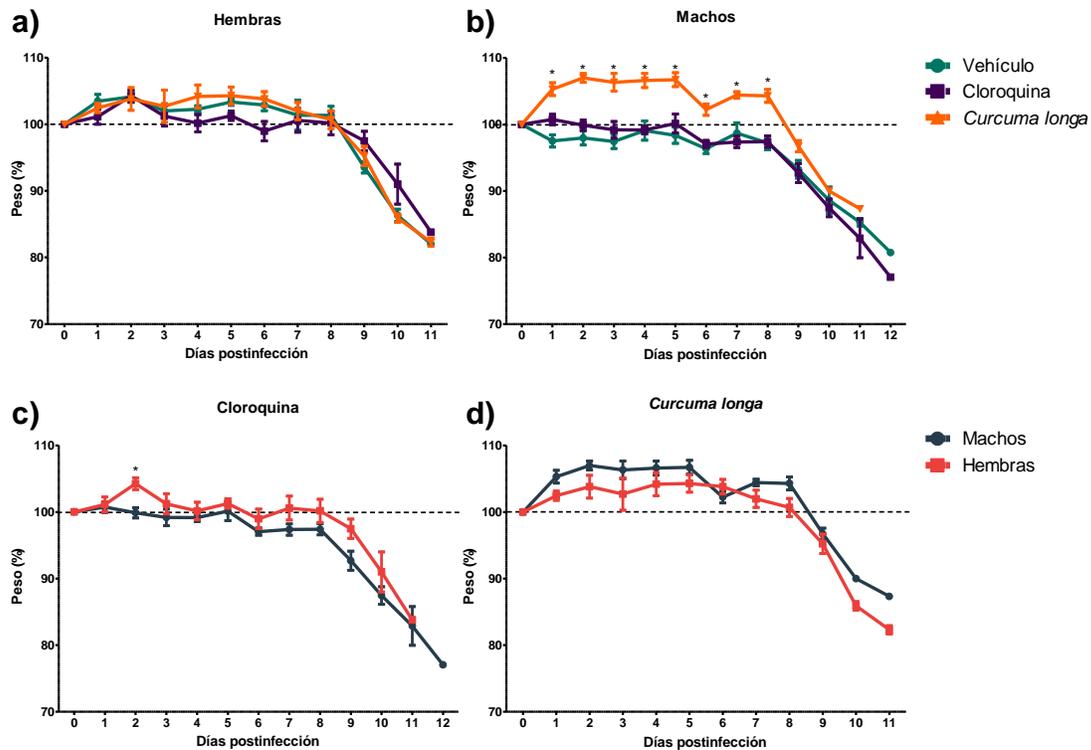


Figura 6 Efecto del sexo en el peso de ratones infectados con *P. berghei* ANKA tratados profilácticamente con *C. longa*. Grupos de ratones CBA/Ca de ambos sexos se trataron dos veces con *C. longa*, cloroquina o vehículo y posteriormente se infectaron con *P. berghei* ANKA. El peso registrado un día previo al inicio del experimento (día cero) se consideró como el 100% y diariamente se calculó el % de pérdida o ganancia de peso con respecto al día cero. a) Cambio en la masa corporal en ratones hembras tratadas con *C. longa*, cloroquina o vehículo, b) Cambio de la masa corporal de ratones machos tratados con *C. longa*, cloroquina o vehículo, c) Comparación del cambio en la masa corporal de ratones machos y hembras tratados con cloroquina; d) Cambio en la masa corporal de ratones machos y hembras tratados con *C. longa*. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPadPrism 5 (n= 5) se utilizó la prueba ANOVA de dos vías y Bonferroni, * indica diferencia estadísticamente significativa.

Se ha reportado que la infección con *Plasmodium* produce anemia (19), por lo tanto en este trabajo analizamos la concentración de hemoglobina durante la infección. No detectamos diferencias estadísticamente significativas en la concentración de hemoglobina entre las hembras y los machos tratados con *C. longa* o cloroquina (Figura 7).

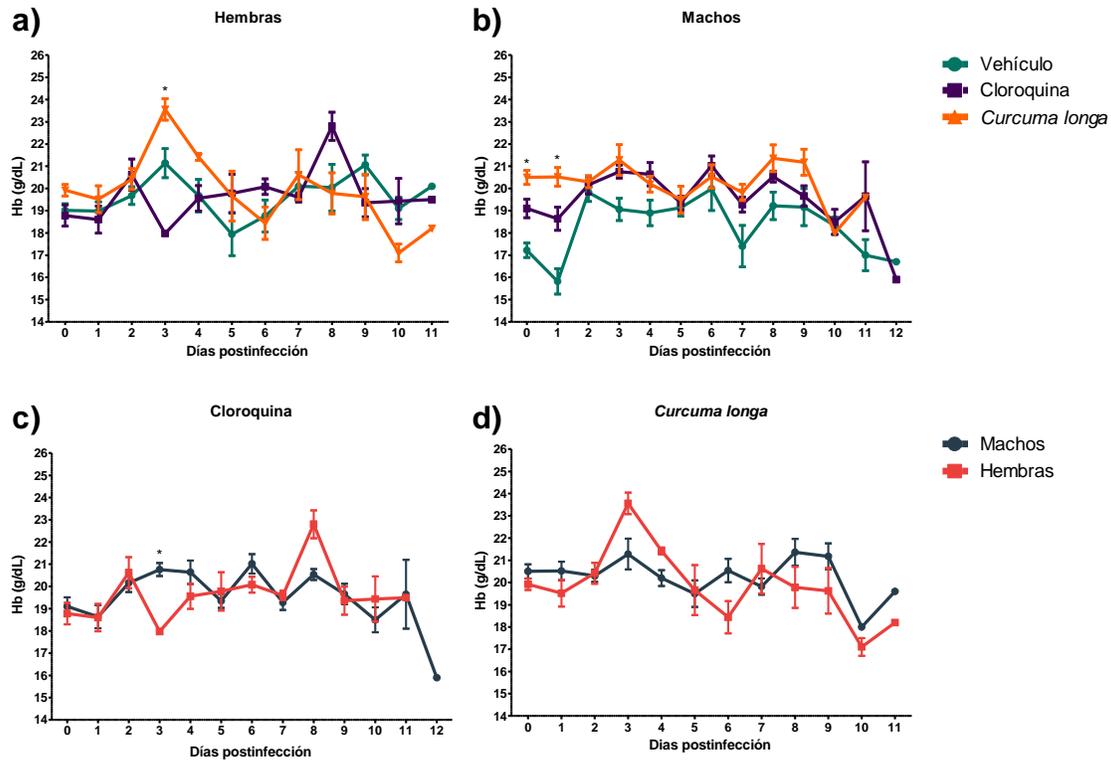


Figura 7 Efecto del sexo en la concentración de hemoglobina de ratones infectados con *P. berghei* ANKA tratados profilácticamente con *C. longa*. Grupos de ratones CBA/Ca de ambos sexos se trataron dos veces con *C. longa*, cloroquina o vehículo y posteriormente se infectaron con *P. berghei* ANKA. Diariamente se cuantificó la concentración de hemoglobina. a) Concentración de hemoglobina en ratones hembras tratadas con *C. longa*, cloroquina o vehículo, b) Concentración de hemoglobina de ratones machos tratados con *C. longa*, cloroquina o vehículo, c) Comparación de la concentración de hemoglobina en ratones machos y hembras tratados con cloroquina; d) Comparación de la concentración de hemoglobina en ratones machos y hembras tratados con *C. longa*. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPadPrism 5 (n= 5) se utilizó la prueba ANOVA de dos vías y Bonferroni, * indica diferencia estadísticamente significativa.

