



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

***“EFECTO DE LA PROLACTINA SOBRE LA PATOLOGÍA, PARASITEMIA Y
EXPRESIÓN DE LOS GENES TNF- α E IL- 10
EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE MALARIA CEREBRAL”***

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)**

PRESENTA

BIOL. ARACELI SOSA CASTILLO

**Directora de tesis: DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA, UNAM.**

CD. MX.

JUNIO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*A mi **alma máter**,
mi querida **U.N.A.M.**
Porque soy la mujer más feliz desde que ingresé.*

A mis hijas,

Karen y Pame.

***Mi razón de ser, inspiración
y fortaleza.***

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la Doctora Martha Legorreta Herrera, por brindarme la oportunidad para seguir creciendo académicamente y por compartir conmigo todo su conocimiento, así como su paciencia.

A mis queridos compañeros, Q.F.B. Jesús Aguilar Castro, Q.F.B. Luis Antonio Orlando Cervantes Candelas y al Biol. Fidel Buendía-González por compartir su conocimiento con paciencia y cariño, al igual que su inefable apoyo en este proceso complejo y largo.

Al Q.F.B. Omar Fernández por su amable disposición en los apoyos técnicos.

Al Q.F.B. Víctor Hugo Suárez González, por su inmensurable colaboración y compañía en el trabajo de laboratorio.

A los miembros de mi comité de sinodales, la Dra. María del Carmen Clapp Jiménez Labora, la Dra. María Isabel Soto Cruz, la Dra. María Esther Cruz Beltrán, la Dra. Adriana Karina Chávez Rueda, y por último la Dra. María Maximina Bertha Moreno Altamirano por sus significativas observaciones y comentarios para la conclusión de este escrito.

INDICE

	PAGINA
I. RESUMEN.....	5
II. INTRODUCCIÓN.....	7
1. MALARIA	7
2. CICLO DE VIDA DEL PARÁSITO <i>Plasmodium</i>	8
3. SÍNTOMATOLOGÍA	10
4. MALARIA CEREBRAL	10
5. <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	11
6. RESPUESTA INMUNE EN MALARIA	11
7. CITOCINAS	13
A) FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF- α)	14
B) INTERLEUCINA 10 (IL-10)	15
8. PROLACTINA	16
9. RATONES KNOCKOUT PARA EL RECEPTOR DE LA PROLACTINA.....	21
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
IV. OBJETIVO	23
V. HIPÓTESIS	23
VI. MATERIAL Y EQUIPO	24
VII. METODOLOGÍA	25
VIII. RESULTADOS	32
IX. DISCUSIÓN	51
X. CONCLUSIÓN	61
XI. REFERENCIAS	62
XII. ANEXOS.....	73

I. RESUMEN

La malaria es una enfermedad infecciosa que anualmente causa la muerte a más de medio millón de personas en el mundo. La sintomatología se caracteriza por: fiebre, anemia, disminución de peso, hipoglucemia y parasitemias altas. La complicación más grave es la malaria cerebral (MC), la mayoría de los enfermos mueren y los sobrevivientes presentan secuelas neurológicas. Se desconocen los mecanismos precisos que regulan el proceso inflamatorio en el cerebro. Se ha relacionado a la MC con inflamación mediada por citocinas, entre ellas el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Esta citocina promueve la citoadhesión del parásito en las células endoteliales, la citotoxicidad, la apoptosis y la necrosis en el cerebro, en áreas relacionadas con la neurogénesis como el hipocampo.

La prolactina (PRL) es una hormona que activa genes asociados con la modulación en la respuesta inmune y el proceso inflamatorio. En este trabajo, estudiamos el papel de la PRL en la patología de la enfermedad, la parasitemia y en la expresión de genes de citocinas involucrados en la respuesta inmune, entre ellos el TNF- α y la IL-10, en cerebro e hipocampo. Para ello utilizamos ratones machos y hembras knockout para el receptor de la PRL (KO) infectados con *P. berghei* ANKA, como control utilizamos grupos de ratones machos y hembras silvestres (WT), del mismo fondo genético que los KO.

Confirmamos hiperprolactinemia en los ratones hembras y machos KO, resultado esperado debido a la ausencia de la inhibición de la PRL sobre su propia secreción por la hipófisis.¹ Además, la concentración de PRL no se modificó al infectar a los ratones hembras o machos WT o KO. Contrario a lo reportado, los ratones KO (hembras y machos) presentaron peso, temperatura y glucemia similar a los silvestres.

En la cepa C57Bl/6 la patología de malaria (caquexia, hipotermia e hipoglucemia) se manifestó días después a lo reportado en ratones CBA/Ca.² En nuestro modelo detectamos que la PRL no modificó el peso, la temperatura o la glucemia durante la infección, en caso extraordinario los ratones machos KO infectados incrementaron su peso. La PRL favoreció el desarrollo de la parasitemia.

Contrario a lo esperado, la infección disminuyó la expresión de TNF- α en cerebro e hipocampo, de las hembras WT y KO infectadas, mientras que en los machos WT y KO no se modificó la expresión de TNF- α , en mismos tejidos, con excepción del hipocampo en el que disminuyó la expresión en los machos KO infectados. En este trabajo, reportar que TNF- α se expresó en el hipocampo es una aportación novedosa en la ciencia, también lo es el hecho de que la expresión sea dimórfica en este tejido. No detectamos expresión de IL-10 en cerebro e hipocampo de los ratones hembras y machos WT y KO. La PRL no modificó la concentración sérica de TNF- α , en hembras y machos WT y KO, la infección disminuyó la concentración de esta citocina en hembras WT y KO. La síntesis de IL-10 resultó dimórfica, fue mayor en los machos que en las hembras WT y KO. La PRL moduló positivamente la concentración de IL-10 en los machos no infectados. Mientras que en los machos WT y KO infectados la concentración de IL-10 disminuyó.

Los resultados sugieren que la PRL disminuyó la actividad inmune en los ratones puesto que aumentó la parasitemia, sin embargo el fondo genético de la cepa C57Bl/6 no permitió evidenciar contundentemente los efectos de la PRL durante la infección con *P. berghei* ANKA, por lo que se recomienda realizar estudios complementarios que deberán investigar los efectos de incrementar la concentración endógena de la PRL.

II. INTRODUCCIÓN

1. MALARIA

La malaria o paludismo es una enfermedad parasitaria, en el año 2015, la OMS reportó 3.2 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad, registró 214 millones de nuevos casos y 438 muertes por malaria (Figura 1).³

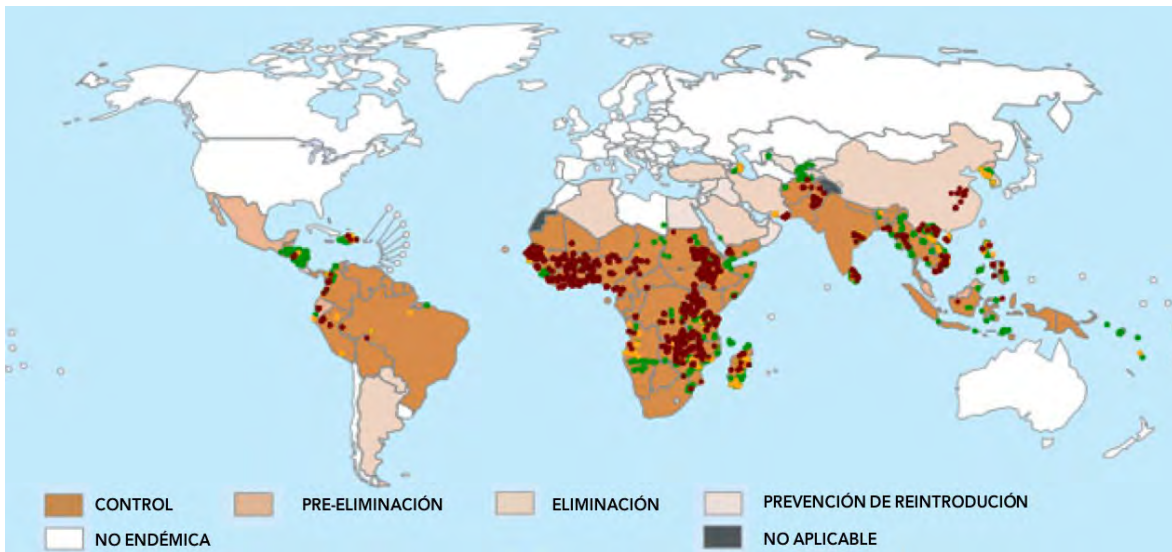


Figura. 1 Países afectados con malaria. Tomado y modificado de WHO *World Malaria Report 2015*³

En México se han detectado casos con malaria en los estados de Chiapas, Oaxaca, Nayarit, Chihuahua, Sinaloa, Sonora y Durango. En el 2014 se reportaron 658 casos de infección por *P. vivax* y 6 con *P. falciparum*.³

La malaria se origina por el protozoo del género *Plasmodium*, se transmite por la picadura de la hembra del mosquito *Anopheles* infectado. Los síntomas surgen entre 10 y 15 días después de la picadura, si la enfermedad no se atiende, peligran la vida del paciente en poco tiempo. Uno de los problemas en el tratamiento, es la resistencia del parásito a medicamentos antimaláricos.³

El género *Plasmodium* pertenece al *phylum* Apicomplexa, este grupo taxonómico se caracteriza por la compleja disposición de estructuras apicales conocidas como roptrias y micronemas, mismas que facilitan la incorporación del parásito a la célula blanco.⁴

Se conocen más de 100 especies de *Plasmodium* que infectan a mamíferos, aves y reptiles. La población humana se puede infectar por cinco especies: *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. falciparum* y *P. knowlesi*.⁴ Se ha reportado a *P. falciparum* como la especie más virulenta, la complicación mas grave de esta infección es la malaria cerebral.^{5, 6}

2. CICLO DE VIDA DEL PARÁSITO *Plasmodium*

El parásito se trasmite de persona a persona a través de la picadura de la hembra del mosquito *Anopheles*. El hombre actúa como reservorio y huésped intermediario para el desarrollo de la fase asexual o esquizogónica; mientras que el mosquito es huésped definitivo, en él se lleva a cabo la fase de reproducción sexual del parásito (Figura 2).^{4, 7}

El ciclo asexual de *Plasmodium* inicia cuando un mosquito infectado inocula esporozoítos a una persona sana, viajan por el torrente sanguíneo y en 30 minutos, llegan hasta el hígado e invaden a los hepatocitos e inicia el ciclo preeritrocítico; los hepatocitos aumentan de volumen como consecuencia de la multiplicación del parásito por reproducción asexual.^{4, 7}

En el hígado, los esporozoítos se diferencian a merozoítos, después de 7 días se liberan al torrente sanguíneo e inician el ciclo eritrocítico. El merozoito invade al glóbulo rojo, crece y se redondea, en su interior se forma una vacuola de gran tamaño que desplaza a la periferia a los demás componentes celulares, el parásito es uninucleado y asemeja un anillo, conocido como trofozoito, el núcleo se divide y se transforma en esquizonte, que al madurar genera nuevamente merozoítos y se liberan del eritrocito para invadir nuevamente a otros eritrocitos. Después de varios ciclos, algunos *merozoítos* se transforman en gametocitos, se producen microgametocitos (masculinos) y macrogametocitos (femeninos).⁴

El proceso continua cuando el mosquito succiona los gametocitos e inicia el ciclo sexual, en el estómago. El núcleo del macrogameto se desplaza a la superficie y forma una proyección, en ella penetra un microgameto y de esta forma ocurre la fertilización, lo que origina al cigoto. En un tiempo de aproximadamente de 20 minutos, se emiten proyecciones citoplasmáticas, como resultado se genera un cuerpo fusiforme que recibe el nombre de oocineto, después de crecer se introduce en una célula epitelial del estómago, enseguida secreta una pared fina, adquiere una forma esférica y se desplaza a la cavidad celómica, esta nueva estructura recibe el nombre de oocisto. Por último, el núcleo se multiplica originando miles de *esporozoitos*.^{4, 7}

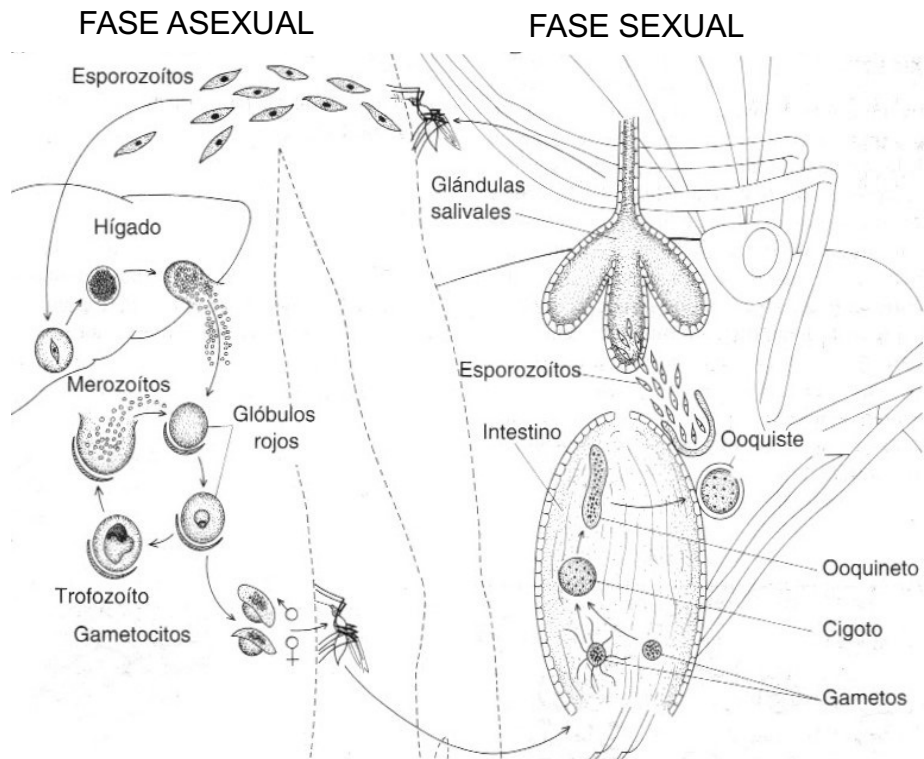


Figura 2. Ciclo de vida de *P. falciparum*. Fase asexual en el humano y fase sexual en el mosquito. Tomado y modificado de Chester, 2003.⁴

3. SÍNTOMATOLOGÍA

Los pacientes con malaria presentan fiebre, cefalea y vómito, síntomas que se manifiestan de 10 a 15 días después de la picadura del mosquito infectado con *Plasmodium*.¹ Los enfermos que no reciben atención mueren en pocos días, principalmente de anemia severa,^{8, 9} disminución de peso o caquexia y fiebre durante la infección,⁶ estos parámetros fisiológicos de la malaria severa se asocian con concentraciones elevadas de citocinas en suero, entre ellas TNF- α , INF- γ , IL-1 β e IL-6.¹⁰

En malaria, la muerte es inevitable cuando la mayoría de los eritrocitos están parasitados, se ha documentado que la parasitemia en el hospedero se incrementa de forma exponencial, a medida que avanza la infección.⁷ También se han reportado estados de hipoglucemia, asociados a un incremento de TNF- α .¹¹

4. MALARIA CEREBRAL

En los humanos las complicaciones graves de la malaria a nivel neurológico conducen a malaria cerebral, generalmente se presenta cuando la infección es con *P. falciparum* y aunque la incidencia es baja, el número de muertes es alta en niños menores a 5 años de edad.^{12, 13}

La enfermedad progresa rápidamente acompañada de dolor de cabeza, malestar en general con ataxia, coma y muerte. Los pacientes que sobreviven corren el riesgo de presentar alteraciones neurológicas y cognitivas, dificultades de comportamiento y cuadros de epilepsia.^{12, 14}

La muerte por malaria cerebral ocurre por lesiones en regiones sensibles del cerebro. La gravedad de la enfermedad se presenta en el momento en que los eritrocitos infectados con el parásito, interaccionan con las células endoteliales de la microcirculación, la adhesión a las células vasculares ocasiona obstrucción y congestión que pueden culminar en un paro respiratorio.⁵

En los modelos de malaria cerebral murina la patología se caracteriza por inflamación y secuestro de eritrocitos parasitados. En el humano, las autopsias a infantes muestran evidencias de secuestro en capilares cerebrales y respuesta

inflamatoria.¹⁵ Al respecto, se ha detectado la expresión de citocinas pro-inflamatorias, entre ellas, TNF- α en tejido post mortem de humanos.^{13, 16}

Monitorear la patogénesis de malaria cerebral en humanos es difícil, por lo que es necesario recurrir a modelos experimentales que permitan entender el progreso de la enfermedad. En los modelos murinos se ha reproducido la infección con parásitos como *Plasmodium berghei* ANKA.⁵

5. *Plasmodium berghei* ANKA

El *Plasmodium berghei* es una de las 4 especies que infecta a roedores en África Central. La descripción de la especie se realizó en 1946, los protozoarios se encontraron en la sangre del mosquito hembra *Anopheles dureni*. En 1948, el parásito se detectó en la sangre del roedor *Grammomys surdaster*, colectado en Kisanga Katenga.¹⁷

Plasmodium berghei ANKA es un parásito letal, induce la producción de citocinas pro y anti-inflamatorias en el hospedero. Sin embargo, las citocinas en exceso generan complicaciones que conducen a la muerte del hospedero.¹⁸

Por lo anterior, este parásito constituye un modelo utilizado ampliamente y bien caracterizado de malaria cerebral. Los ratones de la cepa C57Bl/6, desarrollan alteraciones neurológicas (hemi y paraplejia, ataxia y convulsiones), hemorragias cerebrales y alteraciones en la barrera hematoencefálica,⁵ lo cual coincide con la infección provocada con *P. falciparum*.^{19,20} Además, de parálisis, coma y muerte a los 8 días post-infección.¹⁶

6. RESPUESTA INMUNE EN MALARIA

La infección con *Plasmodium* activa a células del sistema inmune como a: los macrófagos, las asesinas naturales o NK, las dendríticas, los linfocitos B y los linfocitos T, así como factores humorales como anticuerpos y complemento.^{10,21}

La respuesta inmune inicia con el incremento de monocitos en la sangre periférica y acumulación de macrófagos en el bazo e hígado. Los macrófagos ayudan al control de la infección mediante la fagocitosis de los eritrocitos parasitados, por la secreción de citocinas como interleucina 12 (IL-12), interleucina 1 (IL-1) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y por la producción de metabolitos reactivos del

oxígeno y óxido nítrico que provocan la muerte del parásito en el interior del fagocito (Figura 3).^{7, 21}

Los macrófagos activan a las células asesinas naturales (NK), ambos producen interferón gamma (IFN- γ) y TNF- α , los cuales favorecen el establecimiento de la respuesta inmune celular.^{7, 10} Las células dendríticas y los macrófagos activan a los linfocitos T vírgenes, los cuales maduran a células Th1 CD4⁺ y producen citocinas proinflamatorias IFN- γ y TNF- α , que a su vez activan a macrófagos, para que fagociten eritrocitos parasitados.⁷

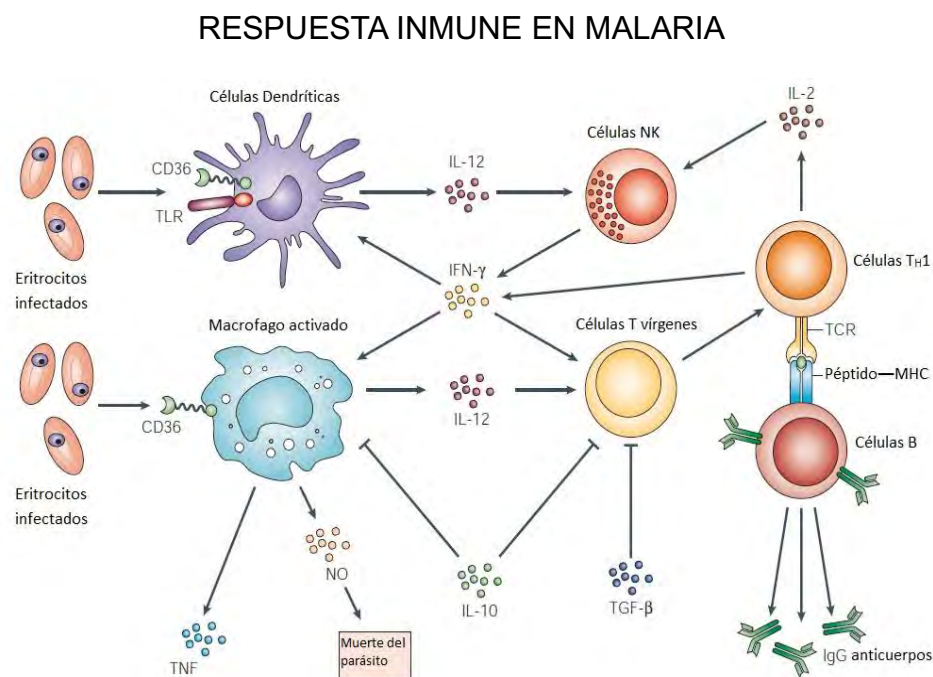


Figura. 3 Relación en el estado sanguíneo de la malaria. Posible regulación de la inmunidad adaptativa mediada por citocinas producidas por células de la respuesta inmune innata en la fase sanguínea del paludismo. Las células dendríticas interactúan con los eritrocitos parasitados vía los receptores CD36 y los receptores tipo Toll (TLR), además reciben estimulación vía citocinas inflamatorias, como el interferón- γ (IFN- γ), las células dendríticas (DCs) maduran y migran al bazo, el sitio primario de la respuesta inmune contra *Plasmodium* en el estado sanguíneo. La maduración de las DCs incrementa la expresión de moléculas MHC de clase II, CD40, CD80, CD86, moléculas de adhesión y la síntesis de interleucina-12 (IL-12) que activa a las células asesinas naturales (NK) para producir IFN- γ e induce la diferenciación de células Th1. La producción de IFN- γ , por las células NK resulta en la maduración de las DC lo que facilita la expansión clonal de las células T CD4⁺ específicas de antígeno que producen IL-2 que activa más células NK para producir IFN- γ , lo que induce la maduración de las DC activa a los macrófagos y amplifica aún más la respuesta inmune adaptativa. La IL-10 y el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) regulan negativamente las respuestas innatas y las adaptativas. Tomado y modificado de Stevenson, 2004.⁶

