



**Universidad Nacional  
Autónoma de México**

---

---

**Facultad de Estudios Superiores Zaragoza**

**Análisis de la expresión de los genes de  
EsR- $\alpha$ , PR y AR en ratones  
gonadectomizados, tratados con  
testosterona, estradiol y DHEA en un  
modelo experimental de malaria murina.**

**TESIS**

Que para obtener el título de  
**Químico Farmacéutico Biólogo**

**PRESENTA:**

**Suárez González Víctor Hugo**



**DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA**

Ciudad de México, 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado principalmente a mi madre Aurora por apoyarme incondicionalmente en toda mi formación y por su ejemplo de salir siempre adelante.

A mi hermano Martín Guillermo que siempre me recuerda que hay retos mayores que superar y que está en uno lograr sus metas.

A mi profesora Beatriz que me impulso a estudiar y me creó un profundo amor a los estudios y a todos aquellos que directa o indirectamente han influido en mi persona, para ser un hombre de bien y un ser humano íntegro.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por proporcionarme las herramientas necesarias y todos los conocimientos que me brindo a lo largo de mi formación.

Este proyecto fue desarrollado en el Laboratorio de Inmunología Molecular de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM con el apoyo del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con el No. De registro IN216914.

Dra. Martha Legorreta Herrera por permitirme la valiosa oportunidad trabajar en este proyecto y todas las enseñanzas que resultaron de él, así como sus valiosos comentarios que me ayudaron a desarrollarme mejor como profesionista, muchas gracias.

<b>ÍNDICE</b>	<b>pág.</b>
1. RESUMEN.....	7
2. INTRODUCCIÓN.....	9
3. FUNDAMENTACIÓN TEORICA.....	10
3.1. Malaria.....	10
3.2. Ciclo de vida del parásito.....	10
3.3. Epidemiología.....	11
3.4. Patología.....	12
3.5. Las hormonas.....	12
3.5.1. Estrógenos.....	14
3.5.2. Andrógenos.....	15
3.5.3. Progesterona.....	17
3.5.4. Dehidroepiandrosterona.....	18
3.6. PCR.....	19
3.7. Electroforesis.....	22
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24
5. HIPÓTESIS.....	25
6. OBJETIVOS.....	26
6.1. Objetivo general.....	26
6.2. Objetivos particulares.....	26
7. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	27
7.1. Población.....	27
7.2. Diseño experimental para la administración de hormonas.....	27
7.3. Diseño experimental para la estandarización de la técnica de PCR....	28
7.4. Variables.....	28
7.5. Material y equipo.....	29
7.6. Método.....	31
7.6.1. Administración de Hormonas.....	31
7.6.2. Infección con <i>Plasmodium</i> .....	32
7.6.3. Extracción de ARN.....	32
7.6.4. Hidratación y cuantificación de ARN.....	33
7.6.5. Retrotranscripción.....	33
7.6.6. Estandarización de la técnica de PCR para los receptores de esteroides.....	33
7.6.7. Amplificación por PCR en tiempo real.....	34
8. RESULTADOS.....	34
8.1. Estandarización de la técnica de PCR en tiempo real.....	35
8.2. Expresión relativa del gene que codifica para el receptor de andrógenos en cerebro.....	39

8.3. Expresión relativa del gene que codifica para el receptor de estrógenos en cerebro.....	41
8.4. Expresión relativa del gene que codifica para el receptor de progesterona en cerebro.....	43
8.5. Expresión relativa del gene que codifica para el receptor de andrógenos en bazo.....	45
8.6. Expresión relativa del gene que codifica para el receptor de estrógenos alfa en bazo.....	47
8.7. Expresión relativa del gene que codifica para el receptor de progesterona en bazo.....	49
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	51
9.1. Calibración de la técnica de PCR en tiempo real para los receptores de: andrógenos estrógenos alfa y progesterona	51
9.2. Expresión del receptor de andrógenos en cerebro.....	52
9.3. Expresión del receptor de estrógenos alfa en cerebro.....	52
9.4. Expresión del receptor de progesterona en cerebro.....	53
9.5. Expresión del receptor de andrógenos alfa en bazo.....	54
9.6. Expresión del receptor de estrógenos en bazo.....	54
9.7. Expresión del receptor de progesterona en bazo.....	55
10. CONCLUSIONES.....	56
11. REFERENCIAS BIBIOGRÁFICAS.....	57

## Índice de figuras

Figura 1 Ciclo de vida del *Plasmodium*

Figura 2 Vía de señalización de los estrógenos sobre su receptor

Figura 3 Vía de señalización de la progesterona sobre su receptor

Figura 4 Vía de señalización de los andrógenos sobre su receptor

Figura 5 Curva de amplificación en PCR tiempo real para el gen que codifica para estrógenos alfa

Figura 6 Curva de amplificación en PCR tiempo real para el gen que codifica para andrógenos

Figura 7 Curva de amplificación en PCR tiempo real para el gen que codifica para progesterona

Figura 8. Efecto de la administración de testosterona, estradiol y DHEA sobre la expresión relativa del ARNm para el receptor de estrógenos alfa en cerebro de ratones infectados con *Plasmodium berghei* ANKA

Figura 9: Efecto de la administración de testosterona, estradiol y DHEA sobre la expresión relativa del ARNm para el receptor de progesterona en cerebro de ratones infectados con *Plasmodium berghei* ANKA

Figura 10: Efecto de la administración de testosterona, estradiol y DHEA sobre la expresión relativa del ARNm para el receptor de andrógenos en cerebro de ratones infectados con *Plasmodium berghei* ANKA.

## 1. RESUMEN

**Introducción.** La malaria es un problema de salud mundial, a pesar de la intensa investigación sobre los mecanismos de respuesta inmune, no se ha logrado obtener una vacuna efectiva que elimine a la malaria. La incidencia es igual en ambos sexos, sin embargo, los hombres desarrollan un cuadro clínico más agudo y una mayor mortalidad que las mujeres. Dado que las principales diferencias entre los sexos se deben a las hormonas sexuales, es probable que las hormonas esteroideas estén involucradas en la patología de la malaria. Por lo tanto, evaluar la expresión de los receptores de las hormonas esteroideas en los órganos clave de la patología de la malaria es importante para entender el papel que juegan los esteroides sexuales en la enfermedad.

**Objetivo.** Estandarización de la técnica de PCR en tiempo real para amplificar los genes del receptor de estrógenos alfa ( $ER\alpha$ ), del receptor de andrógenos (AR) y el receptor de progesterona (PR) en ratón, para evaluar el efecto de administrar los esteroides sexuales estradiol, testosterona y DHEA sobre la expresión de los receptores en la infección con malaria.

**Materiales y métodos.** En este trabajo se estandarizó la técnica de PCR en tiempo real para evaluar la expresión de ARN mensajero de los genes que codifican para los siguientes receptores: estrógenos alfa, andrógenos y progesterona. Con esta herramienta molecular se evaluó el efecto de las hormonas sexuales estradiol, testosterona y DHEA sobre la expresión del ARNm que codifica para esos receptores en el cerebro y el bazo de ratones CBA/Ca infectados con *Plasmodium berghei* ANKA. Se analizaron los siguientes grupos de ratones: a) control de vehículo; b) ratones sin ningún tratamiento; c) ratones gonadectomizados y d) ratones gonadectomizados y reconstituidos con estradiol, testosterona y DHEA.

**Resultados.** Se calibró la técnica de PCR en tiempo real para analizar la expresión de ARNm que codifica para los receptores de andrógenos, estradiol alfa y progesterona. La expresión de los receptores de andrógenos, de estrógenos alfa y de progesterona difiere entre los tejidos de cerebro y bazo, los resultados reflejan mecanismos sumamente complejos de regulación de la expresión génica que ejercen los esteroides sexuales sobre sus propios receptores.

La gonadectomía incrementó la expresión de los receptores andrógenos, de estrógenos alfa y progesterona en los ratones infectados.

La administración de testosterona, estradiol o DHEA moduló la expresión de los receptores lo que depende del sexo, de la gonadectomía y de la infección.

**Conclusiones.** El calibrar la técnica de PCR en tiempo real para analizar la expresión de ARNm que codifica para los receptores de andrógenos, de estrógenos alfa y progesterona constituye una herramienta útil para estudiar la función de los esteroides sexuales durante la infección con *Plasmodium*.

La expresión de los receptores estrógenos alfa, andrógenos y progesterona difiere entre los sexos y entre los tejidos de cerebro y bazo, los resultados reflejan mecanismos sumamente complejos de regulación de la expresión génica que ejercen los esteroides sexuales sobre sus propios receptores con los diferentes tratamientos.

## 2. INTRODUCCIÓN

La malaria o paludismo es la enfermedad infecciosa que provoca la mayor mortalidad en el mundo, cada año se detectan alrededor de 500 millones de nuevos casos (1) y ocasiona la muerte de aproximadamente un millón de personas en su mayoría niños menores de 5 años de edad (1). La incidencia de la enfermedad es igual en ambos sexos, sin embargo, los hombres desarrollan mayor patología y mortalidad que las mujeres.

Debido a que las principales diferencias entre machos y hembras se deben a las hormonas esteroideas, es probable que en la patología de la malaria estén involucradas estas hormonas; además se ha demostrado que la interacción de las hormonas sexuales sobre su receptor puede regular la expresión de diferentes genes de la respuesta inmune por ejemplo  $\text{NF}\kappa\beta$ (2).

Descifrar los mecanismos por los cuales las hormonas sexuales regulan el sistema inmune es sumamente importante debido a que cada vez se incrementa más el número de personas que toman anticonceptivos, que reciben terapia de remplazo hormonal, o bien que los ingieren porque están presentes en los alimentos. Por lo tanto, entender la fisiología y la interacción entre las hormonas sexuales y la función inmune y sus consecuencias patológicas puede ayudar a entender diversas enfermedades infecciosas donde se presenta dimorfismo sexual, también proveerá conocimientos para dirigir otras alternativas en su tratamiento.

Por lo anterior, en este proyecto desarrollamos una herramienta molecular para evaluar el efecto de la administración de las hormonas sexuales estradiol, testosterona y DHEA sobre la expresión del ARNm que codifica para los receptores de estrógenos alfa, andrógenos y progesterona en los tejidos de bazo y cerebro de ratones CBA/Ca infectados con *Plasmodium berghei* ANKA. Se analizó la expresión de esos receptores en grupos de ratones: a) sin infección, b) ratones a quienes solo se le administró el vehículo en el que se disolvieron las hormonas (aceite de ajonjolí), c) ratones intactos, d) ratones gonadectomizados y e) ratones gonadectomizados y reconstituidos con estradiol, testosterona y DHEA.

### 3. MARCO TEORICO

#### 3.1 Malaria

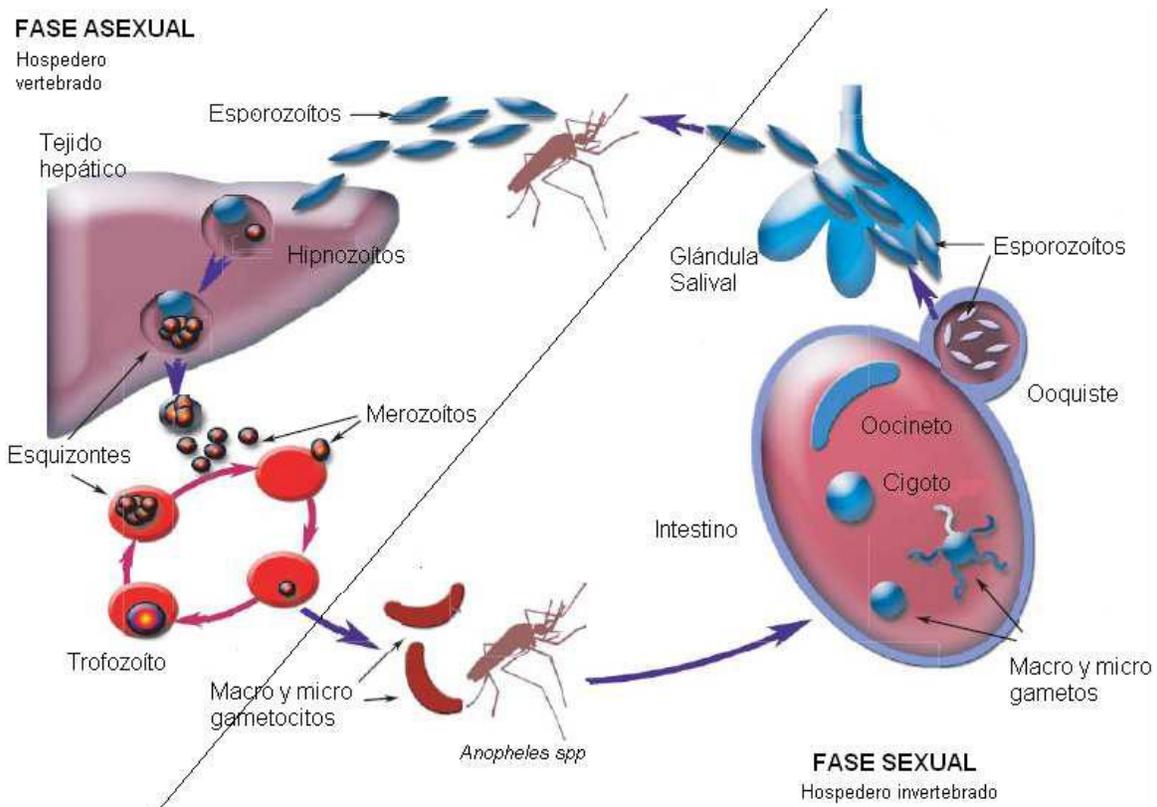
La malaria es una enfermedad parasitaria causada por protozoarios del género *Plasmodium*. Cinco especies infectan a los seres humanos (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi*), difieren de manera significativa en su capacidad para invadir subpoblaciones de eritrocitos: *P. vivax* y *P. ovale* sólo infectan células inmaduras (reticulocitos), mientras que *P. malariae* sólo invade células senescentes. Durante la infección por estas especies, no más de 1 al 2% de la población de células resultan afectadas. En contraste, *P. falciparum* invade eritrocitos sin importar la edad y produce parasitemias elevadas y cuadros clínicos más graves. Es probable que este fenómeno sea el resultado de las diferencias en los receptores en los eritrocitos disponibles para cada especie de *Plasmodium* (3).

#### 3.2 Ciclo de vida del parásito

El ciclo de vida del *Plasmodium* es complejo, comprende una fase asexual o esquizogonia en el hospedero humano, y una breve fase sexual obligatoria en el mosquito vector (Figura 1) (4).

En el humano, la infección comienza con la picadura del mosquito hembra del género *Anopheles* infectada, la cual introduce las formas del parásito denominadas esporozoítos, que circulan por corto tiempo en torrente sanguíneo e invaden las células hepáticas para formar los esquizontes tisulares que se reproducen asexualmente, lisan a los hepatocitos y liberan miles de merozoítos (10,000 a 30,000 merozoítos) que infectan a los glóbulos rojos. Dentro del glóbulo rojo, los merozoítos maduran a los estadios de anillo, trofozoíto y esquizonte eritrocítico. El esquizonte maduro rompe el eritrocito y libera merozoítos que posteriormente invadirán otros glóbulos rojos (Figura 1) (5).

Algunos de estos merozoítos sufren un proceso de diferenciación en formas sexuales denominadas microgametocitos y macrogametocitos, que son los estadios infectantes para el mosquito vector. Una vez el parásito entra al intestino medio del mosquito hembra *Anopheles*, ocurre la maduración y la fertilización de gametos que conducen a la formación del cigoto, el cual se convierte en una forma móvil, denominada ooquineto, que posteriormente se transforma en ooquiste. Esta última forma parasitaria contiene el producto meiótico y mitótico de un cigoto y da lugar a los esporozoítos que migran a las glándulas salivares del mosquito donde quedan listos para infectar al humano en una nueva ingesta sanguínea (Figura 1) (5).



**Figura 1: Ciclo de vida del *Plasmodium*.** Imagen modificada de Winzeler, 2008

### 3.3 Epidemiología

El paludismo se considera una de las zoonosis más común y grave del mundo; en el pasado la enfermedad se encontraba dispersa en el planeta. Ahora está confinada a las áreas tropicales más pobres de África, Asia y América latina. De acuerdo a la OMS, alrededor de la mitad de la población mundial está en riesgo de contraer la enfermedad. Durante el 2006 se registraron 247 millones de casos agudos de paludismo en el mundo de los cuales el 86% ocurrieron en África. El reporte mundial de esta enfermedad registró que todos estos casos que ocurrieron el 91 % fueron ocasionados por *falciparum*. Es un parásito que provoca 881,000 muertes, de las cuales el 85% correspondieron a niños menores de 5 años. Aunque el continente africano es el más afectado, se calcula que más de un tercio de los casos de paludismo clínico y un 3% en el continente americano(6).