Durante el transcurso de la infección con *Plasmodium* la concentración de glucosa en la sangre tiende a decrecer debido al metabolismo del parásito(20). En este trabajo, a medida que avanzó la infección, la concentración de glucosa disminuyó en todos los grupos de ratones. Sin embargo, a partir del día 9 la concentración de glucosa incrementó notoriamente en los machos, en contraste con un menor incremento en las hembras (Figura 8c).El mismo comportamiento se detectó en la concentración de glucosa de ambos controles (vehículo y cloroquina) y en los ratones hembras y machos que fueron tratados con *C. longa*, en esta variable detectamos un marcado dimorfismo sexual (Figura 8d). Es probable que la infección altere el metabolismo de glucosa, particularmente al final de la infección cuando la parasitemia es más alta y el desbalance metabólico aumenta.

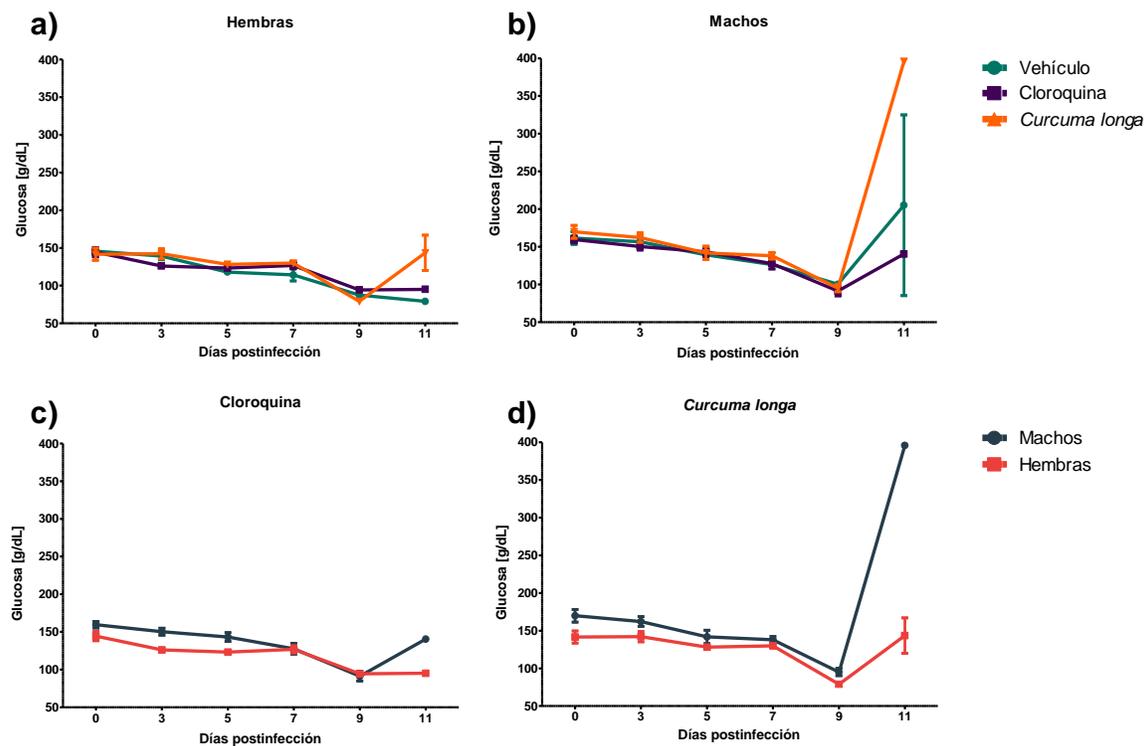


Figura 8 Efecto del sexo en la concentración de glucosa en sangre de ratones infectados con *P. berghei* ANKA tratados profilácticamente con *C. longa*. Grupos de ratones CBA/Ca de ambos sexos se trataron dos veces con *C. longa*, cloroquina o vehículo y posteriormente se infectaron con *P. berghei* ANKA. Diariamente se les cuantificó la concentración de glucosa en sangre periférica. a) Concentración de glucosa en sangre de ratones hembras tratadas con *C. longa*, cloroquina o vehículo, b) Concentración de glucosa en sangre de ratones machos tratados con *C. longa*, cloroquina o vehículo, c) Comparación de la concentración de glucosa en sangre de ratones machos y hembras tratados con cloroquina; d) Comparación de la concentración de glucosa en sangre de ratones machos y hembras tratados con *C. longa*. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPadPrism 5 (n= 5) se utilizó la prueba ANOVA de dos vías y Bonferroni, * indica diferencia estadísticamente significativa.

11.2. Efecto del sexo en el tratamiento profiláctico con *Cymbopogon citratus* en ratones infectados con *P. berghei* ANKA

Para determinar si el tratamiento preventivo con *Cymbopogon citratus* presenta diferente efectividad entre los sexos, previo a la infección con *P. berghei* ANKA se administraron 2 dosis de *C. citratus* en ratones machos o hembras, como control negativo se utilizaron ratones tratados con el vehículo y como control positivo se utilizaron ratones tratados con cloroquina.

Diariamente se registró la sobrevivencia de todos los grupos de ratones y no se detectó diferencia estadísticamente significativa entre machos y hembras tratados con el vehículo, cloroquina o con *C. citratus* (Figura 9). Sin embargo, los machos tratados con *C. citratus* murieron el día 10 post infección, mientras que las hembras sobrevivieron hasta el día 12 (Figura 9d), lo que indica una respuesta diferente en los sexos durante los días 10-12 post infección.