Las células T tipo Th1 producen IL-2 para activar a más células NK en la producción de IFN- γ , lo que a su vez induce la maduración de las células dendríticas (DCs) para activar a los macrófagos, de esta forma se amplifica la respuesta inmune adaptativa. En el proceso, la interleucina IL-10 y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) regulan negativamente la respuesta innata y la adaptativa.⁷

La producción de IFN- γ por las células NK facilita la expansión clonal de los linfocitos T vírgenes a células Th1 y a través de sus receptores TCR se unen al receptor MHC, presente en los linfocitos B, quienes elaboran anticuerpos IgG,⁷ que reconocen a los antígenos del parásito.²²

7. CITOCINAS

Las citocinas son polipéptidos o glucoproteínas que varían en peso, de 8 a 30 kDa, las sintetizan diversos tipos de células, entre ellas las del sistema inmunológico. El mecanismo de acción puede ser parácrino, en el que las citocinas actúan en células vecinas o autócrino si la acción es en la célula productora.²³

La acción de las citocinas es específica, se lleva a cabo mediante receptores de la membrana citoplasmática que inducen señales de transducción, las cuales activan mecanismos efectores de la respuesta celular. La señalización de las citocinas es importante en la salud y en la enfermedad; son esenciales durante el desarrollo prenatal y crecimiento posnatal, específicamente en la estructuración y mantenimiento de tejidos y órganos; son indispensables en los procesos inflamatorios y en la respuesta inmune, así como en la reparación de los tejidos.²⁴

Las citocinas desempeñan un papel importante al modular al sistema inmune, a través de un patrón de secreción de dos tipos: Th1, efectivo para eliminar patógenos intracelulares y Th2 indispensable para eliminar patógenos extracelulares.²⁵

El estudio de la actividad de las citocinas es complicado, algunos tipos celulares segregan la misma citocina, en otros casos una única citocina actúa en diversos tipos celulares, este fenómeno se conoce como pleiotropía. Generalmente, las citocinas se generan en cascada, es decir, una citocina estimula a la célula blanco para la síntesis de otras citocinas.²⁶

7.1 FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF- α)

Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) es una proteína soluble de 17 kDa, es una citocina proinflamatoria producida por células inmunes activadas: macrófagos, mastocitos y linfocitos T y B. Además, puede encontrarse como proteína transmembranal en macrófagos y linfocitos T activados.²⁷

En los procesos infecciosos, TNF- α actúa en forma benéfica y perjudicial, por un lado puede promover la respuesta inflamatoria y por lo tanto la resistencia del huésped, por otra parte el exceso genera toxicidad en el proceso inflamatorio.²⁸

En el torrente sanguíneo, el TNF- α funciona como pirógeno endógeno, es decir, provoca fiebre. Además, induce el debilitamiento metabólico o caquexia.²⁹

En malaria cerebral, las moléculas de TNF- α modulan la expresión de receptores de superficie celular, entre ellas ICAM I y VCAM I, estas moléculas facilitan la adhesión de los neutrófilos, los linfocitos y monocitos para su extravasación en la microvasculatura, donde se lleva a cabo el secuestro de glóbulos rojos parasitados.^{30, 31}

El TNF- α es inductor de síntesis de numerosas citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, y el propio TNF- α . Como parte de los efectos proinflamatorios modula la expresión de moléculas MHC clase I en astrocitos y neuronas.^{32, 33}

En el sistema nervioso central, el TNF- α se produce en astrocitos, microglia y neuronas, mantiene la supervivencia y proliferación de estas células. Por otra parte, induce apoptosis en las células endoteliales.^{33, 34}

En la mayoría de las células se co-expresan dos receptores para el TNF- α , el TNFRI, que es una proteína de 55 a 60 kDa, relacionada con efectos cito-tóxicos y mediación de las acciones de TNF- α soluble. El otro receptor TNFR2, de 75 a 80 kDa que tiene relación con la proliferación celular.³⁵

En las infecciones intracelulares, el TNF- α juega un papel central en la respuesta inmune innata, promueve el reclutamiento de células inflamatorias y la diferenciación celular. También desempeña actividades proinflamatorias en etapas tempranas de la respuesta inflamatoria.³⁶ Desde hace tiempo se reconoce que TNF- α promueve la muerte del parásito de la malaria, no obstante, también contribuye en la gravedad de la enfermedad,³⁷ al incrementarse su concentración se genera inflamación.³⁸

La sobreproducción de TNF- α está relacionada con daño cerebral en patologías como malaria cerebral, meningitis bacteriana, esclerosis múltiple y Alzheimer.³⁹

7.2 INTERLEUCINA 10 (IL-10)

IL-10 es una citocina producida por monocitos, macrófagos, células Th1, Th2, células B y queratinocitos. Posee propiedades antiinflamatorias, por lo que es indispensable para contrarrestar la patología grave en el proceso de infección con *Plasmodium*. Para tal efecto interfiere en la síntesis de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6 y GM-CSF en las células T, en los macrófagos regula negativamente la síntesis de IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- α .⁴⁰

La IL-10 regula el crecimiento y diferenciación de varios tipos celulares, entre ellas: las endoteliales, los queratinocitos, las dendríticas, los linfocitos B, las células NK, los mastocitos y las células T citotóxicas y cooperadoras. También regula la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase II y la síntesis de inmunoglobulinas.^{41, 42}

La IL-10 inhibe a los macrófagos y específicamente la activación de las células T, las cuales reducen su expresión en moléculas MHC clase II y de las moléculas coestimuladoras B7-1 y B7-2. De esta forma se inhibe la respuesta inespecífica y la mediada por células.^{42, 43}

Los efectos reguladores de la IL-10 sobre la respuesta inmunológica e inflamatoria se atribuyen a su capacidad para disminuir la expresión de moléculas MHC clase II y a la posibilidad de inhibir la síntesis de citocinas pro inflamatorias en los monocitos.⁴⁴

En malaria, la concentración elevada de IL-10 inhibe la respuesta inflamatoria, incrementa la parasitemia, así como la anemia a consecuencia de la fagocitosis de eritrocitos infectados y no infectados, lo cual conduce a la muerte.⁴⁴ Por el contrario, al disminuir la concentración de esta citocina se incrementa la síntesis de TNF- α . La IL-10 también reduce la patología en infecciones con *Plasmodium*.⁴⁵

8. PROLACTINA (PRL) Y RECEPTOR PARA PROLACTINA (RPRL)

La PRL es una hormona de naturaleza proteica, se sintetiza y se secreta en el cerebro por las células lactótrofas de la adenohipófisis y otras glándulas, tejidos y células del organismo: próstata, endotelio, epitelio mamario, piel, neuronas y células del sistema inmune, entre ellos, timocitos y linfocitos.^{46, 47, 48}

La síntesis de PRL en las células lactotrófas se estimula por la hormona tirotrópica (TRH) y se inhibe por el neurotransmisor dopamina y el péptido vasoactivo (VIP), secretados por el hipotálamo y las células duodenales, respectivamente. La secreción de la PRL se inhibe por IFN- γ y endotelina 3 y se induce por las citocinas: IL-1, IL-2 e IL-3.⁴⁹

La PRL que se encuentra en la adenohipófisis y el plasma es de 23 kDa, no obstante en muchos mamíferos, que incluyen al humano, se han detectado isoformas como resultado de splicing alternativo de la transcripción primaria, actividad proteolítica y modificaciones postraduccionales.^{46, 48}

Las isoformas de PRL, son: la monomérica pequeña, la grande y la macro. La pequeña está constituida por 199 aminoácidos, tiene un peso molecular de 23 kDa y es la más potente; la grande pesa de 40 a 60 kDa; macroprolactina es un complejo constituido por la PRL monomérica unida al anticuerpo inmunoglobulina G, su peso total es de 150 kDa. También se han identificado isoformas glucosiladas de 25 kDa y de 14 a 18 kDa, proteolíticamente modificadas que se han denominado vasoinhibinas por sus efectos inhibidores de la función vascular.^{46, 48, 50}

En el humano, el gen que codifica para la PRL se encuentra en el cromosoma 6, con una extensión de 10 kb y está constituido de 5 exones y 4 intrones. La transcripción del gen se regula por dos promotores independientes, uno de ellos

próximo a los 5 000 bp que regula la expresión en el interior de la adenohipófisis; el otro promotor, ubicado en la región distal, es responsable de la expresión en otra células y tejidos.⁴⁸

El fragmento del ADN que codifica para la PRL humana, presenta 914 nucleótidos, de ellos, 681 corresponden al marco de lectura para la síntesis de una pre-hormona de 227 aminoácidos. En este péptido, 28 aminoácidos realizan funciones de señalización, al madurar, se separan por lo que la PRL queda constituida de 199 aminoácidos, con peso molecular de 23 kDa. La PRL que se origina en la hipófisis de ratones y ratas difiere de la del humano al contener 197 aminoácidos. En el modelo tridimensional de PRL (Figura. 4), un 50 % de estructuras son en forma de α -hélice (4 cadenas) y el resto en bucles.^{46, 48, 51}

PROLACTINA

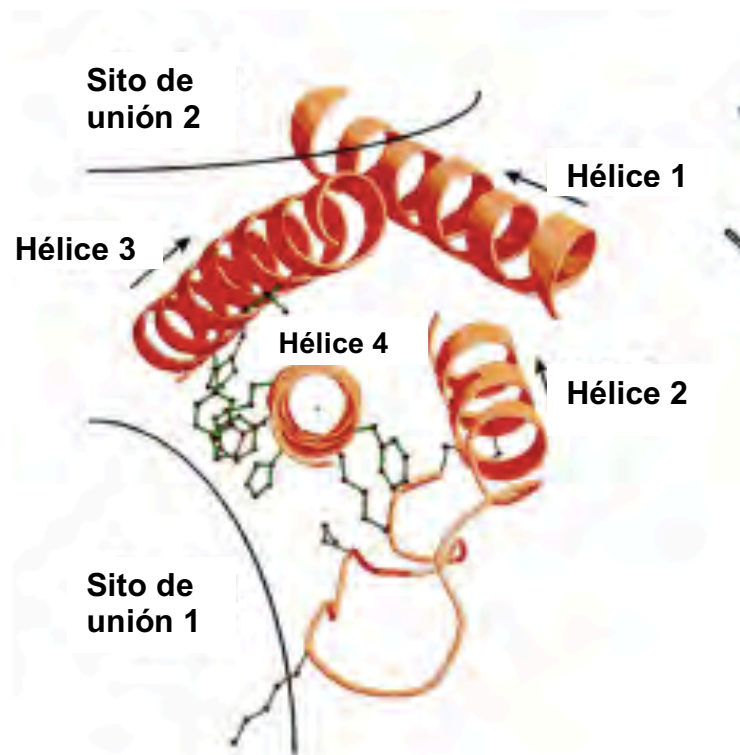


Figura 4. Estructura de la PRL. Tomado y modificado de Bole-Feysot, 1998.⁵¹

La PRL interacciona con receptores transmembranales, que son proteínas codificadas por genes ubicados en el cromosoma 5 y contienen al menos 10 exones. La transcripción del RPRL es específica, el promotor I regula el proceso

en las gónadas, el promotor II en el hígado y el promotor III es genérico, se expresa en las gónadas y en otros tejidos.⁵²

El RPRL se presenta en varias isoformas como resultado de la regulación de los promotores y del splicing alternativo. Presenta variación en longitud y en la secuencia de aminoácidos, así como en la composición del dominio citoplasmático (longitud y secuencia), en las ratas se han descrito tres isoformas del PRLR, la corta de 192 aminoácidos, la intermedia de 393 aminoácidos y la larga de 591 aminoácidos (Fig. 5).^{48, 49} En ratones, se han reportado 4 isoformas, una larga y tres cortas, iguales en su dominio extracelular y transmembranal, difieren en la longitud de su dominio intracelular.⁵³

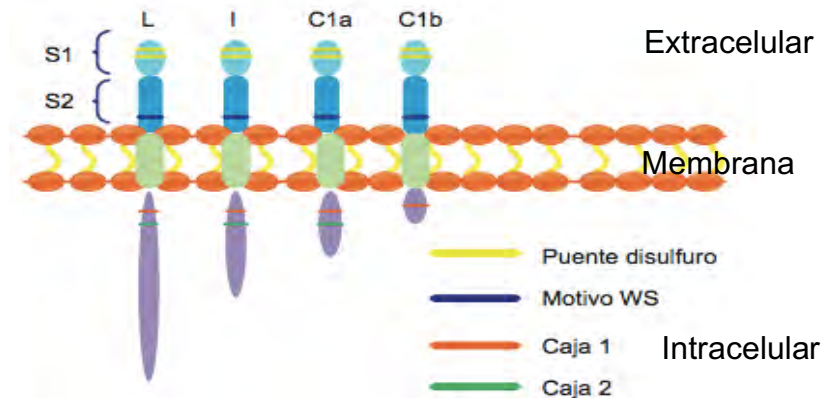


Figura. 5 Receptor de la PRL. Tomado y modificado de Blanco-Favela, 2012.⁴⁸

La PRL se ha relacionado con más de 300 actividades biológicas, por lo que las funciones se han agrupado en categorías: 1) reproducción, 2) osmoregulación, 3) desarrollo y crecimiento, 4) metabolismo de carbohidratos y lípidos, 5) inmunoregulación.^{46, 48, 51, 54}

Las múltiples acciones de la PRL dependen de la interacción con su receptor, se realiza mediante vías de transducción de señal como la JAK2/STATs, constituida por una serie de reacciones en cascada.^{46, 51}

La señal inicia en el momento que la PRL se une a su receptor de la isoforma larga e induce fosforilación de tirosina (tyr). Con esta reacción, se incrementa la afinidad para que otro RPRL se una en otro sitio a la misma PRL, de esta forma se genera un dímero de RPRL fosforilado (Figura. 6).^{46, 51, 54}

El dímero RPRL activa a JAK2 mediante la fosforilación del residuo Tyr, este sitio sirve de anclaje para unirse a STAT, después de fosforilado se une otra molécula STAT y su residuo de Tyr también se fosforila. Este dímero STAT, se disocia de JAK2 y se transloca al núcleo, en el interior identifica secuencias palindrómicas TTxxxGAA, presentes en diferentes promotores, denominadas GAS (Secuencias de activación de IFN- γ).^{46, 51, 55}

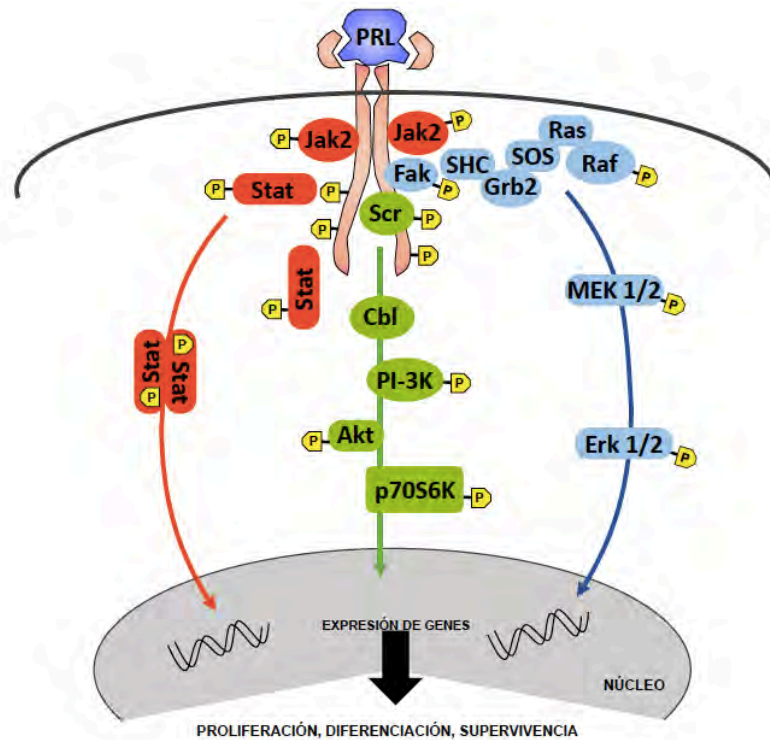


Figura 6. Interacción entre PRL y Receptor de PRL. Tomado y modificado de Goffin, 2005.⁵⁶

Los RPRL son miembros de la superfamilia de receptores de las citocinas, están presentes en células del sistema inmune: monocitos, macrófagos, linfocitos T y B, asesinas naturales (NK), granulocitos y células epiteliales del timo.^{51, 52}

En la respuesta inmune innata y adaptativa, la PRL desempeña un papel importante, regula la maduración de linfocitos T CD4⁻ y CD8⁻ a CD4⁺ y CD8⁺, respectivamente a través de la expresión del receptor para IL-2, tiene efecto antiapoptótico, específicamente en linfocitos T.^{57,58}

La secreción de PRL puede regularse por el sistema inmunológico, las citocinas IL-1, IL-6 y TNF- α son reguladores endócrinos en la liberación de esta hormona en la hipófisis.^{59, 60}

Entre otras funciones inmunológicas la PRL tiene un efecto antiinflamatorio en el pulmón, inhibe la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS) y la producción de NO inducido por citocinas proinflamatorias.⁶¹ La PRL experimenta proteólisis, los productos generados se conocen como vaso-inhibinas, con actividad proinflamatorio al promover la expresión de iNOS, con una potencia comparable al de las citocinas.⁶²

Además, la PRL promueve la expresión de moléculas MCH clase II y de las co-estimuladoras: CD40, CD80 y CD86. De igual forma promueve la síntesis de inmunoglobulinas, favorece la producción de citocinas en las células Th1 y Th2, regula la producción de IL-6 e IFN- γ , así como la actividad de IL-2.^{59, 63, 64} En malaria, la PRL interviene en la expresión de NKp46 y NKp30 de las células NK, moléculas que inducen actividad cito tóxica contra una variedad de diana células.⁶⁵

La secreción de PRL en el humano es de 400 μ g/día (186 nmol/día), el 78 % se elimina en el hígado y el 25% por el riñón, se calcula que la vida media de eliminación en el plasma es próxima a los 50 minutos. Las concentraciones basales en el sexo femenino y masculino son diferentes, en promedio existen 13 ng/mL y 5 ng/mL, respectivamente.⁶⁶

Las concentraciones circulantes, superiores a 23 ng/mL definen el estado de hiperprolactinemia (HPRL),⁶⁷ en mujeres se asocia con manifestaciones clínicas de galactorrea, amenorrea primaria y secundaria, retraso en la menarca, alteraciones en la menstruación, específicamente en cantidad y regularidad por

acortamiento de la fase lútea y anovulación, aspectos que determinan infertilidad.^{66, 68}

En los hombres, la HPRL provoca disminución en la síntesis de testosterona y disminución en el proceso de espermatogénesis, por lo que clínicamente se presenta disminución en libido, disfunción eréctil e infertilidad. En general, se tiene HPRL después del coito, en condiciones de incremento de estrés, en el embarazo, consumo de medicamentos, durante la lactancia, enfermedades del hígado y riñón, hipotiroidismo, adenomas (40%) en la glándula pituitaria.^{66, 69, 24}

Por otra parte, se ha observado que en varias enfermedades autoinmunes, particularmente lupus eritematoso, esclerosis múltiple, esclerosis sistémica y el síndrome Sjogren's, los pacientes presentan HPRL. No obstante, se desconoce el papel de las diferentes isoformas de PRL en la patogénesis y actividad de estas enfermedades autoinmunes.⁵²

La PRL desempeña un papel importante en la respuesta inmune, Blanco-Favela y colaboradores sugieren la inducción de HPRL para el control de algunas enfermedades infecciosas.⁴⁸ Se ha sugerido que la PRL podría asociarse a la patología de la malaria porque las mujeres embarazadas infectadas con *P. falciparum* desarrollan anemia más severa y concentraciones altas de PRL.⁷⁰ Sin embargo, esta asociación no se ha demostrado experimentalmente. Por lo tanto, en este trabajo se evaluó la participación de la PRL en la patología de la malaria. Para ello, se utilizaron ratones KO para el receptor de PRL que se infectaron con *P. berghei* ANKA, que emula la sintomatología de la infección con *P. falciparum*.