En México, 58% de la superficie del territorio nacional corresponde a zonas endémicas al paludismo. Las áreas de alto riesgo comprenden los estados de

Chiapas, Tabasco, Campeche, Quintana Roo, Sinaloa, Chihuahua, Durango y Sonora(6).

### **3.4 Patología**

Las infecciones por *Plasmodium* inducen un amplio espectro de síntomas en el humano, desde parasitemias asintomáticas hasta enfermedades graves. Las manifestaciones clínicas en personas que adquieren por primera vez la infección son similares al inicio de otros procesos de infección generalizada, como fiebre malestar general, cefalea náuseas y vómito (6).

Después de algunos días empiezan a ocurrir los accesos palúdicos durante un determinado momento del día y tienen una duración de aproximadamente 60 minutos: en un inicio, el paciente tiene una sensación de frío intenso que le provoca escalofríos. Este periodo dura pocas horas y se acompaña de una caída de la presión, aceleración de pulso, cefalea, náuseas y vómito (6).

A esto le sigue una sensación de calor; de hecho se han presentado temperaturas de más de 38°C; el enfermo puede delirar y presentar sed intensa. Finalmente aparece el sudor generalizado y sensación de alivio; la orina se torna amarilla cetrina y el paciente queda con una sensación de debilidad. Todo el proceso puede extenderse de 8 a 12 horas. El hecho de que los eritrocitos infectados tiendan a adherirse al endotelio presente en los bazos sanguíneos conduce a que, además de los accesos palúdicos, ocurran manifestaciones cerebrales, renales, anemia grave entre otras(6).

La severidad de la enfermedad entre hombres y mujeres en el área de investigación clínica es muy importante ya que se ha observado que la infección con malaria induce diferentes cambios significativos entre machos y hembras por ejemplo: la pérdida de peso en machos es mayor en comparación con las hembras (7). Esto probablemente se relaciona a las diferencias dependientes del género ya que existe evidencia que las hormonas sexuales pueden modular la respuesta inmune (7).

### **3.5 Las hormonas**

Las hormonas son moléculas producidas por las glándulas y los tejidos endócrinos, que por lo general pasan a circulación y ejercen su acción en otros tejidos distantes del lugar de secreción (8). Algunas hormonas actúan sobre un tipo celular exclusivamente (tejido-diana específico), mientras que otras lo hacen sobre distintos tipos celulares, siempre que estos dispongan de receptores específicos. La respuesta celular dependerá, en cualquier caso, de su

programación genética previa, por lo que la misma hormona podrá generar distintas respuestas en diferentes tejidos (9).

El control de la secreción hormonal se realiza a través de sistemas cerrados mediante circuitos de retroalimentación (feedback). Cada circuito funciona encadenado con otro u otros, de manera que los cambios en uno de ellos determinará modificaciones en él o en los demás (9).

En función de sus características químicas, podemos distinguir 4 tipos fundamentales de moléculas con función hormonal; las aminas, proteínas y péptidos, hormonas esteroides y las prostaglandinas. Las hormonas esteroideas incluyen a las suprarrenales y a las sexuales (9). Las hormonas sexuales se clasifican en andrógenos y estrógenos, se sintetizan en las gónadas (ovarios y testículos) y en muy poca proporción, alrededor del 10%, en las glándulas suprarrenales (10).

### **3.5.1 El efecto de las hormonas en la respuesta inmune**

Los sistemas nervioso central, el endócrino y el inmune se conectan a través de redes de moléculas señal (neurotransmisores, hormonas y citocinas) que actúan sobre un grupo de receptores. Una de las consecuencias de esta interacción es el efecto que tienen los esteroides sexuales sobre el desarrollo y función de las células del sistema inmune (11), por ejemplo la localización de receptores de las hormonas sexuales en las células inmunes como linfocitos, macrófagos, granulocitos y mastocitos demuestran una conexión directa entre el sistema endócrino e inmune y de cómo los factores endócrinos pueden modular directamente la expresión de genes blanco en las células de la respuesta inmune (12).

En general las mujeres desarrollan niveles más elevados de anticuerpos y montan respuestas humorales más intensas después de las infecciones que los hombres. Además, en los modelos animales se ha demostrado que las hembras rechazan aloinjertos de forma más eficiente que los machos (13).

En la malaria, se presenta dimorfismo sexual los hombres y las mujeres responden diferente a la enfermedad (en general la sintomatología es más severa en los hombres que en las mujeres) (13). Es probable que las hormonas sexuales jueguen un papel importante en dirigir las diferencias en la respuesta inmune innata y la adaptativa que se observan entre ambos sexos en la malaria cerebral, lo cual se explicará más adelante (14).

### **3.5.2 Estrógenos**

Los estrógenos se sintetizan principalmente en los ovarios, de los cuales el estradiol es el que se secreta en mayor concentración (15), debido a esto tienen un papel significativo en la regulación de la función sexual femenina, sin embargo los estrógenos no son solo hormonas sexuales femeninas debido a que tienen funciones en machos y hembras (16).

Además de su papel central en la reproducción, los estrógenos también afectan los sistemas: nervioso central, esquelético, inmune y nervioso (16).

### **3.5.2.1 Receptor de estrógenos alfa**

Los efectos de los estrógenos requieren la interacción con sus receptores intracelulares los cuales regulan la transcripción de sus genes blanco a través de su unión a secuencias de ADN específicas (Figura 2) (17).

En ambos sexos los receptores de los estrógenos se distribuyen ampliamente en el cuerpo, el receptor de estrógenos alfa, se expresa predominantemente en los órganos reproductores (útero, mama y ovario), así como en el hígado y en el sistema nervioso central (18).

El receptor de estrógenos alfa también modula los mecanismos no genómicos ya que la interacción de receptor de estrógenos con determinadas proteínas conducen a la activación y represión de la transcripción, la integración de vías de señalización intracelular y el control del ciclo celular (Figura 2) (19).

### **3.5.2.2 Los estrógenos en la respuesta inmune**

Se ha demostrado que el tratamiento con estrógenos induce activación policlonal de los linfocitos B con un marcado incremento de autoanticuerpos característicos de las enfermedades autoinmunes. No obstante, los anticuerpos son importantes para la eliminación de diversas enfermedades infecciosas incluidas la malaria. Además, el  $17\text{-}\beta$  estradiol (E2) modula la respuesta inmune e interviene de forma indirecta sobre las células presentadoras de antígeno en donde junto con el  $\text{TNF-}\alpha$  induce la maduración anormal de las células dendríticas lo que genera respuestas inmunes tipo Th2 (20).

Los estrógenos también pueden mejorar la función inmune en las hembras ya que protegen contra la apoptosis a los linfocitos de sangre periférica (21, 22), y durante la infección del sistema nervioso central la expresión de moléculas MHC clase II

en los astrocitos, células endoteliales y en la microglia es mejor en hembras que en los machos (23), también se ha demostrado que la exposición de las células NK a  $17\beta$ -estradiol *in vitro* mejora su citotoxicidad (23), así como la síntesis de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  en los macrófagos (24).

En cuanto a los receptores de los estrógenos se expresan en varias células de tejidos linfoides así como en linfocitos y macrófagos en circulación (7, 25, 26).

Los efectos de los estrógenos sobre los factores de transcripción tales como NF- $\kappa$ B, son específicos de cada célula, los estrógenos pueden mejorar o inhibir la señalización de NF- $\kappa$ B dependiendo del tipo de célula (27, 28). Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares mediante los cuales los estrógenos afectan las funciones del sistema inmune no se han entendido completamente.

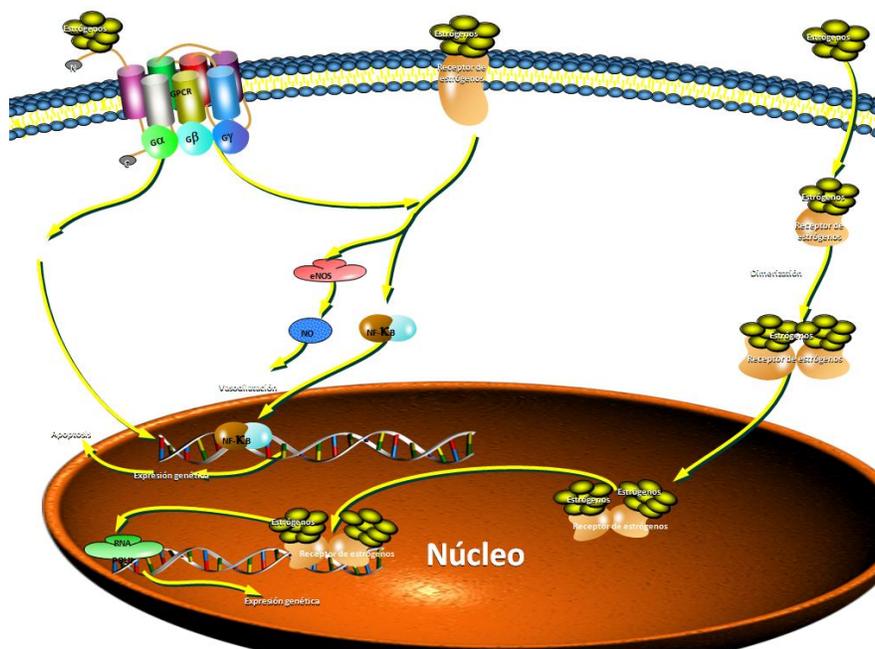


Figura 2: Vía de señalización de los estrógenos al unirse a su receptor. Modificado de <https://www.qiagen.com/us/shop/genes-and-pathways/pathway-details>

### 3.5.3 Andrógenos

Los andrógenos median diversas respuestas físicas y de desarrollo, entre las más importantes está la diferenciación y desarrollo de la pubertad masculina, el mantenimiento de la espermatogénesis y la regulación de las gonadotropinas masculinas (29).

El principal esteroide de los andrógenos es la testosterona, que se segrega en los testículos y media las funciones de los andrógenos con su metabolito la dihidrotestosterona (30).

### 3.5.3.1 Receptor de andrógenos

Los andrógenos ejercen la mayoría de los efectos conocidos a través de su interacción con receptores intracelulares específicos que funcionan como factores de transcripción, se activan cuando interaccionan con su ligando y entonces alteran la expresión de diferentes genes (Figura 3) (31).

Los receptores de los andrógenos se han identificado en varios tejidos linfoides como el timo, la médula ósea y el bazo de varias cepas de ratones, así como las primeras poblaciones de macrófagos (7, 25, 32).

La testosterona también puede tener efectos no genómicos en infecciones como en malaria por la unión a receptores de membrana acoplados a proteínas G sobre la superficie de la célula T y macrófagos (Figura 3) (32).

### 3.5.3.2 Andrógenos y el sistema inmune

Los efectos inmunosupresores de la testosterona pueden manifestarse como la inhibición de los mecanismos de señalización del receptor de andrógenos sobre los factores de transcripción como NF- $\kappa$ B que induce la síntesis de citocinas proinflamatorias (Figura 3) (2). Se ha observado que la estimulación de macrófagos murinos con testosterona *in vivo* reduce la síntesis de moléculas pro-inflamatorias como el TNF- $\alpha$  y la enzima óxido nítrico sintasa. En contraste, la testosterona incrementa la síntesis de citocinas anti-inflamatorias como IL-10 (33).

Existe también evidencia que la involución del timo se debe al menos en parte a la presencia de andrógenos, ya que los ratones castrados incrementan el tamaño del timo (13), esto incrementa las células B del bazo y la síntesis de autoanticuerpos así como la de IL-2 y de IFN $\gamma$  (10), una probable explicación es que se genera apoptosis mediada por andrógenos, debido a que pueden suprimir la respuesta inmune por incremento en la expresión y traducción de proteínas del estrés y factores apoptóticos (22, 34), pero también las citocinas como TGF- $\beta$  contribuyen a la involución del timo (10).

Adicionalmente, se ha descrito que cuando los ratones hembras infectadas con *P. chabaudi* se exponen a testosterona reducen la síntesis de anticuerpos,

disminuyen la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II en las células del bazo y generan un incremento de células linfoides CD8+ en bazo (35).

Alternativamente, los andrógenos pueden transformarse en estrógenos por la enzima aromatasa que se expresa en las paredes vasculares (15).

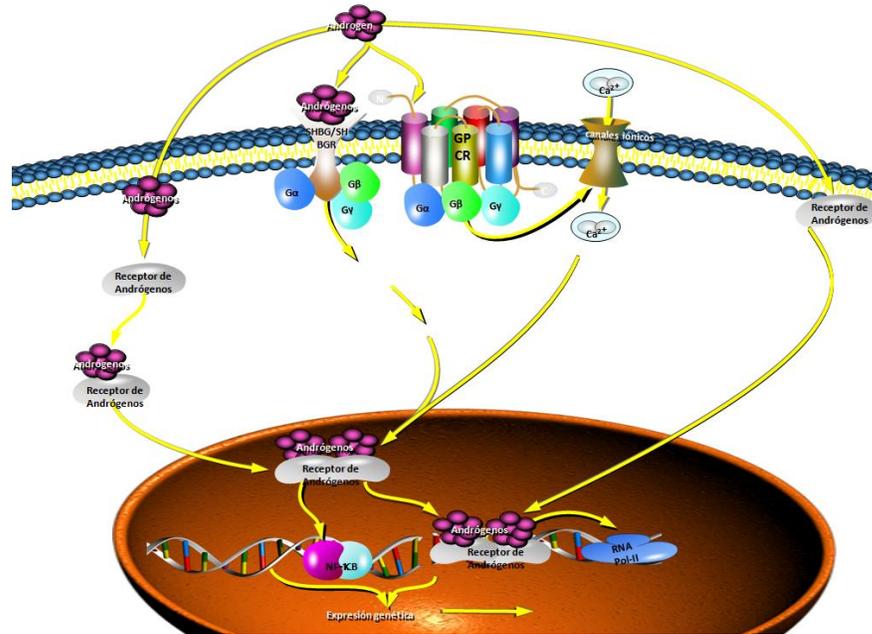


Figura 3: Vía de señalización de los andrógenos al unirse a su receptor. Modificado de <https://www.qiagen.com/us/shop/genes-and-pathways>

### 3.5.4 Progesterona

La funci6n principal de la progesterona es servir de precursor de los dem6s esteroides (8), en las mujeres su actividad, depende de la funci6n ov6rica en concordancia con los estr6genos (8). Esta hormona se produce en grandes cantidades por el cuerpo l6teo (gl6ndula temporal que se desarrolla a partir del fol6culo ovulatorio) y se pueden detectar concentraciones altas despu6s de la ovulaci6n, tambi6n se incrementa antes de la menstruaci6n. Las hormonas gonadales no son totalmente espec6ficas y la progesterona puede tener reacci6n cruzada al unirse a receptores de andrógenos para ejercer efectos androg6nicos o antiandrog6nicos (36).

La progesterona tiene varias acciones durante el embarazo; es importante su intervenci6n en el parto. Sirve adem6s como sustrato para la s6ntesis de glucocorticoides. Adem6s se ha sugerido su efecto como inmunomodulador ya que suprime la respuesta materna a los ant6genos fetales (8).

#### **3.5.4.1 Receptor de progesterona**

Los receptores de progesterona se han identificado en las células epiteliales, mastocitos, granulocitos (por ejemplo eosinófilos), macrófagos y linfocitos (7, 24, 37).

La progesterona también se puede unir a los receptores de los glucocorticoides, los cuales son más abundantes en el sistema inmune que los receptores de la progesterona y pueden presentar un mecanismo alterno para que la progesterona induzca cambios en la función inmune (24).

#### **3.5.4.2 Progesterona en la respuesta inmune**

La progesterona suprime la respuesta innata en particular la de los macrófagos y la actividad de las células NK, así como la traducción de señales vía  $\text{NF-}\kappa\beta$  (2, 24, 38-40). La progesterona puede inhibir la producción de óxido nítrico así como la producción de RNAm que codifica para  $\text{TNF-}\alpha$  en macrófagos murinos (38, 41, 42). La elevada concentración de progesterona durante el embarazo inhibe el desarrollo de la respuesta inmune tipo Th1 que puede conducir a un rechazo del feto y promover respuestas tipo Th2 así como la síntesis de IL-4 e IL-5. Además, la progesterona es una hormona anti-inflamatoria y también suprime la síntesis de anticuerpos (43).

