



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Laboratorio de Inmunología Molecular

Efecto de la prolactina sobre la concentración de anticuerpos: IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG total e IgM en ratones infectados con *P. berghei* ANKA.

T E S I S

Que para obtener el título de
Químico Farmacéutico Biólogo

Presenta

Odra Berenisse Villa Reyes

Directora: Dra. Martha Legorreta Herrera

Fecha: Septiembre del 2017



1976 - 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad”.

Albert Einstein

“El científico no tiene por objeto un resultado inmediato. Él no espera que sus ideas avanzadas sean fácilmente aceptadas. Su deber es sentar las bases para aquellos que están por venir, y señalar el camino”.

Nikola Tesla

Agradecimientos

Este trabajo recibió financiamiento de DGAPA proyecto PAPIIT IN220417 y PAPIIME PE208715.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente a la Facultad de estudios Superiores Zaragoza y al Laboratorio de Inmunología Molecular bajo la dirección de la Dra. Martha Legorreta Herrera, por ser las instituciones y lugares donde desarrolle el trabajo de investigación.

A mis sinodales Dra. Martha Legorreta Herrera, M. en C. Rosa Elba Galván Duarte, Dra. Raquel Retana Ugalde, Q.F.B. Luis Antonio Cervantes Candelas, Q.F.B. Francisco Javier Parada García, ya que sus consejos y observaciones realizadas de manera tan acertada enriquecieron este trabajo.

A la Dra. Martha Legorreta Herrera por brindarme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo, enseñarme a realizar siempre un buen trabajo, así como su apoyo y paciencia, ya que siempre estuvo dispuesta para aclarar o ampliar cualquier duda, por sus comentarios en la realización de este trabajo y demostrarme con su ejemplo que lo que se desea se obtiene a base de trabajo y esfuerzo.

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

A la Dra. María del Carmen Clapp Jiménez Labora por la donación de los ratones C57Bl/6.

A la Dra. Raquel Retana Ugalde y a la M. en C. Rosa Elba Galván Duarte, porque ustedes me vieron crecer como estudiante y como persona siempre tendré presente su apoyo incondicional en todo momento, GRACIAS.

A mis mamás Maura Isela Reyes Ramírez y Elvia Ramírez Morales, por todo el cariño y apoyo incondicional que me han ofrecido a lo largo de toda mi vida, por hacerme pasar maravillosos e increíbles momentos a su lado, sobre todo por darme la vida y acompañarme en todo momento, por entenderme en momentos de ausencia familiar. Sin ustedes no lo habría logrado.

A mi Padre Gustavo Reyes, que ya no está conmigo pero me enseñó que la palabra padre no se le atribuye a quien engendra si no a quien cuida.

A mi hermana Cielo por siempre mostrarme su apoyo en todo momento.

A Alejandro ya que siempre me ha acompañado en las buenas y en las malas, mostrando su cariño y apoyo en todo momento.

A Diego, Alan, Iván, Víctor, Oscar por ser mis amigos compartiendo momentos de alegría en momentos de estrés, escuchándome y aconsejándome, estoy agradecida por su amistad incondicional.

A mis compañeros del Laboratorio de Inmunología Molecular, Fidel, Jesús, Luis, Omar, Sofía y Teresita, por enseñarme lo que representa el trabajo en equipo y brindar su amistad, por compartir momentos agradables dentro y fuera del laboratorio.

Contenido

Agradecimientos	3
1. Introducción	8
2. Marco Teórico	9
2.1. Malaria o Paludismo	9
2.2. Ciclo de vida del parásito <i>Plasmodium</i>	10
2.3. Modelos experimentales	11
2.4. <i>P. berghei</i> ANKA y la malaria cerebral experimental	12
2.5. Dimorfismo sexual en Malaria.....	12
2.6. Inmunidad en Malaria	13
2.7. Anticuerpos en el sistema inmune	14
2.8. Inmunoglobulina M en el sistema inmune.....	16
2.9. Inmunoglobulina M en malaria.....	17
2.10. Inmunoglobulina G y subclases en el sistema inmune	17
2.11. Inmunoglobulina G en malaria	18
2.12. Efecto de las hormonas sobre la respuesta inmune	18
2.13. Prolactina.....	19
2.14. Otros efectos de la prolactina	21
2.15. Prolactina y sistema inmunológico.....	22
2.16. Prolactina y Malaria	22
2.17. Metoclopramida (MTC)	22
2.18. Técnicas y fundamentos	23
3. Planteamiento del problema	25
4. Hipótesis	25
5. Objetivo	25