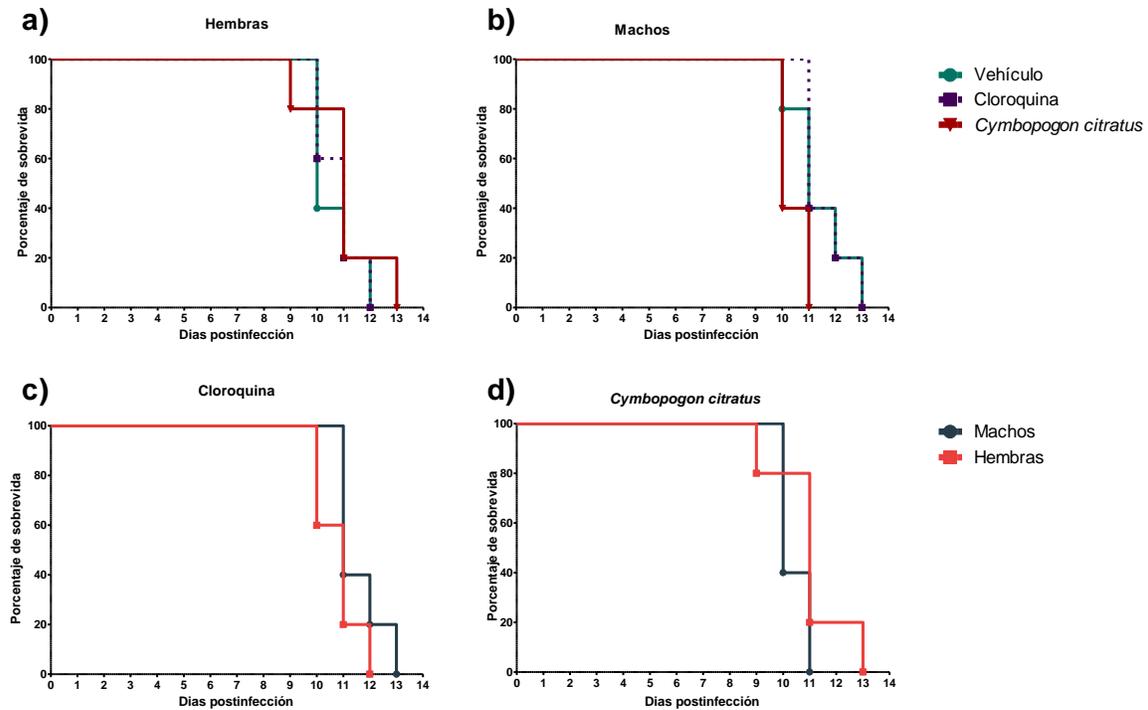


Figura 9 Efecto del sexo en la sobrevivencia de ratones infectados con *P. berghei* ANKA tratados profilácticamente con *C. citratus*. Grupos de ratones CBA/Ca de ambos sexos se trataron dos veces con *C. citratus*, cloroquina o vehículo y posteriormente se infectaron con *P. berghei* ANKA. a) Ratones hembras tratadas con *C. citratus*, b) Ratones machos tratados con *C. citratus*, c) Comparación de la sobrevivencia de ratones machos y hembras tratados con cloroquina, d) Comparación de la sobrevivencia de ratones machos y hembras tratados con *C. citratus*, el análisis estadístico se realizó con el programa GraphPadPrism 5 (n= 5) utilizando la prueba de Kaplan-Meier.

En las hembras tratadas con *C. citratus* la parasitemia resultó menor a la del grupo que recibió vehículo hasta el día 9 post infección, pero después se presentó un incremento que inclusive superó la parasitemia del grupo tratado con el vehículo; la parasitemia más baja se detectó en el grupo que recibió cloroquina (Figura 10a). La parasitemia de los machos tratados con *C. citratus* resultó más alta en el grupo que recibió el vehículo hasta el día 10 post infección, el grupo que recibió *C. citratus* desarrolló parasitemias similares al grupo que recibió cloroquina hasta el día 9 post infección, posteriormente la parasitemia incrementó en el grupo tratado con *C. citratus* y alcanzó a la del grupo tratado con vehículo (Figura 10b). Sin embargo, al comparar el comportamiento de la parasitemia entre machos y hembras no detectamos diferencias (Figura 10d).

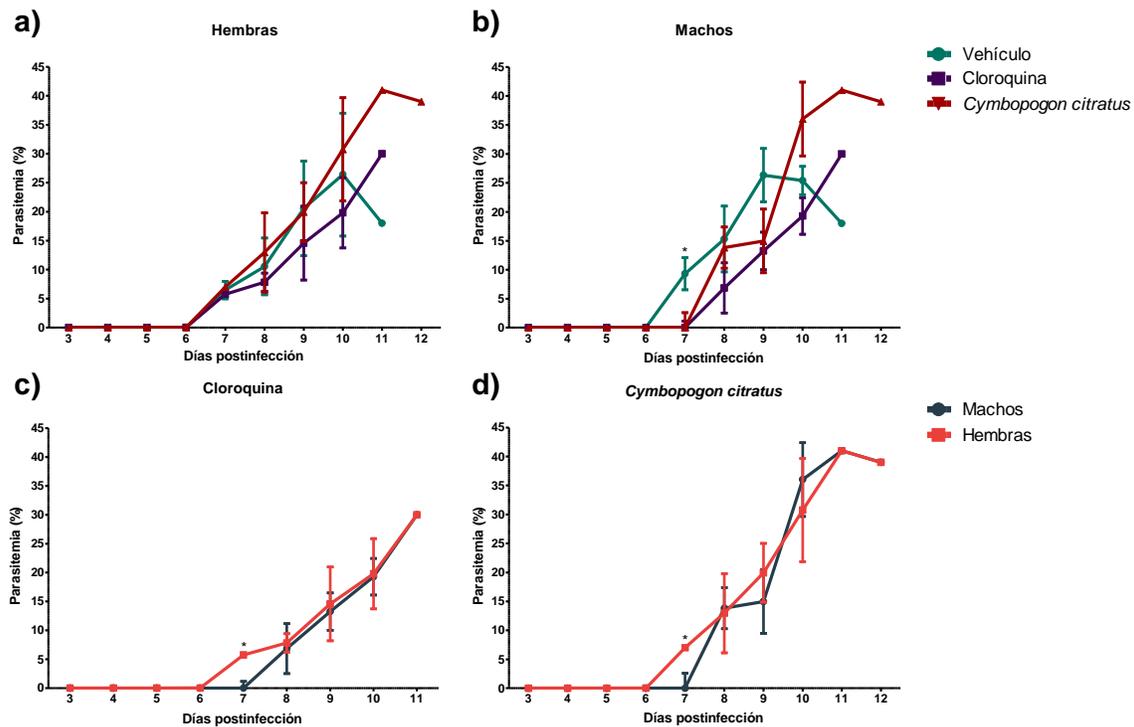


Figura 10 Efecto del sexo en la parasitemia de ratones infectados con *P. berghei* ANKA tratados profilácticamente con *C. citratus*. Grupos de ratones CBA/Ca de ambos sexos se trataron dos veces con *C. citratus*, cloroquina o vehículo y posteriormente se infectaron con *P. berghei* ANKA. a) Parasitemia en ratones hembras tratadas con *C. citratus*, cloroquina o vehículo, b) Parasitemia de ratones machos tratados con *C. citratus*, cloroquina o vehículo, c) Comparación de la parasitemia en ratones machos y hembras tratados con cloroquina; d) Comparación de la parasitemia en ratones machos y hembras tratados con *C. citratus*. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPadPrism5 (n= 5) se utilizó la prueba ANOVA de dos vías y Bonferroni, * indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