#### **3.5.5 Dehidroepiandrosterona**

La dehidroepiandrosterona es una hormona esteroidea segregada en mayor cantidad por las glándulas suprarrenales en la zonas reticulares de la corteza cerebral, y en menor cantidad por el cerebro, la piel, los ovarios (células de la teca) y los testículos (44, 45).

Los niveles plasmáticos de la DHEA-S en las mujeres adultas son 10,000 veces más elevados que los de la testosterona y de 3,000 a 30,000 veces más altos que los del estradiol (E2), proporcionando así una gran reserva de sustrato para la conversión en los andrógenos y los estrógenos en los tejidos periféricos que poseen los mecanismos enzimáticos necesarios para transformar la DHEA en los esteroides sexuales activos. Es de interés puntualizar que a pesar de su menor concentración en el torrente sanguíneo, la DHEA presenta mayor actividad biológica que su forma sulfatada (44).

En los hombres, más del 50 % de las hormonas sexuales masculinas se derivan de la DHEA; mientras que en las mujeres, aproximadamente el 70 % de las hormonas sexuales femeninas derivan de ella antes de la menopausia, y posteriormente en un 100 % (postmenopausia). La producción de la DHEA en hombres es de aproximadamente de 30 a 50 mg al día, mientras que en las mujeres solo se produce la mitad de esta concentración de DHEA al día (44, 46, 47).

### 3.5.5.1 Dehidroepiandrosterona y la función inmune

La DHEA actúa como un amortiguador de los efectos negativos de las hormonas secretadas en situaciones de estrés; estimula el sistema inmunológico; disminuye la grasa del cuerpo y el colesterol; aumenta la masa muscular; es neuroprotector del sistema nervioso central (SNC) y tiene efecto antiinflamatorio (45).

Se ha observado que DHEA también inhibe la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de diferentes especies que puede potenciar el decremento intracelular de glutatión. Por lo tanto esto puede tener acciones antiparasitarias contra el *Plasmodium* spp.(48).

De esta forma el género se convierte en uno de los factores de riesgo de mayor importancia epidemiológica para el desarrollo de autoinmunidad y de enfermedades infecciosas. Por lo tanto, entender la fisiología y la interacción entre las hormonas sexuales, la función inmune y sus consecuencias patológicas puede ayudar a comprender diversas enfermedades infecciosas donde se presenta dimorfismo sexual.

## 3.6 PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una de las más poderosas tecnologías en biología molecular. Con esta metodología se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico. El método es tan sensible que la amplificación puede iniciarse en teoría a partir de una sola molécula de ADN y se basa en la facilidad que tiene la molécula de ADN para desnaturalizarse y renaturalizarse así como la capacidad que tiene la *Taq* polimerasa de sintetizar una nueva cadena (49).

El método utiliza un par de oligonucleótidos sintéticos, cada uno hibrida a una hebra de ADN blanco de doble cadena, los oligonucleótidos son responsables de la amplificación específica del fragmento deseado. Su elección y diseño debe ser

muy cuidadoso. Idealmente la concentración aceptable de cada oligonucleótido oscila entre 0.05 y 1  $\mu\text{M}$  (50).

Al igual que la concentración de los oligonucleótidos, la concentración de iones magnesio es importante en la reacción ya que funciona como cofactor para la actividad enzimática de la mayoría de las ADN polimerasas. Para una reacción estándar se recomienda utilizar una concentración de final de 0.5 a 2.5  $\mu\text{M}$  (50).

Las temperaturas de desnaturalización (92° a 98°C) y de extensión (70 a 74°C) generalmente son estándares para todas las reacciones. La temperatura que tiene el efecto más crítico en la especificidad es la de alineación, la cual está determinada por la temperatura media de fusión (50).

### **3.6.1 Optimización de la PCR**

No existen las condiciones de reacción que sirvan para todas las amplificaciones, por lo que se deben establecer de forma experimental para cada caso. Las variables de mayor importancia que se deben considerar para obtener un resultado satisfactorio son: la concentración de magnesio, la temperatura y tiempo de alineación, la concentración de la enzima, el ajuste del número de ciclos y la concentración de los dNTP's, aunque existen otros parámetros que también son importantes como: la concentración y pureza del ADN complementario (ADNc), así como la naturaleza química de las sondas que se desean utilizar dado que influyen en la eficiencia y estandarización de la técnica (51).

La concentración de magnesio: puede afectar la unión de los iniciadores al ADN blanco, así como la especificidad de la reacción y la aparición de dímeros de primers y así perjudicar tanto la actividad como la especificidad de la enzima.

La temperatura y el tiempo de alineación del iniciador al ADN: depende la composición de bases de los oligos, del número de nucleótidos, de la longitud de los mismos y de la concentración. Estas condiciones se establecen experimentalmente para cada caso, pero se utiliza con buenos resultados una temperatura de 5 a 15 °C inferior a la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de los oligos. El incremento de la temperatura de alineación aumenta la discriminación contra iniciadores inespecíficos y reduce la incorporación errónea de nucleótidos, esto aumenta a la especificidad de la amplificación (51).

La concentración de la enzima: los requerimientos de enzima pueden variar con respecto a determinados ADN blanco o iniciadores. Las concentraciones de enzima demasiado bajas producirán amplificaciones insuficientes, mientras que concentraciones demasiado altas pueden producir amplificaciones inespecíficas.

Desoxiribonucleótidos trifosfatos: los cuatro desoxiribonucleótidos se deben utilizar a concentraciones equivalentes. Concentraciones elevadas o desequilibradas de nucleótidos tienden a aumentar la tasa de incorporación errónea de los nucleótidos durante la etapa de polimerización (51).

### 3.6.2 PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real permite la amplificación y cuantificación de una secuencia específica de ácido nucleído con la detección de los productos de PCR. La cuantificación de ADN, ADNc, o ARN molde se logra fácilmente mediante la determinación del ciclo umbral (Ct), cuando se detectan los primeros productos de PCR (52).

Esta técnica es adecuada para diversas aplicaciones, por ejemplo el análisis de la expresión de genes, la determinación de la carga viral, la detección de organismos genéticamente modificados, la identificación del genotipo o polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) y la discriminación alélica (52).

Los productos de la reacción se detectan con compuestos fluorescentes que se unen a la doble cadena de ADN o bien con sondas de secuencia específica marcada con un fluoróforo. La fluorescencia se mide en cada ciclo ya que es directamente proporcional a la cantidad del producto de PCR (52).

Los datos que se obtienen se cuantifican absolutamente y/o relativamente. Para la primera se requiere de una curva de calibración interna, mientras que la cuantificación relativa es una comparación de un gen blanco con uno de referencia.

Para este trabajo se utilizó el método del  $\Delta\Delta C_t$ , en el cual se requiere de la muestra, y la amplificación de un gen de interés y un gen de referencia.

Para el modelo de la eficiencia calibrada se requiere calcular la eficiencia con el empleo de diluciones seriadas de ADN y se amplifica el gen de interés y el gen de referencia. Se obtiene el valor denominado Ct que se gráfica contra el logaritmo de la concentración (53).

Se obtiene la pendiente de la recta la cual se introduce a la siguiente ecuación para determinar la eficiencia

$$E_{interes} = 10^{-1/pendiente} - 1 \times 100$$

$$E_{referencia} = 10^{-1/pendiente} - 1 \times 100$$

Para realizar la cuantificación relativa se requiere de la siguiente ecuación

$$\text{Cuantificación relativa} = \frac{E_{interes} \Delta Ct_{interes}}{E_{referencia} \Delta Ct_{referencia}}$$

Donde

$$E = \text{eficiencia}$$

$$\Delta Ct_{interes} = Ct_{control} - Ct_{tratamiento}$$

$$\Delta Ct_{referencia} = Ct_{control} - Ct_{tratamiento} \text{ (54).}$$

### 3.7 Electroforesis

La electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida es el método estándar para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN. Se basa en la capacidad de las macromoléculas cargadas para desplazarse en un campo eléctrico, con velocidad proporcional a su carga e inversamente proporcional a su tamaño (55).

La movilidad de la molécula de ácido nucleico dependerá fundamentalmente de: su tamaño, concentración del gel, la conformación del ácido nucleico, la corriente aplicada al gel, la composición de bases y la temperatura (55)

La molécula de ADN tiene carga negativa debido a su esqueleto de grupos fosfatos y en un campo eléctrico se aleja del polo negativo (cátodo) y se dirige hacia el polo positivo (ánodo). La separación de los fragmentos de ADN de doble cadena se realiza en geles de agarosa o poliacrilamida; en ambos casos el gel se prepara con distintas concentraciones en función al tamaño de los fragmentos de ADN que se requiere separar (55).

Una vez separadas las moléculas de ADN se visualizan normalmente por la fluorescencia de algunos compuestos que se unen a ellas. El más utilizado es el bromuro de etidio cuya fluorescencia aumenta cuando se une al ADN y se intercala entre las pares de bases, como resultado, cuando el gel se ilumina con la luz ultravioleta, las regiones del gel que contienen ADN fluorescen con mayor intensidad que las regiones del gel sin ADN (56).

#### 4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La malaria es un problema de salud pública a nivel mundial, anualmente cobra la vida de aproximadamente 700 mil personas. A pesar de la intensa investigación sobre los mecanismos de respuesta inmune, no se ha logrado obtener una vacuna efectiva que elimine a la malaria. La incidencia es igual en ambos sexos, sin embargo, los hombres desarrollan mayor patología y mortalidad que las mujeres. Dado que las principales diferencias entre los sexos se deben a las hormonas sexuales, es probable que en la patología de la malaria las hormonas esteroideas estén involucradas, se ha demostrado que la interacción de las hormonas sexuales sobre su receptor puede regular la expresión de diferentes genes de la respuesta inmune. Por lo anterior, en este proyecto desarrollamos una herramienta molecular para evaluar el efecto de la administración de las hormonas sexuales estradiol, testosterona y DHEA sobre la expresión del ARNm que codifica para los receptores de estrógenos alfa, andrógenos y progesterona en ratones CBA/Ca infectados con *Plasmodium berghei* ANKA.

## 5 HIPÓTESIS

La administración de estradiol o testosterona disminuirá la expresión de los receptores de estrógenos alfa y andrógenos respectivamente. La administración de DHEA incrementará la expresión de ARNm de los receptores estrógenos alfa, andrógenos y progesterona. Mientras que la infección disminuirá la expresión de los receptores de andrógenos y progesterona y aumentara la expresión de estrógenos alfa.

## 6 OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo general

- Estandarización de la técnica de PCR en tiempo real para amplificar los genes del receptor de estrógenos alfa, del receptor de andrógenos y el receptor de progesterona en ratón, para evaluar el efecto de administrar los esteroides sexuales estradiol, testosterona y DHEA sobre la expresión de estos receptores en la infección con *Plasmodium berghei* ANKA.

### 6.2 Objetivos particulares

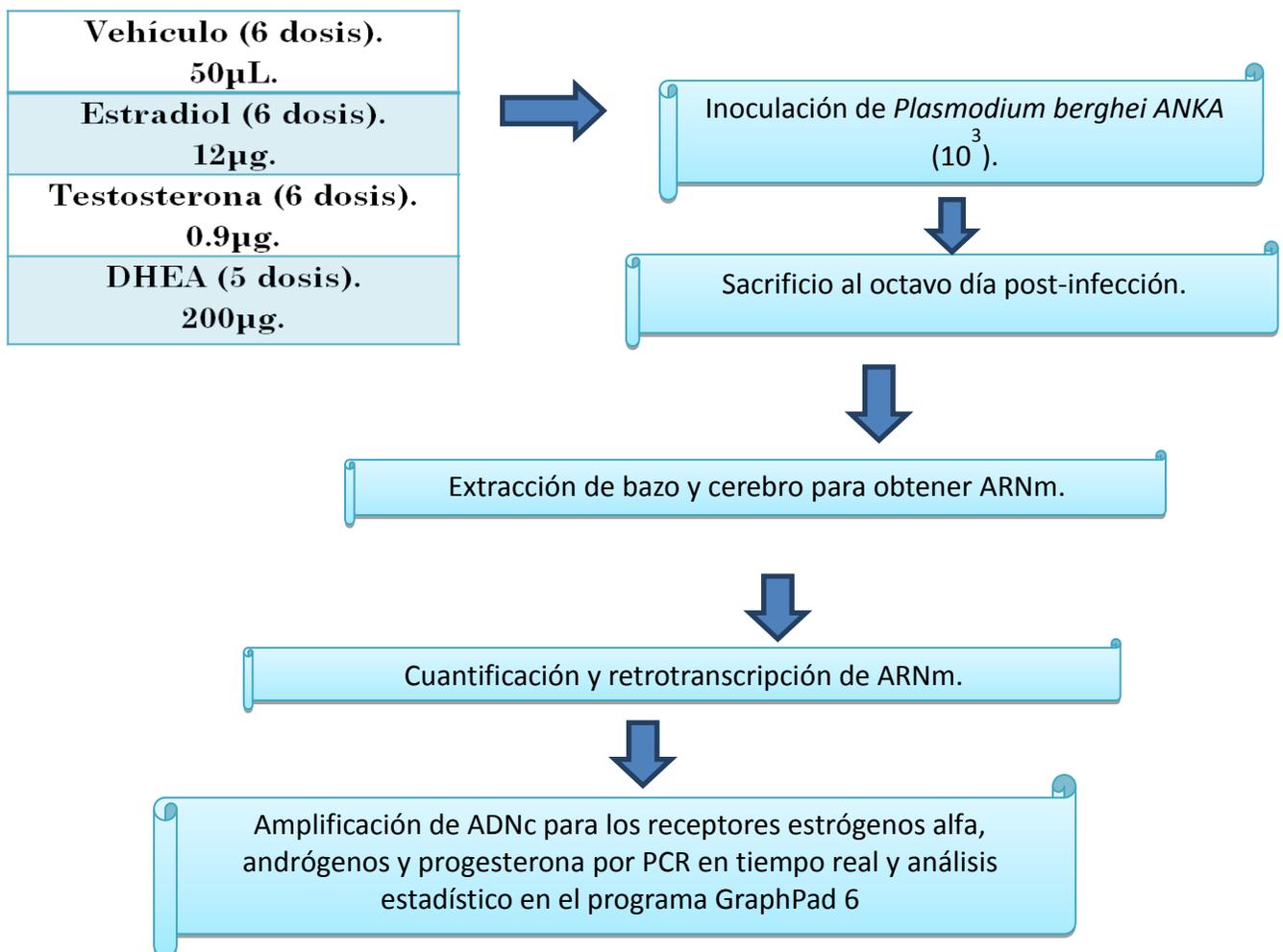
- Calibrar la técnica de PCR en tiempo real para los receptores de estrógenos alfa, andrógenos y progesterona.
- Evaluar la expresión de los receptores: estrógenos alfa, andrógenos y progesterona, en ratones gonadectomizados, reconstituidos con testosterona, estradiol o DHEA e infectados con *Plasmodium berghei* ANKA.
- Evaluar la expresión de los receptores: estrógenos alfa, andrógenos y progesterona, en ratones sin infección, tratados con testosterona, estradiol o DHEA.
- Evaluar su expresión de los receptores: estrógenos alfa, andrógenos y progesterona, en ratones CBA/Ca infectados con *Plasmodium berghei* ANKA, tratados con testosterona, estradiol o DHEA.