5.1. Objetivos particulares	26
6. Material y métodos	27
6.1 Población de estudio.....	27
6.2. Parásito.....	27
6.3. Variables.....	27
6.3.1 Independientes	27
6.3.2 Dependientes.....	27
6.4. Material de laboratorio	28
6.5. Equipo.....	28
6.6. Reactivos	29
7. Diseño experimental.....	29
7.1. Determinación de hemoglobina	30
7.2. Determinación de peso	31
7.3. Determinación de temperatura	31
7.4. Cuantificación de glucosa	31
7.5. Parasitemia.....	31
7.6. Sacrificio	32
7.7. Metodología de ELISA	32
8. Análisis estadístico	35
9. Resultados	36
9.1. Efecto de la prolactina sobre la parasitemia de ratones machos y hembras infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.....	36
9.2. Efecto de la prolactina sobre la concentración de glucosa en ratones machos y hembras	37
9.3. Efecto de la prolactina sobre la concentración de hemoglobina en ratones machos y hembras.....	40

9.4. Efecto de la prolactina sobre el peso de ratones machos y hembras ...	43
9.5. Efecto de la prolactina sobre la temperatura de ratones machos y hembras.....	46
9.6. Efecto de la prolactina sobre la concentración de anticuerpos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG total, IgM de ratones machos y hembras	49
10. Análisis de resultados	52
10.1. Efecto de la prolactina sobre la parasitemia de ratones machos y hembras C57BL/6 infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.....	52
10.2. Efecto de la prolactina sobre la concentración de glucosa en ratones machos y hembras C57BL/6.....	52
10.3. Efecto de la prolactina sobre la concentración de hemoglobina en ratones machos y hembras C57BL/6.....	53
10.4. Efecto de la prolactina sobre el peso de ratones machos y hembras C57BL/6.....	53
10.5. Efecto de la prolactina sobre la temperatura de ratones machos y hembras C57BL/6	54
10.6. Efecto de la prolactina sobre los niveles de anticuerpos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG total, IgM de ratones machos y hembras.....	55
11. Conclusiones	56
12. Perspectivas.....	56
13. Referencias	57

1. Introducción

La malaria o paludismo es una enfermedad causada por parásitos del género *Plasmodium*; se ha convertido en una prioridad para la comunidad sanitaria internacional con 214 millones de nuevas infecciones y más de 400,000 muertes en 2015. Se transmite por la picadura del mosquito hembra *Anopheles*. La gravedad de las manifestaciones clínicas del paludismo depende del tipo de plasmodio o la virulencia de una cepa determinada y de la inmunidad previa de la persona infectada. El estudio de esta enfermedad en modelos experimentales ha permitido conocer mecanismos involucrados en la respuesta inmune tanto humoral como celular contra la malaria, la concentración de anticuerpos producidos por la respuesta humoral como: IgM e IgG total que se divide en IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 importantes para la eliminación del parásito.

La infección con *Plasmodium* en ratones resulta una disminución de temperatura corporal, anemia grave, disminución de peso corporal, hipoglucemia e hiperparasitemia. Esta enfermedad presenta un fuerte componente dimórfico en el que los varones desarrollan mayor patología y mortandad que las mujeres, dado que las hormonas son responsables de las principales diferencias entre mujeres y hombres, es probable que también modulen la expresión de diferentes genes que impactan a la respuesta inmune. En este trabajo analizamos el efecto de la prolactina en la patología y en la concentración de anticuerpos específicos contra el *Plasmodium berghei* ANKA. Para ello tratamos con metoclopramida (este fármaco incrementa la concentración de prolactina) a ratones C57Bl/6 hembras y machos, posteriormente los infectamos con *P. berghei* ANKA para evaluar si la prolactina afecta de forma distinta a cada sexo.