La infusión de la planta *C. citratus* se ha utilizado como antipirético(37), en la malaria de ratones la infección se caracteriza por generar hipotermia(16, 38), por lo anterior, en este trabajo se evaluó el efecto de la planta sobre la temperatura de los ratones tratados con *C. citratus* y cloroquina, no detectamos diferencias significativas entre los grupos durante la infección, todos los ratones desarrollaron hipotermia después del día 8 post infección (Figura 11a y 11b), lo que puede atribuirse a la infección y no a los tratamientos. Al comparar las temperaturas entre los machos y hembras, detectamos que la temperatura resultó más constante durante los primeros días de la infección en los ratones machos que recibieron *C.citratus*, además la temperatura durante la infección fue mayor en las hembras tratadas con *C. citratus* con respecto a los machos (Figura 11d). No detectamos diferencia estadísticamente significativa en la temperatura entre los grupos de machos y hembras tratados con cloroquina (Figura 11c). En general, las hembras tratadas tanto con *C. citratus* como con cloroquina desarrollaron temperaturas más altas que los machos (Figura 11c y 11d).

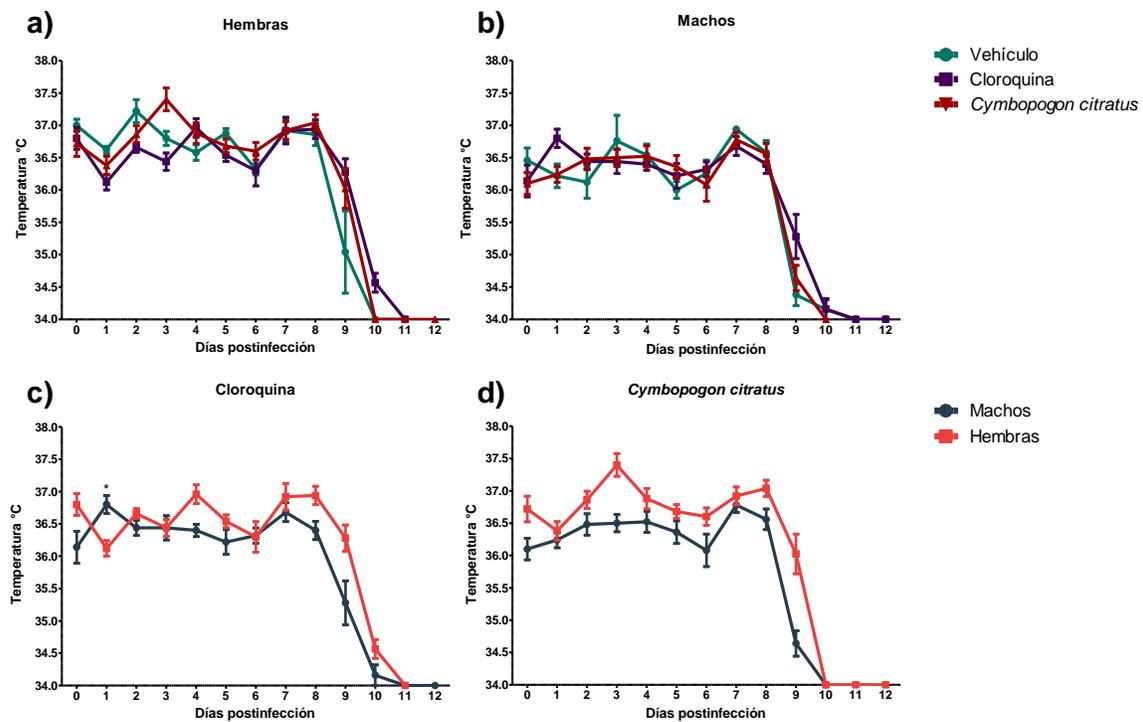


Figura 11 Efecto del sexo sobre el cambio de la temperatura corporal de ratones infectados con *P. berghei* ANKA tratados profilácticamente con *C. citratus*. Grupos de ratones CBA/Ca de ambos sexos se trataron dos veces con *C. citratus*, cloroquina o vehículo y posteriormente se infectaron con *P. berghei* ANKA. a) Temperatura en ratones hembras tratadas con *C. citratus*, cloroquina o vehículo, b) Temperatura de ratones machos tratados con *C. citratus*, cloroquina o vehículo, c) Comparación de la temperatura en ratones machos y hembras tratados con cloroquina; d) Comparación de la temperatura en ratones machos y hembras tratados con *C. citratus*. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPadPrism 5 (n= 5) se utilizó la prueba ANOVA de dos vías y Bonferroni, * indica diferencia estadísticamente significativa.

C. citratus es una planta que se ha utilizado para bajar de peso, y en malaria la pérdida de peso es una característica de la enfermedad(18, 38), por lo que en este trabajo analizamos las variaciones en el peso corporal de los ratones tratados con *C. citratus*. No detectamos diferencias estadísticamente significativas en la variación del peso debida a los tratamientos o debida al sexo, por lo que en esta variable no detectamos dimorfismo sexual, sin embargo, hasta el quinto día postinfección el peso de los machos que recibieron *C. citratus* fue mayor que el de los respectivos controles (Figura 12).