## 7 DISEÑO EXPERIMENTAL

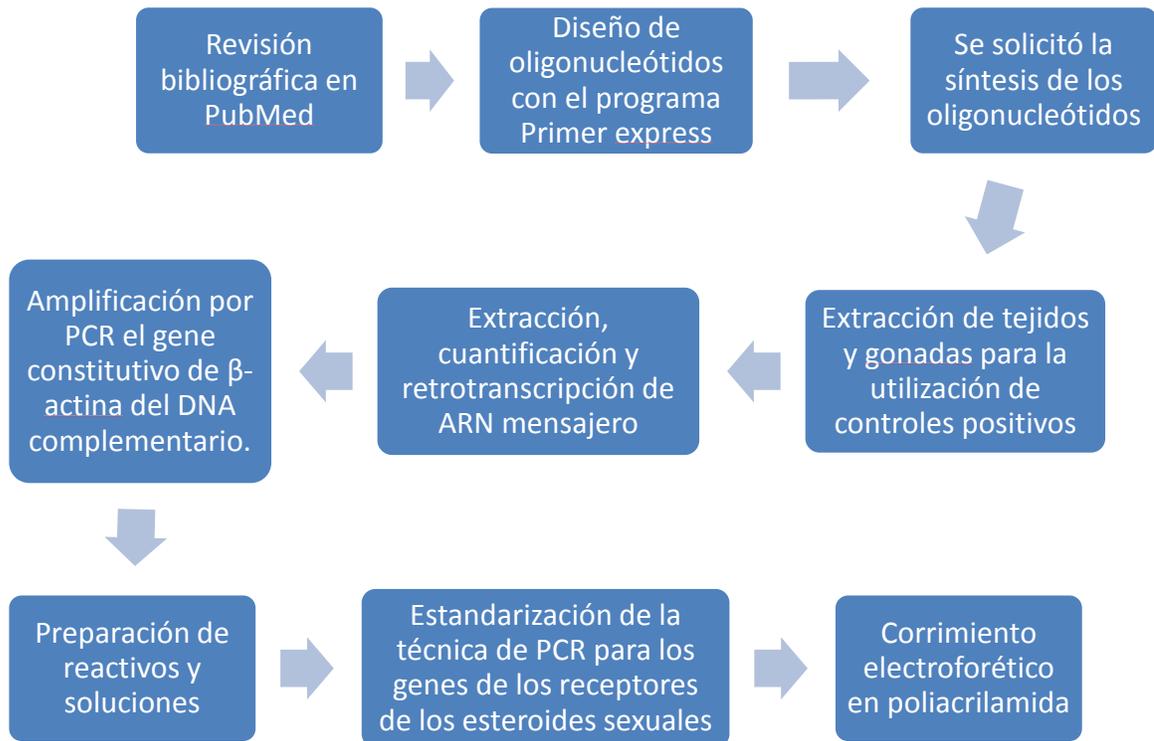
### 7.1 Población

- Ratones singénicos CBA/Ca machos y hembras de 8 semanas de edad, mantenidos en condiciones libres de patógenos.
- Ratones singénicos CBA/Ca machos y hembras de 4 semanas de edad, que se les extrajo las gónadas al mes de nacidos.

### 7.2 Diseño experimental para la administración de hormonas



### 7.3 Diseño experimental para la estandarización de la técnica de PCR



### 7.4 Variables

#### Variables dependientes

- Estandarización de la técnica de PCR de los receptores
- Expresión de los receptores de estrógenos alfa, progesterona y andrógenos

#### Variables independientes

- Infección

#### Diseño estadístico

Se utilizó el programa GraphPad Prism 6 para realizar el análisis estadístico el cuál consistió en una prueba de ANOVA de una vía, posteriormente se realizó el

análisis de varianza con la prueba de Tukey, se consideró un valor de  $p \leq 0.05$  como significativo.

## 7.5 Materiales y equipo

### Material biológico

- Ratones CBA/Ca machos y hembras de 8 semanas de edad, mantenidos en condiciones libres de patógenos y ratones machos y hembras de 4 semanas de edad a los cuales se les extrajeron las gónadas.
- Eritrocitos de ratón parasitados con la cepa *Plasmodium berghei* ANKA conservados en nitrógeno líquido, donado por el Dr. William Jarra del National Institute for Medical Research, Londres, Inglaterra.

### Material de laboratorio

- Portaobjetos
- Tijeras de disección
- Guantes de hule de látex
- Tela organza
- Gorros y botas para áreas estériles
- Tubos Falcon: 15 y 50 mL estériles
- Cajas Petri de 10 cm de diámetro.
- Tubos Eppendorf de 1.5 mL nuevos y estériles
- Puntas para micropipetas: 10, 200, 1000  $\mu$ L, nuevas, con filtro, libre de nucleasas y estériles

### Reactivos

- Agua desionizada, Theisier
- Agua DEPC
- Agua bidestilada millipore
- Alcohol isoamílico Sigma
- Amortiguador para retrotranscripción 5X (5X first strand buffer), Promega
- Bis acrilamida, Sigma
- Bromuro de etidio Sigma
- Cloruro de magnesio, Sigma
- dNTP's Invitrogen
- dTT (Promega)
- EDTA, Sigma
- Etanol absoluto, Merck

- Gelatina Sigma
- Inhibidor de RNAsa Promega
- Isopropanol Sigma
- Marcador de peso molecular Invitrogen
- Matanol JT BAKER
- Oligo dT (Promega)
- Persulfato de amonio Sigma
- Retrotranscriptasa MMLV-RT (Promega)
- SDS ( Dodecilsulfato de sodio ) Sigma
- Taq polimerasa (AmpliTaq DNA polimerase, Applied Biosystems)
- TEMED (Sigma)
- Tripure (Roche)
- Oligonucleótidos iniciadores para la amplificación de los genes

a) Receptor de andrógenos

Sonda [CY3]TGGCGGTCCTTCACTAATGTCA [BHQ2]

Secuencia de oligonucleótido sentido TGGGACTGATGGTATTTG

Secuencia de oligonucleótido antisentido ATGCGGTAATCATTGAAA

b) Receptor de estrógenos Receptor de estrógenos alfa

Sonda [FAM]CATCCAACAAGGCACTGACCATC[BHQ1]

Secuencia de oligonucleótido sentido GCACACTAAGAAGAATAGC

Secuencia de oligonucleótido antisentido GAAGGATCATATTCAGAATAGA

c) Receptor de progesterona PR

Sonda [FAM]TACAACAGGCTACTACACAGGCTATG [BHQ1]

Secuencia de oligonucleótido sentido CCATGAGAAGGGAAGAAA

Secuencia de oligonucleótido antisentido TGCACATCACATTTTGAC

d) B-actina

Secuencia de oligonucleótido sentido CTATGCTCTCCCTCACGCCATC

Secuencia de oligonucleótido antisentido

CGGGTCAGGTAGTCTGTCAGGTCC[JOE]G

## Equipo

- Campana de flujo laminar Veco
- Congelador Nieto
- Espectrofotómetro UV WPA
- Microcentrifuga Eppendorf 5415 C
- Micropipetas Eppendorf 2.5, 10, 20, 100 1000
- Refrigerador May Tag
- Tanque de nitrógeno líquido 34 XT Taylon-Wharton
- Vortex Genie 2 Digger
- Utracongelador -70°C REVCO, Legaci refrigerador System
- Autoclave Tuttnauer Brinkmann 2540 M
- Termociclador PCR tiempo real Applied Biosystem
- Termociclador Mastercycler gradient Eppendorf
- Software PCR tiempo real, 7500 sequence Detection System

## 7.6 Métodos

### 7.6.1 Administración de hormonas

Para evaluar el efecto de la testosterona, estradiol y DHEA se utilizaron 5 grupos de ratones CBA/Ca.

El primer grupo estuvo constituido por 30 ratones (15 machos y 15 hembras), diez de los cuales se gonadectomizaron (GX), otros 10 ratones se dejaron intactos con la administración del vehículo (aceite de ajonjolí). Cada subgrupo se infectó con  $1 \times 10^3$  eritrocitos parasitados con *P. berghei* ANKA y los últimos diez ratones se dejaron intactos con la administración del vehículo, este subgrupo se utilizó como control.

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

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

El cuarto grupo fue para evaluar el efecto del 17- $\beta$  estradiol se procedió de igual forma que para la testosterona, la dosis fue de 12  $\mu$ g de estradiol administrado vía subcutánea dos veces por semana durante 3 semanas.

El quinto grupo fue para evaluar el efecto de DHEA a 10 ratones machos y a 10 hembras se les administraron 200  $\mu$ g del dihidroepiandrosterona diariamente por cinco días. Posteriormente, a 5 ratones machos y a 5 hembras se les infectó con *P. berghei* ANKA y se utilizaron como controles de la infección.

En el día 8 post infección todos los ratones se sacrificaron y se les extrajo el cerebro y bazo para determinar la expresión de ARN mensajero de los genes que codifican para los receptores de: estradiol alfa, andrógenos y progesterona.

### **7.6.2 Infección con *Plasmodium***

Los grupos de ratones CBA/Ca se inocularon intravenosamente con  $1 \times 10^3$  eritrocitos infectados con *Plasmodium berghei* ANKA.

### **7.6.3 Extracción de ARN**

- El día 8 pos-infección los ratones se sacrificaron por dislocación cervical.
- Se extrajo el bazo y el cerebro.
- El bazo se maceró haciéndolo pasar por una tela de Nylon con el embolo de una jeringa estéril y PBS libre de calcio y magnesio, se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante.
- Al tejido de cerebro se le agregaron 200  $\mu$ L de PBS y se sónico durante 10 segundos.
- Se utilizaron 500  $\mu$ L de ese tejido y 200  $\mu$ L de reactivo de Tripure respectivamente y se agitaron vigorosamente.
- Se adicionaron 100  $\mu$ L de la mezcla cloroformo alcohol isoamílico (49:1) a cada tejido y se agitó en vortex por 10 minutos.
- Se centrifugó a 14000 rpm durante 15 minutos.
- Se transfirió la fase acuosa a otro tubo sin tocar la interfase.
- Se adicionó un volumen igual de isopropanol previamente enfriado a -20°C
- Se centrifugaron los tubos a 14000 rpm durante 15 minutos
- Se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 500  $\mu$ L de etanol al 80% en agua DEPC enfriado previamente a -20°C
- Las muestras se centrifugaron a 14000 rpm durante 15 minutos
- Se desechó el sobrenadante

- Se dejó secar el botón a temperatura ambiente.

#### 7.6.4 Hidratación y cuantificación de ARN

1. Las muestras se hidrataron con 20  $\mu\text{L}$  de agua DEPC al 0.1% estéril.
2. Se agitaron por 5 minutos y en caso de no disolverse se calentaron a 60°C por 5 min.
3. Se agregó 1  $\mu\text{L}$  de ARN en un tubo Eppendorf y se adicionaron 199  $\mu\text{L}$  de agua biodestilada estéril (dilución 1:200)
4. Se determinó la absorbancia a 260 nm
5. Se calculó la concentración de ARN en  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de acuerdo a la siguiente fórmula.

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

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

#### 7.6.5 Retrotranscripción

- Se retrotranscribieron 1.5  $\mu\text{g}$  de ARN
- En un tubo Eppendorf se adicionó agua estéril, el oligo dT y el volumen calculado de ARN.
- Se incubó a 65°C por 5 minutos y se centrifugó a 14000 rpm durante 5 segundos se colocó en hielo y se adicionaron 10  $\mu\text{L}$  con la mezcla de reacción (Enzima MMLV-RT, dNTP's, inhibidor de ARNasa, dTT y amortiguador de retrotranscripción).
- Se incubó a 37°C por una hora y posteriormente a 95°C durante 5 minutos en el termociclador.
- Se adicionaron 80  $\mu\text{L}$  de agua DEPC y se almacenó a -70°C hasta su uso.

#### 7.6.6 Estandarización de la técnica de PCR para los receptores de esteroides

Se realizó una búsqueda bibliográfica en PubMed para obtener la secuencia de ARN mensajero para los receptores de las siguientes hormonas sexuales:

estrógenos alfa (EsR- $\alpha$ ), estrógenos beta (E $\beta$ ), andrógenos (AR) y progesterona (PR). Se utilizó el programa Primer express para diseñar los oligonucleótidos específicos para cada gen. Se calculó a temperatura de alineación y se enviaron las secuencias a sintetizar. Para generar los controles positivos, se extrajo el ARN de hipotálamo, hipocampo, de ovarios y próstata de ratones CBA/Ca, se cuantificó, se retrotranscribió y el ADN complementario así obtenido se utilizó como control positivo para calibrar los juegos de oligos específicos para cada receptor. Como gen de referencia se utilizó  $\beta$ -actina. Se calcularon las diluciones de primers y las soluciones de los reactivos a utilizar, posteriormente se determinaron las condiciones óptimas de las concentraciones de magnesio, DMSO, ADNc, sonda, enzima, fluorocromo de referencia, oligos para cada gen y se analizaron los diferentes tejidos. También se determinaron las temperaturas óptimas de alineación así como el número de ciclos para lograr una eficiencia cercana al 100%. Además, se probaron distintas concentraciones de Sybr Green y Evagreen.

#### **7.6.7 Amplificación por PCR en tiempo real**

Se preparó la mezcla de reacción específica para cada receptor como se muestra en la Tabla 1 con los siguientes reactivos: agua doble destilada estéril, cloruro de magnesio, *Taq* polimerasa, oligonucleótidos sentido y antisentido específicos para cada gene, fluorocromo de referencia pasiva (ROX) y dNTP's (200  $\mu$ M), KCl 50mM y gelatina 200  $\mu$ M. Se adicionó la muestra de ADNc y se colocó en el termociclador de PCR en tiempo real. Se utilizaron los programas de amplificación que se muestran en las Tablas 3 y 4. Cada muestra se amplificó por duplicado.

## **8. RESULTADOS**

### **8.1 Estandarización de la técnica de PCR en tiempo real**

Para estandarizar las condiciones de amplificación del gen del receptor de estrógenos beta se probaron diferentes sondas y se modificaron las temperaturas de alineación así como los tiempos y el programa de amplificación. Se analizaron diferentes concentraciones de oligos, de cloruro de magnesio y de aditivos como DMSO. No obstante no se logró obtener una amplificación adecuada para ese gen.

Originalmente, los primers se diseñaron para realizar una reacción múltiple con los genes que presentaban fluorocromos diferentes, sin embargo al intentar realizar la reacción múltiple, las eficiencias decrecían, por lo que no se continuó con el multiplex. Además, se probaron diferentes temperaturas de alineación. Para corroborar que el producto de amplificación correspondía al peso molecular esperado, los amplicones se sometieron a electroforesis en acrilamida. Los resultados de las condiciones óptimas para los reactivos de los receptores de esteroides se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1. Condiciones óptimas para cada gen**

<b>Reactivos</b>	<b>[ ]/Rx AR</b>	<b>[ ]/Rx EsR-<math>\alpha</math></b>	<b>PR</b>
Agua MQ	-----	-----	-----
Amortiguador 10X	1X	1X	1X
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	3 mM.	3 mM.	3 mM.
TAQ 5U/ $\mu$ L.	0.03 U/ $\mu$ L.	0.03 U/ $\mu$ L.	0.03 U/ $\mu$ L.
ROX 50x	0.1X	1x	1x
Oligonucleótido forward [15 $\mu$ M.]	0.3 $\mu$ M.	0.3 $\mu$ M.	0.3 $\mu$ M.
Oligonucleótido reverse [15 $\mu$ M.]	0.3 $\mu$ M.	0.3 $\mu$ M.	0.3 $\mu$ M.
Sonda TaqMan [500nM]	0.1 $\mu$ M	0.1 $\mu$ M	0.1 $\mu$ M
DMSO 99.97%	3%	-	-
DNA <sub>c</sub>	15 ng/ $\mu$ L.	15 ng/ $\mu$ L.	15 ng/ $\mu$ L.
El volumen total por reacción es de 10 $\mu$ L			

Se calibraron las condiciones óptimas de amplificación para cada gen. Las temperaturas de alineación, los tiempos y el número de ciclos en los que se obtuvieron las eficiencias más altas para el receptor de andrógenos y para el de estrógenos se presentan en la Tabla 2.

**Tabla 2. Programa de amplificación para AR y EsR- $\alpha$ .**

CICLAJE		
	Temperatura	Tiempo
1	95°C	5 minutos
2	95°C	30 segundos
3	51.4°C	30 segundos
4	40°C	30 segundos
5	Repetir del punto 2 al 3 45 veces	

Las condiciones óptimas en el programa de amplificación para el receptor de progesterona se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3. Programa de amplificación para PR**

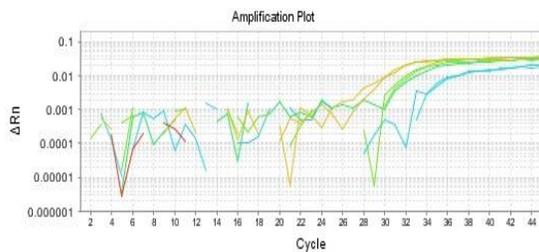
CICLAJE		
	Temperatura	Tiempo
1	95°C	5 minutos
2	95°C	30 segundos
3	52°C	30 segundos
4	40°C	30 segundos
5	Repetir del punto 2 al 3 45 ciclos	

## Umbral, eficiencia y especificidad de las amplificaciones para los genes de los receptores de estrógenos alfa, andrógenos y progesterona.