2. Marco Teórico

2.1. Malaria o Paludismo

La Malaria o Paludismo es la infección parasitaria que ocasiona el mayor número de muertes en el mundo, la Organización Mundial de la Salud publicó en 2015, 212 millones de casos de paludismo que ocasionaron la muerte de 429,000 personas (1).

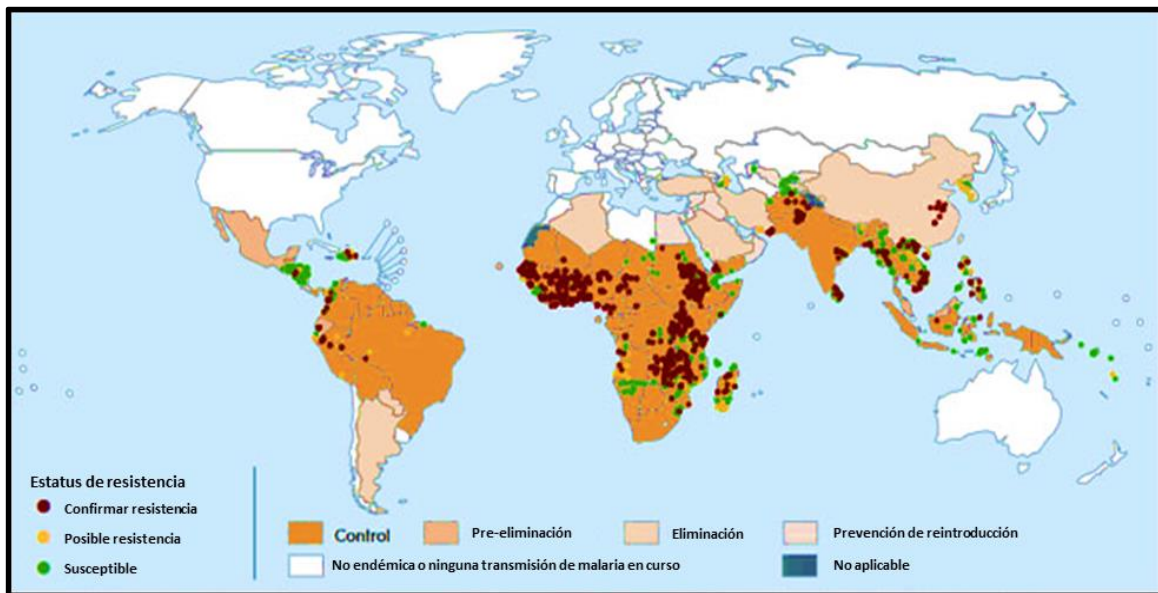


Figura 1. Países afectados con malaria. Tomado y modificado de WHO. World Malaria Report 2015.

La mayoría de los casos y de las muertes se registran en el África subsahariana, pero también se afecta Asia, Latinoamérica y Medio Oriente. En 2015, La población con más riesgo de contraer la enfermedad y presentar manifestaciones graves fueron: los lactantes, los niños menores de cinco años, las embarazadas y los pacientes con VIH/SIDA, así como los emigrantes no inmunes de zonas endémicas, los viajeros y los grupos de población itinerante son las poblaciones con mayor riesgo (1, 2). Los síntomas asociados con la malaria incluyen, anemia, dificultad respiratoria, fiebre, hipotermia y pérdida de peso, además de problemas neurológicos como la ataxia, parálisis, coma y la muerte, estos síntomas junto con la mortalidad, son más severos en los hombres que en las mujeres (2).

2.2. Ciclo de vida del parásito *Plasmodium*

Es una enfermedad causada por protozoarios parásitos del género *Plasmodium*, se han identificado más de 100 especies de *Plasmodium*, que pueden infectar a mamíferos, aves y reptiles de los cuales 5 de ellos infectan al hombre: *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi*, que se transmite a través de la picadura del mosquito hembra *Anopheles sp.* infectada (2, 3).