6. RATONES KNOCKOUT PARA EL RECEPTOR DE PRL.

Los ratones se han utilizado como modelo en estudios genéticos y bioquímicos debido a la similitud de los procesos biológicos en mamíferos, en especial para comprender los problemas en el desarrollo de enfermedades en la especie humana.⁷¹

Los ratones a los que se les han eliminado genes específicos se les denomina knockout (KO). Este modelo de ratones, ofrece la posibilidad de comprender la

actividad de la PLR en diversos procesos biológicos, entre ellos, la participación del receptor para PRL (RPRL) en los mecanismos de señalización, así como la participación en el desarrollo de patologías, como el cáncer de mama.^{56, 72}

Los ratones KO para RPRL se caracterizan por una modificación en el exón 5, se trata de una delección que determina la falta de una cisteína, en la región extra celular de la proteína, un dominio altamente conservado. La pérdida de este aminoácido confiere un plegamiento en el dominio de unión que restringe la interacción con la PRL.^{56, 72, 73}

El gen que codifica para el RPRL, se modificó desde la célula madre embrionaria de los roedores, de esta forma se han creado cepas de ratones con esta mutación puntual, que no es letal. No obstante se han reportado defectos en la reproducción de los animales.⁷²

En roedores hembras KO heterocigotas, se ha registrado un fracaso total en la lactancia, las hembras homocigotas son estériles y la implantación del embrión es nula. Con relación a los machos KO homocigotos, algunos presentan problemas de fertilidad.⁷²

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La PRL es una hormona con propiedades inmunoreguladoras, promueve en las células, la proliferación, diferenciación y síntesis de citocinas. No obstante se desconoce el papel de la PRL en enfermedades infecciosas y mortales como la malaria.³

La PRL interacciona con receptores, que activan vías de señalización que regulan tanto el peso como la temperatura corporal, así como el metabolismo de la glucosa. Durante la infección con *Plasmodium* se desencadenan procesos como caquexia, fiebre e hipoglucemia que conducen a la muerte del individuo, por lo que consideramos importante analizar el papel de la PRL en la pérdida de peso, en la regulación de la temperatura corporal y el metabolismo de la glucosa durante la infección con *P. berghei* ANKA. Para tal efecto se utilizaron ratones Knockout (KO) para el receptor de PRL, que se infectaron con *P. berghei* ANKA. Este modelo

constituye un sistema que permite examinar *in vivo*, los efectos mediados por la vía de señalización del RPRL. El *Plasmodium berghei* ANKA es un parásito letal que induce la producción de citocinas pro inflamatorias, así como complicaciones a nivel neurológico, característicos de malaria cerebral que reproducen la infección con *P. falciparum* en humanos. Este trabajo permitirá determinar el papel de la PRL en las principales complicaciones de la malaria que incluyen a la malaria cerebral.

IV. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la PRL sobre la patología y la expresión de las citocinas TNF- α e IL-10 en un modelo experimental de malaria cerebral.

2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el efecto de la PRL sobre el peso, la temperatura y la concentración de glucosa sanguínea, durante la infección con *P. berghei* ANKA, en ratones knockout para el receptor de la PRL.
- Evaluar el efecto de la PRL sobre la parasitemia durante la infección con *P. berghei* ANKA, en ratones knockout para el receptor de la PRL.
- Determinar el efecto de la PRL sobre la expresión de ARN mensajero que codifica para TNF- α e IL-10 en cerebro e hipocampo en ratones knockout para el receptor de la PRL.

V. HIPÓTESIS

Si la PRL interviene negativamente en modular el peso, la temperatura corporal, así como el metabolismo de la glucosa en sangre y la parasitemia en malaria, entonces si inhibimos la interacción de la PRL con su receptor con el uso de ratones KO para el receptor de PRL y los infectamos con *P. berghei* ANKA, los ratones ganarán peso, disminuirán su temperatura corporal, se dispararán las concentraciones de glucosa en sangre y desarrollarán menores parasitemias en relación a los ratones silvestres que poseen el receptor de PRL. De igual forma, se

espera un aumento en la expresión de TNF- α e IL-10, en el cerebro e hipocampo de estos ratones.

VI. MATERIALES Y EQUIPO

1. Material biológico

Ratones singénicos de la cepa C57Bl/6 silvestres y KO para el receptor de PRL, fueron una donación de la Dra. Carmen Clapp del Instituto de Neurociencias de la UNAM, Juriquilla, Querétaro.

Ratones singénicos CBA/Ca. Los ratones pie de cría originales fueron una donación del National Institute for Medical Research, Londres, Inglaterra.

Todos los ratones se mantuvieron en el área libre de patógenos específicos en el bioterio de la FES Zaragoza, UNAM. Los protocolos y técnicas utilizados en los ratones están aprobados por el Comité de ética de la FES Zaragoza, UNAM.

Plasmodium berghei ANKA y *Plasmodium chabaudi* AS, ambos fueron una donación del Dr. William Jarra del National Institute for Medical Research, Londres, Inglaterra. Los parásitos se almacenaron en crioviales sumergidos en nitrógeno líquido. Para utilizarse, se descongeló un criovial e inmediatamente el contenido se inyectó intraperitonealmente en un ratón, cuando la parasitemia alcanzó el 20% el parásito se cuantificó para preparar el inóculo.

2. EQUIPO

Balanza electrónica (Ohaus Parsippany, Nueva Jersey, EE.UU.).

Cámara para electroforesis ®BIORAD

Campana de flujo laminar ®VECO

Centrifuga y microcentrifuga ®Eppendorf

Espectrofotómetro para luz UV ®WPA

Estuche de disección

Film óptico ®Platemax

Microscopio óptico (Carl Zeiss LTD, Welwyn Garden City, Reino Unido).

Parafilm

Termociclador Master Cyclor ®Eppendorf

Termociclador ®Applied Biosystems 7500

Termómetro infrarrojo (Thermofocus, 01500A / H1N1, Vedano Olona- Varese, Italia)

Tubos Eppendorf de 0.5 µL, 1.5 mL

Vortex

Pipetas ®Eppendorf de 2 µL, 10 µL, 50 µL, 100 µL, 200 µL y 1000 µL

Puntas estériles ®Axygen libres de ADNAsas y ARNAsas para tomar volúmenes de 2 µL, 10µL, 50µL, 100µL, 200µL y 1000µL estériles.

VII. METODOLOGÍA

1. DISEÑO EXPERIMENTAL

- Variables:

Dependientes: Peso, temperatura, concentración de glucosa en sangre, parasitemia, concentración de citocinas TNF- α e IL10 en suero, concentración de PRL en suero y expresión de los genes TNF- α e IL-10 en cerebro e hipocampo de ratones.

Independientes: Sexo, ausencia del receptor para PRL en los ratones de la cepa C57Bl/6 (knockout), infección con *P. berghei* ANKA.

- Análisis estadístico: Programa Graph Pad Prism 5; prueba de ANOVA de dos vías para análisis de peso, temperatura corporal, concentración de glucosa en sangre, concentración de citocinas TNF- α e IL-10 y concentración de PRL; prueba de ANOVA de una vía para análisis de expresión de los genes TNF- α e IL-10; Prueba de Tukey con valor significativo de $p < 0.05$

Para evaluar el efecto de la PRL sobre la patología en malaria se utilizaron 8 grupos de ratones machos y hembras de 4 a 6 meses de edad, de los cuales 4 grupos fueron silvestres (WT) y 4 grupos knockout (KO) para el receptor de PRL, cada grupo constituido de 5 a 10 ratones. En la Tabla 1 se muestra la distribución de los grupos y el tratamiento, que consistió en infectar a los ratones con 1×10^3 eritrocitos parasitados con *P. berghei* ANKA. Se utilizaron grupos de ratones sin infección como controles.

Tabla 1. Distribución de ratones C57Bl/6. Grupos WT (silvestres) y KO (knockout) para el receptor de PRL, sanos e infectados con *P. berghei* ANKA.

SEXO	GENOTIPO	TRATAMIENTO
HEMRAS	WT	SIN INFECCIÓN
	WT	INFECCIÓN
MACHOS	WT	SIN INFECCIÓN
	WT	INFECCIÓN
HEMRAS	KO	SIN INFECCIÓN
	KO	INFECCIÓN
MACHOS	KO	SIN INFECCIÓN
	KO	INFECCIÓN

Se utilizaron al menos 5 ratones para estudiar las demás variables: concentración de PRL en suero, expresión de los genes TNF- α e IL-10 y concentración de citocinas TNF- α e IL-10 en suero.

Los ratones se sacrificaron en el día 9 post-infección, diariamente se registró el peso, la temperatura y la concentración de glucosa, de igual forma la parasitemia se evaluó diariamente a partir del tercer día post-infección.

2. PROCEDIMIENTO

a) Determinación de peso. La evaluación del peso corporal se realizó diariamente con una balanza electrónica, el peso de los ratones el día de la infección se consideró el 100% y los resultados se presentan en porcentaje relativo al 100% para cada ratón, en cada grupo se graficó la media \pm SEM de cada grupo.⁷⁴

b) Determinación de temperatura. A partir del día 0 y diariamente se registró la temperatura corporal con un termómetro infrarrojo. El registro se realizó a 5 cm del abdomen de los ratones. Los datos en las gráficas representan el promedio de cada grupo en el día indicado \pm SEM.⁷⁴

c) Cuantificación de glucosa en sangre. La concentración de glucosa se determinó con un glucómetro, en la tira reactiva se colocó una gota de sangre, extraída de la cola de los ratones y se registró el resultado de concentración obtenido con el aparato.

d) Parasitemia. Se extrajo una gota de sangre de la cola de los ratones, se prepararon frotis sanguíneos, se permitió que secan para fijar con metanol absoluto y se tiñeron con Giemsa. La parasitemia se evaluó en un microscopio óptico, con la lente 100x y aceite de inmersión. Se contaron los eritrocitos parasitados por campo con relación a los eritrocitos sanos. Si existían menos de 2 eritrocitos parasitados por campo, se evaluaron 50 campos y si existían más de dos eritrocitos parasitados se evaluaron 200 eritrocitos totales. La parasitemia se documentó como la media geométrica del porcentaje de eritrocitos parasitados \pm SD.⁷⁴

e) Toma de muestras de tejido. El noveno día post-infección los ratones se sacrificaron, se obtuvo la sangre de corazón para separar el suero y cuantificar las concentraciones de PRL y de las citocinas TNF- α e IL-10. También se extirparon el cerebro e hipotálamo, de ellos se extrajo ARNm y por retrotranscripción se obtuvo ADNc para determinar la expresión relativa de los genes TNF- α e IL-10.

f) Extracción de ARN

Los tejidos se colocaron en tubos Eppendorf y se maceraron en el ultrasonicador, a una amplitud de 25 Watts durante 5 segundos, se adicionaron 500 μL de reactivo TriPure y 100 μL de la mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico 40:1. La muestras se agitaron durante 15 minutos y se centrifugaron, a 8,000 rpm durante 15 minutos, la fase acuosa se transfirió a un tubo estéril y el ARN se precipitó con 250 μL de isopropanol previamente enfriado a -20°C . Se centrifugó nuevamente a 15,000 rpm por 15 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Al botón se le adicionaron 500 μL de etanol frío al 80 % en agua dietilpirocarbonado (DEPC), se centrifugó nuevamente a 15,000 rpm durante 15 minutos y se eliminó el sobrenadante. El botón se secó a temperatura ambiente y se re-suspendió en 80 μL de agua estéril. Una alícuota se diluyó 1:200 en agua destilada estéril se cuantificó y por espectrofotometría a 260 nm, para calcular la concentración de RNA se utilizó la siguiente fórmula:

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

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

g) Retrotranscripción

Se utilizaron 1.5 μg de ARN, se adicionaron 1.0 μL de oligo dT a una concentración 10 μM y se incubó por 10 minutos a 60°C , inmediatamente se colocó en hielo y se centrifugó durante 10 segundos, se adicionaron 10 μL de una mezcla de reacción que contenía: 4 μL de amortiguador First Strand, 2 μL de dTT 1.5 M, 200 U de la enzima MMLV-RT, 40 U del inhibidor de ARNasa y 0.5 mM de cada dNTP. La mezcla se colocó en el termociclador y se incubó a 37°C durante una hora y a 95°C por 5 minutos. Finalmente se agregaron 80 μL de agua tratada con **dietilpirocarbonado** DEPC para obtener la concentración de 15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ADNc.

3. CONTROLES POSITIVOS PARA CITOCINAS

a) Se infectaron 3 ratones de la cepa CBA/Ca con 5×10^4 eritrocitos parasitados con *P. chabaudi* AS. Los ratones se sacrificaron los 7 días post infección para obtener el bazo. Se extrajo el ARN, se cuantificó y se retrotranscribió de la forma descrita anteriormente. A partir del ADN complementario obtenido en la retrotranscripción, se utilizaron 15 μ g para amplificar en punto final los genes de β -actina, TNF- α e IL-10. La mezcla de reacción para cada gene contenía: cloruro de magnesio 2 mM, oligonucleótidos para cada citocina a una concentración de 100 nM de y 0.025 U de *Taq* Polimerasa, posteriormente se colocó en el termociclador con el siguiente programa:

1. 50°C durante 2 min.
2. 95°C durante 2 min.
3. 95°C durante 30 seg.
4. 65 °C 45 seg.
5. 72°C durante 45 seg
6. Repetir 3-5 durante 40 ciclos

f) Electroforesis. El producto de PCR se colocó en un gel de acrilamida al 5%, el cual contenía 2.745 mL de agua destilada, 1.67 mL de acrilamida bis acrilamida, 1.67 de TBE 10 X, 80 μ L de persulfato de amonio al 10 %, 6 μ L de TEMED. El producto se corrió a 170 volts en una cámara de electroforesis, durante 40 minutos. El gel se tiñó con bromuro de etidio y se revisó en un analizador de geles.

4. TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL PARA LOS GENES DE β -ACTINA, TNF- α E IL-10.

Se prepararon diluciones seriadas de ADNc (15 ng, 3 ng, 0.6 ng y 0.12 ng) correspondientes a los controles positivos de β -actina, TNF- α e IL-10 con el fin de calcular la eficiencia de la reacción.

Los controles positivos y los genes de β -Actina, TNF- α e IL-10 de las muestras en estudio, se amplificaron en una mezcla que contenía 0.03 U de *Taq* polimerasa,

ROX 1X, los oligos correspondientes a una concentración de 200 nM y 6 mM de MgCl₂, para la amplificación de los genes de β-actina e IL-10. Para el gen de TNF-α se utilizó una concentración de 3 mM de MgCl₂. Para IL-10 se utilizó la sonda Taqman a una concentración de 0.1 μM.

La amplificación de cada gen se realizó en el termociclador Applied Biosystems 7500 para PCR en tiempo real, con el siguiente programa: temperaturas de desnaturalización de 95°C por 2 minutos, de extensión de 72°C por 45 segundos y de alineamiento de 60°C por 45 segundos para los genes de β-Actina e IL 10, en tanto que para TNF-α fue de 65°C.

El análisis de la expresión relativa de los genes TNF-α e IL-1 se realizó con respecto al gen β-Actina, con la siguiente ecuación:

Expresión relativa

$$= \frac{(1 + \text{eficiencia TNF}\alpha)^{ct \text{ TNF}\alpha (\text{grupo control}) - ct \text{ TNF}\alpha (\text{grupo de investigación})}}{(1 + \text{eficiencia } \beta\text{actina})^{ct \beta\text{actina}(\text{grupo control}) - ct \beta\text{actina}(\text{grupo de investigación})}}$$

La eficiencia se calculó con la siguiente fórmula: $E = 10^{-1/m}$

Donde m es la pendiente de la curva

4. TÉCNICA DE CUANTIFICACIÓN DE CITOCINAS Th1, Th2, Th17 POR CITOMETRIA DE FLUJO

Para el análisis de la concentración de citocinas se utilizó la técnica de citometría de flujo. Se cuantificaron las proteínas TNF-α e IL-10 en el suero de los ratones, de acuerdo a las especificaciones del método comercial de Becton & Dickinson Th1/Th2/Th17.⁷⁵ El estuche contiene 7 diferentes tipos de perlas recubiertas con anticuerpos de captura específicos para citocinas, incluye TNF-α e IL 10, las muestras se analizaron en el citómetro de flujo.

Las perlas de captura reaccionan con estándares recombinantes de las citocinas o con las muestras problema de suero, después se incuban con los anticuerpos anti-interleucina conjugados a ficoeritrina (PE), se forman complejos tipo sándwich. La

intensidad de fluorescencia emitida por la PE de cada complejo permite detectar la concentración de las citocinas, al comparar con la emitida por las curvas estándar. Los resultados se analizaron con el software del equipo.

Se reconstituyó el vial de los estándares liofilizados con 2 mL del diluyente de ensayo. Se etiquetaron tubos Eppendorf de 1.5 mL para realizar diluciones seriadas de los estándares como sigue: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024 y 1:2048 respectivamente, a cada uno se le adicionaron 100 μ L del diluyente. Se transfirieron 100 μ L del estándar sin diluir al tubo etiquetado como 1:2 y se mezcló, de este tubo se transfirieron 100 μ L al tubo 1:4 y así sucesivamente.

Las perlas se agitaron por 10 segundos en vortex y se adicionaron 3.4 μ L de cada citocina a cada uno de los tubos de muestras, en seguida se adicionaron 25 μ L de los estándares y en otros tubos 25 μ L de cada muestra de suero desconocida. Posteriormente, se adicionaron 17 μ L del reactivo de detección Th1/ Th2/Th17 PE y se incubaron por dos horas a temperatura ambiente, protegido de la luz.

A cada tubo se agregaron 0.4 mL de solución de lavado y se eliminó el sobrenadante por centrifugación a 200 rpm por 5 minutos. Después de eliminar el sobrenadante, se adicionaron 100 μ L de solución de FACS para re-suspender el botón. El análisis de las muestras se realizó en el citómetro de flujo Aria II BD.

5. TÉCNICA DE ELISA PARA CUANTIFICACIÓN DE PRL EN SUERO.

La cuantificación de la PRL en suero de los ratones se realizó con la técnica de ELISA, recomendada en ratones C57Bl/6 por Guillou, 2015.⁷⁶ El procedimiento consistió en incubar a 4 °C y durante la noche el anticuerpo antiprolactina, diluido 1.1000 con PBS. Al día siguiente, la solución se decantó y lavó con PBS, posteriormente se adicionaron 200 μ L de leche descremada como solución bloqueadora, se incubó por dos horas, se decantó y lavó con PBS. Se adicionaron 50 μ L las muestras de suero de los ratones y el estándar (por duplicado), se incubó a temperatura ambiente por dos horas, se decantó y lavó con PBS. Se incorporaron 50 μ L del anticuerpo de conejo anti PRL ratón, se incubó a

temperatura ambiente por dos horas, se decantó y lavó con PBS. Se adicionaron 50 µl del segundo anticuerpo anti conejo conjugado con la enzima peróxidasa de rábano (diluido con la solución de bloqueo al 50 % y 50 % con PBS), a temperatura ambiente se incubó por 90 minutos. Se adicionó O-fenilenolamina como sustrato de la enzima y se incubó por 30 minutos protegido de la luz. Finalmente se adicionaron 50 µL de HCl 3 M como solución de paro, las muestras se analizaron en el espectrofotómetro a una densidad óptica de 490 nm.

VIII. RESULTADOS

1. CUANTIFICACIÓN DE PRL

Para confirmar la HPRL en los ratones KO cuantificamos la concentración de PRL en el suero de todos los grupos. En la Tabla 2 se muestra el promedio de la concentración de PRL en el día 8 post-infección.

Tabla 2. Concentración promedio de PRL en los diferentes grupos de ratones WT y KO

SEXO	GENOTIPO	TRATAMIENTO	PROMEDIO PRL SUERLO (ng/mL)	ERROR SD
HEMBRAS	WT	SIN INFECCIÓN	3.14	.988
		INFECCIÓN	3.5	.904
	KO	SIN INFECCIÓN	388.20	66.841
		INFECCIÓN	321.077	77.870
MACHOS	WT	SIN INFECCIÓN	1.72	.430
		INFECCIÓN	2.36	.183
	KO	SIN INFECCIÓN	62.15	11.306
		INFECCIÓN	36.27	8.517

Se detectó que la concentración de PRL en las hembras y machos WT y KO no se modificó cuando los ratones se infectaron con *P. berghei* ANKA (Figura 9).