Los resultados de las curvas de amplificación en tiempo real para cada receptor; la eficiencia de la amplificación y  $R^2$  para cada curva, así como el corrimiento electroforético de los amplicones para los receptores de andrógenos, estrógenos y progesterona se muestran en las Figuras 4, 5 y 6 respectivamente.

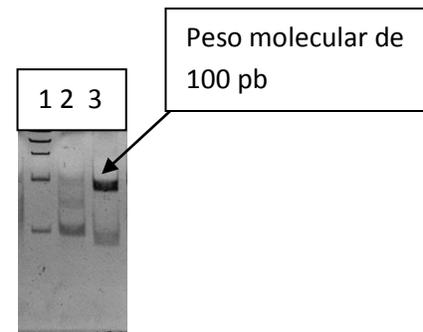
### Curva de la amplificación del gen del receptor de andrógenos

A



Umbral	Eficiencia	$R^2$
0.001164	100.496	0.948

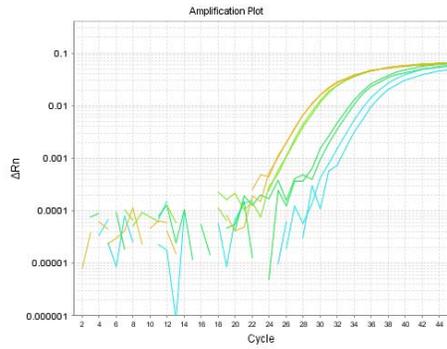
B



**Figura 4. Calibración de la reacción para la amplificación del receptor de andrógenos.** A) Curva de la amplificación en PCR tiempo real para el gen que codifica para el receptor de andrógenos, se graficó el número de ciclos contra unidades arbitrarias de fluorescencia del control positivo (testículo de ratón CBA/Ca), se amplificaron diluciones seriadas del ADNc; B) Electroforesis en acrilamida al 10% del producto de amplificación. Carril 1 marcador de peso molecular de 50 pares de bases, carril 2 Blanco, carril 3 amplicón que corresponde a 100 pares de bases.

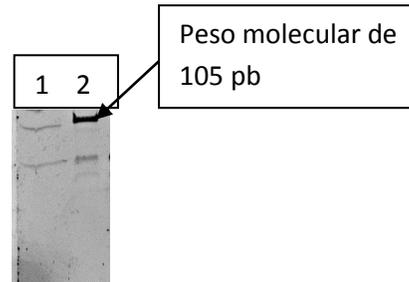
## Curva de amplificación del gen de receptor de estrógenos alfa

A



Umbral	Eficiencia	$R^2$
0.0098	99.375	0.915

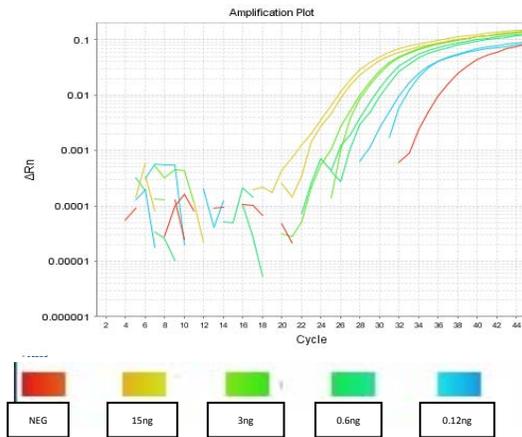
B



**Figura 5. Calibración de la reacción para la amplificación del receptor de estrógenos alfa** A) Curva de la amplificación en PCR tiempo real para el gen que codifica para el receptor de estrógenos alfa, se graficó el número de ciclos contra unidades arbitrarias de fluorescencia del control positivo (testículo de ratón CBA/Ca), se amplificaron diluciones seriadas del ADNc; B) Electroforesis en acrilamida al 10% del producto de amplificación. Carril 1 marcador de peso molecular de 50 pares de bases, carril 2 amplicón que corresponde a 105 pares de bases.

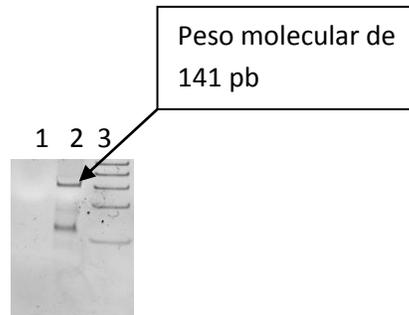
## Curva de amplificación del gen de receptor de progesterona

A



Umbral	Eficiencia	R <sup>2</sup>
0.006892	105.798	0.961

B

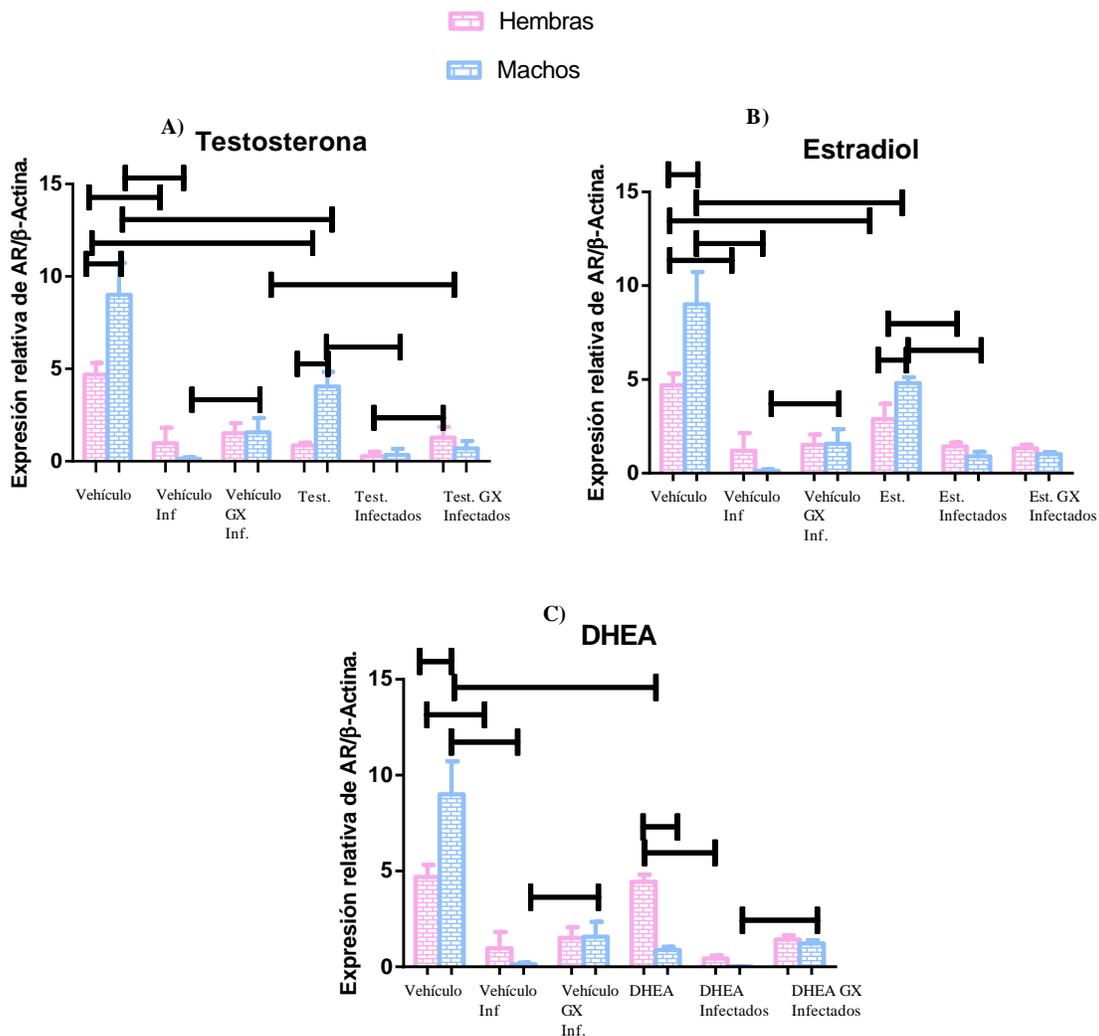


**Figura 6. Calibración de la reacción para la amplificación del receptor de progesterona** A) Curva de la amplificación en PCR tiempo real para el gen que codifica para el receptor de progesterona, se graficó el número de ciclos contra unidades arbitrarias de fluorescencia del control positivo (testículo de ratón CBA/Ca), se amplificaron diluciones seriadas del ADN; B) Electroforesis en acrilamida al 10% del producto de amplificación. Carril 1 Blanco, carril 2 amplicón que corresponde a 141 pares de bases, carril 3 marcador de peso molecular de 50 pares de bases.

## 8.2 Expresión relativa del gen que codifica para el receptor de andrógenos en cerebro

En general, la expresión de ARNm para el receptor de andrógenos fue mayor en los machos que en las hembras, la infección disminuyó significativamente la expresión del receptor de andrógenos en ambos sexos; mientras que la gonadectomía incrementó la expresión del receptor únicamente en los machos infectados en comparación a los ratones machos intactos infectados tratados con el vehículo. La administración de testosterona en los ratones no infectados disminuyó la expresión del receptor en ambos sexos. En las hembras gonadectomizadas e infectadas la testosterona incrementó la expresión del receptor de andrógenos mientras que no generó cambios en los machos gonadectomizados e infectados (Figura 7A). La administración de estradiol disminuyó la expresión del receptor de andrógenos tanto en machos como en hembras no infectadas. La administración de estradiol en los ratones gonadectomizados no modificó la expresión del receptor de andrógenos en

comparación a los ratones intactos infectados tratados con estradiol (Figura 7B). La administración de DHEA disminuyó la expresión del receptor de andrógenos en los machos pero no en las hembras sin infección. Los ratones gonadectomizados, tratados con DHEA e infectados incrementaron la expresión del receptor de andrógenos en relación a los ratones infectados tratados con DHEA (Figura 7C).



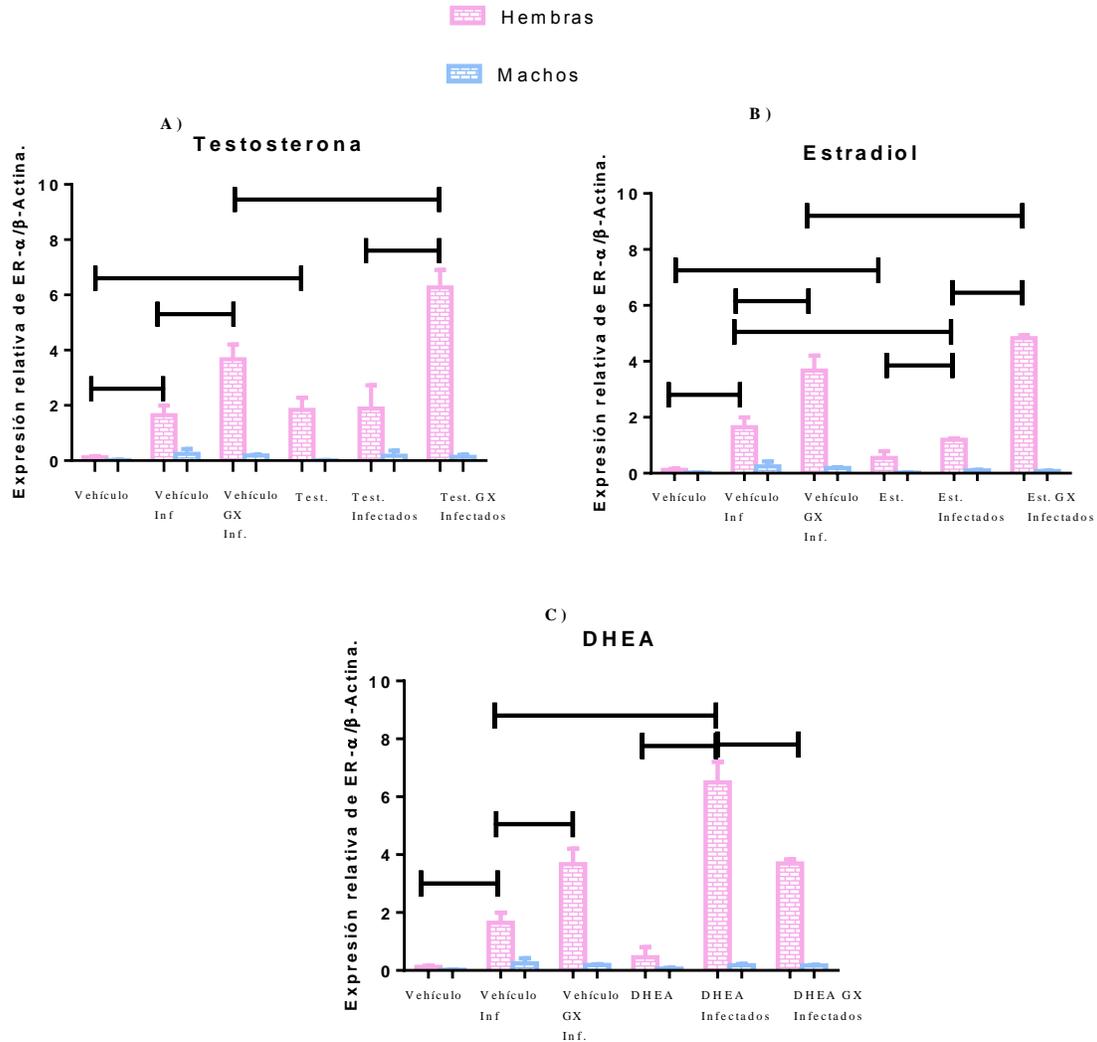
**Figura 7: Efecto de la administración de testosterona, estradiol y DHEA sobre la expresión relativa del ARNm para el receptor de andrógenos en cerebro de ratones infectados con *Plasmodium berghei* ANKA y gonadectomizados.** Grupos de ratones CBA/Ca machos y hembras se separaron en 12 grupos: Grupo 1 ratones que únicamente recibieron vehículo; Grupo 2, ratones que recibieron vehículo y se infectaron (Vehículo Inf); Grupo 3 ratones que se gonadectomizaron, recibieron el vehículo y se infectaron (Vehículo GX Inf); Grupo 4 ratones que recibieron testosterona (Test); Grupo 5 ratones intactos que recibieron testosterona y se infectaron (Test Inf); Grupo 6 ratones gonadectomizados que recibieron testosterona y se infectaron (Test GX Inf); Grupo 7 ratones intactos que recibieron estradiol (Est); Grupo 8 ratones intactos que recibieron estradiol y se infectaron (Est Inf); Grupo 9 ratones gonadectomizados, que recibieron estradiol y se infectaron (Est GX Inf); Grupo 10 ratones intactos que recibieron dihidroepiandrosterona (DHEA); Grupo 11 ratones que recibieron DHEA y se infectaron (DHEA Inf); Grupo 12 ratones que se gonadectomizaron y recibieron DHEA y se infectaron (DHEA GX Inf). La gráfica representa la expresión relativa de ARNm para el receptor de andrógenos en el cerebro. Las barras azules representan a los grupos de ratones machos y las barras rosas a los grupos de ratones hembras. Las líneas sobre los histogramas representan diferencias significativas entre los grupos con una ( $p \leq 0.05$ ) se utilizó un análisis de varianza de dos vías y la prueba de Tukey para comparar la media de cada grupo con todos los demás.

### **8.3 Expresión relativa del gene que codifica para el receptor de estrógenos en cerebro.**

La expresión del receptor para estrógenos alfa fue significativamente mayor en las hembras que en los machos en todas las condiciones analizadas, la expresión es dimórfica. La infección y la gonadectomía aumentaron significativamente la expresión del receptor de estrógenos alfa en las hembras en comparación con los machos de su mismo grupo. La administración de testosterona, estradiol o DHEA no modificó la expresión del receptor de estrógenos alfa en los machos, mientras que en las hembras, la testosterona solo aumentó la expresión del receptor de estrógenos alfa en las hembras gonadectomizadas.

La administración de estradiol incrementó la expresión del receptor de estrógenos alfa en las hembras intactas y en las infectadas pero este aumento fue mayor en las hembras gonadectomizadas con respecto al grupo tratado con vehículo.