El ciclo de vida del parásito, se lleva a cabo en un hospedero invertebrado (mosquito) donde el parásito se reproduce sexualmente y un hospedero vertebrado (hombre) donde la reproducción es asexual (figura 2) (4).

El ciclo de reproducción asexual consta de dos fases: La fase pre eritrocítica y la fase eritrocítica. La fase pre eritrocítica de *Plasmodium* inicia cuando un mosquito infectado inocula esporozoitos a una persona sana, viajan por el torrente sanguíneo y en 30 minutos llegan al hígado e invaden a los hepatocitos, aumentan de volumen como consecuencia de la multiplicación del parásito por reproducción asexual. En el hígado, los esporozoitos se diferencian a merozoitos, después de 7 días se liberan al torrente sanguíneo e inician el ciclo eritrocítico (5). 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 se asemeja a un anillo, conocido como trofozoito, el núcleo se divide y se transforma en esquizonte, que al madurar genera nuevamente merozoitos y se liberan del eritrocito para invadir a otros eritrocitos (5).

Después de varios ciclos, algunos merozoitos se transforman en gametocitos, microgametocitos (masculinos) y macrogametocitos (femeninos), son las formas infectantes para el mosquito (6). De esta manera cuando el mosquito se alimenta con la sangre de un individuo infectado ingiere eritrocitos con las fases sexuales, los gametocitos maduran, se transforman en gametos y se lleva a cabo la fecundación. El oocigoto sufre mitosis y se diferencia a oocineto, forma móvil del

huevo. El oocineto crece y atraviesa la pared estomacal, donde se cubre con una fina pared para dar lugar al ooquiste y más tarde a miles de esporozoitos móviles que migran a las glándulas salivales del mosquito y nuevamente continua con el ciclo al infectar a otro individuo sano (5, 6).