Confirmamos HPRL en los ratones hembras y machos KO sin infección, las concentraciones de PRL en el suero, incrementaron significativamente con relación a los ratones WT hembras y machos sanos (Figura 9).

Respecto al sexo, se detectó que las hembras KO con o sin infección presentaron mayor concentración de PRL que los machos KO en la misma condición (Figura 9).

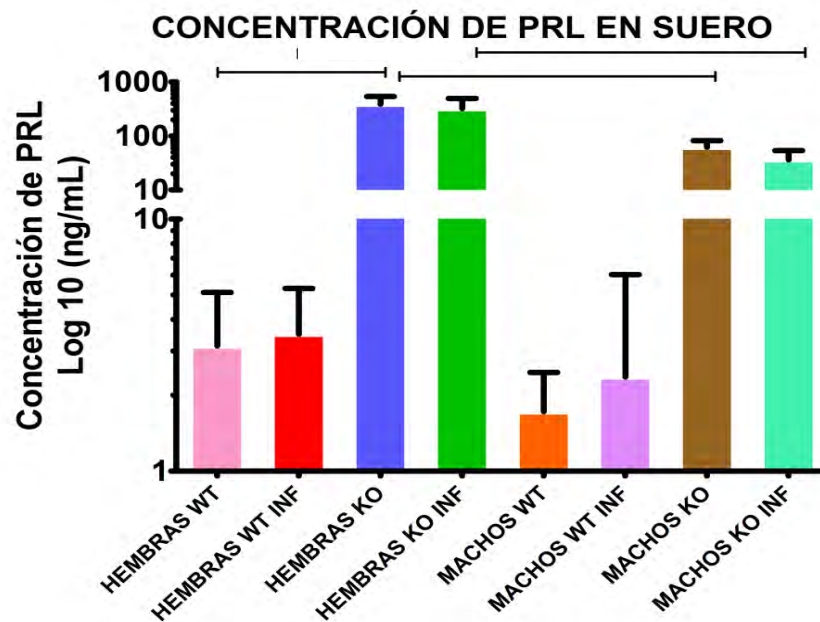


Figura 9. Concentración de PRL en el suero de hembras y machos infectados con *P. berghei* ANKA. Grupos de ratones machos y hembras KO para el receptor de PRL y WT (silvestres) se infectaron con *P. berghei* ANKA. En el día 8 post infección los ratones se sacrificaron, se les extrajo suero y se cuantificó la concentración de PRL con la técnica de ELISA. Cada punto representa el valor promedio de 5 ratones analizados por duplicado y la desviación estándar. Se utilizó la prueba estadística ANOVA de una vía con prueba Posthoc de Tukey con un valor significativo de $p < 0.05$. Las barras sobre el histograma representan diferencias estadísticas entre los grupos.

2. EFECTO DE LA PRL SOBRE EL PESO DE RATONES INFECTADOS CON *P. berghei* ANKA.

Para determinar si la PRL regula el peso corporal en malaria, se pesaron los ratones de los grupos todos los grupos. El peso en el día cero de la infección se consideró como 100% para cada ratón. Durante la infección los ratones se pesaron diariamente.

No se detectó diferencia estadísticamente significativa entre el peso corporal de las hembras WT y las hembras KO con o sin infección hasta el día 4 post-infección (Figura 10). Sin embargo, en ambos genotipos infectados disminuyó el peso a partir del día 5 en los KO y del día 6 post-infección en los WT (Figura 10).

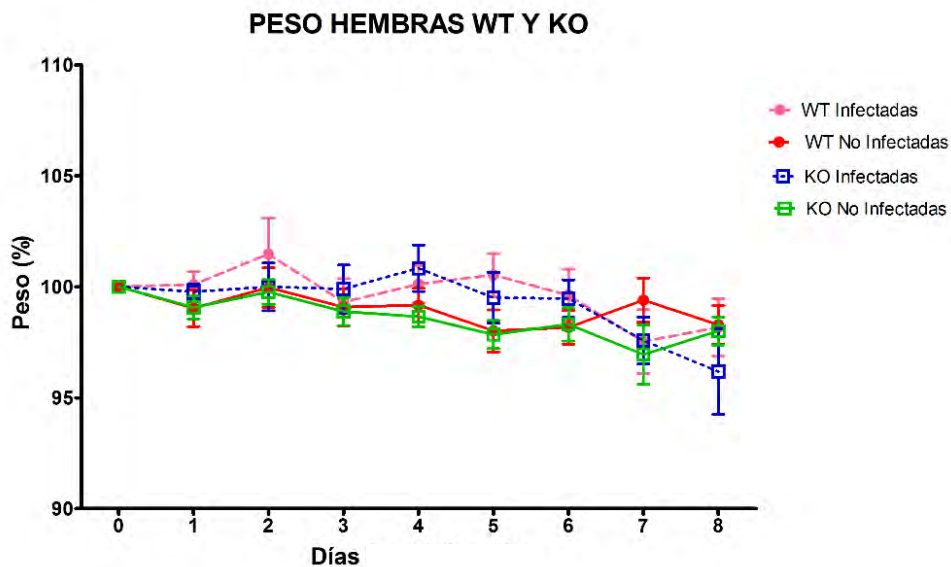


Figura 10. Efecto de la PRL sobre el cambio en el peso corporal en las hembras. Grupos de ratones hembras KO para el receptor de PRL y WT (silvestres) se infectaron con *P. berghei* ANKA. Diariamente se registró el peso corporal a partir del día de la infección (0). También se analizó el cambio de peso en ratones hembras KO y WT sin infección, como controles. Cada punto representa el valor promedio de 5 ratones y la desviación estándar. Se utilizó la prueba estadística ANOVA de dos vías con prueba de Posthoc de Bonferroni con un valor significativo de $p < 0.05$.

En los ratones machos WT, el peso no se modificó con la infección hasta el día 6 post-infección, a diferencia de los KO infectados, que incrementaron significativamente el peso corporal al siguiente día de la infección. Sin embargo, en ambos grupos el peso comenzó a disminuir progresivamente a partir del día 5 post-infección y hasta el día del sacrificio (Figura 11).

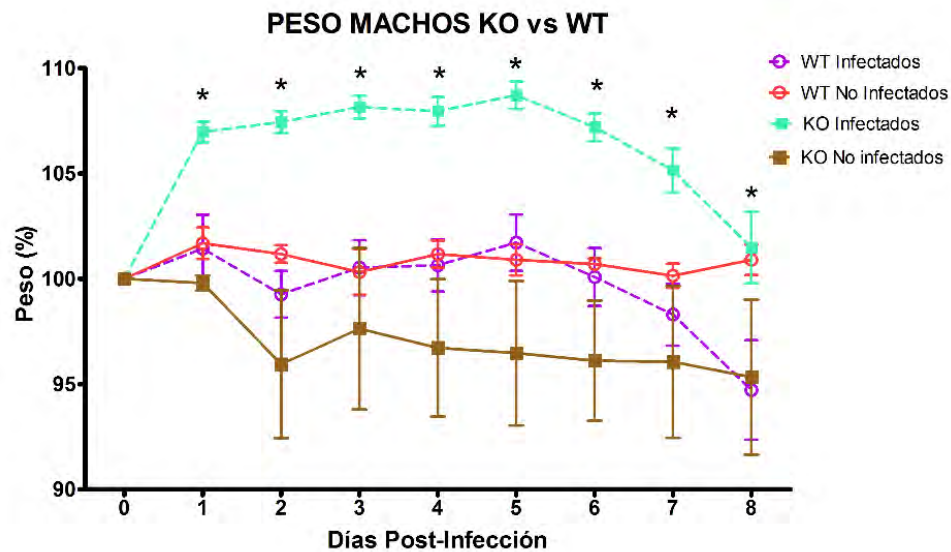


Figura 11. Efecto de la PRL sobre el cambio en el peso corporal en los machos. Grupos de ratones machos KO para el receptor de PRL y WT (silvestres) se infectaron con *P. berghei* ANKA. Diariamente, se registró el peso corporal a partir del día de la infección (0). También se analizó el cambio de peso en ratones machos KO y WT sin infección que se utilizaron como controles. Cada punto representa el valor promedio de 5 ratones y la desviación estándar. Se utilizó la prueba estadística ANOVA de dos vías con prueba de Posthoc de Bonferroni con un valor significativo de $p < 0.05$. *Representa la diferencia estadísticamente significativa con relación al grupo control.

Para analizar si la PRL afecta de forma diferencial el cambio de peso corporal entre hembras y machos durante la infección, se realizó la comparación entre los sexos. Los ratones machos KO incrementaron significativamente su peso en relación a las hembras KO (Figura 12).

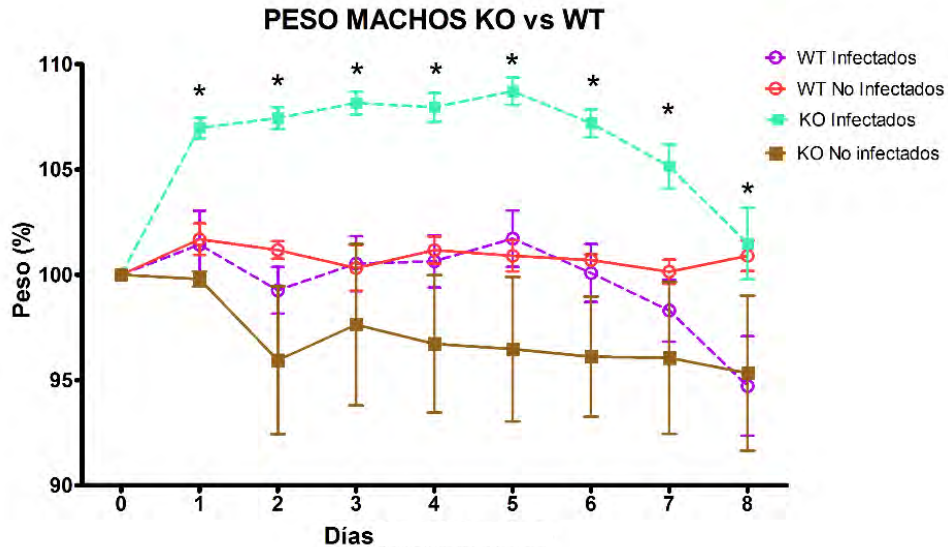


Figura 12. Efecto de la PRL sobre el cambio en el peso corporal en los machos. Grupos de ratones machos KO para el receptor de PRL y WT (silvestres) se infectaron con *P. berghei* ANKA. Diariamente, se registró el peso corporal a partir del día de la infección (0). También se analizó el cambio de peso en ratones machos KO y WT sin infección que se utilizaron como controles. Cada punto representa el valor promedio de 5 ratones y la desviación estándar. Se utilizó la prueba estadística ANOVA de dos vías con prueba de Posthoc de Bonferroni con un valor significativo de $p < 0.05$. *Representa la diferencia estadísticamente significativa con relación al grupo control.

3. EFECTO DE LA PRL SOBRE LA TEMPERATURA DE RATONES INFECTADOS CON *P. berghei* ANKA.

Para determinar si la PRL interviene en la regulación de la temperatura en malaria, se evaluó este parámetro diariamente. En las hembras WT infectadas se detectó menor temperatura que en las hembras WT sanas, con diferencia significativa solo en los días 5 y 6 post-infección. Mientras que en las hembras KO la temperatura corporal no se modificó con la infección. (Fig.13).

Las hembras que carecen del receptor funcional de PRL no infectadas presentaron menor temperatura que las hembras WT sanas, con diferencia significativa los días 7 y 8 post-infección (Figura 13).

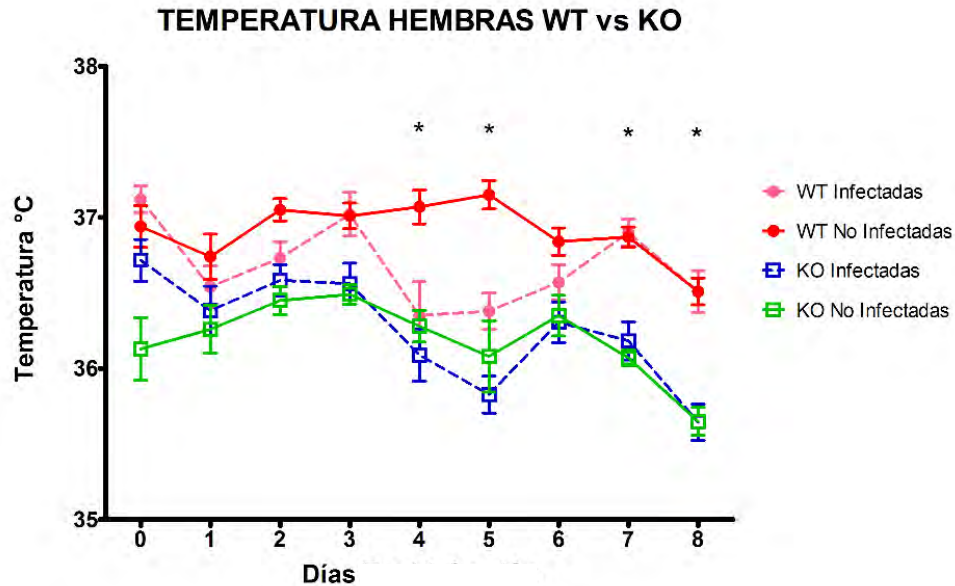


Figura 13. Efecto de la PRL sobre el cambio en la temperatura en las hembras. Grupos de ratones hembras KO para el receptor de PRL y WT (silvestres) se infectaron con *P. berghei* ANKA. Diariamente, se registró la temperatura corporal a partir del día de la infección (0). También se analizó la temperatura en ratones hembras KO y WT sin infección que se utilizaron como controles. Cada punto representa el valor promedio de 5 ratones y la desviación estándar. Se utilizó la prueba estadística ANOVA de dos vías con prueba de Posthoc de Bonferroni con un valor significativo de $p < 0.05$. *Representa la diferencia estadísticamente significativa con relación al grupo control.

En los machos, no se registraron diferencias significativas en la temperatura corporal, entre los distintos grupos, a excepción del día 5 post-infección en el que los KO sin infección presentaron significativamente menor temperatura que los WT sanos. También se registró, que el día del sacrificio los ratones machos WT presentaron significativamente menor temperatura con la infección. Es importante señalar que en los grupos de ratones machos WT y KO infectados, se registraron descensos importantes de temperatura el día del sacrificio (Figura 14).

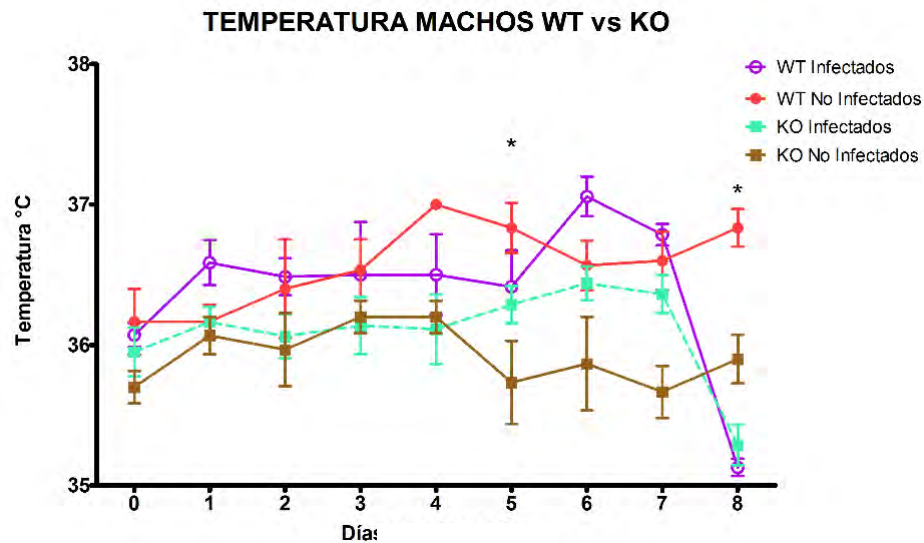


Figura 14. Efecto de la PRL sobre el cambio en la temperatura en ratones machos infectados con *P. berghei* ANKA. Grupos de ratones machos KO para el receptor de PRL y WT (silvestres) se infectaron con *P. berghei* ANKA. Diariamente, se registró la temperatura corporal a partir del día de la infección (0). También se analizó la temperatura en ratones machos KO y WT sin infección que se utilizaron como controles. Cada punto representa el valor promedio de 5 ratones y la desviación estándar. Se utilizó la prueba estadística ANOVA de dos vías con prueba de Posthoc de Bonferroni con un valor significativo de $p < 0.05$. *Representa la diferencia estadísticamente significativa con relación al grupo control.

Se comparó si existía una respuesta distinta, por efecto de la infección entre machos y hembras. Detectamos que la temperatura corporal fue similar en ambos sexos, tanto en WT como en KO. No obstante, el día del sacrificio, los machos infectados WT y KO, presentaron descenso de temperatura más acentuados que las hembras infectadas, con diferencia significativa de menor temperatura en los machos WT que las hembras con el mismo genotipo (Figura 15).

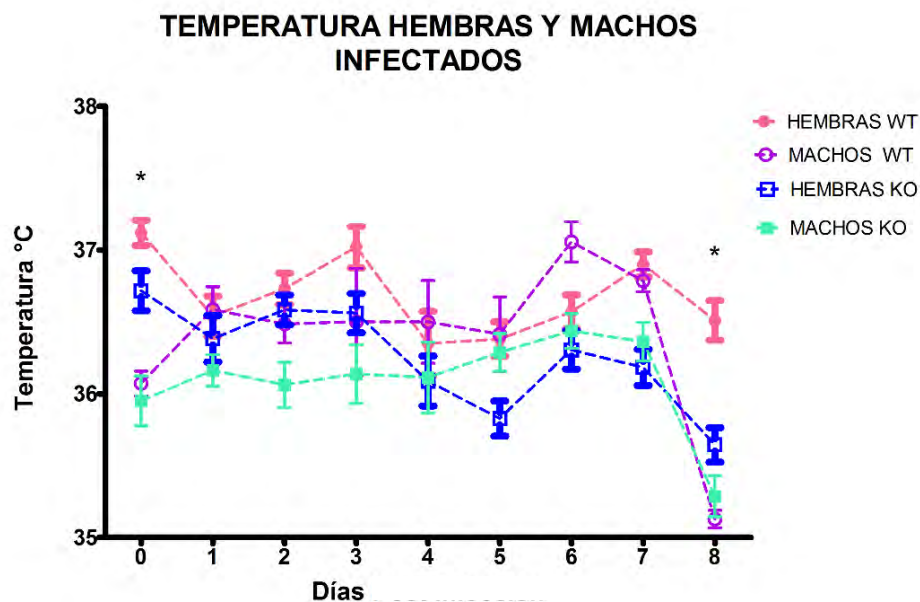


Figura 15. Efecto de la PRL sobre el cambio en la temperatura entre hembras y machos infectados con *P. berghei* ANKA. Grupos de ratones machos y hembras KO para el receptor de PRL y WT (silvestres) de ambos sexos se infectaron con *P. berghei* ANKA. Diariamente, se registró la temperatura corporal a partir del día de la infección (0). También se analizó la temperatura en ratones machos KO y WT sin infección que se utilizaron como controles. Cada punto representa el valor promedio de 5 ratones y la desviación estándar. Se utilizó la prueba estadística ANOVA de dos vías con prueba de Posthoc de Bonferroni con un valor significativo de $p < 0.05$. *Representa la diferencia estadísticamente significativa con relación al grupo control.

4. EFECTO DE LA PRL SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA EN RATONES INFECTADOS CON *P. berghei* ANKA.

En malaria se presenta hipoglucemia y la PRL está relacionada con en el metabolismo de la glucosa ⁷³, razón por la que evaluamos el papel de esta hormona durante la infección.

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de glucosa sanguínea entre las hembras WT y KO sanas y las WT y KO infectadas. Sin embargo, la glucemia comenzó a disminuir en los grupos infectados a partir del día 6 post-infección y hasta el día del sacrificio (Figura 16).