La administración de DHEA incrementó la expresión del receptor de estrógenos alfa únicamente en las hembras intactas infectadas y no tuvo efecto en las hembras gonadectomizadas (Figura 8).

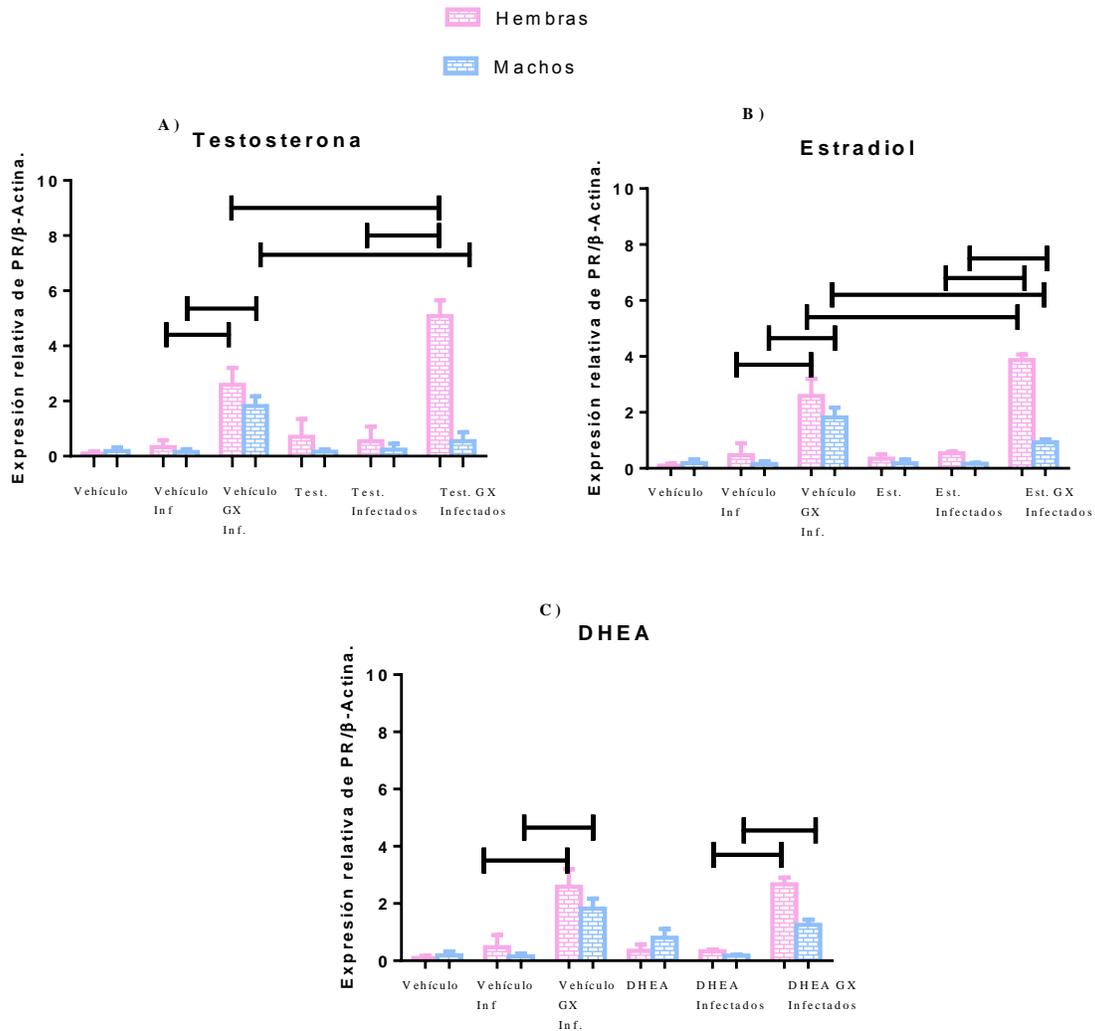


**Figura 8. Efecto de la administración de testosterona, estradiol y DHEA sobre la expresión relativa del ARNm para el receptor de estrógenos alfa en cerebro de ratones infectados con *Plasmodium berghei* ANKA y gonadectomizados.** Grupos de ratones CBA/Ca machos y hembras se separaron en 12 grupos: Grupo 1 ratones que únicamente recibieron vehículo; Grupo 2, ratones que recibieron vehículo y se infectaron (Vehículo Inf); Grupo 3 ratones que se gonadectomizaron, recibieron el vehículo y se infectaron (Vehículo GX Inf); Grupo 4 ratones que recibieron testosterona (Test); Grupo 5 ratones intactos que recibieron testosterona y se infectaron (Test Inf); Grupo 6 ratones gonadectomizados que recibieron testosterona y se infectaron (Test GX Inf); Grupo 7 ratones intactos que recibieron estradiol (Est); Grupo 8 ratones intactos que recibieron estradiol y se infectaron (Est Inf); Grupo 9 ratones gonadectomizados, que recibieron estradiol y se infectaron (Est GX Inf); Grupo 10 ratones intactos que recibieron dihidroepiandrosterona (DHEA); Grupo 11 ratones que recibieron DHEA y se infectaron (DHEA Inf); Grupo 12 ratones que se gonadectomizaron y recibieron DHEA y se infectaron (DHEA GX Inf). La gráfica representa la expresión relativa de ARNm para el receptor de estrógenos alfa (ERα) en el cerebro. Las barras azules representan a los grupos de ratones machos y las barras rosas a los grupos de ratones hembras. Las líneas sobre los histogramas representan diferencias significativas entre los grupos con una ( $p \leq 0.05$ ) se utilizó un análisis de varianza de dos vías y la prueba de Tukey para comparar la media de cada grupo con todos los demás.

#### **8.4 Expresión relativa del gen que codifica para el receptor de progesterona (PR) en cerebro.**

Se detectó la tendencia de una mayor expresión del receptor en las hembras en comparación con los machos. La infección no modificó la expresión del PR. La gonadectomía incrementó la expresión del receptor de progesterona en el cerebro de los ratones machos y hembras. La administración de testosterona incrementó la expresión del receptor de progesterona únicamente en las hembras gonadectomizadas (Figura 9 A).

La administración de estradiol incrementó la expresión del receptor de progesterona únicamente en las hembras gonadectomizadas e infectadas, mientras que en los machos gonadectomizados e infectados disminuyó la expresión del receptor de progesterona en relación al grupo control gonadectomizado que recibió vehículo (Figura 9B). La administración de DHEA no modificó la expresión del receptor de progesterona (Figura 9C).

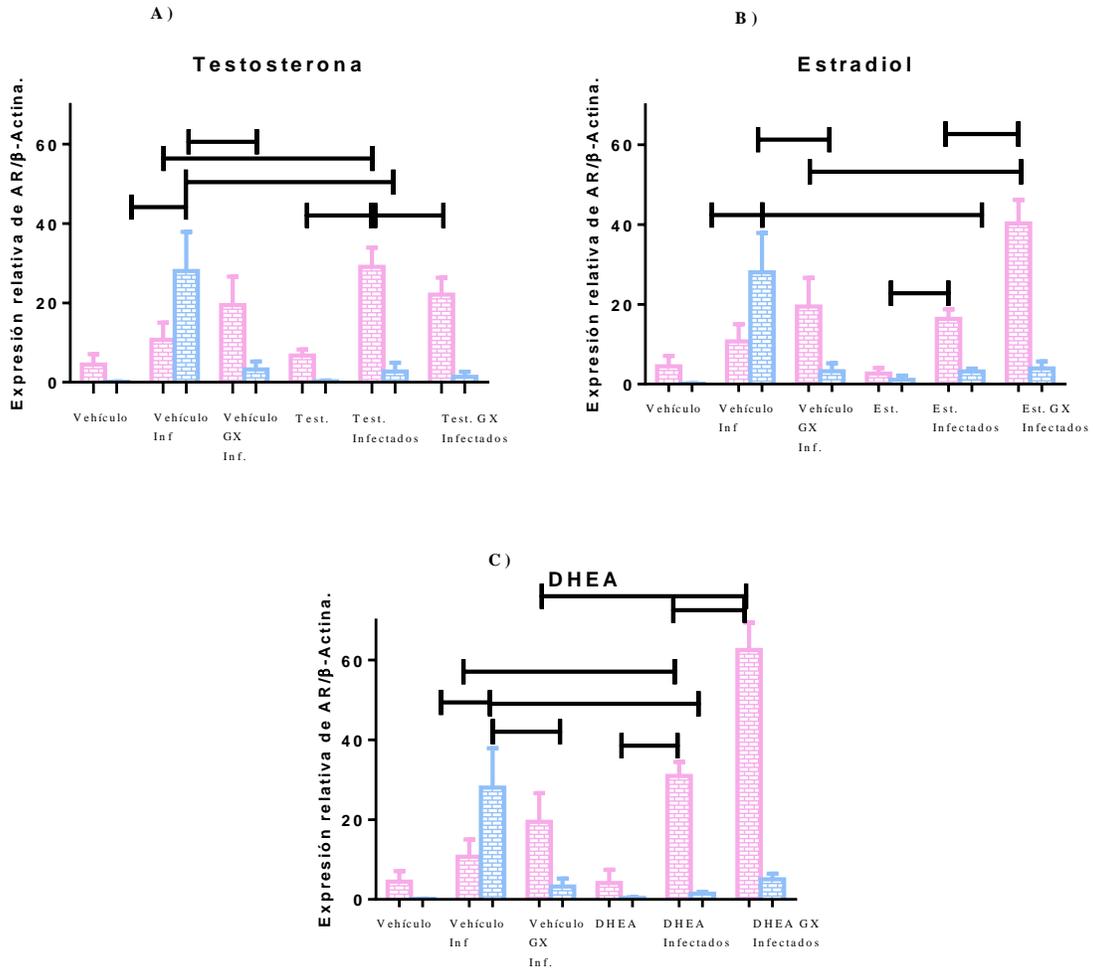


## **8.5 Expresión relativa del gen que codifica para el receptor de andrógenos en bazo**

En general la expresión de ARNm para el receptor de andrógenos en el bazo fue mayor en las hembras que en los machos a excepción del grupo de machos tratado con vehículo e infectado. La infección incrementó la expresión del receptor de andrógenos en los ratones de ambos sexos. La gonadectomía disminuyó significativamente la expresión del receptor únicamente en los machos. La administración de testosterona en los ratones sin infectar no modificó la expresión de ese receptor, mientras que cuando se administró testosterona a los ratones infectados la expresión aumentó en las hembras mientras que disminuyó en los machos. La administración de testosterona a los ratones gonadectomizados no modificó la expresión de receptor de andrógenos en los machos o hembras infectados (Figura 10A).

La administración de estradiol no modificó la expresión de receptor de andrógenos en los ratones no infectados; sin embargo, en las hembras infectadas el administrar estradiol incrementó la expresión de receptor de andrógenos. La gonadectomía incrementó significativamente la expresión de receptor de andrógenos en las hembras infectadas pero no en los machos (Figura 10B).

La administración de DHEA incrementó significativamente la expresión del receptor de andrógenos únicamente en las hembras infectadas y la gonadectomía aunada con la administración de DHEA incrementó significativamente la expresión de AR con relación a las hembras infectadas tratadas con DHEA (Figura 10C).



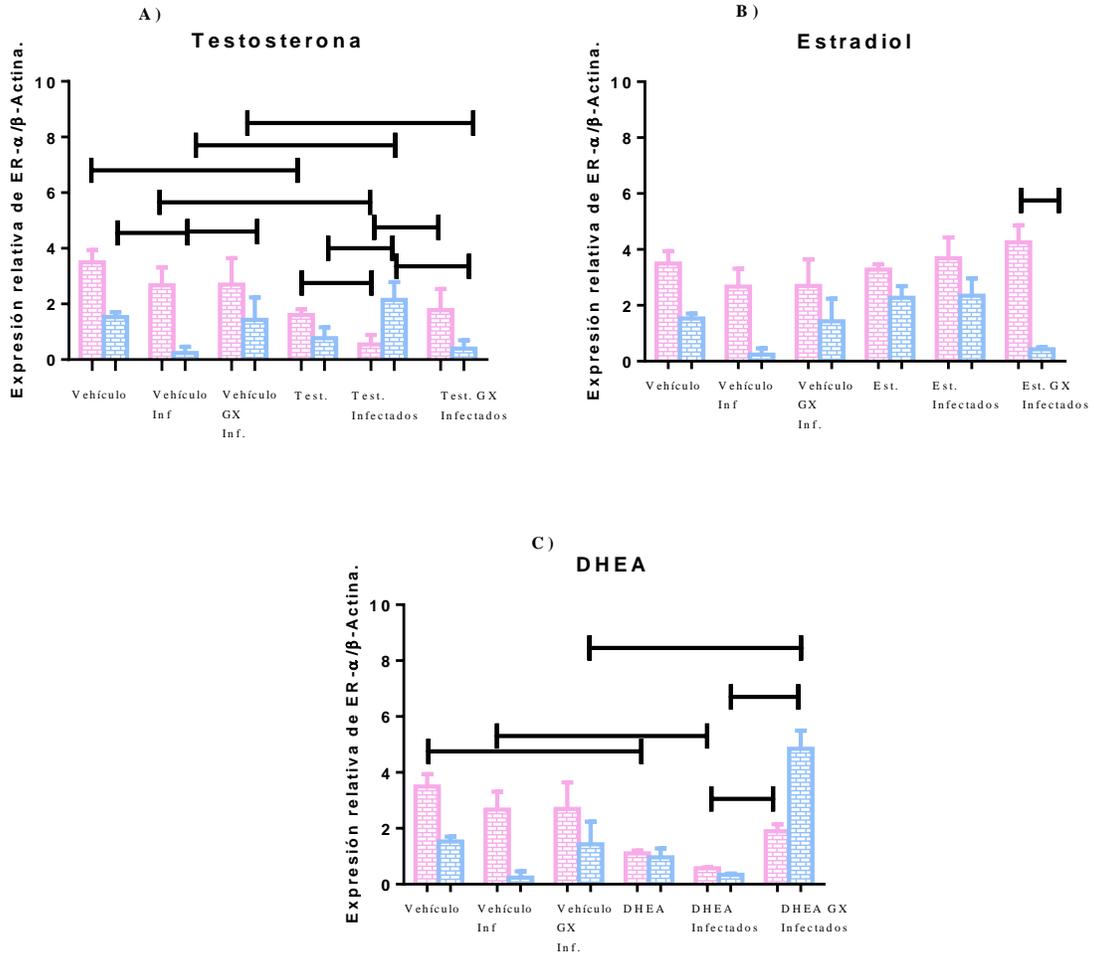
**Figura 10. Efecto de la administración de testosterona, estradiol y DHEA sobre la expresión relativa del ARNm para el receptor de andrógenos en bazo ratones infectados con *Plasmodium berghei* ANKA y gonadectomizados.** Grupos de ratones CBA/Ca machos y hembras se separaron en 12 grupos: Grupo 1 ratones que únicamente recibieron vehículo; Grupo 2, ratones que recibieron vehículo y se infectaron (Vehículo Inf); Grupo 3 ratones que se gonadectomizaron, recibieron el vehículo y se infectaron (Vehículo GX Inf); Grupo 4 ratones que recibieron testosterona (Test); Grupo 5 ratones intactos que recibieron testosterona y se infectaron (Test Inf); Grupo 6 ratones gonadectomizados que recibieron testosterona y se infectaron (Test GX Inf); Grupo 7 ratones intactos que recibieron estradiol (Est); Grupo 8 ratones intactos que recibieron estradiol y se infectaron (Est Inf); Grupo 9 ratones gonadectomizados, que recibieron estradiol y se infectaron (Est GX Inf); Grupo 10 ratones intactos que recibieron dihidroepiandrosterona (DHEA); Grupo 11 ratones que recibieron DHEA y se infectaron (DHEA Inf); Grupo 12 ratones que se gonadectomizaron y recibieron DHEA y se infectaron (DHEA GX Inf). La gráfica representa la expresión relativa de ARNm para el receptor de andrógenos en el bazo. Las barras azules representan a los grupos de ratones machos y las barras rosas a los grupos de ratones hembras. Las líneas sobre los histogramas representan diferencias significativas entre los grupos con una ( $p \leq 0.05$ ) se utilizó un análisis de varianza de dos vías y la prueba de Tukey para comparar la media de cada grupo con todos los demás.