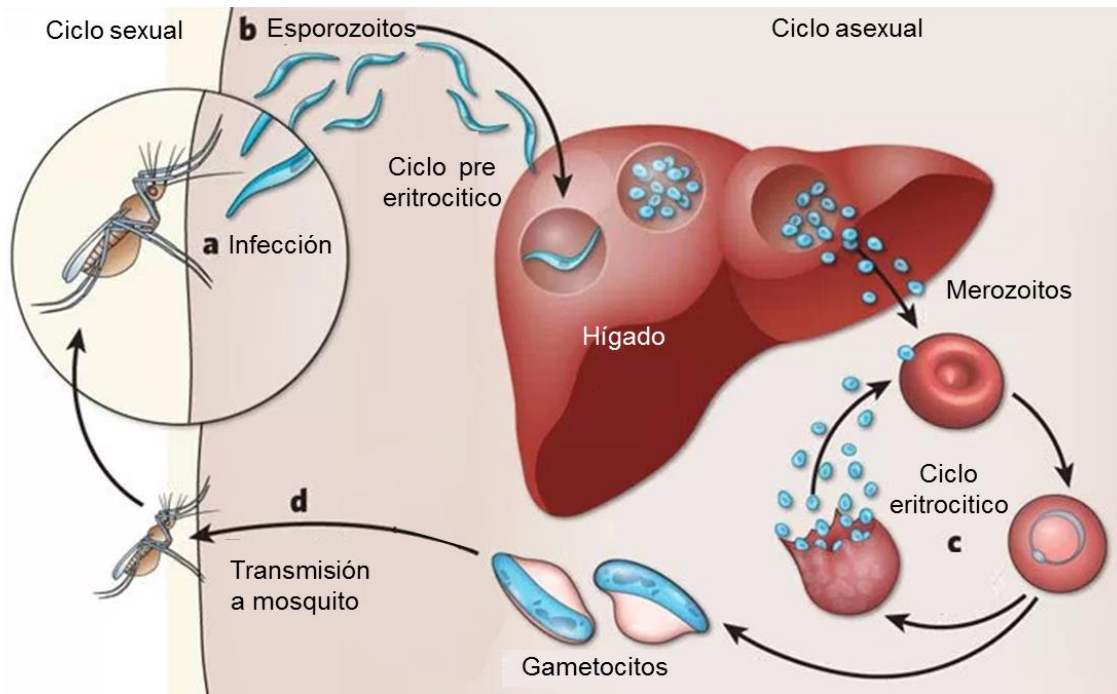


Figura 2. Ciclo biológico del Plasmodium. A) El parásito Plasmodium es inyectado en el mamífero por la picadura del mosquito Anopheles hembra, inocula los esporozoitos. B) Los esporozoitos infectan las células hepáticas, donde proliferan y se convierten en merozoitos. C) Los merozoitos proliferan, se rompen permitiendo la infección de nuevos eritrocitos, ahí se desarrollan los estadios de anillo, trofozoitos y esquizontes, terminan con la ruptura del eritrocito y liberación de los merozoitos, estos merozoitos infectan nuevos eritrocitos, después de un periodo multiplicativo asexual, una proporción de los merozoitos se diferencia a D) Los gametocitos se producen a partir de los merozoitos y se transmiten a los mosquitos que pican a los mamíferos infectados. Tomado y modificado de (7).

2.3. Modelos experimentales

Los modelos experimentales de la malaria se han desarrollado en monos, ratas y ratones, aunque ninguno de ellos mimetiza exactamente el síndrome humano, permiten representar fielmente ciertos aspectos de la malaria humana (8).

La disponibilidad de diferentes cepas de ratones, que incluyen cepas knockout, ha permitido profundizar en los mecanismos moleculares implicados en la patología

del *Plasmodium*. Aunque no existe un modelo experimental que reproduzca todos los aspectos de la enfermedad en humanos, los ratones C57Bl/6 infectados con *P. berghei* ANKA constituyen uno de los modelos más utilizados de malaria cerebral en los últimos 50 años (8). Este modelo de malaria cerebral, presenta síntomas neurológicos como: ataxia, convulsiones y / o parálisis, los ratones mueren entre los días 6 a 8 después de la infección. *Plasmodium berghei* es utilizado como modelo para estudiar la patología del hígado, los pulmones, el bazo y el cerebro. (9).

2.4. *P. berghei* ANKA y la malaria cerebral experimental

Los modelos de ratón son útiles para estudiar los mecanismos inmunológicos y la fisiología de los individuos infectados con *Plasmodium*. El *P. berghei* ANKA se multiplica rápidamente y ocasiona la muerte del ratón antes que *P. chabaudi* AS (9). La parasitemia en este modelo comienza aproximadamente a partir del tercer día, con un ascenso del 5% que se alcanza los días 4 y 6 post infección, aunque no rebasa el 20% (10). La infección con *Plasmodium* en los ratones resulta en una rápida disminución de la temperatura corporal (11), la hipotermia predice el estado terminal en este modelo, la anemia grave que se limita a las cepas (CBA, C57Bl/6) genéticamente susceptibles a generar una intensa respuesta proinflamatoria, asociado a la pérdida de peso corporal, deshidratación e hipoglucemia (12).

2.5. Dimorfismo sexual en Malaria

El dimorfismo sexual es un término que describe las diferencias morfológicas y fisiológicas entre sexos (13). La determinación del genotipo sexual en la concepción, seguida por el desarrollo fisiológico provoca múltiples y complejas diferencias entre machos y hembras en muchas especies sexualmente dimórficas

(14). La base de estas diferencias se encuentra principalmente en la función y desarrollo del eje hipotálamo-pituitaria-gónadas (HPG) (13, 14). Las complejas interacciones entre las hormonas producidas por el eje HPG y otras hormonas, producen un fenotipo de macho y hembra. El fenotipo de hembra se caracteriza por elevaciones cíclicas de estrógenos, progesterona y concentraciones bajas de andrógenos. En contraste, el fenotipo hormonal de macho se caracteriza por concentraciones bajas de estrógenos, progesterona y elevadas de andrógenos (14). En el dimorfismo inmunológico las hembras de diferentes especies producen concentraciones más elevadas de inmunoglobulinas circulantes y presentan una respuesta inmune de tipo humoral más pronunciada en contra de los patógenos. La producción de anticuerpos autoreactivos también es más frecuente en las hembras. Se ha comprobado que los estrógenos incrementan la respuesta de células B tanto *in vivo* como *in vitro*, mientras los andrógenos y la progesterona disminuyen la síntesis de anticuerpos (14).