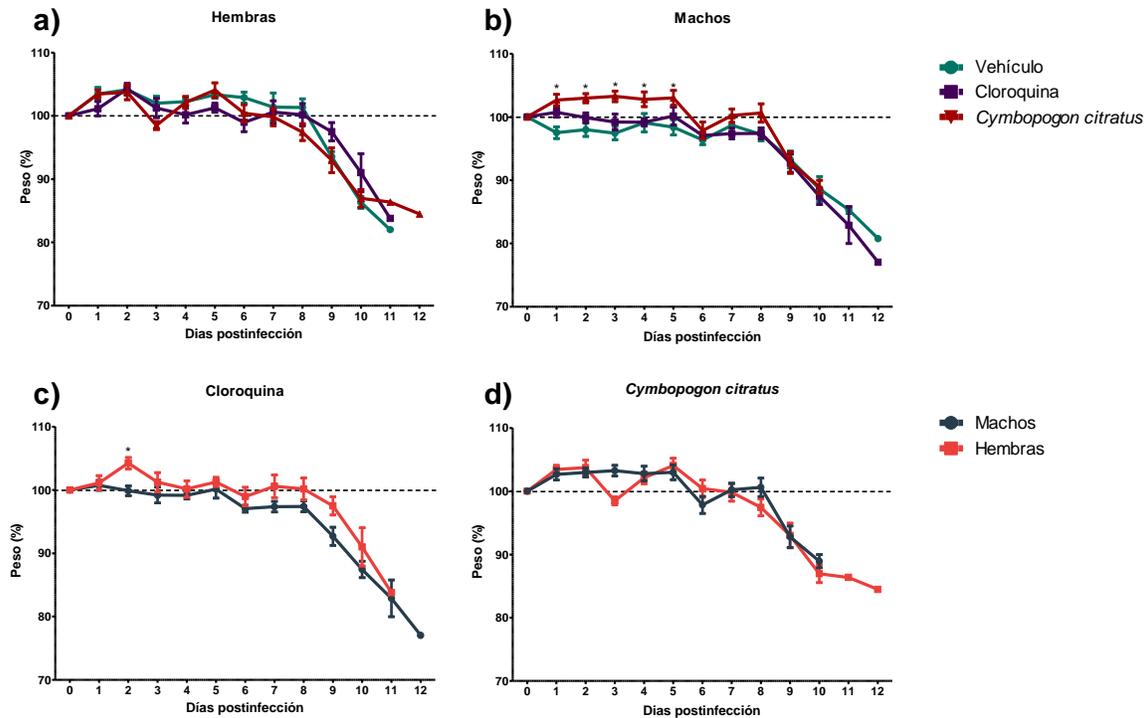


Figura 12. Efecto del sexo en el peso de ratones infectados con *P. berghei* ANKA tratados profilácticamente con *C. citratus*. Grupos de ratones CBA/Ca de ambos sexos se trataron dos veces con *C. citratus*, cloroquina o vehículo y posteriormente se infectaron con *P. berghei* ANKA. El peso registrado un día previo al inicio del experimento (día cero) se consideró como el 100% y diariamente se calculó el % de pérdida o ganancia de peso con respecto al día cero. a) Comparación del cambio de masa corporal en ratones hembras tratadas con *C. citratus*, cloroquina o vehículo, b) Comparación del cambio de masa corporal en ratones machos tratados con *C. citratus*, cloroquina o vehículo, c) Comparación del cambio de masa corporal en ratones machos y hembras tratados con cloroquina; d) Comparación del cambio de masa corporal en ratones machos y hembras tratados con *C. citratus*. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPadPrism 5 (n= 5) se utilizó la prueba ANOVA de dos vías y Bonferroni, * indica diferencia estadísticamente significativa.

Se ha reportado que la infección con *Plasmodium* produce anemia en el hospedero(19), en este trabajo no detectamos diferencias estadísticamente significativas en la concentración de hemoglobina entre los diferentes grupos. Sin embargo, en el grupo de machos tratado con vehículo se observaron las concentraciones menores de hemoglobina y en el grupo tratado con cloroquina las concentraciones fueron más altas (Figura 13a). En los grupos de hembras no detectamos diferencia entre los diferentes tratamientos (Figura 13b). Al comparar la concentración de hemoglobina entre machos y hembras detectamos que a partir del día 7 post infección las hembras tratadas con *C. citratus* presentaron concentraciones más altas de hemoglobina que los machos (Figura 13c). Finalmente, al comparar la concentración de hemoglobina entre machos y hembras que recibieron cloroquina, no detectamos diferencias estadísticamente significativas entre los sexos (Figura 13d).

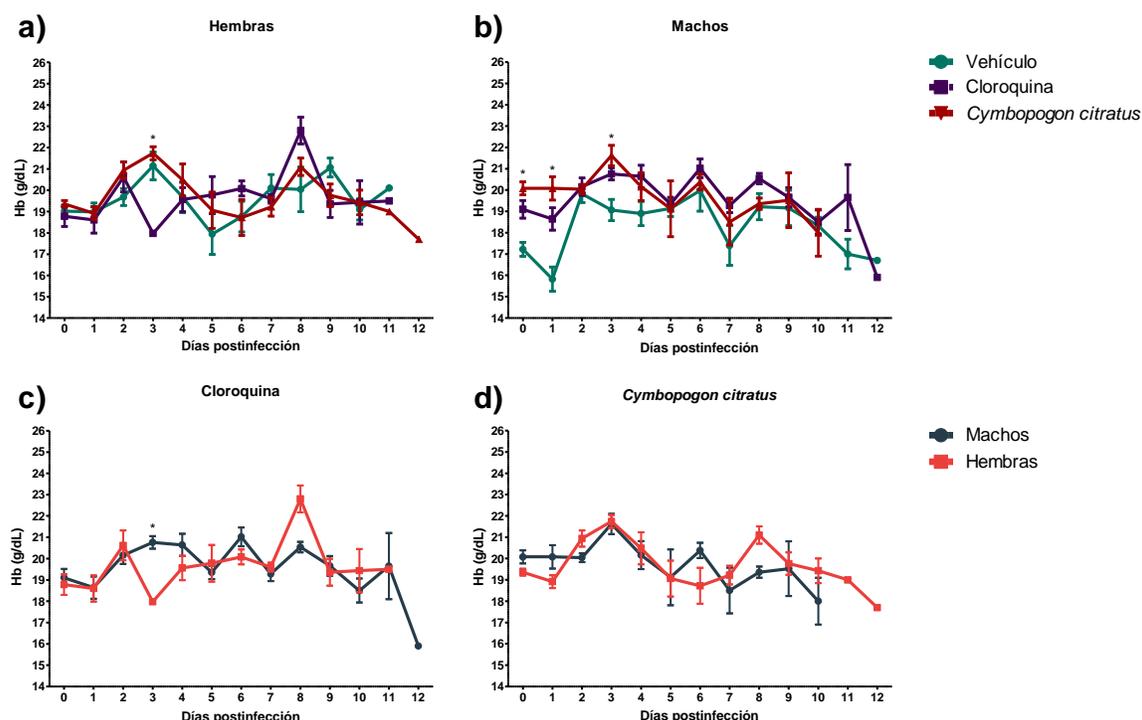


Figura 13. Efecto del sexo en la concentración de hemoglobina de ratones infectados con *P. berghei* ANKA tratados profilácticamente con *C. citratus*. Grupos de ratones CBA/Ca de ambos sexos se trataron dos veces con *C. citratus*, cloroquina o vehículo y posteriormente se infectaron con *P. berghei* ANKA. Diariamente se cuantificó la concentración de hemoglobina en los siguientes grupos: a) Concentración de hemoglobina en ratones hembras tratadas con *C. citratus*, cloroquina o vehículo, b) Concentración de hemoglobina en ratones machos tratados con *C. citratus*, cloroquina o vehículo, c) Comparación de la concentración de hemoglobina en ratones machos y hembras tratados con cloroquina; d) Comparación de la concentración de hemoglobina en ratones machos y hembras tratados con *C. citratus*. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPadPrism 5 (n= 5) se utilizó la prueba ANOVA de dos vías y Bonferroni,* indica diferencia estadística significativa.