## 8.6 Expresión relativa del gen que codifica para el receptor de estrógenos alfa (EsR- $\alpha$ ) en bazo

En general la expresión de ARNm para el receptor de estrógenos en el bazo fue mayor en las hembras que en los machos a excepción de los grupos de machos tratados con testosterona e infectados y machos gonadectomizados tratados con DHEA e infectados, lo que indica un marcado dimorfismo sexual en la expresión de este receptor. La infección disminuyó la expresión del receptor de estrógenos alfa en los ratones de ambos sexos. La gonadectomía incrementó significativamente la expresión del receptor de estrógenos alfa únicamente en los machos. La administración de testosterona en los ratones sin infectar disminuyó significativamente la expresión del receptor de estrógenos alfa únicamente en las hembras; mientras que cuando se administró testosterona a los ratones infectados la expresión disminuyó en las hembras mientras que aumentó en los machos. La administración de testosterona a los ratones gonadectomizados e infectados incrementó la expresión del receptor de estrógenos alfa en las hembras y la disminuyó significativamente en los machos gonadectomizados e infectados (Figura 11A).

La administración de estradiol no modificó la expresión del receptor de estrógenos alfa en los ratones no infectados o en los infectados. La gonadectomía en las hembras indujo un incremento en la expresión del receptor de estrógenos alfa que no resultó significativo en relación a las hembras tratadas con estradiol e infectadas, mientras que en los machos gonadectomizados infectados la administración de estradiol disminuyó significativamente la expresión del receptor de estrógenos alfa con relación a las hembras GX tratadas con estradiol e infectadas (Figura 11B).

La administración de DHEA disminuyó significativamente la expresión del receptor de estrógenos alfa únicamente en las hembras con o sin infección con respecto a sus grupos control tratados con vehículo. La gonadectomía aunada con la administración de DHEA incrementó significativamente la expresión del receptor de estrógenos alfa en ambos sexos con relación los grupos tratados con DHEA e infectados (Figura 11C).



**Figura 11: Efecto de la administración de testosterona, estradiol y DHEA sobre la expresión relativa del RNAm para el receptor de estrógenos alfa en bazo de ratones infectados con *Plasmodium berghei* ANKA y gonadectomizados**

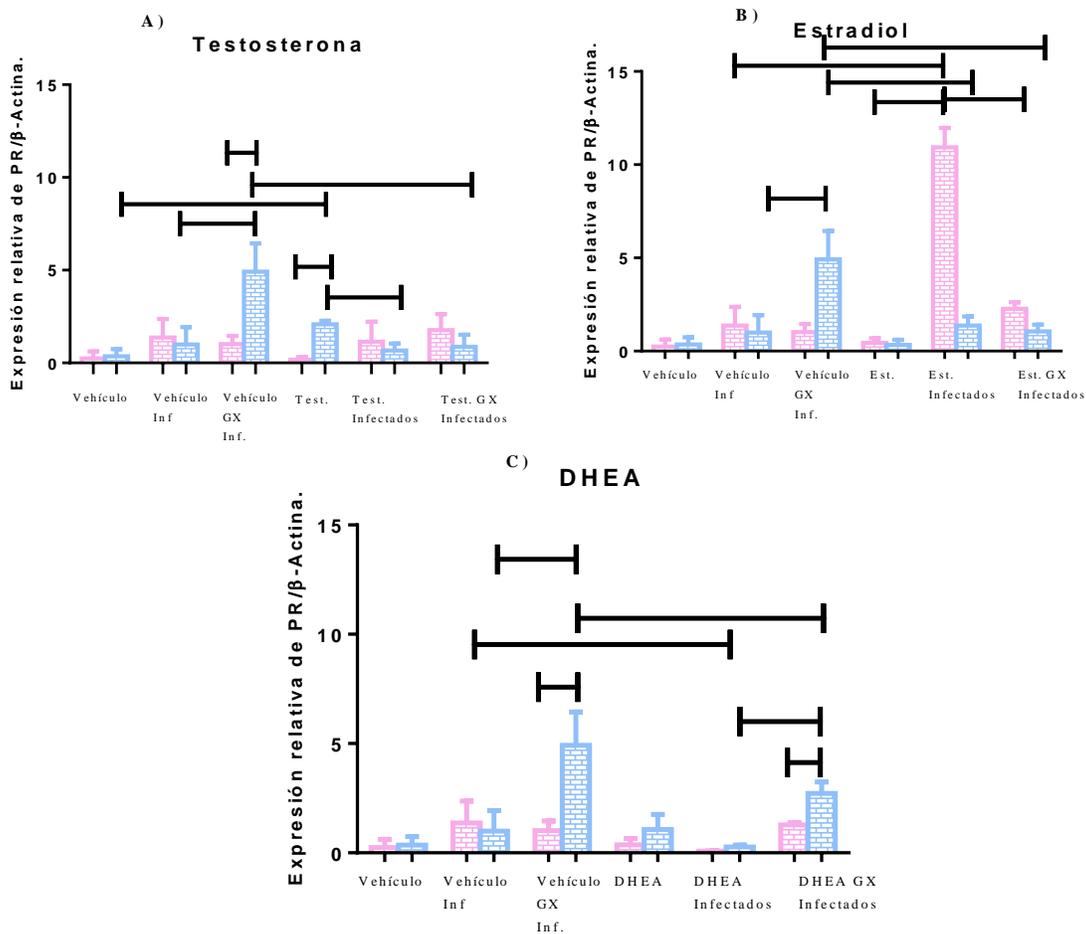
Grupos de ratones CBA/Ca machos y hembras se separaron en 12 grupos: Grupo 1 ratones que únicamente recibieron vehículo; Grupo 2, ratones que recibieron vehículo y se infectaron (Vehículo Inf); Grupo 3 ratones que se gonadectomizaron, recibieron el vehículo y se infectaron (Vehículo GX Inf); Grupo 4 ratones que recibieron testosterona (Test); Grupo 5 ratones intactos que recibieron testosterona y se infectaron (Test Inf); Grupo 6 ratones gonadectomizados que recibieron testosterona y se infectaron (Test GX Inf); Grupo 7 ratones intactos que recibieron estradiol (Est); Grupo 8 ratones intactos que recibieron estradiol y se infectaron (Est Inf); Grupo 9 ratones gonadectomizados, que recibieron estradiol y se infectaron (Est GX Inf); Grupo 10 ratones intactos que recibieron dihidroepiandrosterona (DHEA); Grupo 11 ratones que recibieron DHEA y se infectaron (DHEA Inf); Grupo 12 ratones que se gonadectomizaron y recibieron DHEA y se infectaron (DHEA GX Inf). La gráfica representa la expresión relativa de ARNm para el receptor de estrógenos-α (EsR-α) en el bazo. Las barras azules representan a los grupos de ratones machos y las barras rosas a los grupos de ratones hembras. Las líneas sobre los histogramas representan diferencias significativas entre los grupos con una ( $p \leq 0.05$ ) se utilizó un análisis de varianza de dos vías y la prueba de Tukey para comparar la media de cada grupo con todos los demás.

## **8.7 Expresión relativa del gen que codifica para el receptor de progesterona en bazo**

La infección incrementó la expresión del receptor de progesterona (PR) en ambos sexos pero la diferencia no resultó estadísticamente significativa. La gonadectomía incrementó significativamente la expresión del receptor de progesterona únicamente en los ratones machos infectados. La administración de testosterona disminuyó significativamente la expresión del receptor de progesterona únicamente en los machos gonadectomizados. La infección redujo la expresión del receptor de progesterona en los ratones machos tratados con testosterona. (Figura 12A).

La administración de estradiol incrementó significativamente la expresión del receptor de progesterona únicamente en las hembras infectadas y no modificó la expresión del receptor de progesterona en los machos infectados en comparación con los grupos que recibieron vehículo. La administración de estradiol a los ratones gonadectomizados e infectados disminuyó significativamente la expresión del receptor de progesterona únicamente en las hembras. (Figura 12B).

La administración de DHEA disminuyó la expresión del receptor de progesterona en las hembras infectadas. La gonadectomía incrementó la expresión del receptor de progesterona únicamente en los machos infectados. La administración de DHEA a los ratones gonadectomizados disminuyó significativamente la expresión del receptor de progesterona en los ratones machos (Figura 12C).



**Figura 12. Efecto de la administración de testosterona, estradiol y DHEA sobre la expresión relativa del RNAm para el receptor de progesterona en bazo de ratones infectados con *Plasmodium berghei* ANKA y gonadectomizados.** Grupos de ratones CBA/Ca machos y hembras se separaron en 12 grupos: Grupo 1 ratones que únicamente recibieron vehículo; Grupo 2, ratones que recibieron vehículo y se infectaron (Vehículo Inf); Grupo 3 ratones que se gonadectomizaron, recibieron el vehículo y se infectaron (Vehículo GX Inf); Grupo 4 ratones que recibieron testosterona (Test); Grupo 5 ratones intactos que recibieron testosterona y se infectaron (Test Inf); Grupo 6 ratones gonadectomizados que recibieron testosterona y se infectaron (Test GX Inf); Grupo 7 ratones intactos que recibieron estradiol (Est); Grupo 8 ratones intactos que recibieron estradiol y se infectaron (Est Inf); Grupo 9 ratones gonadectomizados, que recibieron estradiol y se infectaron (Est GX Inf); Grupo 10 ratones intactos que recibieron dihidroepiandrosterona (DHEA); Grupo 11 ratones que recibieron DHEA y se infectaron (DHEA Inf); Grupo 12 ratones que se gonadectomizaron y recibieron DHEA y se infectaron (DHEA GX Inf). La gráfica representa la expresión relativa de ARNm para el receptor de progesterona (PR) en el bazo. Las barras azules representan a los grupos de ratones machos y las barras rosas a los grupos de ratones hembras. Las líneas sobre los histogramas representan diferencias significativas entre los grupos con una ( $p \leq 0.05$ ) se utilizó un análisis de varianza de dos vías y la prueba de Tukey para comparar la media de cada grupo con todos los demás.

## 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 9.1 Calibración de la técnica de PCR en tiempo real para los receptores de: andrógenos estrógenos alfa y progesterona.

Los resultados de la amplificación del gen del receptor de andrógenos (AR) en PCR en tiempo real, se muestran en la Figura 4A. Se presenta la curva de amplificación de las 4 diluciones del ADNc que se prepararon y el efecto de dilución en el desplazamiento a la derecha de las curvas. Para comprobar que el tamaño del amplicón correspondía al peso molecular esperado, se utilizó electroforesis en acrilamida al 10% en la Figura 4B se presenta la fotografía del gel, se detectó la banda del peso molecular esperado (100 pb), los controles negativos no amplificaron ya que sólo se observó la banda de los primers y se utilizó sonda Taqman. En este gel se detectaron bandas mal definidas, esto probablemente se debió a que la fluorescencia se apagó ya que la sonda contiene el fluorocromo Cy3 que absorbe en el filtro número 3 y se traslapa con la longitud de onda de emisión del fluorocromo de referencia ROX.

La amplificación del gen del receptor de estrógenos alfa en PCR en tiempo real, se presenta en la Figura 5A. Las gráficas representan la amplificación de las 4 diluciones seriadas del ADNc correspondiente al control positivo y la curva de calibración ya que a mayor dilución del ADNc, aumenta el número de ciclos en los que se alcanza la fluorescencia umbral. La ausencia de amplificación de los negativos indica que los reactivos no están contaminados y que el amplicón que se detectó en el carril del control positivo corresponde al gen de interés, adicionalmente para demostrarlo, en la Figura 5B se presenta el correspondiente producto de PCR resuelto en un gel de poliacrilamida al 10% en el que se detectó la banda del peso molecular esperado ( $\approx 105$  pb), también se utilizó una sonda Taqman.

La amplificación de las diferentes diluciones del ADNc del gen del receptor de progesterona (PR) se presentan en la Figura 6A, es evidente el efecto de dilución, los controles negativos amplificaron en el ciclo 36 en comparación con las muestras del control positivo cuyo Ct se detectó en el ciclo 23 esta diferencia permite diferenciar un valor negativo y uno positivo, en la Figura 6B se muestra el producto de PCR sometido a electroforesis en poliacrilamida (banda de peso molecular 141pb), no se detectó amplificación de los controles negativos, también se utilizaron sondas Taqman porque son muy específicas e hibridan justo en la región que se amplifica del gen de interés ya que la sonda es una secuencia complementaria de esa región.

## **9.2 Expresión del receptor de andrógenos en cerebro**

En general la expresión del receptor de andrógenos fue mayor en los machos que en las hembras. Este resultado se esperaba dado que los andrógenos se presentan en mayor concentración en los machos que las hembras. La infección disminuyó la expresión del receptor de andrógenos, este efecto probablemente este asociado al efecto inmunosupresor que tiene la testosterona (2) y como el sistema inmune se activa, existe la posibilidad que la expresión del receptor de andrógenos esté bajo la regulación de genes de la respuesta inmune, esta explicación tendría que demostrarse experimentalmente. La administración de testosterona disminuyó la expresión del receptor de andrógenos en ambos sexos lo que indica que la misma hormona regula la expresión de su propio receptor (31).

La administración de DHEA disminuyó la expresión del receptor de andrógenos en los machos infectados, probablemente se deba a que DHEA funciona como un inmunopotenciador en malaria (48). Es posible que se abata la expresión del receptor de andrógenos puesto que los andrógenos son inmunosupresores, de esa forma puede contender mejor con la infección.

## **9.3 Expresión del receptor de estrógenos alfa en cerebro**

Se presentó mayor expresión del receptor de estrógenos alfa en hembras que en los machos, este resultado se esperaba ya que los estrógenos se sintetizan en mayor concentración en las hembras que en los machos (15). La infección y la gonadectomía incrementaron la expresión del receptor de estrógenos en el cerebro, es probable que en condiciones de estrés provocado por la infección o por la cirugía de quitar las gónadas, se requiera de una respuesta antiinflamatoria promovida por estradiol, lo que induciría una mayor expresión del receptor para contender con la enfermedad, ya que se ha demostrado que los estrógenos modulan positivamente la respuesta inmune (23). Es probable que debido a que los ratones gonadectomizados carezcan del órgano en donde se lleva a cabo la síntesis de esteroides sexuales, tratan de compensar esta deficiencia con un aumento en la expresión de los receptores para poder captar la mayor cantidad de estrógenos que pudiera producirse en otros sitios.

La administración de testosterona en las hembras aumentó la expresión del receptor de estradiol, es probable que las hembras utilizan a la testosterona para convertirla en estradiol (15), lo que induce un incremento en la síntesis del receptor. Interesantemente, la gonadectomía incrementó la expresión del receptor de estrógenos, una probable explicación es que al no producirse en las cantidades

adecuadas, el cerebro incrementa la síntesis del receptor para tratar de capturar la mayor cantidad de estradiol posible (Figura 5B), o bien es probable que el propio estradiol module la expresión de su receptor y al disminuir la concentración de estradiol por la gonadectomía se dispara la síntesis del receptor. Lo anterior sugiere una regulación compleja de la expresión del receptor de estradiol que depende de la concentración de estradiol.

La administración de DHEA incrementó la expresión del receptor de estrógenos en cerebro únicamente en las hembras infectadas y no afectó la expresión del receptor en las hembras gonadectomizadas infectadas. Es probable que como DHEA es un precursor de estradiol, en las hembras DHEA se transforma por la enzima  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa en androstenediona y por medio de la aromatasa en estrona que a su vez se convierte en  $17\beta$ -estradiol por medio de la enzima  $17\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (57), por lo que se incrementaría el estradiol y como consecuencia también aumentaría la expresión de EsR- $\alpha$ .

#### **9.4 Expresión del receptor de progesterona en cerebro**

En general el receptor de progesterona se expresó más en las hembras que en los machos, este resultado se esperaba dado que esta hormona se presenta en mayor concentración en las hembras (36). La infección no modificó la expresión de este receptor. Sin embargo, la gonadectomía aumentó significativamente la expresión del gene del receptor para progesterona, probablemente para compensar la deficiencia de la hormona que se produce por la ausencia de las gónadas (10).