En general los machos son más susceptibles a las infecciones de diversos protozoarios que las hembras, ese incremento en la susceptibilidad se ha asociado con las hormonas sexuales. *Plasmodium* es uno de los géneros protozoarios que causa dimorfismo sexual en humano y animales, la prevalencia y la gravedad de las infecciones parasitarias es mayor en machos que en hembras (14). La incidencia e intensidad de *Plasmodium falciparum* es mayor en hombres que en mujeres (14).

2.6. Inmunidad en Malaria

La respuesta inmune en malaria es compleja, la protección bajo condiciones naturales requiere de una exposición continua con el parásito durante varios años, esto se logra después de que el individuo se infecta con un gran número de poblaciones de parásitos antigénicamente diferentes y no es absoluta dado que la parasitemia persiste en ausencia de enfermedad clínica (13, 15, 16).

La adquisición y mantenimiento de la inmunidad protectora contra la malaria depende de los linfocitos T, que desempeñan una función indispensable en la cooperación para la producción de anticuerpos ([17-19](#)). La infección por *Plasmodium* es capaz de estimular células NK (*Natural Killer* por sus siglas en inglés: Asesinas naturales), macrófagos, así como las células T CD4⁺ ([20](#)).

Las células TCD4⁺ se requieren para controlar la infección en la fase eritrocítica, son fundamentales para el establecimiento de la respuesta inmune humoral o tipo Th2 de acuerdo a su patrón de producción de anticuerpos. Las células tipo Th2 producen citocinas como: IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 que promueven la diferenciación de los linfocitos B en células plasmáticas, al cambio de isotipo y producción de anticuerpos, importantes en la inmunidad ([21](#)). La respuesta tipo Th2 predomina durante la fase tardía de la infección ([21](#)).

La respuesta humoral específica es importante en el control de los esporozoitos y de los estadios asexuales del *Plasmodium*. Los anticuerpos se pueden detectar en el curso de la primera semana de la infección y sus concentraciones aumentan con la repetición de la infección de las fases sanguíneas. El mecanismo protector de los anticuerpos séricos se basa en que facilitan la opsonización de los eritrocitos infectados por los macrófagos, a su vez pueden aumentar la citotoxicidad mediada por células NK y dirigen el ataque del complemento ([5](#), [7](#)).

2.7. Anticuerpos en el sistema inmune

Los anticuerpos desempeñan un papel protector contra los parásitos, al demostrarse que en ensayos de transferencia de suero de individuos adultos inmunes a niños infectados no inmunes son una estrategia eficaz de tratamiento contra el *Plasmodium* ([22](#)). Además, en modelos de ratón carentes de células B revelan la importancia en el paludismo, ya que son incapaces de eliminar definitivamente el parásito de *Plasmodium* ([22](#)). Los linfocitos B inmaduros se originan en la médula ósea, se diferencian a células B transitorias 1 (T1) al

abandonar dicho órgano, viajan por el torrente sanguíneo hasta el bazo dando lugar a las células B transitorias 2 (T2). En estos estadios solo son capaces de expresar IgM en su membrana. Las células B T2 continúan su desarrollo para formar células maduras que circulan en búsqueda de un Ag. Las células B maduras expresan en su membrana IgM, pero el reconocimiento de un antígeno las activa, que implica el cambio de isotipo de los anticuerpos de membrana, principalmente IgG en el caso de una infección por malaria (23).