11.2.1. Glucosa

De forma similar a los ratones tratados con *C. longa* (Figura 8), la concentración de glucosa tiende a disminuir durante la infección en los ratones machos infectados tratados con cloroquina, *C. citratus* o vehículo probablemente debido al consumo de glucosa por el parásito (Figura 14a). Sin embargo el día 11 post infección se registró un incremento importante en la concentración de glucosa de los grupos tratados con cloroquina y con el vehículo, probablemente como consecuencia del desorden metabólico generado por la infección. En las hembras se mantiene la tendencia a la disminución en la concentración de glucosa y permanece así hasta el día 11 post infección (Figura 14b). Cuando comparamos la concentración de glucosa entre los sexos detectamos que en las hembras tratadas con *C. citratus* disminuye la concentración de glucosa en particular los primeros días de la infección, en relación con los machos (Figura 14c). La misma tendencia de menor concentración de glucosa en las hembras se detectó al comparar machos y hembras tratados con cloroquina (Figura 14d).

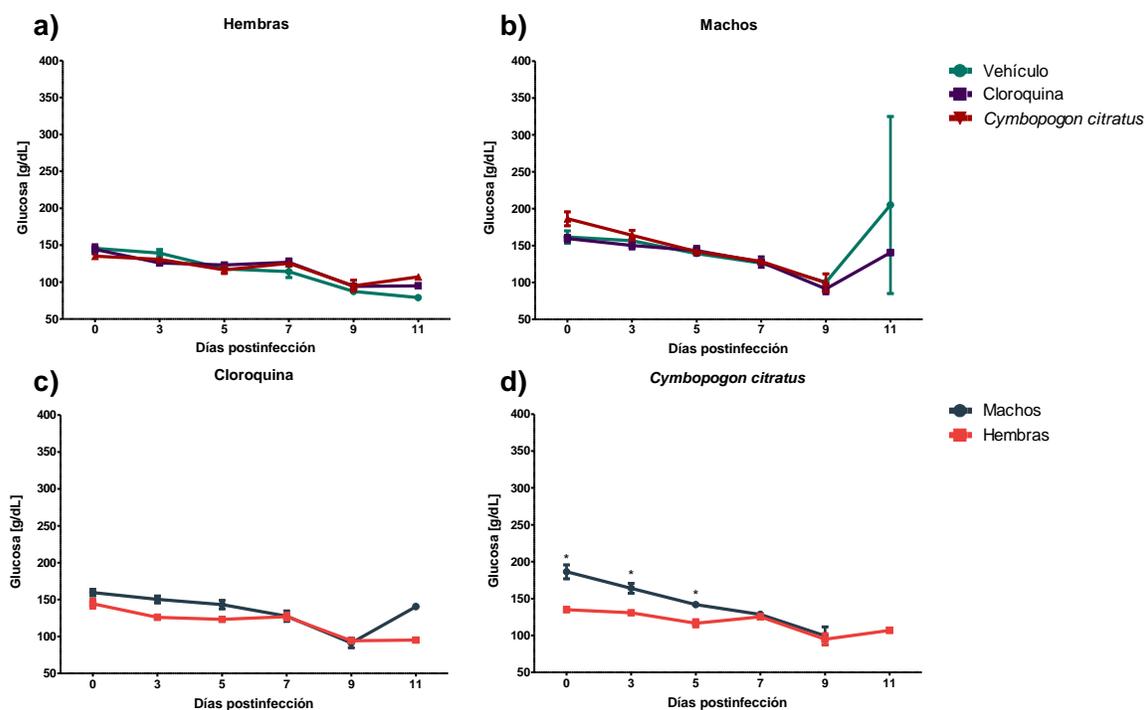


Figura 14 Efecto del sexo en la concentración de glucosa en sangre de ratones infectados con *P. berghei* ANKA tratados profilácticamente con *C. citratus*. Grupos de ratones CBA/Ca de ambos sexos se trataron dos veces con *C. citratus*, cloroquina o vehículo y posteriormente se infectaron con *P. berghei* ANKA. Diariamente se les cuantificó la concentración de glucosa en sangre periférica. a) Concentración de glucosa en sangre en ratones hembras tratadas con *C. citratus*, cloroquina o vehículo, b) Concentración de glucosa en sangre de ratones machos tratados con *C. citratus*, cloroquina o vehículo, c) Comparación de la concentración de glucosa en sangre de ratones machos y hembras tratados con cloroquina; d) Comparación de la concentración de glucosa en sangre de ratones machos y hembras tratados con *C. citratus*. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPadPrism 5 (n= 5) se utilizó la prueba ANOVA de dos vías y Bonferroni, * indica diferencia estadísticamente significativa.

12. Discusión

En la búsqueda de nuevos antimaláricos los investigadores se han enfocado en las plantas medicinales (39), los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que es viable el uso de *C. longa* y *C. citratus* como tratamientos antimaláricos alternativos y que su efectividad es influenciada por el sexo.

En la sobrevivencia de los ratones machos y hembras no hubo diferencia estadísticamente significativa durante el tratamiento con *C. longa* o *C. Citratus*, sin embargo, en los ratones tratados con *C. citratus* las hembras sobrevivieron dos días más que los machos, por lo que se requiere realizar ensayos para determinar si las hormonas sexuales modifican la respuesta inmune que genera el tratamiento con las plantas en contra del parásito.

La infección con *Plasmodium* induce hipotermia en los ratones (16), en este trabajo todos los grupos de ratones presentaron hipotermia después del octavo día postinfección, además, aunque no encontramos diferencia estadísticamente significativa, después de que los ratones se trataron con *C. citratus*, la temperatura de las hembras fue mayor con respecto a la de los machos, mientras que en los ratones machos tratados con *C. citratus* o *C. longa* la temperatura se mantuvo estable hasta el sexto día postinfección, este hallazgo, sugiere que ambas plantas regulan la temperatura en los individuos con malaria.

La pérdida de peso es uno de los síntomas presentes en los modelos de malaria murina (2), el tratamiento antimalárico con *Cymbopogon citratus* o *Curcuma longa* además de prevenir la pérdida de peso también fomentó la ganancia del mismo durante los primeros días de la infección, este hallazgo sugiere que además del efecto directo que tienen las plantas sobre el parásito, estas podrían contener compuestos que estimulen el apetito o que eviten la pérdida de peso (24, 25, 40).

En los ratones tratados con *C. citratus* o *C. longa* el peso y la concentración de hemoglobina fueron similares en ambos sexos durante la infección. Es probable que con *C. longa* tales diferencias no se manifestaran a causa de que la dosis utilizada pudo no ser la adecuada, sin embargo, los resultados obtenidos con el tratamiento con *C. citratus* indican que no todas las variables que estudiamos se modificaron con relación al sexo.