#### **9.5 Expresión del receptor de andrógenos en bazo**

Contrario a lo esperado, detectamos que el receptor de andrógenos se expresa más en hembras que en machos a excepción del grupo de machos tratado con vehículo e infectado que desarrolló mayor expresión que su contraparte en hembras, una posible explicación para este resultado es que las hembras al tener menor concentración de andrógenos expresen el receptor en mayor cantidad para compensar esa deficiencia. Las hembras infectadas desarrollaron mayor expresión de receptor de andrógenos cuando se les administró testosterona, lo que sugiere que la testosterona regula la expresión de su receptor en el bazo de las hembras. Por el contrario, la administración de testosterona disminuyó la expresión de AR en los machos infectados, lo que refleja un mecanismo de regulación por retroalimentación al incrementar la concentración de testosterona artificialmente

ocurre una disminución de la expresión del receptor de andrógenos (9). La administración de estradiol no modificó la expresión del receptor de andrógenos en los machos pero si en las hembras por lo tanto es posible que el estradiol se transforme en testosterona y eso generó un incremento de la expresión del receptor de andrógenos. Finalmente, la administración de DHEA incrementó la expresión del receptor de andrógenos únicamente en las hembras infectadas y en las hembras gonadectomizadas e infectadas, lo que sugiere que DHEA pueda transformarse en testosterona y por lo tanto se incremente la expresión del receptor de andrógenos.

### **9.6 Expresión del receptor de estrógenos alfa en bazo**

En todas las gráficas se demostró un marcado dimorfismo sexual con una mayor expresión en general del receptor de estrógenos en hembras. La infección disminuyó la expresión del receptor tanto en machos como en hembras (Figura 10B). Es probable que la infección al mermar al organismo también abate la síntesis de proteínas como la del receptor de estrógenos alfa lo que podría abatir a la respuesta inmune dado que los receptores de estrógenos regulan a las células de la respuesta inmune innata y adquirida (58), lo que sugiere una posible explicación de la mayor letalidad del parásito en los machos.

Interesantemente, la expresión de receptor de estrógenos alfa aumentó en los ratones machos gonadectomizados e infectados probablemente porque se reduce la concentración de la hormona y para compensar esa deficiencia hormonal se induce la expresión del receptor en un intento por captar la hormona que se produce en otros tejidos.

La administración de estradiol aparentemente incrementó la expresión del receptor de estrógenos alfa en las hembras pero no resultó estadísticamente significativo por lo que hay una tendencia, probablemente se deba a que las hembras al estar gonadectomizadas e infectadas tratan de tomar la mayor cantidad de estradiol para contener la infección y compensar la falta de hormona que no producen las gónadas.

La administración de testosterona disminuyó la expresión del receptor de estrógenos alfa tanto en hembras como en machos, probablemente se deba a que la testosterona es un inmunosupresor lo que abate la expresión del receptor de estrógenos en el bazo, que es el órgano donde se lleva a cabo la destrucción del parásito por las células del sistema inmune. Por el contrario, en los ratones machos infectados la administración de testosterona incrementó la expresión del EsR- $\alpha$ , probablemente para contender contra el parásito. Sin embargo, las

hembras infectadas tratadas con testosterona disminuyeron la expresión de EsR- $\alpha$ , es probable que la testosterona suprima la síntesis del receptor de estradiol alfa.

Las hembras gonadectomizadas, infectadas y tratadas con testosterona incrementaron la expresión de EsR- $\alpha$ , es probable que para compensar la falta de estradiol se incrementó la expresión del receptor de estradiol en este grupo de ratones para poder contender contra la infección.

La administración de DHEA disminuyó significativamente la expresión del receptor de estrógenos alfa en las hembras infectadas y no infectadas, es probable que un exceso de DHEA puede conducir a su transformación en estradiol en las hembras y por eso se disminuye la expresión del receptor EsR- $\alpha$ , debido a que esta hormona puede enzimáticamente transformarse en testosterona o estradiol en las gónadas y por lo tanto llegar a un equilibrio debido al exceso de esta hormona (15). Por el contrario, en los grupos de ratones gonadectomizados e infectados de ambos sexos que se trataron con DHEA aumentaron la expresión de EsR- $\alpha$ . Una probable explicación es que como estos ratones carecen de gónadas no detectan el incremento del precursor de esteroides y para compensar la carencia incrementan la expresión del receptor de estrógenos alfa para captar la mayor cantidad de estradiol.

### **9.7 Expresión del receptor de progesterona en bazo**

La infección incrementó la expresión del receptor de progesterona (PR) en el bazo de los ratones de ambos sexos. La gonadectomía incrementó la expresión de PR únicamente en los machos, este hallazgo podría explicarse porque al carecer de gónadas este grupo de ratones incrementa la expresión del receptor para capturar la mayor cantidad de progesterona. La administración de testosterona no modificó la expresión de PR en los ratones infectados de ambos sexos; Sin embargo, administrar testosterona a los ratones machos gonadectomizados e infectados abatió la expresión de PR en relación al testigo gonadectomizado infectado y tratado con el vehículo. Este hallazgo podría explicarse porque la testosterona es un inmunosupresor y bien podría suprimir la expresión del gene del PR.

La administración de estradiol incrementó la expresión de PR en los machos gonadectomizados e infectados y en las hembras infectadas. Interesantemente, el administrar estradiol a las hembras gonadectomizadas e infectadas disminuyó significativamente la expresión de PR, lo que sugiere un mecanismo de regulación complejo en el que el estradiol modula la expresión diferencial del receptor de progesterona en el bazo y la ausencia de gónadas abate la expresión del receptor

en las hembras GX infectadas. Mientras que en los machos, la administración de estradiol a los ratones gonadectomizados disminuyó significativamente la expresión de progesterona en comparación con los ratones GX que se infectaron y recibieron el vehículo.

La administración de DHEA no modificó la expresión de PR en los ratones sanos o en los infectados, pero disminuyó significativamente la expresión de PR en los machos gonadectomizados e infectados.

## **10. CONCLUSIONES**

Los esteroides sexuales juegan un papel importante en la regulación de la expresión de diferentes genes involucrados en la respuesta inmune. En este trabajo se desarrolló la técnica de PCR en tiempo real para analizar la expresión diferencial de los receptores de los esteroides sexuales: andrógenos, estrógenos alfa y progesterona, esta técnica constituye una herramienta útil para el entendimiento de los complejos mecanismos de regulación que ejercen las hormonas sobre el sistema inmune en malaria.

La expresión de los receptores de andrógenos, estrógenos alfa y progesterona difiere entre los tejidos de cerebro y bazo, lo cual es de esperarse ya que cada órgano cumple con funciones diferentes en el organismo, y debido a que cada órgano está conformado por varios tipos de células la expresión de cada receptor dependerá del tipo de célula, por esta razón los resultados reflejan mecanismos sumamente complejos de regulación de la expresión génica que ejercen los esteroides sexuales sobre esos receptores.

La gonadectomía modifica la expresión de los receptores de andrógenos, de estrógenos alfa y progesterona en los ratones infectados debido en gran parte a la deficiencia de las gónadas que son la principal fuente de producción de estos esteroides y a la infección ya que hay una estrecha relación entre el sistema inmune y el sistema endócrino.

La administración de testosterona, estradiol o DHEA modula la expresión de los receptores lo que depende del órgano, sexo, de la condición de gonadectomizado y de la infección.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2005;434(7030):214-7.
2. McKay LI, Cidlowski JA. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor- $\kappa$ B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocrine reviews*. 1999;20(4):435-59.
3. Kenneth J. Ryan CGR. MICROBIOLOGÍA MÉDICA. Cuarta edición ed. México: Mc Graw Hill; 2005.
4. Jiménez JN, Muskus CE, Vélez ID. Diversidad genética de *Plasmodium falciparum* y sus implicaciones en la epidemiología de la malaria. *Biomédica*. 2005;25(4):588-602.
5. Fujioka H, Aikawa M. 2 The Malaria Parasite and its Life-cycle. *Malaria: Molecular and Clinical Aspects*. 1999:19.
6. Becerril MA. *Parasitología Médica*. 4 ed. México 20014 20014. 437 p.
7. Roberts CW, Walker W, Alexander J. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001;14(3):476-88.
8. Albarrán Aj. *Endocrinología*  
2ed. España 2010 2010. 58 p.
9. Esteban BM. *Diagnóstico y tratamiento en endocrinología*. España Diaz de Santos 1994. 6 p.
10. Viselli S, Stanziale S, Shults K, Kovacs W, Olsen N. Castration alters peripheral immune function in normal male mice. *Immunology*. 1995;84(2):337.
11. Vásquez AM, Tobón A. Mecanismos de patogenia en la malaria por *Plasmodium falciparum*. *Biomédica*. 2012;32(suppl 1):106-20.
12. Klein S. The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2000;24(6):627-38.
13. Olsen NJ, Olson G, Viselli SM, Gu X, Kovacs WJ. Androgen Receptors in Thymic Epithelium Modulate Thymus Size and Thymocyte Development 1. *Endocrinology*. 2001;142(3):1278-83.
14. Grossman CJ. Interactions between the gonadal steroids and the immune system. *Science*. 1985;227(4684):257-61.
15. Nelson LR, Bulun SE. Estrogen production and action. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2001;45(3):S116-S24.
16. Driggers PH, Segars JH. Estrogen action and cytoplasmic signaling pathways. Part II: the role of growth factors and phosphorylation in estrogen signaling. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2002;13(10):422-7.
17. Moggs JG, Orphanides G. Estrogen receptors: orchestrators of pleiotropic cellular responses. *EMBO reports*. 2001;2(9):775-81.
18. Jones KJ, Alexander TD, Brown TJ, Tanzer L. Gonadal steroid enhancement of facial nerve regeneration: role of heat shock protein 70. *Journal of neurocytology*. 2000 May-Jun;29(5-6):341-9. PubMed PMID: 11424950.
19. Gustafsson J-Å. Novel aspects of estrogen action. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2000;7(1 suppl):S8-S9.
20. Caballero Hernández D, Tamez Guerra RS, Rodríguez Padilla C, Tamez Guerra P, Weber RJ, Gómez Flores RA. Regulación neuroendocrina del sistema inmune. *Ciencia UANL*. 2001;4(2):205-14.

21. VEGETO E, POLLIO G, PELLICCIARI C, MAGGI A. Estrogen and progesterone induction of survival of monoblastoid cells undergoing TNF- $\alpha$ -induced apoptosis. *The FASEB journal*. 1999;13(8):793-803.
22. Hofmann-Lehmann R, Holznagel E, Lutz H. Female cats have lower rates of apoptosis in peripheral blood lymphocytes than male cats: correlation with estradiol-17 $\beta$ , but not with progesterone blood levels. *Veterinary immunology and immunopathology*. 1998;65(2):151-60.
23. Barna M, Komatsu T, Bi Z, Reiss CS. Sex differences in susceptibility to viral infection of the central nervous system. *Journal of neuroimmunology*. 1996;67(1):31-9.
24. Miller L, Hunt JS. Sex steroid hormones and macrophage function. *Life sciences*. 1996;59(1):1-14.
25. Cutolo M, Accardo S, Villaggio B, Barone A, Sulli A, Coviello DA, et al. Androgen and estrogen receptors are present in primary cultures of human synovial macrophages. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1996;81(2):820-7.
26. Danel L, Souweine G, Monier J, Saez S. Specific estrogen binding sites in human lymphoid cells and thymic cells. *Journal of steroid biochemistry*. 1983;18(5):559-63.
27. Kono H, Wheeler MD, Rusyn I, Lin M, Seabra V, Rivera CA, et al. Gender differences in early alcohol-induced liver injury: role of CD14, NF-B, and TNF. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000;278:G652-G661.
28. Evans MJ, Eckert A, Lai K, Adelman SJ, Harnish DC. Reciprocal antagonism between estrogen receptor and NF- $\kappa$ B activity in vivo. *Circulation research*. 2001;89(9):823-30.
29. Heinlein CA, Chang C. The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Molecular Endocrinology*. 2002;16(10):2181-7.
30. P. Reed Larsen HMK. *Williams Tratado de Inmunología*. España 2006. 10 p.
31. Tsai M, O'Malley BW. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annual review of biochemistry*. 1994;63(1):451-86.
32. Wunderlich F, Benten WPM, Lieberherr M, Guo Z, Stamm O, Wrehlke C, et al. Testosterone signaling in T cells and macrophages. *Steroids*. 2002;67(6):535-8.
33. D'AGOSTINO P, Milano S, Barbera C, Bella G, Rosa M, Ferlazzo V, et al. Sex Hormones Modulate Inflammatory Mediators Produced by Macrophages. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1999;876(1):426-9.
34. Jones KJ, Alexander TD, Brown TJ, Tanzer L. Gonadal steroid enhancement of facial nerve regeneration: role of heat shock protein 70. *Journal of neurocytology*. 2000;29(5-6):341-9.
35. Benten WP, Ulrich P, Kuhn-Velten WN, Vohr HW, Wunderlich F. Testosterone-induced susceptibility to Plasmodium chabaudi malaria: persistence after withdrawal of testosterone. *The Journal of endocrinology*. 1997 May;153(2):275-81. PubMed PMID: 9166117.
36. Fitzpatrick TB. *Dermatología en medicina general*: Ed. Médica Panamericana; 2009.
37. Piccinni M-P, Scaletti C, Maggi E, Romagnani S. Role of hormone-controlled Th1-and Th2-type cytokines in successful pregnancy. *Journal of neuroimmunology*. 2000;109(1):30-3.
38. Rai U. Sex steroid hormones modulate the activation of murine peritoneal macrophages: receptor mediated modulation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. 1998;119(2):199-204.
39. Baley J, Schacter B. Mechanisms of diminished natural killer cell activity in pregnant women and neonates. *The Journal of Immunology*. 1985;134(5):3042-8.
40. Toder V, Nebel L, Elrad H, Blank M, Durdana A, Gleicher N. Studies of natural killer cells in pregnancy. II. The immunoregulatory effect of pregnancy substances. *Journal of clinical & laboratory immunology*. 1984;14(3):129-33.

41. Miller L, Alley EW, Murphy W, Russell S, Hunt J. Progesterone inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide production in murine macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*. 1996;59(3):442-50.
42. Miller L, Hunt JS. Regulation of TNF- $\alpha$  production in activated mouse macrophages by progesterone. *The Journal of Immunology*. 1998;160(10):5098-104.
43. Lü F, Abel K, Ma Z, Rourke T, Lu D, Torten J, et al. The strength of B cell immunity in female rhesus macaques is controlled by CD8+ T cells under the influence of ovarian steroid hormones. *Clinical & Experimental Immunology*. 2002;128(1):10-20.
44. Stevens N. La DHEA:¿ fuente de la eterna juventud?: Editorial Sirio, SA; 1997.
45. Naveros BC, Martínez MAR, Lara VG. Hormonas anti envejecimiento: melatonina y deshidroepiandrosterona. *Piel*. 2008;23(10):582-5.
46. Labrie F. 12 DHEA and Cancer Risk or Prevention? DHEA in Human Health and Aging. 2011;2:153.
47. Speziale AMT. Estado actual de la terapia de reemplazo hormonal con deshidroepiandrosterona (TRH-DHEA).
48. Zuluaga L, Parra S, Garrido E, López-Muñoz R, Maya J, Blair S. Dehydroepiandrosterone effect on Plasmodium falciparum and its interaction with antimalarial drugs. *Experimental parasitology*. 2013;133(1):114-20.
49. Satz M LaRRK. La reacción en cadena de la polimerasa: El método y sus aplicaciones. *Ciencia Hoy* 1993.
50. Res T-LMAM. Genes and type2 diabetes mellitus2005:[210-22 pp.].
51. México UNAd. Manual de prácticas de laboratorio de genética clínica parte II. 2009. México DF. 1ª. [32-50, 62-73].
52. QIAGEN pag Critical Factors for Successful Real-Time PCR. , Germany,: QIAGEN; 2009.
53. Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC bioinformatics*. 2006;7(1):1.
54. Klein D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in molecular medicine*. 2002;8(6):257-60.
55. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Molecular cell biology*: WH Freeman New York; 2000.
56. Luque J, Herráez Á. Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética. *Conceptos, técnicas y aplicaciones en Ciencias de la salud*. 2001.
57. Chin EH, Shah AH, Schmidt KL, Sheldon LD, Love OP, Soma KK. Sex differences in DHEA and estradiol during development in a wild songbird: Jugular versus brachial plasma. *Hormones and behavior*. 2008 Jun;54(1):194-202. PubMed PMID: 18423637.
58. Kovats S. Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. *Cellular immunology*. 2015 Apr;294(2):63-9. PubMed PMID: 25682174. Pubmed Central PMCID: 4380804.