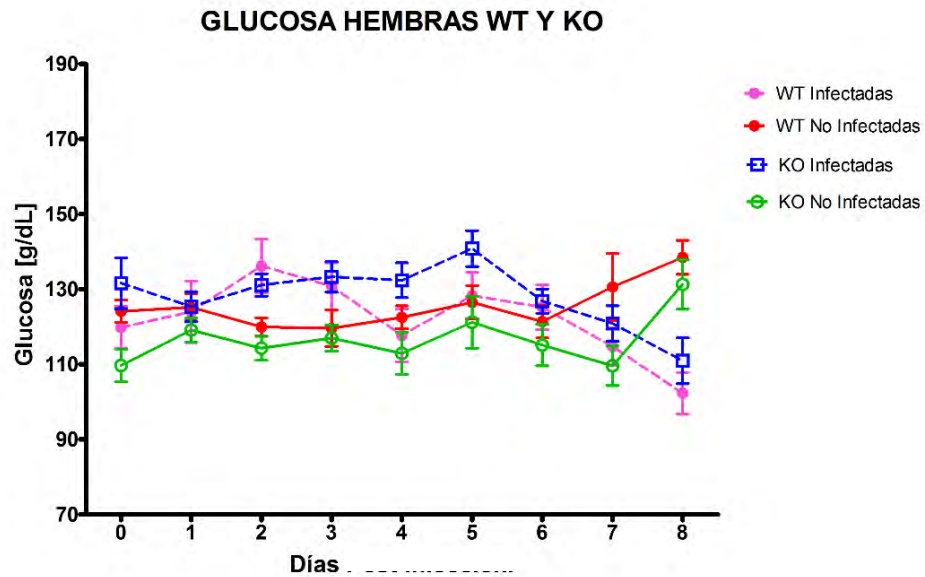


Figura 16. Efecto de la PRL sobre la concentración de glucosa en hembras WT y KO infectadas con *P. berghei* ANKA. Grupos de hembras KO para el receptor de PRL y WT (silvestres) se infectaron con *P. berghei* ANKA. Diariamente, se registró la concentración de glucosa a partir del día de la infección (día 0). También se analizó la concentración de glucosa en ratones machos KO y WT sin infección. Cada punto representa el valor promedio de 5 ratones y la desviación estándar. Se utilizó la prueba estadística ANOVA de dos vías con prueba de Posthoc de Bonferroni con un valor significativo de $p < 0.05$.

También se estudió si la PRL modificaba la concentración de glucosa en los machos infectados con *P. berghei* ANKA. Al igual que en hembras, no detectamos diferencia significativa, entre la glucemia de ratones machos WT y KO, con o sin infección. No obstante, se registró lo mismo que en las hembras, disminución en la concentración de la glucosa en los machos infectados WT y KO, a partir del día 7 post-infección y hasta el día del sacrificio, día (8) en que la diferencia resultó significativa con relación a los grupos no infectados (Figura 17).

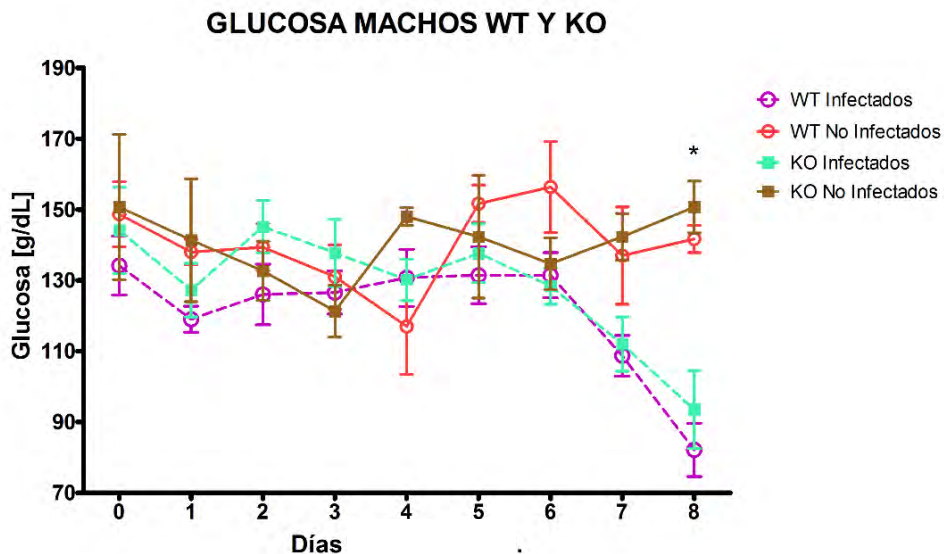


Figura 17. Efecto de la PRL sobre la concentración de glucosa en machos WT y KO infectados con *P. berghei* ANKA. Grupos de machos KO para el receptor de PRL y WT (silvestres) se infectaron con *P. berghei* ANKA. Diariamente, se registró la concentración de glucosa a partir del día de la infección (cero). También se analizó la concentración de glucosa en ratones machos KO y WT sin infección. Cada punto representa el valor promedio de 5 ratones y la desviación estándar. Se utilizó la prueba estadística ANOVA de dos vías con prueba de Posthoc de Bonferroni con un valor significativo de $p < 0.05$. *Representa la diferencia estadísticamente significativa con relación al grupo control.

Con relación al sexo y la infección, no detectamos diferencias estadísticamente significativas en la concentración de glucosa entre machos y hembras WT y KO. Aunque es evidente la disminución de la glucemia desde el día 5 post-infección y hasta el día del sacrificio, en el que los machos WT presentaron glucemia mas baja (Figura 18).

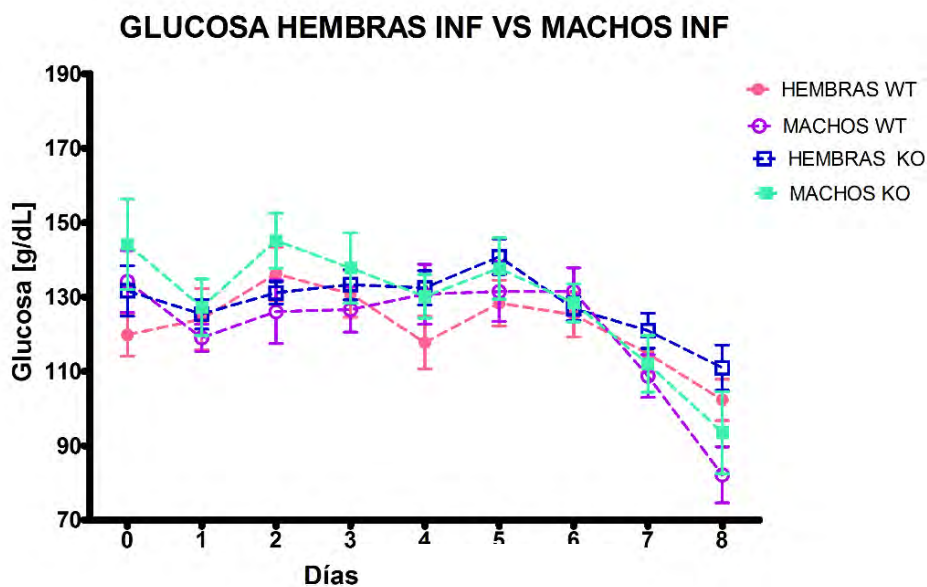


Figura 18. Efecto de la PRL sobre el cambio en la concentración de glucosa entre hembras y machos infectados con *P. berghei* ANKA. Grupos de ratones machos y hembras KO para el receptor de PRL y WT (silvestres) de ambos sexos se infectaron con *P. berghei* ANKA. Diariamente, se registró la concentración de glucosa a partir del día de la infección (día 0). También se analizó concentración de glucosa en la sangre de ratones machos KO y WT sin infección que se utilizaron como controles. Cada punto representa el valor promedio de 5 ratones y la desviación estándar. Se utilizó la prueba estadística ANOVA de dos vías con prueba de Posthoc de Bonferroni con un valor significativo de $p < 0.05$.

5. EFECTO DE LA PRL SOBRE LA PARASITEMIA EN RATONES INFECTADOS CON *P. berghei* ANKA.

Evaluamos si la PRL afecta la eliminación del *Plasmodium*. Los ratones machos y hembras KO desarrollaron parasitemias significativamente menores que los ratones WT. La parasitemia en las hembras inició el día 7 post-infección mientras que en los machos el día 5 post infección. Además los machos WT y KO desarrollaron parasitemias significativamente más altas que las hembras del mismo genotipo correspondiente (Figura 19).

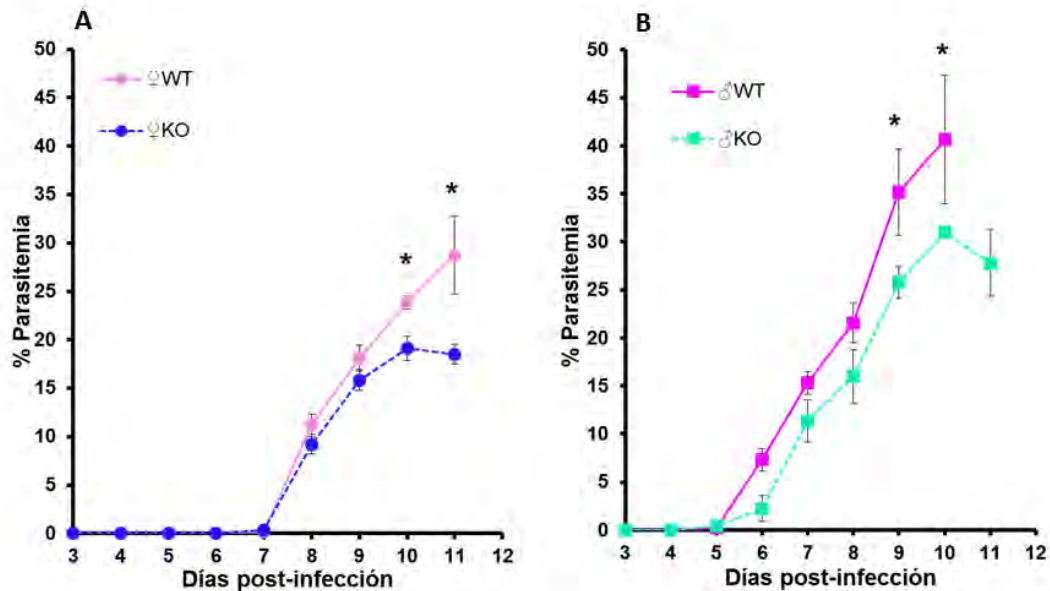


Figura 19. Efecto de la PRL sobre la parasitemia de ratones machos y hembras infectados con *P. berghei* ANKA. Grupos de ratones hembras silvestres (WT) y knockout para el receptor de PRL (KO), se infectaron con *P. berghei* ANKA. A) Parasitemia en las hembras, B) parasitemia en los machos. A partir del día 3 post-infección se determinó la parasitemia diariamente. Cada punto representa la media geométrica de al menos 5 ratones y el SEM. El *indica diferencias estadísticamente significativas con la prueba de signo.

6. EXPRESIÓN DE GENES

6.1 CONTROLES POSITIVOS

Los controles positivos de las citocinas se obtuvieron de ratones CBA/Ca infectados con *P. chabaudi* AS y sacrificados a los 8 días post-infección. Del bazo se obtuvo el ARNm, se cuantificó y se retrotranscribió como se indica en los métodos. Las moléculas de ADNc de los genes β -Actina, TNF- α e IL-10 se

amplificaron por PCR en punto final, los productos se analizaron en geles de acrilamida al 5 % con la técnica de electroforesis (Figura 20

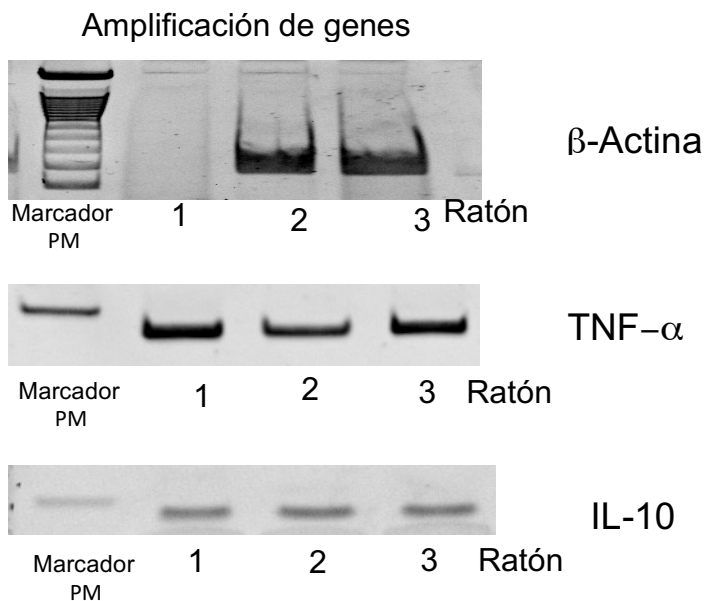


Figura 20. Controles positivo para los gen β-Actina, TNF-α e IL-10. Se infectaron 3 ratones CBA/Ca con 5×10^4 eritrocitos parasitados con *P. chabaudi* AS, sacrificados a los 8 días post-infección para extraer del bazo el ARN, retrotranscribirlo y amplificar el ADNc.

6.2 VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL

Para cada citocina fue indispensable validar la técnica de PCR en Tiempo real, se tuvo la seguridad de que los genes amplificados correspondieran a β-Actina, TNF-α e IL-10. También se tuvo la certeza de que el ADNc de los controles positivos presentaran eficiencias adecuadas y semejantes, para ello se prepararon diluciones seriadas y se amplificaron en condiciones óptimas, descritas en la metodología (Figura 21)

Curva de amplificación de IL-10

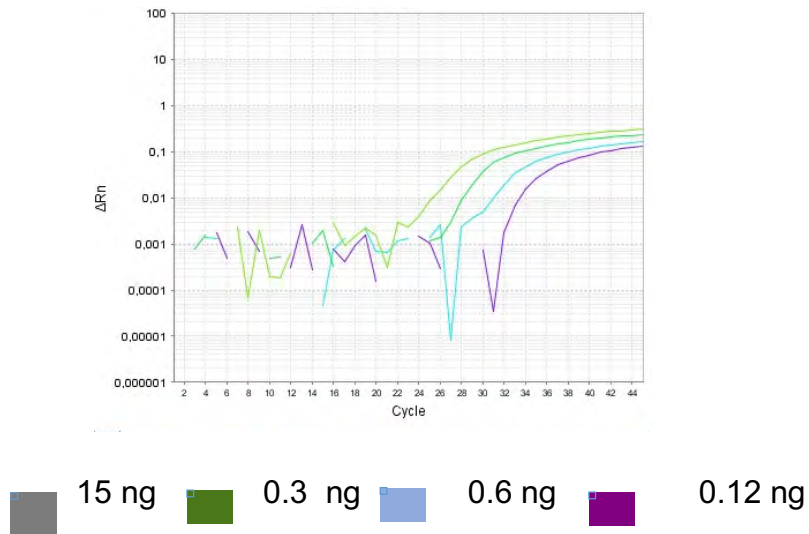


Figura 21. Curva de amplificación de IL-10. Amplificación de diluciones seriadas con factor 1:5 del ADNc del control positivo para IL-10. Se grafica en el eje de las abscisas el número de ciclos contra la fluorescencia.

Con las diluciones seriadas se obtuvo la curva estándar de cada uno de los genes amplificados y se calculó la eficiencia (Figura 22)

Curva estándar para IL-10

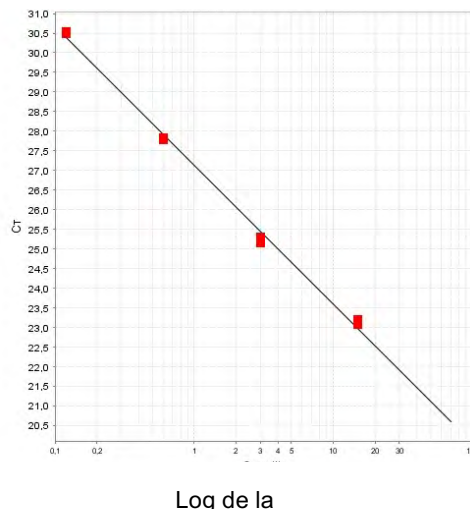


Figura 22. Gráfica de la curva estándar de IL-10. En el eje de las abscisas se grafica el logaritmo base 10 de la concentración de ADNc contra el Ct de la dilución.

La validación se cumple si el valor de la pendiente es de $-3.32 \pm 10 \%$ y la Eficiencia es el $100 \% \pm 10 \%$. En nuestros resultados, las eficiencias de amplificación se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Eficiencias de amplificación de los genes β -Actina, TNF- α e IL-10. El ADNc de los controles positivos diluido en series de 1:5, amplificación por PCR Tiempo real en el equipo Applied Biosystems 7500. Pendiente calculada por el software V 2.0.5 y la eficiencia calculada con la ecuación $E = (10^{-1/\text{pendiente}}) * 100$

GEN	PENDIENTE	EFICIENCIA (%)
β -Actina	-3.371	97.99
TNF- α	-3.353	107.55
IL-10	-3.499	93.10

6.3 EFECTO DE LA PRL SOBRE LA EXPRESIÓN RELATIVA DEL GEN TNF α .

El TNF- α participa en los procesos inflamatorios en el cerebro durante la infección con *P. berghei* ANKA, además la complicación más grave de esta enfermedad es la malaria cerebral y como los genes de las citocinas se regulan hormonalmente, analizamos si la PRL regula la expresión de este gen en cerebro e hipocampo de los ratones infectados con *P. berghei* ANKA.

6.3.1 Efecto de la PRL sobre la expresión de TNF- α en el cerebro de ratones infectados con *P. berghei* ANKA.

Detectamos que la expresión relativa del gen TNF- α , en el cerebro de hembras WT y KO disminuyó significativamente cuando los grupos de ratones se infectaron con *P. berghei* ANKA. Por el contrario, en los machos WT y KO infectados no se detectaron modificaciones significativas en la expresión de este gen en el cerebro (Figura 23).

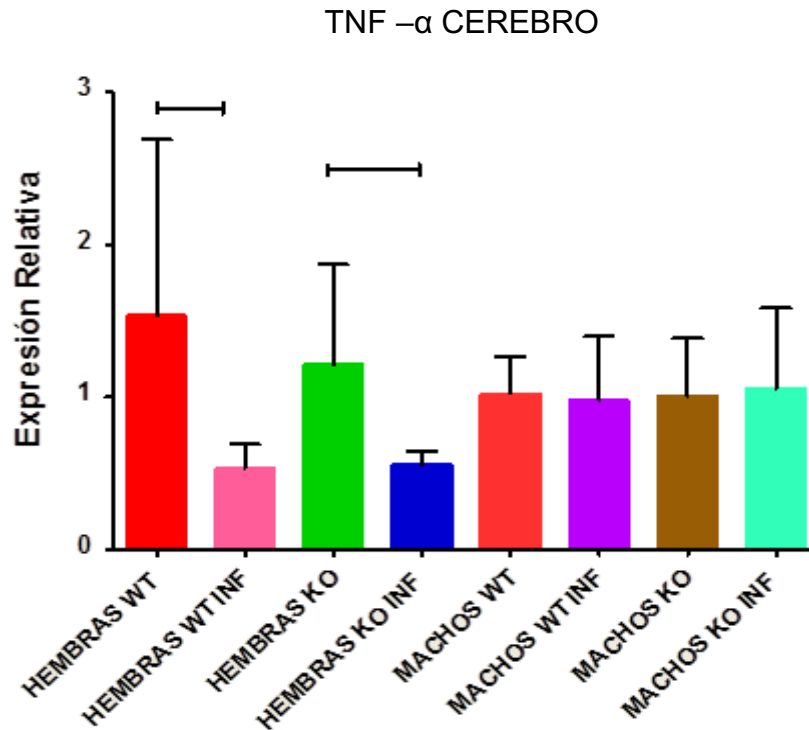


Figura 23. Efecto de la PRL sobre la expresión de TNF- α en el cerebro de hembras y machos infectados con *P. berghei* ANKA. Grupos de ratones machos y hembras KO para el receptor de PRL y WT (silvestres) de ambos sexos se infectaron con *P. berghei* ANKA. En el día 8 post infección los ratones se sacrificaron y se les extrajo RNA de cerebro que se retrotranscribió y el gene de TNF- α se amplificó por PCR en tiempo real. Cada punto representa el valor promedio de 5 ratones analizados por duplicado y la desviación estándar. Se utilizó la prueba estadística ANOVA de una vía con prueba de Tukey con un valor significativo de $p < 0.05$. Las barras sobre el histograma representan diferencias estadísticas entre los grupos.

6.3.2 Efecto de la PRL sobre la expresión de TNF- α en el hipocampo de ratones infectados con *P. berghei* ANKA.

El incremento en TNF- α se asocia con malaria cerebral⁶⁰ y se desconoce si la PRL regula este gen en el cerebro, particularmente en el hipocampo. Por lo anterior, determinamos la expresión de TNF- α en el hipocampo de ratones WT y KO infectados con *P. berghei* ANKA.

En el hipocampo de hembras WT y KO, la expresión relativa del gen TNF- α disminuyó significativamente en los ratones infectados, lo mismo se registró en los

machos KO infectados. En cambio, en los machos WT, la expresión de este gen no se modificó con la infección (Figura 24).

No se encontró diferencia en la expresión de TNF- α en machos y en hembras WT. Por el contrario, en los machos KO, la expresión de este gen se incrementó significativamente en comparación con las hembras KO (Figura 24).