Se ha reportado que *C. longa* y *C. citratus* poseen un efecto hipoglucémico, se cree que puede deberse a un incremento en la síntesis y liberación de insulina o a un incremento en la utilización de la glucosa periférica (41, 42), en este trabajo detectamos que tanto en hembras como en los machos, la concentración de glucosa disminuyó a medida que avanzó la infección; en los ratones tratados con *Cymbopogon citratus* la glucemia en las hembras fue significativamente menor con respecto a los machos hasta el quinto día postinfección, mientras que en los ratones tratados con *Curcuma longa* se presentó un incremento en la concentración de glucosa un día antes de morir, el incremento fue hasta tres veces mayor en los machos con respecto a las hembras, por lo que es probable que después de haber metabolizado las plantas, los ratones presentarían una desregulación en el metabolismo de la glucosa, lo que derivó en el incremento en la concentración de ese metabolito.

13. Conclusión

Los resultados de este trabajo demuestran que el sexo influye en la eficiencia de la cloroquina, *Curcuma longa* y *Cymbopogon citratus* como tratamientos contra *Plasmodium berghei* ANKA, esto sienta las bases para estudiar la influencia del sexo en la eficiencia de otros antimaláricos.

14. Prospectiva

Este trabajo demostró que el sexo influye en la eficacia del tratamiento antimalárico, sin embargo, se requieren realizar ensayos que permitan determinar de qué forma *Curcuma longa* y *Cymbopogon citratus* modifican la respuesta inmune en contra del parásito, para así poder definir lo que origina el dimorfismo sexual en la eficiencia del tratamiento antimalárico.

15. Referencias bibliográficas

1. Kaur K, Jain M, Kaur T, Jain R. Antimalarials from nature. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2009;17(9):3229-56.
2. Tadesse SA, Wubneh ZB. Antimalarial activity of *Syzygium guineense* during early and established *Plasmodium* infection in rodent models. *BMC complementary and alternative medicine*. 2017 Jan 05;17(1):21. PubMed PMID: 28056963. Pubmed Central PMCID: PMC5217433. Epub 2017/01/07. eng.
3. Organization WH. World Malaria Report 2015. Available from: www.int/malaria/publications/world_malaria_report_2015/report/en.
4. Organization WH, Fund UNCs. Achieving the malaria MDG target: reversing the incidence of malaria 2000-2015 2015 September, 2015:[40 p.]. Available from: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241509442/en/>.
5. O'Brien SF, Delage G, Seed CR, Pillonel J, Fabra CC, Davison K, et al. The Epidemiology of Imported Malaria and Transfusion Policy in 5 Nonendemic Countries. *Transfusion medicine reviews*. 2015 Jul;29(3):162-71. PubMed PMID: 25933591. Epub 2015/05/03. Eng.
6. Gomes PS, Bhardwaj J, Rivera-Correa J, Freire-De-Lima CG, Morrot A. Immune Escape Strategies of Malaria Parasites. *Frontiers in microbiology*. 2016;7:1617. PubMed PMID: 27799922. Pubmed Central PMCID: PMC5066453. Epub 2016/11/02. Eng.
7. Dekel E, Rivkin A, Heidenreich M, Nadav Y, Ofir-Birin Y, Porat Z, et al. Identification and classification of the malaria parasite blood developmental stages, using imaging flow cytometry. *Methods (San Diego, Calif)*. 2017 Jan 01;112:157-66. PubMed PMID: 27350362. Epub 2016/06/29. eng.
8. Gay F, Zougbede S, N'Dilimabaka N, Rebollo A, Mazier D, Moreno A. Cerebral malaria: what is known and what is on research. *Revue neurologique*. 2012 Mar;168(3):239-56. PubMed PMID: 22386676. Epub 2012/03/06. Eng.
9. Clark IA, Budd AC, Alleva LM, Cowden WB. Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. *Malaria Journal*. 2006;5(1):85.
10. Giefing-Kroll C, Berger P, Lepperdinger G, Grubeck-Loebenstien B. How sex and age affect immune responses, susceptibility to infections, and response to vaccination. *Aging cell*. 2015 Jun;14(3):309-21. PubMed PMID: 25720438. Pubmed Central PMCID: PMC4406660. Epub 2015/02/28. Eng.
11. Legorreta-Herrera M, Mosqueda-Romo NA, Nava-Castro KE, Morales-Rodriguez AL, Buendia-Gonzalez FO, Morales-Montor J. Sex hormones modulate the immune response to *Plasmodium berghei* ANKA in CBA/Ca mice. *Parasitology research*. 2015 Jul;114(7):2659-69. PubMed PMID: 25876048. Epub 2015/04/16. Eng.
12. Cernetich A, Garver LS, Jedlicka AE, Klein PW, Kumar N, Scott AL, et al. Involvement of gonadal steroids and gamma interferon in sex differences in response to blood-stage malaria infection. *Infection and immunity*. 2006 Jun;74(6):3190-203. PubMed PMID: 16714546. Pubmed Central PMCID: PMC1479253. Epub 2006/05/23. Eng.
13. Bostrom S, Giusti P, Arama C, Persson JO, Dara V, Traore B, et al. Changes in the levels of cytokines, chemokines and malaria-specific antibodies in response to *Plasmodium falciparum* infection in children living in sympatry in Mali. *Malar J*. 2012 Apr 05;11:109. PubMed PMID: 22480186. Pubmed Central PMCID: PMC3366880. Epub 2012/04/07. Eng.
14. Bostrom S, Ibitokou S, Oesterholt M, Schmiegelow C, Persson JO, Minja D, et al. Biomarkers of *Plasmodium falciparum* infection during pregnancy in women living in northeastern Tanzania. *PloS one*. 2012;7(11):e48763. PubMed PMID: 23155405. Pubmed Central PMCID: PMC3498253. Epub 2012/11/17. Eng.
15. Wassmer SC, Grau GER. Severe malaria: what's new on the pathogenesis front? *International Journal for Parasitology*.