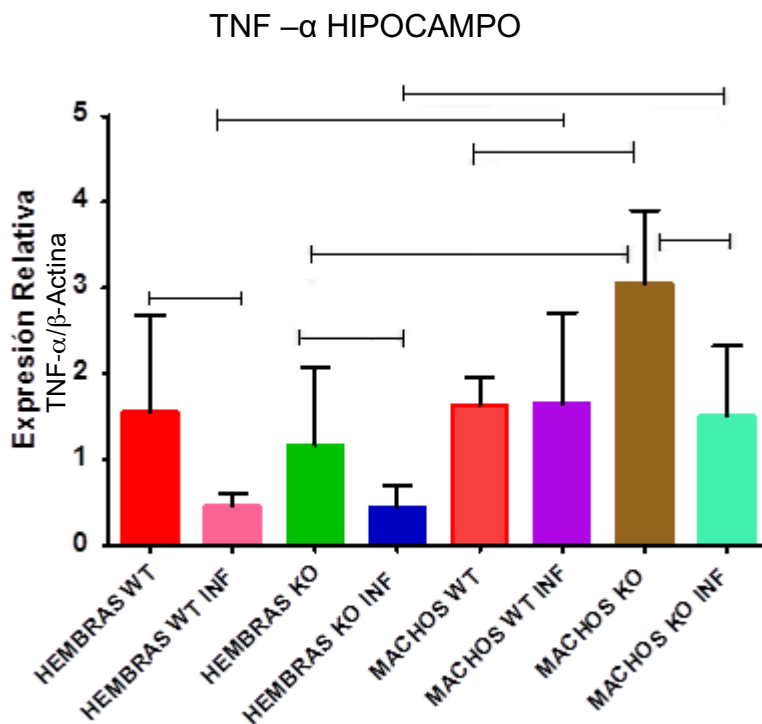


Figura 24. Efecto de la PRL sobre la expresión de TNF- α en el hipocampo de hembras y machos infectados con *P. berghei* ANKA. Grupos de ratones machos y hembras KO para el receptor de PRL y WT (silvestres) se infectaron con *P. berghei* ANKA. En el día 8 post infección los ratones se sacrificaron y se les extrajo RNA de hipocampo que se retrotranscribió y el gene de TNF- α se amplificó por PCR en tiempo real. Cada punto representa el valor promedio de 5 ratones analizados por duplicado y la desviación estándar. Se utilizó la prueba estadística ANOVA de una vía con prueba de Posthoc de Tukey con un valor significativo de $p < 0.05$. Las barras sobre el histograma representan diferencias estadísticas entre los grupos.

Al comparar la expresión de TNF- α entre los sexos detectamos que la expresión de TNF- α fue significativamente menor en las hembras infectadas que en los machos ya sean WT o KO infectados (Figura 24).

6.4 EFECTO DE LA PRL SOBRE LA EXPRESIÓN DE IL-10 EN EL CEREBRO DE RATONES INFECTADOS CON *P. berghei* ANKA.

La IL-10 regula negativamente la síntesis de TNF- α ,⁴⁰ por lo que decidimos analizar si la PRL modula la expresión de IL-10 en el cerebro y en el hipocampo de ratones WT y KO infectados con *P. berghei* ANKA.

Después de calibrar la técnica de PCR en tiempo real para la amplificación de IL-10, se analizó la expresión de IL-10 en cerebro e hipocampo de los ratones WT y KO infectados con *P. berghei* ANKA.

La eficiencia de la reacción fue cercana al 100% y la amplificación de los controles positivos indicaron que la técnica permitía determinar de forma adecuada, la expresión de IL-10. Sin embargo, no detectamos amplificación de este gen en las muestras de cerebro e hipocampo correspondientes a este experimento, probablemente porque la expresión de este gen se encontraba abajo del nivel de detección de la técnica.

7. EFECTO DE LA PRL SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE TNF- α EN EL SUERO DE RATONES INFECTADOS CON *P. berghei* ANKA POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

En la malaria se incrementa el TNF- α , para determinar si la PRL modula la concentración sérica de TNF- α , cuantificamos su concentración todos los ratones. Detectamos que la concentración de TNF- α el suero de las hembras WT y KO disminuyó significativamente al infectarlos con *P. berghei* ANKA, mientras que en los machos WT y KO no se registraron modificaciones, en la concentración de esta citocina, cuando los grupos de ratones, en ambos genotipos, se infectaron (Figura 25).

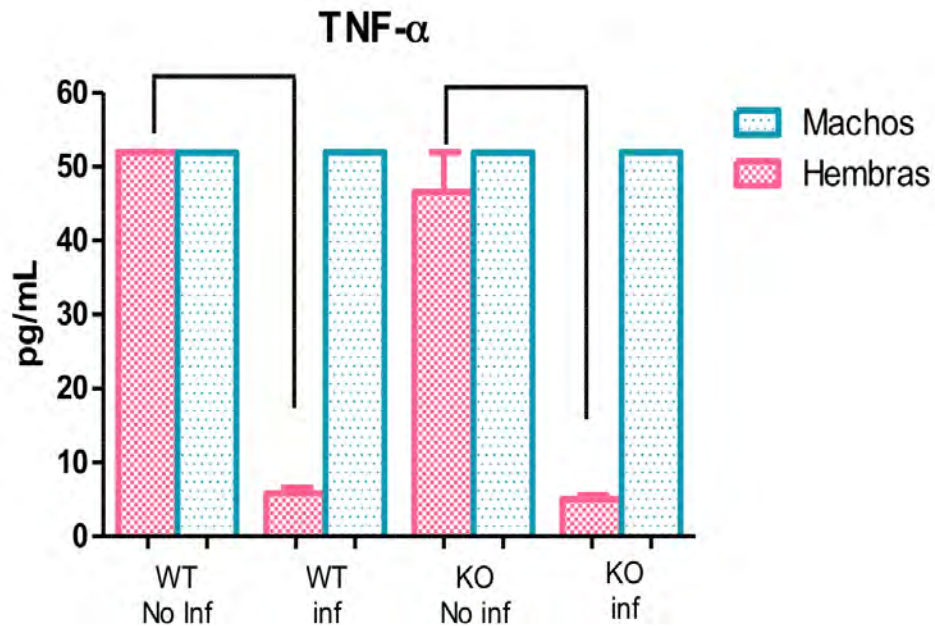


Figura 25. Efecto de la PRL sobre la concentración de TNF- α en el suero de hembras y machos infectados con *P. berghei* ANKA. Grupos de ratones machos y hembras KO para el receptor de PRL y WT (silvestres) se infectaron con *P. berghei* ANKA. En el día 8 post infección los ratones se sacrificaron y se les extrajo suero y se cuantificó la concentración de TNF- α por citometría de flujo. Cada punto representa el valor promedio de 5 ratones analizados por duplicado y la desviación estándar. Se utilizó la prueba estadística ANOVA de una vía con prueba de Posthoc de Tukey con un valor significativo de $p < 0.05$. Las barras sobre el histograma representan diferencias estadísticas entre los grupos.

9. EFECTO DE LA PRL SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE IL-10 EN EL SUERO DE RATONES INFECTADOS CON *P. berghei* ANKA POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

La concentración de esta citocina no se modificó, en las hembras sanas e infectadas con el genotipo WT o KO. Por el contrario, en los machos WT y KO se detectó que la concentración de IL-10 disminuyó significativamente cuando se infectaron. También se registró que los machos WT sanos producen mayor cantidad de IL-10 que los ratones KO no infectados (Figura 26).

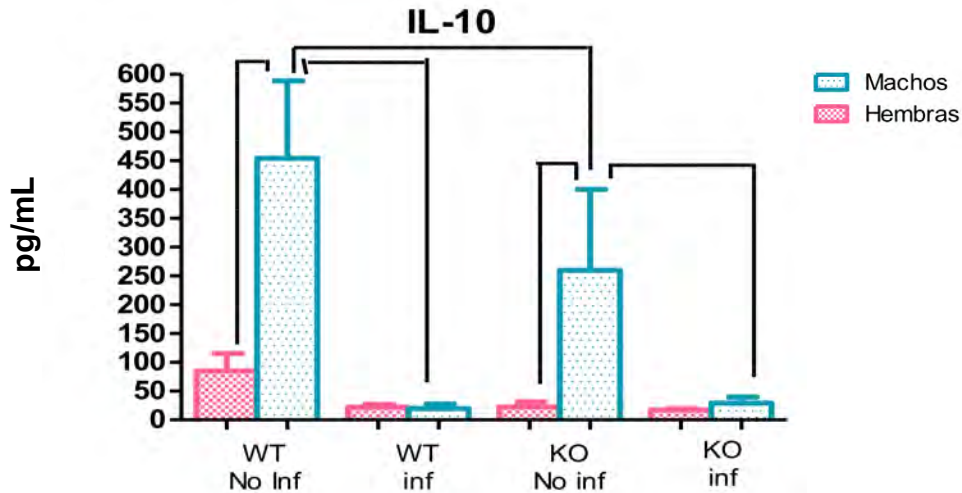


Figura 26. Efecto de la PRL sobre la concentración de IL-10 en el suero de hembras y machos infectados con *P. berghei* ANKA. Grupos de ratones machos y hembras KO para el receptor de PRL y WT (silvestres) se infectaron con *P. berghei* ANKA. En el día 8 post infección los ratones se sacrificaron y se les extrajo suero y se cuantificó la concentración de IL-10 por citometría de flujo. Cada punto representa el valor promedio de 5 ratones analizados por duplicado y la desviación estándar. Se utilizó la prueba estadística ANOVA de una vía con prueba de Posthoc de Tukey con un valor significativo de $p < 0.05$. Las barras sobre el histograma representan diferencias estadísticas entre los grupos.

IX. DISCUSIÓN

Se ha documentado que los ratones KO con deficiencias en el receptor de PRL desarrollan HPRL.⁷⁷ Nuestros resultados confirman este hallazgo, las hembras y machos KO presentaron en el suero, mayor cantidad de esta hormona con relación al genotipo silvestre. Este resultado sugiere que posiblemente la concentración elevada de PRL sea una consecuencia de la falta de interacción de la hormona con su receptor, lo que se traduce en una mayor síntesis de PRL para tratar de compensar la deficiencia en la interacción. Lo anterior es posible debido a que la PRL ejerce una retroalimentación negativa sobre su propia secreción hipofisiaria, mediada a través del aumento en la producción de dopamina hipotalámica.⁷⁸

Resulta interesante que tanto las hembras y machos KO sobrevivan a las concentraciones altas de PRL, por lo que es recomendable realizar estudios que ayuden a explicar este comportamiento.

Las hembras KO presentaron mayor concentración de PRL que los machos, la diferencia sugiere que la inhibición de la PRL de su propia síntesis es mayor en hembras que en machos, probablemente para contrarrestar la acción estimuladora de la secreción de la PRL por parte de los estrógenos.⁷⁹ Por lo anterior, es probable que las hormonas sexuales modulen la síntesis de PRL.

En este trabajo, las concentraciones de PRL no se modificaron en los ratones silvestres y KO al infectarse con *Plasmodium berghei* ANKA.

Relativo al peso corporal, se ha descrito que en la malaria, la caquexia es un marcador de la severidad de la enfermedad que se acompaña de anemia y pérdida de peso.^{6, 8, 80} Los ratones hembras y machos IRC infectados con *P. berghei* ANKA, disminuyen el peso corporal, desde el tercer día post-infección.⁹

Lo anterior concuerda con nuestros resultados, solo que en la cepa de ratones C57Bl/6 WT y KO, infectados con *Plasmodium berghei* ANKA, la pérdida de peso inició entre los días 6 y 7 post-infección y disminuyó progresivamente hasta el día del sacrificio. Posiblemente, este resultado se deba a que la cepa de ratones de nuestro experimento fue menos susceptible a la infección. En días posteriores al sacrificio, la infección disminuyó significativamente el peso corporal en los ratones (datos no mostrados del laboratorio de Inmunología molecular, FES Zaragoza U.N.A.M).

Por otra parte, Freemark et al. encontraron en el modelo de ratones KO deficientes para el receptor de PRL, una disminución en el peso corporal, en el que las hembras se afectaron más que los machos.⁸¹ Este hallazgo no concuerda con lo obtenido en nuestro estudio, no detectamos disminución de peso estadísticamente significativa en las hembras o machos KO con los respectivos WT sin infección. Por el contrario, los machos KO infectados aumentaron de peso en relación a los machos WT infectados. Además, los machos KO infectados desarrollaron mayor peso que las hembras KO infectadas, lo que podría indicar que el sistema inmune

de los machos sea más susceptible de ser inhibido por la PRL que el de las hembras.

Otra posibilidad en el incremento de peso de los machos KO infectados, es que los ratones hayan desarrollado un proceso de hiperfagia, se ha reportado que la HPRL genera alteraciones en la ingesta de alimentos, puesto que la PRL promueve la expresión del neuropéptido Y (NPY) en el hipotálamo, lo que desencadena hiperfagia.⁸² Al respecto, en humanos la HPRL se ha asociado con problemas de obesidad y ganancia de peso corporal.⁸³

También es importante señalar que se ha descrito que el peso corporal se modifica con la acción de PRL, al potenciar la expresión de leptina en el tejido adiposo, mediante la activación de mecanismos de señalización vía JAK/STAT en ratones KO deficientes para el receptor de PRL y se ha demostrado que en la ausencia de señal, por parte de PRL, se reduce la liberación de leptina en los adipocitos.⁸⁴ En otro estudio, con el mismo modelo de ratón KO, encontraron en el citoplasma del tejido adiposo de hembras, reducción en los niveles de leptina, asociado a disminución de peso corporal.⁸¹

La leptina es una hormona clave en el control de peso corporal, existen evidencias de que esta hormona interacciona con el neuropéptido Y⁸⁵ y disminuye su producción, por lo que se inhibe la vía orexigénica, inductora de apetito en el hipotálamo.⁸⁶ En otros estudios se ha reportado que en un ambiente de HPRL se genera resistencia a la leptina y predominan acciones de hiperfagia. No obstante, investigaciones recientes con el mismo modelo KO, revelan que no existe interacción entre la acción de la PRL y la leptina en el peso corporal.⁷⁷ Por lo anterior, si el incremento en el peso de los KO machos solo ocurre cuando están infectados es probable que aumente la concentración de leptina, por lo que se recomienda realizar experimentos para corroborar esta posibilidad.

Por otra parte, si en los ratones KO la PRL no interactúa con su receptor quiere decir que la PRL no influye sobre el peso corporal en hembras con o sin infección y en machos no infectados.

Si el peso no se modifica en los ratones KO sin infección, es probable que la PRL pueda activar otras vías de señalización, debido a que comparte con otras

hormonas, como la del crecimiento y lactógeno placentario, características relacionadas en estructura, función y origen genético. Razones por las que, estas hormonas forman parte de una familia que probablemente resultaron de la duplicación de un gen ancestral.^{56, 51} Una de las vías que la PRL podría activar es la del receptor de la hormona del crecimiento, se ha encontrado similitud con el receptor de PRL, principalmente en el dominio extracelular.⁸⁷

Con relación a si la PRL afecta de forma diferencial a los sexos durante la infección con *Plasmodium*, en este trabajo el peso corporal fue similar en las hembras y machos WT, por lo que al menos en este modelo de malaria ambos sexos responden de igual forma ante la infección con *P. berghei* ANKA. Situación diferente en los machos KO, al infectarse incrementaron el peso corporal.

Otra variable que analizamos fue la temperatura, los ratones ICR infectados con *P. berghei* ANKA desarrollaron hipotermia.⁹ En este trabajo, durante la fase aguda de la infección, se detectó hipotermia, más acentuada en las hembras que en los machos WT (Figura 15). Sin embargo, el descenso no fue tan marcado como en la cepa ICR, no resultó menor a los 35 °C, por lo que la cepa de ratones C57Bl/6 regula mejor la temperatura corporal cuando se infectó con el mismo parásito.

Con relación a la PRL se ha descrito que puede incidir en la homeostasis de la energía, a través de la modulación del metabolismo de los lípidos, mediado por el receptor de PRL del tejido adiposo marrón.⁸⁸ Las células de este tejido, se caracterizan por su función termogénica es decir, disipan energía y proporcionan calor por medio de proteínas desacoplantes (UCP1); cuya función principal es la de translocar protones a través de la membrana de la mitocondria durante la fosforilación oxidativa de la cadena respiratoria.⁸⁹ En otro estudio, se administró PRL a ratones e incrementaron los niveles de la proteína UCP⁹⁰ por lo que se sugiere la posible participación de PRL en la termorregulación.⁸⁴ Por otra parte, en los pacientes con HPRL se han observado alteraciones en el metabolismo energético.⁸³

En los ratones KO para RPRL se ha reportado hipotermia a consecuencia de la ausencia en la vía de señalización del RPRL.⁵⁴ Lo anterior concuerda con los resultados de nuestros experimentos, en donde las hembras y machos KO

presentaron temperaturas corporales menores que el grupo control, con diferencia significativa para los días 5 (machos), 7 y 8 (hembras) post infección. La disminución de temperatura corporal en estos ratones KO, apoyan la idea de que el tejido marrón presenta alteraciones fisiológicas, determinadas por deficiencia en el receptor de PRL en células marrones y que posiblemente también presentan disminución en la proteína UPC1.⁹¹

Respecto a la infección con *P. berghei* ANKA en los ratones con el genotipo KO, en hembras y machos la temperatura corporal no se modificó en comparación con los ratones WT, por lo que la ausencia de señalización de la PRL no influye sobre el control de la temperatura en animales con o sin infección.

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la temperatura generadas por la infección en ambos sexos en ratones WT, en hembras y machos la temperatura corporal mostro variaciones, en los que unos días los ratones perdieron más calor que otros.

También estudiamos si la PRL modifica la glucemia en ratones infectados con *P. berghei* ANKA. Se ha demostrado que el receptor de PRL es indispensable en la homeostasis de la glucosa, al interactuar con la PRL se incrementa la proliferación de las células β , así como la secreción de la insulina en el páncreas.⁹² En los ratones KO, de la cepa C57Bl/6 se ha reportado una disminución en la cantidad de células β del páncreas, así como en la densidad de los islotes y disminución en el contenido de insulina pancreática. Además, la deleción en el RPRL genera una respuesta deficiente en la secreción de insulina y alteraciones en la tolerancia a la glucosa, en comparación con los ratones silvestres.⁹³ Por otra parte, en mujeres en el último trimestre del embarazo, se ha documentado que la HPRL induce resistencia a la insulina.⁹⁴

Lo anterior no es consistente con nuestros resultados, en el genotipo KO, en machos y hembras, no se presentaron modificaciones en la concentración de glucosa en sangre, este hallazgo indica que el metabolismo de la glucosa no se altera, a pesar de la deleción en el RPRL. Es posible que en los ratones KO, la PRL interactuone con otra vía de señalización para regular el metabolismo de la glucosa.

Con relación a los ratones infectados WT y KO, la concentración de glucosa en la sangre no se modificó durante la fase aguda de la infección y concuerda con la parasitemia, que se presenta a partir del día 4 y 5 post-infección, lo cual fue comprensible debido a que no existieron suficientes parásitos que consumieran a la glucosa para su supervivencia. Es muy claro que conforme se incrementó la parasitemia, disminuyó la concentración de glucosa, situación que se presentó a partir del día 7 post-infección. También se ha reportado que en malaria, los pacientes presentan hipoglucemia asociada con el incremento en la concentración de TNF- α generada por aumento en la densidad del parásito.¹¹ En este trabajo, encontramos que en las hembras WT y KO infectadas, la concentración de TNF- α disminuyó significativamente en el suero en relación a las no infectadas y la concentración de glucosa bajó en el día 8 post infección, mientras que en los machos la infección no modificó la concentración de TNF- α , probablemente este hallazgo se deba a las características de la cepa C57Bl/6.

También estudiamos como afecta la PRL a la parasitemia de ratones WT y KO de ambos sexos infectados con *P. berghei* ANKA. En otros modelos de malaria, la parasitemia se incrementa de forma exponencial a medida que avanza la infección, la mayoría de los eritrocitos se infectan y la muerte es inevitable.^{7,9}

En general, los machos CBA/Ca, infectados con *P. berghei* ANKA, desarrollan parasitemias más elevadas que las hembras particularmente en los días 8 y 9 post infección.⁹⁵ También se ha descrito que la concentración de TNF- α se eleva conforme se incrementa la densidad del parásito, lo que corresponde a la manifestación de los síntomas neurológicos, por lo que esta citocina se relaciona con el desarrollo de MC.^{11, 96}

En esta investigación, detectamos dimorfismo sexual en la parasitemia, las hembras desarrollaron parasitemias significativamente más bajas que los machos en ambos genotipos, este resultado confirma lo descrito en la literatura.² Además nuestros resultados sugieren que la PRL favorece el incremento de la parasitemia puesto que los ratones KO quienes no pueden llevar a cabo la señalización vía la PRL desarrollaron parasitemias significativamente menores que los ratones WT y este fenómeno ocurrió en ambos sexos.

En este trabajo, la parasitemia incrementó conforme trascurrieron los días. En todos los grupos de ratones, el inicio de la parasitemia comenzó el día 4 ó 5 post infección y detectamos parasitemias menores en los ratones KO en relación a los WT machos y hembras. Este hallazgo sugiere que la PRL podría favorecer el crecimiento del parásito, resultado acorde con la mayor susceptibilidad a la malaria que presentan las mujeres embarazadas quienes desarrollan concentraciones más altas de PRL.⁷⁰

Contrario a lo que se ha documentado para los ratones CBA/Ca, con relación a que los machos desarrollan parasitemias más altas que las hembras^{3, 25} en este trabajo no detectamos esa tendencia, lo anterior podría deberse a que estos experimentos se desarrollaron en ratones con un fondo genético distinto (C57Bl/6) y que además eran KO para el gen del receptor de PRL, por lo tanto factores distintos pudieron participar en la proliferación del parásito.

Diversos estudios refieren que en la patología de la malaria, particularmente de la malaria cerebral, las citocinas juegan un papel muy importante,¹³ por ello decidimos analizar si la PRL modifica la expresión relativa de TNF- α e IL-10 en el cerebro y en el hipocampo de ratones WT y KO.

El TNF- α es una citocina que se sobre expresa en procesos inflamatorios, con múltiples efectos fisiológicos en el cerebro, entre ellos se le atribuye la participación en la homeostasis del sistema nervioso central, en la proliferación y la supervivencia de astrocitos, así como en la expresión de moléculas MHC clase I en astrocitos y neuronas.³³ No obstante, la sobre expresión de este gen en el cerebro puede conducir a la malaria cerebral.⁹⁷

En los ratones CBA/T6 con malaria cerebral fatal (parálisis, hemiplejia, convulsiones y coma), se ha descrito sobre expresión del ARNm que codifica para TNF- α , así como la proteína TNF- α asociada a células de la microglia, astrocitos, monocitos y endotelio vascular.⁹⁸ Así mismo, en un modelo de ratas, se demostró que las células microgliales responden a procesos patológicos, por lo que se consideran las principales células de la respuesta inmune innata que producen TNF- α , lo que promueve la progresión del proceso inflamatorio al activar la transcripción de moléculas pro inflamatorias, que incluyen el mismo TNF- α y el

Factor nuclear kB (NF-kB) en células del parénquima, adyacentes a las células microgliales.⁹⁹

En general, el TNF- α se sobre expresa en el proceso inflamatorio, causado por malaria.¹⁰ En el presente trabajo, demostramos que este gen se expresa en el cerebro de ratones silvestres hembras y machos sanos y no se evidenció dimorfismo sexual en la expresión de este gen en los ratones WT o en los KO.^{1,8} Además, al comparar la expresión de los ratones machos WT con la de los machos KO no se detectó diferencia significativa.

En contraste a lo esperado, la infección en las hembras WT y KO disminuyó la expresión relativa de TNF- α en el cerebro y en el hipocampo, con respecto a las hembras sanas. Lo que sugiere que existen mecanismos reguladores sumamente potentes como para abatir inclusive debajo de lo normal la síntesis de TNF- α en los ratones infectados con *P. berghei* ANKA. También es posible que cuando se sacrificaron los ratones aún no se alcanzaba el máximo de la parasitemia y que la expresión del ARNm todavía no se disparaba en ese día de la infección.

En los machos infectados WT y KO, los ratones respondieron de igual forma que los ratones sanos. Además de la infección, en los ratones machos KO, la condición de carecer del RPRL no modificó la expresión de este gen.

En cuanto al efecto del genotipo WT en comparación con el KO y la infección, entre hembras y entre machos, la condición KO no afectó la expresión relativa del gen TNF- α en el cerebro, lo que sugiere que la PRL no modula la expresión de este gen, en el cerebro infectado con *P. berghei* ANKA.

Respecto al dimorfismo sexual, en ratones sanos WT y KO, las hembras y los machos, presentaron el mismo nivel en la expresión relativa del gen TNF- α , este hallazgo sugiere que en el cerebro, las hormonas sexuales y la PRL no interfieren en la expresión de este gen. Otra posibilidad es que el carecer del RPRL impide que el ligando interactúe con el receptor y eso interrumpa mecanismos de señalización que involucren a la PRL y por eso no se detectaron cambios en la expresión de TNF- α .

Interesantemente, los ratones infectados disminuyeron la expresión de ARNm que codifica para TNF- α , lo que sugiere la existencia de mecanismos de regulación

que podrían dispararse para contender contra la inflamación sistémica y así proteger al cerebro. Otra posibilidad es que en el día 8 post infección cuando se sacrificó a los ratones todavía no se había incrementado la expresión del gen, por lo que en experimentos posteriores sería conveniente evaluar la expresión de TNF- α en diferentes tiempos, con las condiciones en las que sobreviven a la infección.

El hipocampo es una estructura relacionada con la memoria,¹⁰⁰ se ha reportado deterioro de las neuronas en algunas enfermedades.⁹³ En el caso de malaria no se encontraron reportes de investigaciones que refieran con precisión el desarrollo de la patología en el hipocampo. Solo se ha descrito que los pacientes que se recuperan de MC, corren el riesgo de presentar alteraciones neurológicas y cognitivas, dificultades de comportamiento y cuadros de epilepsia.^{12,14} En este contexto fue que se decidió estudiar el efecto de la PRL en el hipocampo durante la infección con *P. berghei* ANKA.

En este trabajo detectamos que el ARNm que codifica para TNF- α se expresó de forma constitutiva en el hipocampo de hembras y machos silvestres sin infección. No detectamos expresión diferencial de este gen entre hembras y machos WT. Se observó dimorfismo sexual en los machos KO sin infección, la expresión relativa de TNF- α , fue significativamente mayor que en las hembras en la misma condición. Este resultado sugiere que la PRL disminuye la expresión relativa de TNF- α únicamente en el hipocampo de los machos no infectados, por lo que es probable que las hormonas sexuales masculinas también participen en la regulación de TNF- α en este tejido.

Contrario a lo esperado, la infección disminuyó la expresión del gen TNF- α tanto en las hembras WT como en las KO. Este resultado sugiere la posibilidad de que el parásito genere modificaciones en el hipocampo que suprimen la expresión de dicho gen. Situación que no ocurrió en los machos silvestres sanos e infectados, en ellos la expresión relativa del gen TNF α , no se modificó.

Respecto dimorfismo sexual, en los ratones no infectados detectamos que la expresión de TNF- α , fue mayor en los machos KO con respecto a las hembras del mismo genotipo. Situación que sugiere, que en los machos, la PRL abatió la

expresión de ARNm para TNF- α . Mientras que en los ratones machos KO es probable que la PRL regule negativamente la expresión de este gen, quedan por estudiar los mecanismos que expliquen la razón de que en la infección con *P. berghei* ANKA disminuya la expresión de este gen tanto en cerebro como en hipocampo.

Un hallazgo interesante de este trabajo es que no detectamos expresión relativa de ARN que codifique para IL-10, por lo que validamos el método y el resultado fue el mismo, lo que sugiere que en el cerebro de estos ratones se presenta una fuerte regulación negativa en la expresión de este gen.

Nuestros resultados concuerdan con los descritos por Keswani y cols,¹⁰¹ quienes demostraron una menor expresión de IL-10 en el bazo de ratones infectados con *P. berghei* ANKA, lo que probablemente se asocie con la patología de la infección. Finalmente, evaluamos la concentración de TNF- α y de IL-10 en el suero de machos y hembras WT y KO, los resultados en las hembras fueron opuestos a los esperados, la infección disminuyó la expresión de TNF- α tanto en los WT como en los KO, mientras que en los machos no detectamos cambios debidos a la infección. Es probable que las modificaciones en la expresión de TNF- α en los machos hayan ocurrido a diferente tiempo que el estudiado y por esa razón no lo detectamos, se tendría que hacer la determinación al menos en 3 días distintos durante la infección para evaluar la cinética de la expresión de este gen.

La concentración de IL-10 en suero no corresponde a la ausencia de expresión de este gen que detectamos en el cerebro. Además contrario a lo esperado detectamos una disminución en la concentración de IL-10 como resultado de la infección en los ratones machos y hembras WT y KO. Este hallazgo sugiere que la PRL no regula la expresión de IL-10 en los ratones infectados KO o WT.

X. CONCLUSIONES

Confirmamos HPRL en los ratones hembras y machos KO, las concentraciones de PRL no se modificaron con la infección en ambos genotipos, sean machos o hembras.

El fondo genético de los ratones C57Bl/6 mostró resistencia a la infección con *P. berghei* ANKA, en consecuencia la patología (caquexia, hipotermia e hipoglucemia) de la malaria se manifestó tiempo después a lo que se ha reportado para la cepa CBA/Ca.

En este modelo, de ratones C57Bl/6 infectados con *P. berghei* ANKA, la PRL no generó modificaciones en el peso, la temperatura y la glucemia de los ratones infectados, con excepción de los ratones KO que incrementaron de peso y se requiere de estudios para explicar este comportamiento.

Nuestros resultados sugieren que la PRL incrementa la parasitemia en ratones C57Bl/6.

Detectamos expresión de TNF- α en cerebro e hipocampo de hembras y machos WT y KO que no depende de la PRL. La infección disminuyó la expresión de TNF- α en las hembras WT y KO y en los machos KO.

En el hipocampo de ratones hembras y machos silvestres se expresa el gen que codifica a TNF- α . En el hipocampo de los ratones KO no infectados la expresión de TNF- α es dimórfica

La PRL no moduló la concentración de TNF- α en el suero de hembras y machos WT y KO. No detectamos expresión de IL-10 en el cerebro y en particular en el hipocampo de hembras y machos en el día 8 post-infección.

La PRL reguló positivamente la concentración sérica de IL-10 en el suero de ratones machos. La concentración de IL-10 en el suero es dimórfica, los machos producen más que las hembras WT y KO.

XI. REFERENCIAS

1. Devost D, Boutin JM. Autoregulation of the rat prolactin gene in lactotrophs. *Mol Cell Endocrinol*. 1999;158(1-2):99-109. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10630410>. Accessed June 8, 2017.
2. Mosqueda-Romo NA, Rodríguez-Morales AL, Buendía-González FO, Aguilar-Sánchez M, Morales-Montor J, Legorreta-Herrera M. Gonadal steroids negatively modulate oxidative stress in CBA/Ca female mice infected with *P. berghei* ANKA. *Biomed Res Int*. 2014;2014:805495. doi:10.1155/2014/805495.
3. Who. *World Malaria Report 2015*. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/200018/1/9789241565158_eng.pdf. Accessed February 25, 2016.
4. Chester BP. *Parasitología Clínica de Craig Faust*. México; 2003.
5. Nacer A, Movila A, Baer K, Mikolajczak SA, Kappe SHI, Frevort U. Neuroimmunological blood brain barrier opening in experimental cerebral malaria. *PLoS Pathog*. 2012;8(10):e1002982. doi:10.1371/journal.ppat.1002982.
6. Onwuamaegbu ME, Henein M, Coats AJ. Cachexia in malaria and heart failure: therapeutic considerations in clinical practice. *Postgrad Med J*. 2004;80(949):642-649. doi:10.1136/pgmj.2004.020891.
7. Stevenson MM, Riley EM. Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(3):169-180. doi:10.1038/nri1311.
8. Chang K-H, Stevenson MM. Malarial anaemia: mechanisms and implications of insufficient erythropoiesis during blood-stage malaria. *Int J Parasitol*. 2004;34(13-14):1501-1516. doi:10.1016/j.ijpara.2004.10.008.
9. Basir R, Rahiman SF, Hasballah K, et al. Plasmodium berghei ANKA Infection in ICR Mice as a Model of Cerebral Malaria. *Iran J Parasitol*. 2012;7(4):62-74. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23323093>. Accessed June 23, 2016.
10. Malaguarnera L, Musumeci S. The immune response to Plasmodium falciparum malaria. *Lancet Infect Dis*. 2002;2(8):472-478.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12150846>. Accessed February 22, 2016.
11. Shaffer N, Grau GE, Hedberg K, et al. Tumor necrosis factor and severe malaria. *J Infect Dis*. 1991;163(1):96-101.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1984482>. Accessed July 10, 2016.
 12. Idro R, Marsh K, John CC, Newton CRJ. Cerebral Malaria: Mechanisms of Brain Injury and Strategies for Improved Neurocognitive Outcome. *Pediatr Res*. 2010;68(4):267-274. doi:10.1203/PDR.0b013e3181eee738.
 13. Brown H, Turner G, Rogerson S, et al. Cytokine expression in the brain in human cerebral malaria. *J Infect Dis*. 1999;180(5):1742-1746.
doi:10.1086/315078.
 14. Severe falciparum malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000;94 Suppl 1:S1-90.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11103309>. Accessed February 29, 2016.
 15. Taylor TE, Fu WJ, Carr RA, et al. Differentiating the pathologies of cerebral malaria by postmortem parasite counts. *Nat Med*. 2004;10(2):143-145.
doi:10.1038/nm986.
 16. White NJ, Turner GDH, Medana IM, Dondorp AM, Day NPJ. The murine cerebral malaria phenomenon. *Trends Parasitol*. 2010;26(1):11-15.
doi:10.1016/j.pt.2009.10.007.
 17. Doolan DL. *Malaria Methods and Protocols*. Springer Science & Business Media; 2002. <https://books.google.com/books?id=nBMjPxxgHnH0C&pgis=1>. Accessed March 6, 2016.
 18. May J, Lell B, Luty AJ, Meyer CG, Kremsner PG. Plasma interleukin-10:Tumor necrosis factor (TNF)-alpha ratio is associated with TNF promoter variants and predicts malarial complications. *J Infect Dis*. 2000;182(5):1570-1573. doi:10.1086/315857.
 19. Hunt NH, Grau GE, Engwerda C, et al. Murine cerebral malaria: the whole story. *Trends Parasitol*. 2010;26(6):272-274. doi:10.1016/j.pt.2010.03.006.
 20. Landau, I. And Boulard Y. *Life Cycles and Morphology*. In: *Rodent Malaria*.

Academic Press; 2012.

<https://books.google.com/books?id=qduC6o08fGAC&pgis=1>. Accessed March 6, 2016.

21. Legorreta-Herrera M, Sánchez-Cruz P. LA RESPUESTA INMUNE CELULAR CONTRA EL Plasmodium: AGENTE ETIOLÓGICO DE LA MALARIA. *Vertientes Rev Espec en Ciencias la Salud*. 2(1-2).
22. ABBAS ABUL K. INMUNOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR + STUDENT CONSULT (6ª ED.) - ABUL K. ABBAS. <http://mx.casadellibro.com/libro-inmunologia-celular-y-molecular--student-consult-6-ed/9788480863117/1193988>. Accessed February 23, 2016.
23. Lin E, Calvano SE, Lowry SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery*. 2000;127(2):117-126. doi:10.1067/msy.2000.101584.
24. Mann WA. Treatment for prolactinomas and hyperprolactinaemia: a lifetime approach. *Eur J Clin Invest*. 2011;41(3):334-342. doi:10.1111/j.1365-2362.2010.02399.x.
25. De León-Nava MA, Morales-Montor J. [Immune sexual dimorphism: can sex steroids affect the Th1/Th2 cytokine profile?]. *Rev Investig clínica; organo del Hosp Enfermedades la Nutr*. 58(2):161-169. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16827268>. Accessed April 18, 2016.
26. Zhang J-M, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin*. 2007;45(2):27-37. doi:10.1097/AIA.0b013e318034194e.
27. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med*. 1996;334(26):1717-1725. doi:10.1056/NEJM199606273342607.
28. Rockett KA, Awburn MM, Aggarwal BB, Cowden WB, Clark IA. In vivo induction of nitrite and nitrate by tumor necrosis factor, lymphotoxin, and interleukin-1: possible roles in malaria. *Infect Immun*. 1992;60(9):3725-3730. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=257383&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>. Accessed April 19, 2016.
29. DiPiro JT. Cytokine Networks with Infection: Mycobacterial Infections, Leishmaniasis, Human Immunodeficiency Virus Infection, and Sepsis.

- Pharmacother J Hum Pharmacol Drug Ther.* 1997;17(2):205-223.
doi:10.1002/j.1875-9114.1997.tb03702.x.
30. Mazier D, Nitchou J, Idrissa-Boubou M. Cerebral malaria and immunogenetics. *Parasite Immunol.* 2000;22(12):613-623.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11123753>. Accessed April 19, 2016.
 31. Craig A, Scherf A. Molecules on the surface of the Plasmodium falciparum infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion. *Mol Biochem Parasitol.* 2001;115(2):129-143.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11420100>. Accessed April 19, 2016.
 32. Meager A. Cytokine regulation of cellular adhesion molecule expression in inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1999;10(1):27-39.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10379910>. Accessed April 19, 2016.
 33. Akassoglou K, Probert L, Kontogeorgos G, Kollias G. Astrocyte-specific but not neuron-specific transmembrane TNF triggers inflammation and degeneration in the central nervous system of transgenic mice. *J Immunol.* 1997;158(1):438-445. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8977220>.
Accessed April 19, 2016.
 34. Grell M, Zimmermann G, Gottfried E, et al. Induction of cell death by tumour necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF. *EMBO J.* 1999;18(11):3034-3043. doi:10.1093/emboj/18.11.3034.
 35. Muñoz-Fernández MA, Fresno M. The role of tumour necrosis factor, interleukin 6, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system. *Prog Neurobiol.* 1998;56(3):307-340. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9770242>.
Accessed April 19, 2016.
 36. Körner H, McMorran B, Schlüter D, Fromm P. The role of TNF in parasitic diseases: Still more questions than answers. *Int J Parasitol.* 2010;40(8):879-888. doi:10.1016/j.ijpara.2010.03.011.
 37. Randall LM, Engwerda CR. TNF family members and malaria: Old observations, new insights and future directions. *Exp Parasitol.*

- 2010;126(3):326-331. doi:10.1016/j.exppara.2010.04.016.
38. Clark IA, Allewa LM, Vissel B. The roles of TNF in brain dysfunction and disease. *Pharmacol Ther.* 2010;128(3):519-548. doi:10.1016/j.pharmthera.2010.08.007.
 39. Probert L, Akassoglou K, Pasparakis M, Kontogeorgos G, Kollias G. Spontaneous inflammatory demyelinating disease in transgenic mice showing central nervous system-specific expression of tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(24):11294-11298. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=40618&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed April 19, 2016.
 40. Niikura M, Inoue S-I, Kobayashi F. Role of interleukin-10 in malaria: focusing on coinfection with lethal and nonlethal murine malaria parasites. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:383962. doi:10.1155/2011/383962.
 41. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman KL OA. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. - PubMed - NCBI. *Annu Rev Immunol.* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11244051>. Published 2001. Accessed April 26, 2016.
 42. Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest.* 2000;117(4):1162-1172. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10767254>. Accessed February 4, 2016.
 43. Smith EM, Cadet P, Stefano GB, Opp MR, Hughes TK. IL-10 as a mediator in the HPA axis and brain. *J Neuroimmunol.* 1999;100(1-2):140-148. doi:10.1016/S0165-5728(99)00206-4.
 44. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med.* 1991;174(5):1209-1220. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2119001&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed April 19, 2016.
 45. Smith EM, Cadet P. Stefano GB, Opp MR HTJ. IL-10 as a mediator in the HPA axis and brain. - PubMed - NCBI. *J Neuroimmunol.* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10695724>. Published 1999. Accessed

April 26, 2016.

46. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin : Structure , Function , and Regulation of Secretion. 2015;80(4):1-211. doi:10.1016/B978-012515400-0/50037-3.
47. Peeva E, Zouali M. Spotlight on the role of hormonal factors in the emergence of autoreactive B-lymphocytes. *Immunol Lett.* 2005;101(2):123-143. doi:10.1016/j.imlet.2005.05.014.
48. Blanco-Favela F 1, María Victoria Legorreta-Haquet 1, Yunuen Rocío Huerta-Villalobos 1, et al. Role of prolactin in the immune response. <http://www.scielo.org.mx/pdf/bmim/v69n5/v69n5a3.pdf>. Published 2012. Accessed March 7, 2016.
49. Chikanza IC. Prolactin and neuroimmunomodulation: in vitro and in vivo observations. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;876:119-130. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10415600>. Accessed March 7, 2016.
50. Clapp C, Thebault S, Martínez de la Escalera G. Role of prolactin and vasoinhibins in the regulation of vascular function in mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2008;13(1):55-67. doi:10.1007/s10911-008-9067-7.
51. Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. Prolactin (PRL) and Its Receptor: Actions, Signal Transduction Pathways and Phenotypes Observed in PRL Receptor Knockout Mice. *Endocr Rev.* July 1998. http://press.endocrine.org/doi/10.1210/edrv.19.3.0334?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&. Accessed January 12, 2016.
52. Vera-Lastra O, Jara LJ, Espinoza LR. Prolactin and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2002;1(6):360-364. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12848992>. Accessed January 9, 2016.
53. Ben-Jonathan N, LaPensee CR, LaPensee EW. What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr Rev.* 2008;29(1):1-41. doi:10.1210/er.2007-0017.
54. Goffin V, Binart N, Clément-Lacroix P, et al. From the molecular biology of

- prolactin and its receptor to the lessons learned from knockout mice models. *Genet Anal.* 1999;15(3-5):189-201.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10596761>. Accessed March 17, 2016.
55. Clevenger C V, Freier DO, Kline JB. Prolactin receptor signal transduction in cells of the immune system. *J Endocrinol.* 1998;157(2):187-197.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9659281>. Accessed March 14, 2016.
56. Goffin V, Bernichtein S, Touraine P, Kelly PA. Development and potential clinical uses of human prolactin receptor antagonists. *Endocr Rev.* 2005;26(3):400-422. doi:10.1210/er.2004-0016.
57. Krishnan N, Thellin O, Buckley DJ, Horseman ND, Buckley AR. Prolactin suppresses glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis in vivo. *Endocrinology.* 2003;144(5):2102-2110. doi:10.1210/en.2003-0053.
58. Moreno J, Varas A, Vicente A, Zapata AG. Role of prolactin in the recovered T-cell development of early partially decapitated chicken embryo. *Dev Immunol.* 1998;5(3):183-195.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2275984&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed March 7, 2016.
59. Matera L. Action of pituitary and lymphocyte prolactin. *Neuroimmunomodulation.* 4(4):171-180.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9524961>. Accessed March 7, 2016.
60. Spangelo BL, Macleod RM. The role of immunopeptides in the regulation of anterior pituitary hormone release. *Trends Endocrinol Metab.* 1(8):408-412.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18411153>. Accessed March 7, 2016.
61. Corbacho AM, Macotela Y, Nava G, et al. Cytokine induction of prolactin receptors mediates prolactin inhibition of nitric oxide synthesis in pulmonary fibroblasts. *FEBS Lett.* 2003;544(1-3):171-175.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12782310>. Accessed June 3, 2016.
62. Corbacho AM, Nava G, Eiserich JP, et al. Proteolytic cleavage confers nitric oxide synthase inducing activity upon prolactin. *J Biol Chem.* 2000;275(18):13183-13186. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10788422>. Accessed June 2, 2016.