16. Lamb TJ, Brown DE, Potocnik AJ, Langhorne J. Insights into the immunopathogenesis of malaria using mouse models. *Expert reviews in molecular medicine*. 2006 Mar 23;8(6):1-22. PubMed PMID: 16556343. Epub 2006/03/25. eng.
17. Bernabeu M, Smith JD. EPCR and Malaria Severity: The Center of a Perfect Storm. *Trends in parasitology*. 2016 Dec 06. PubMed PMID: 27939609. Epub 2016/12/13. eng.
18. Onwuamaegbu ME, Henein M, Coats AJ. Cachexia in malaria and heart failure: therapeutic considerations in clinical practice. *Postgraduate medical journal*. 2004 Nov;80(949):642-9. PubMed PMID: 15537847. Pubmed Central PMCID: PMC1743137. Epub 2004/11/13. eng.
19. Totino PR, Daniel-Ribeiro CT, Ferreira-da-Cruz MF. Evidencing the Role of Erythrocytic Apoptosis in Malarial Anemia. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2016;6:176. PubMed PMID: 28018860. Pubmed Central PMCID: PMC5145864. Epub 2016/12/27. eng.
20. Meireles P, Sales-Dias J, Andrade CM, Mello-Vieira J, Mancio-Silva L, Simas JP, et al. GLUT1-mediated glucose uptake plays a crucial role during Plasmodium hepatic infection. *Cellular microbiology*. 2017 Feb;19(2). PubMed PMID: 27404888. Epub 2016/07/13. eng.
21. Mishra M, Mishra VK, Kashaw V, Iyer AK, Kashaw SK. Comprehensive review on various strategies for antimalarial drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017 1/5;125:1300-20.
22. White NJ. Does antimalarial mass drug administration increase or decrease the risk of resistance? *The Lancet Infectious diseases*. 2016 Nov 10. PubMed PMID: 27839929. Epub 2016/11/15. Eng.
23. Gunsaru B, Burgess SJ, Morrill W, Kelly JX, Shomloo S, Smilkstein MJ, et al. Simplified Reversed Chloroquines to Overcome Malaria Resistance to Quinoline-based Drugs. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 Feb 13. PubMed PMID: 28193646. Epub 2017/02/15. eng.
24. Gupta SC, Sung B, Kim JH, Prasad S, Li S, Aggarwal BB. Multitargeting by turmeric, the golden spice: From kitchen to clinic. *Molecular nutrition & food research*. 2013 Sep;57(9):1510-28. PubMed PMID: 22887802. Epub 2012/08/14. Eng.
25. Singh BR, Singh V, Singh RK, Ebibeni N. Antimicrobial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against microbes of environmental, clinical and food origin. *International Research Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2011;1:228-36.
26. Okere S, Sangodele J, Ogunwole E, Adams M, Shafe M. Antiplasmodial Activity of Aqueous leaf Extract of *Cymbopogon citratus* against *Plasmodium falciparum* Infected Rats. *American Journal of Biomedical and Life Sciences*. 2014;2(3):60-4.
27. Akram M, Uddin S, Ahmed A, Usmanghani K, Hannan A, Mohiuddin E, et al. Curcuma longa and curcumin: a review article. *Rom J Biol Plant Biol*. 2010;55(2):65-70.
28. Tayyem RF, Heath DD, Al-Delaimy WK, Rock CL. Curcumin content of turmeric and curry powders. *Nutr Cancer*. 2006;55(2):126-31. PubMed PMID: 17044766. Epub 2006/10/19. Eng.
29. Tarkang PA, Appiah-Opong R, Ofori MF, Ayong LS, Nyarko AK. Application of multi-target phytotherapeutic concept in malaria drug discovery: a systems biology approach in biomarker identification. *Biomarker research*. 2016;4:25. PubMed PMID: 27999673. Pubmed Central PMCID: PMC5154004. Epub 2016/12/22. eng.
30. Reddy RC, Vatsala PG, Keshamouni VG, Padmanaban G, Rangarajan PN. Curcumin for malaria therapy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Jan 14;326(2):472-4. PubMed PMID: 15582601. Epub 2004/12/08. Eng.
31. Ghosh A, Banerjee T, Bhandary S, Surolia A. Formulation of nanotized curcumin and demonstration of its antimalarial efficacy. *International journal of nanomedicine*. 2014;9:5373-87. PubMed PMID: 25484584. Pubmed Central PMCID: PMC4245089. Epub 2014/12/09. eng.
32. Rahim SM, Taha EM, Al-janabi MS, Al-douri BI, Simon KD, Mazlan AG. Hepatoprotective effect of *Cymbopogon citratus* aqueous extract against hydrogen peroxide-induced liver injury in male rats. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines : AJTCAM*.

- 2014;11(2):447-51. PubMed PMID: 25435631. Pubmed Central PMCID: PMC4202655. Epub 2014/12/02. Eng.
33. Tarkang PA, Okalebo FA, Siminyu JD, Ngugi WN, Mwaura AM, Mugweru J, et al. Pharmacological evidence for the folk use of Nefang: antipyretic, anti-inflammatory and antinociceptive activities of its constituent plants. *BMC complementary and alternative medicine*. 2015 Jun 09;15:174. PubMed PMID: 26055261. Pubmed Central PMCID: PMC4459057. Epub 2015/06/10. eng.
34. Campos J, Schmeda-Hirschmann G, Leiva E, Guzman L, Orrego R, Fernandez P, et al. Lemon grass (*Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf) polyphenols protect human umbilical vein endothelial cell (HUVECs) from oxidative damage induced by high glucose, hydrogen peroxide and oxidised low-density lipoprotein. *Food chemistry*. 2014 May 15;151:175-81. PubMed PMID: 24423518. Epub 2014/01/16. Eng.
35. Chukwuocha UM, Fernandez-Rivera O, Legorreta-Herrera M. Exploring the antimalarial potential of whole *Cymbopogon citratus* plant therapy. *Journal of ethnopharmacology*. 2016 Sep 29. PubMed PMID: 27693771. Epub 2016/10/04. Eng.
36. Sharma K, Agrawal S, Gupta M. Development and Validation of UV spectrophotometric method for the estimation of Curcumin in Bulk Drug and Pharmaceutical Dosage Forms. *International Journal of Drug Development and Research*. 2012.
37. Shah G, Shri R, Panchal V, Sharma N, Singh B, Mann A. Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (Lemon grass). *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*. 2011;2(1):3.
38. Fentahun S, Makonnen E, Awas T, Giday M. In vivo antimalarial activity of crude extracts and solvent fractions of leaves of *Strychnos mitis* in *Plasmodium berghei* infected mice. *BMC complementary and alternative medicine*. 2017 Jan 05;17(1):13. PubMed PMID: 28056932. Pubmed Central PMCID: PMC5217609. Epub 2017/01/07. eng.
39. Nandakumar DN, Nagaraj VA, Vathsala PG, Rangarajan P, Padmanaban G. Curcumin-artemisinin combination therapy for malaria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 May;50(5):1859-60. PubMed PMID: 16641461. Pubmed Central PMCID: PMC1472230. Epub 2006/04/28. eng.
40. Tajidin N, Ahmad S, Rosenani A, Azimah H, Munirah M. Chemical composition and citral content in lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil at three maturity stages. *African Journal of Biotechnology*. 2012;11(11):2685.
41. Singh V, Jain M, Misra A, Khanna V, Prakash P, Malasoni R, et al. Curcuma oil ameliorates insulin resistance & associated thrombotic complications in hamster & rat. *The Indian journal of medical research*. 2015 Jun;141(6):823-32. PubMed PMID: 26205026. Pubmed Central PMCID: PMC4525408. Epub 2015/07/25. eng.
42. Adeneye AA, Agbaje EO. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of fresh leaf aqueous extract of *Cymbopogon citratus* Stapf. in rats. *J Ethnopharmacol*. 2007 Jul 25;112(3):440-4. PubMed PMID: 17513076. Epub 2007/05/22. eng.