63. Lahat N, Miller A, Shtiller R, Touby E. Differential effects of prolactin upon activation and differentiation of human B lymphocytes. *J Neuroimmunol.* 1993;47(1):35-40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8376547>. Accessed March 7, 2016.
64. Cesario TC, Yousefi S, Carandang G, Sadati N, Le J, Vaziri N. Enhanced yields of gamma interferon in prolactin treated human peripheral blood mononuclear cells. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1994;205(1):89-95. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8115356>. Accessed March 7, 2016.
65. Mavoungou E. Interactions Between Natural Killer Cells, Cortisol and Prolactin in Malaria During Pregnancy. *Clin Med Res.* 4(1):33-41. <http://www.clinmedres.org>. Accessed March 10, 2017.
66. Gardner DG. *Endocrinología Básica Y Clínica de Greenspan.* México; 2013.
67. Mah PM, Webster J. Hyperprolactinemia: Etiology, Diagnosis, and Management. *Semin Reprod Med.* 2002;20(4):365-374. doi:10.1055/s-2002-36709.
68. Shelly S, Boaz M, Orbach H. Prolactin and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2012;11(6-7):A465-70. doi:10.1016/j.autrev.2011.11.009.
69. Bolyakov A, Paduch DA. Prolactin in men's health and disease. *Curr Opin Urol.* 2011;21(6):527-534. doi:10.1097/MOU.0b013e32834bdf01.
70. Pearson RD. Prolactin, pregnancy and anaemia in severe malaria. *Trends Parasitol.* 2001;17(8):362. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11685894>. Accessed June 8, 2017.
71. Gertsenstein NAMV k. and BR. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual.* 3rd ed. New York; 2002.
72. Ormandy CJ, Camus A, Barra J, et al. Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes Dev.* 1997;11(2):167-178. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9009200>. Accessed March 14, 2016.
73. Rozakis-Adcock M, Kelly PA. Mutational analysis of the ligand-binding domain of the prolactin receptor. *J Biol Chem.* 1991;266(25):16472-16477. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1885580>. Accessed March 27, 2016.

74. Chukwuocha UM, Fernández-Rivera O, Legorreta-Herrera M. Exploring the antimalarial potential of whole *Cymbopogon citratus* plant therapy. *J Ethnopharmacol.* 2016;193:517-523. doi:10.1016/j.jep.2016.09.056.
75. Becton D and C. *BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit.* (BD Biosciences, ed.); 2009.
76. Guillou A, Romanò N, Steyn F, et al. Assessment of Lactotroph Axis Functionality in Mice: Longitudinal Monitoring of PRL Secretion by Ultrasensitive-ELISA. *Endocrinology.* 2015;156(5):1924-1930. doi:10.1210/en.2014-1571.
77. Carré N, Solomon G, Gertler A, Binart N. Effects of high affinity leptin antagonist on prolactin receptor deficient male mouse. *PLoS One.* 2014;9(3):e91422. doi:10.1371/journal.pone.0091422.
78. Le Tissier PR, Hodson DJ, Martin AO, Romanò N, Mollard P. Plasticity of the Prolactin (PRL) Axis: Mechanisms Underlying Regulation of Output in Female Mice. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology.* Vol 846. ; 2015:139-162. doi:10.1007/978-3-319-12114-7_6.
79. Kavarthapu R, Dufau ML. Essential role of endogenous prolactin and cdk7 in estrogen-induced upregulation of the prolactin receptor in breast cancer cells. *Oncotarget.* 2017;8(16):27353-27363. doi:10.18632/oncotarget.16040.
80. Ageely HM, Dawoud HA, Heiba AA. Anemia, interleukin-10, tumor necrosis factor alpha, and erythropoietin levels in children with acute, complicated and uncomplicated malignant malaria in Jazan, Saudi Arabia. *J Egypt Soc Parasitol.* 2008;38(2):359-370. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18853611>. Accessed April 27, 2016.
81. Freemark M, Fleenor D, Driscoll P, Binart N, Kelly P. Body weight and fat deposition in prolactin receptor-deficient mice. *Endocrinology.* 2001;142(2):532-537. doi:10.1210/endo.142.2.7979.
82. Sauvé D, Woodside B. Neuroanatomical specificity of prolactin-induced hyperphagia in virgin female rats. *Brain Res.* 2000;868(2):306-314. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10854583>. Accessed June 20, 2016.
83. Greenman Y, Tordjman K, Stern N. Increased body weight associated with

- prolactin secreting pituitary adenomas: weight loss with normalization of prolactin levels. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1998;48(5):547-553. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9666865>. Accessed April 28, 2016.
84. Viengchareun S, Bouzinba-Segard H, Laigneau J-P, et al. Prolactin potentiates insulin-stimulated leptin expression and release from differentiated brown adipocytes. *J Mol Endocrinol*. 2004;33(3):679-691. doi:10.1677/jme.1.01563.
 85. Martinez JA, Aguado M, Fruhbeck G. Interactions between leptin and NPY affecting lipid mobilization in adipose tissue. 2000;56(1):1-8.
 86. Morales Clavijo M, Carvajal Garcés CF. OBESIDAD Y RESISTENCIA A LA LEPTINA. *Gac Médica Boliv*. 2010;33(1):63-68.
 87. Leung DW, Spencer SA, Cachianes G, et al. Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. *Nature*. 330(6148):537-543. doi:10.1038/330537a0.
 88. Ling C, Hellgren G, Gebre-Medhin M, et al. Prolactin (PRL) receptor gene expression in mouse adipose tissue: increases during lactation and in PRL-transgenic mice. *Endocrinology*. 2000;141(10):3564-3572. doi:10.1210/endo.141.10.7691.
 89. Ricquier D, Bouillaud F. Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *J Physiol*. 2000;529 Pt 1:3-10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11080246>. Accessed June 30, 2016.
 90. Budge H, Mostyn A, Wilson V, et al. The effect of maternal prolactin infusion during pregnancy on fetal adipose tissue development. *J Endocrinol*. 2002;174(3):427-433. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12208663>. Accessed June 30, 2016.
 91. Viengchareun S, Serval N, Fève B, Freemark M, Lombès M, Binart N. Prolactin receptor signaling is essential for perinatal brown adipocyte function: a role for insulin-like growth factor-2. *PLoS One*. 2008;3(2):e1535. doi:10.1371/journal.pone.0001535.
 92. Huang C, Snider F, Cross JC. Prolactin receptor is required for normal

- glucose homeostasis and modulation of beta-cell mass during pregnancy. *Endocrinology*. 2009;150(4):1618-1626. doi:10.1210/en.2008-1003.
93. Freemark M, Avril I, Fleenor D, et al. Targeted deletion of the PRL receptor: effects on islet development, insulin production, and glucose tolerance. *Endocrinology*. 2002;143(4):1378-1385. doi:10.1210/endo.143.4.8722.
94. Gustafson AB, Banasiak MF, Kalkhoff RK, Hagen TC, Kim HJ. Correlation of hyperprolactinemia with altered plasma insulin and glucagon: similarity to effects of late human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 1980;51(2):242-246. doi:10.1210/jcem-51-2-242.
95. Mosqueda-Romo NA, Rodríguez-Morales AL, Buendía-González FO, Aguilar-Sánchez M, Morales-Montor J, Legorreta-Herrera M. Gonadal steroids negatively modulate oxidative stress in CBA/Ca female mice infected with *P. berghei* ANKA. *Biomed Res Int*. 2014;2014:805495. doi:10.1155/2014/805495.
96. Grau GE. Essential role of tumor necrosis factor and other cytokines in the pathogenesis of cerebral malaria: experimental and clinical studies. *Verh K Acad Geneeskd Belg*. 1992;54(2):155-175. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1357836>. Accessed October 26, 2016.
97. Hunt NH, Grau GE, Souza JB de, et al. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends Immunol*. 2003;24(9):491-499. doi:10.1016/S1471-4906(03)00229-1.
98. Medana IM, Hunt NH, Chaudhri G. Tumor necrosis factor-alpha expression in the brain during fatal murine cerebral malaria: evidence for production by microglia and astrocytes. *Am J Pathol*. 1997;150(4):1473-1486. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9095002>. Accessed July 18, 2016.
99. Nadeau S, Rivest S. Regulation of the gene encoding tumor necrosis factor alpha in the rat brain and pituitary in response to different models of systemic immune challenge. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1999;58:61-77. <http://dx.doi.org/10.1097/00005072-199901000-00008>.
100. Manns JR, Hopkins RO, Reed JM, Kitchener EG, Squire LR. Recognition Memory and the Human Hippocampus. *Neuron*. 2003;37(1):171-180.

doi:10.1016/S0896-6273(02)01147-9.

101. Keswani T, Sarkar S, Sengupta A, Bhattacharyya A. Role of TGF- β and IL-6 in dendritic cells, Treg and Th17 mediated immune response during experimental cerebral malaria. *Cytokine*. 2016;88:154-166.
doi:10.1016/j.cyto.2016.08.034.
102. Espinosa Asuar L. Guía práctica sobre la técnica de PCR 517 Guía práctica sobre la técnica de PCR.
103. QIAGEN. *Critical Factors for Successful Real-Time PCR - Documents*.; 2010. <http://documents.mx/documents/critical-factors-for-successful-real-time-pcr.html>.
104. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*. 2000;25:169-193.

XII. ANEXOS

1. REACTIVOS Y SOLUCIONES

TRIS-HCl 100 mM

Acrilamida @Sigma

Amortiguador de retrotranscripción First Strand @Invitrogen

Bisacrilamida @USB

Bromuro de etidio @Sigma

Cloroformo: alcohol isoamilico 49:1 @Sigma

dNTP's @Invitrogen

dTT 0.1M @Invitrogen

EDTA 5mM @Sigma

Enzima MMLV-RT @Invitrogen

Etanol @MERCK

Fluorocromo ROX 50 X Invitrogen

Giemsa (Sigma, St. Louis, MO, EUA)

Glucómetro (ACCU-CHEK® Performa, Roche, Alemania)

Heparina ®USB

Inhibidor de RNAsa 40U/μL ®Promega

Isopropanol ® Sigma

MgCl₂ 50mM ®Sigma

Oligo dT 500μg/μL ®Promega PBS 1X

Taq polimerasa 5U/μL ®Applied Biosystems

TBE 10X

TEMED ®Sigma

TriPure ®Roche

Oligos F* y R 10μM ®Invitrogen para

β-actina: 5' a 3' DNA-CGG-GTC-AGG-TAG-TCT-GTC-AGG-TCC[JOE]G

5' a 3' DNA-CTA-TGC-TCT-CCC-TCA-CGC-CAT-C

TNF-α: 5' a 3' DNA-CGG-CTG-CTG-TCT-TTG-AGA-TCC-ATC-C[FAM]G

5' a 3' DNA-CGT-CGT-AGC-AAA-CCA-CCA-AGT-G

IL-10: 5' a 3' DNA-CGG-TTC-TGG-ACA-ACA-TAC-TGC-TAA-C[FAM]G

5' a 3' DNA-TGG-ATC-ATT-TCC-GAT-AAG-GCT-TG

Sonda: Taqman SIGMA-ALDRICH

IL 10 5 á 3' DNA-[6FAM]ACAACATACTGCTAACCGACTCCTT[BHQ1]G

2. TECNICAS

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Una de las técnicas que más se emplean en Biología Molecular es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La técnica permite amplificar o copiar un fragmento de ADN específico, la precisión de esta técnica radica en el diseño de dos secuencias de ADN cortos, conocidos como oligonucleótidos o primers, los cuales se unen al ADN con el fin de delimitar el gen que se desea amplificar. Este fragmento sirve como molde para obtener dos cadenas complementarias de ADN, al mismo tiempo.¹⁰²

La reacción de PCR se realiza al mezclar los siguientes reactivos: enzima *Taq* polimerasa, oligonucleótidos, nucleótidos libres (dNTP's), el ADN que se desea amplificar, el ión Mg⁺⁺ que funciona como cofactor de la *Taq* polimerasa y solución

amortiguadora como medio que favorece la función de la enzima. La mezcla se coloca en un termociclador, con un programa de diferentes temperaturas. Inicialmente se emplean temperaturas de 92 a 98°C para separar las dos cadenas de ADN (desnaturalización), posteriormente la temperatura disminuye de entre 40°C a 60 °C para propiciar la alineación de los primers a las cadenas molde del ADN. Posteriormente, la temperatura se incrementa a 72 °C para que la *Taq* polimerasa inicie la polimerización a partir de los primers en el sentido 5' → 3'.¹⁰²

La técnica de PCR es confiable por el grado de sensibilidad puede amplificar una secuencia de ADN blanco a partir de una cantidad mínima. La secuencia de los oligonucleótidos asegura la especificidad en la amplificación del gen en estudio, ya que delimitan la región que se amplificará del ADN.¹⁰²

Existen dos variantes en la técnica de PCR, en punto final e implica que al término del procedimiento se pueda evaluar la cantidad del gen amplificado. En tiempo real es la otra variante y se caracteriza por la posibilidad de monitorear en cada ciclo la síntesis del ADN producto de la reacción, para tal efecto se requiere de fluorocromos que se unen al ADN o bien sondas de hibridación TaqMan que generan fluorescencia al hibridar el ADN y oligos específicos marcados con un fluoróforo, así como un termociclador que los detecta. En cada amplificación se emite fluorescencia, por lo que la cantidad de fluorescencia que detecta el equipo es proporcional al número de copias presentes en la muestra. En este sentido, PCR en tiempo real es un método de precisión confiable para el análisis cuantitativo de la expresión génica en diversos estudios.¹⁰³

En el termociclador es posible visualizar la expresión relativa de los genes, el equipo elabora una gráfica con la fluorescencia emitida (eje de las ordenadas) y el número de ciclos (eje de las abscisas). En la reacción se presentan tres fases: 1) Exponencial, con incremento del producto debido a los reactivos ilimitados; 2) Lineal, en el que el producto incrementa linealmente y los reactivos comienzan a escasear; 3) Estacionaria, en el que el producto no se incrementa en consecuencia de la limitación de los reactivos (Figura 7).¹⁰³

Curva de amplificación de β -Actina

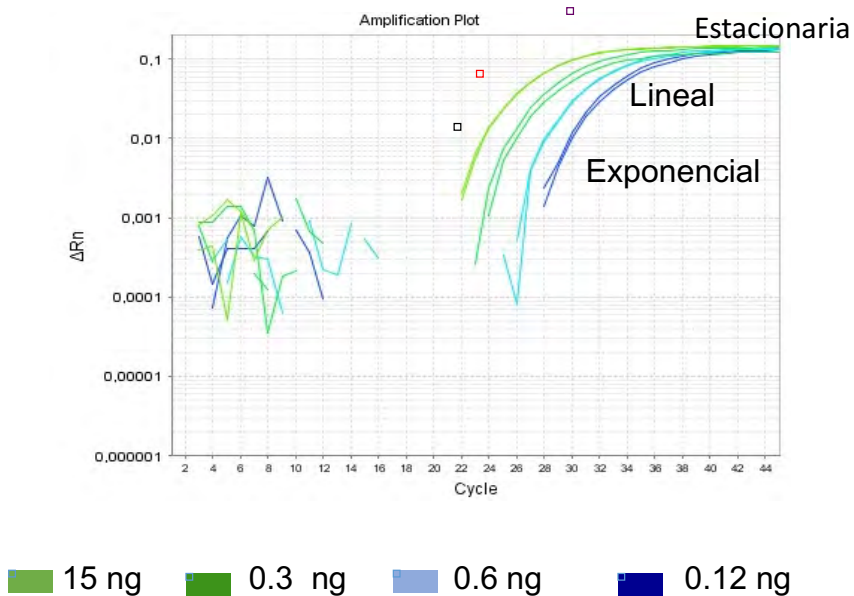


Figura 7. Fases de la Reacción de PCR. Curva de amplificación del gen β -Actina obtenida con muestras en el laboratorio de Inmunología Molecular, FES Zaragoza, UNAM.

En la gráfica de amplificación se puede identificar el Ct (*Threshold cycle*), el cual representa el ciclo en el que la fluorescencia alcanza el valor umbral. En la práctica, este valor se alcanza más rápidamente a medida que las muestras contengan mayor cantidad de ADN, por lo que el número de ciclos será menor para conseguir el Ct.¹⁰³

Los datos obtenidos en PCR en tiempo real se pueden cuantificar en forma absoluta o relativa. En el primer caso se requiere una curva de calibración interna, en el segundo, se compara un gen blanco con uno de referencia. El análisis de los datos se puede realizar con el modelo de eficiencia calibrada o el método $\Delta\Delta Ct$, los cuales se ajustan a los experimento si se tiene la muestra, el control, la amplificación del gen de interés y uno de referencia.¹⁰³

Se amplifican diluciones seriadas de ADN para calcular la eficiencia, también se amplifica el gen de interés y el gen de referencia. Al obtener el valor Ct se gráfica contra el logaritmo de la concentración (Figura 8).

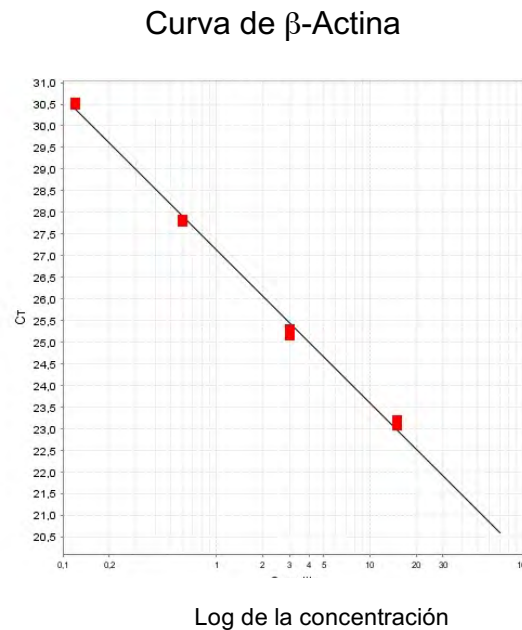


Figura 8. Curva estándar de β -Actina, con diluciones seriadas de ADN: 15 ng, 3 ng, 0.6 ng y 12 ng. Curva obtenida con muestras en el laboratorio de Inmunología Molecular, FES Zaragoza, UNAM.

Al obtener la pendiente de la recta se puede determinar la eficiencia, para tal efecto se emplea la siguiente ecuación:

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

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

La cuantificación relativa se obtiene con la siguiente ecuación:

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

Donde.⁶⁷

$E = \text{eficiencia}$

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

$$\Delta Ct_{\text{referencia}} = Ct_{\text{control}} - Ct_{\text{tratamiento}}$$

RETROTRANSCRIPCIÓN

Retrotranscripción o transcripción inversa es un método sensible que se emplea para la detección de ARNm en muestras de tejido. A partir de este ácido nucleico es posible la síntesis de ADN complementario (ADNc), la enzima transcriptasa reversa obtenida a partir del retrovirus de la leucemia murina malonil (MMLV-RT) cataliza la reacción de retrotranscripción, que además requiere de: una solución amortiguadora que contiene los cofactores de la enzima, el ARN mensajero molde, así como dNTP's para producir la cadena de ADNc a partir del ARN molde.¹⁰⁴