Los anticuerpos pueden neutralizar al patógeno al unirse a los receptores que utilizan para entrar a una célula y bloquearlo, pueden opsonizarlo al unirse a células fagocíticas, fijan el complemento e inician la cascada de complemento que perfora las membranas celulares (24). Además, los anticuerpos pueden cooperar con la rama celular del sistema inmunitario al unirse a células citotóxicas y aumentar la actividad de las células natural killer, en un proceso llamado citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (24). La capacidad de los anticuerpos para mediar estas respuestas depende de su especificidad para el antígeno y de su isotipo, que determina si fija o no el complemento, a cuales receptores se unirá y que efectos celulares tendrá (24). Estos mecanismos destruyen al parásito, estimulan la fagocitosis y la digestión de complejos antígeno-anticuerpo, también destruyen directamente las membranas células del parásito, o inducen apoptosis de la célula infectada (24).

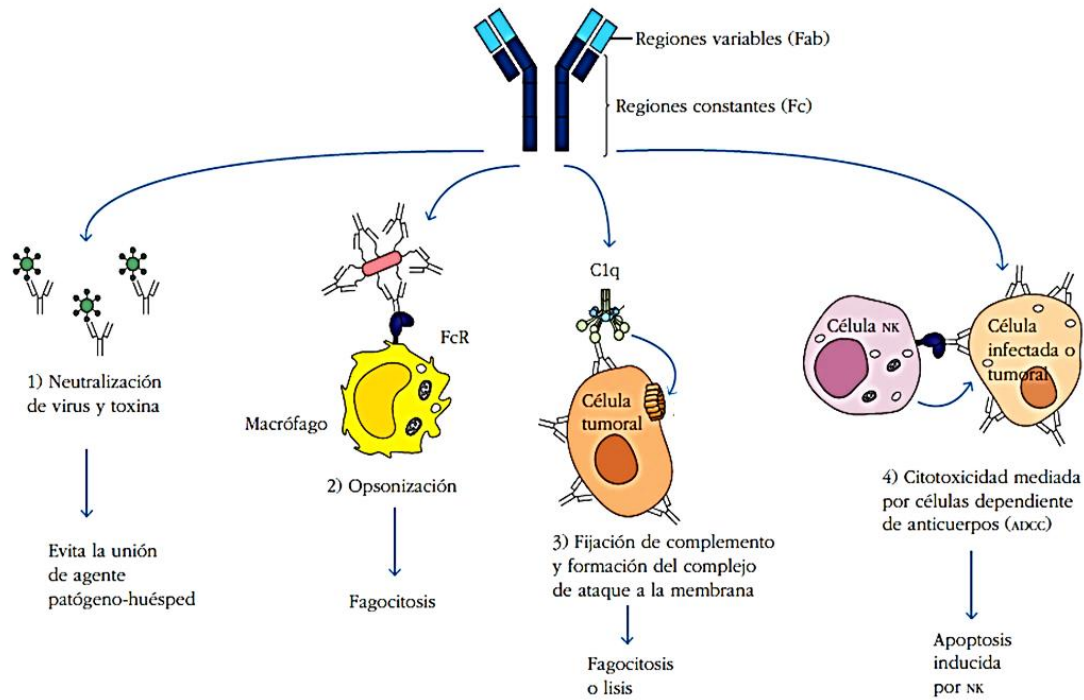


Figura 3. Funciones efectoras de los anticuerpos. La unión a anticuerpos puede aumentar la eliminación de patógenos mediante 1) unión a sus receptores (neutralización), 2) interacción con receptores de la Fracción constante (Fc) sobre la superficie de células fagocíticas, e inducción de internalización y degradación (opsonización), 3) reclutamiento de proteínas del complemento pueden matar de manera directa un patógeno o aumentar su fagocitosis, y 4) unión FcR sobre las células citotóxicas y dirección de su actividad a células infectadas. **Tomado y modificado de kubby, 2003 (24).**

2.8. Inmunoglobulina M en el sistema inmune

La inmunoglobulina M (IgM) es la primera que se produce durante una respuesta inmune primaria. Constituye el 10% de las inmunoglobulinas en el plasma y la concentración es aproximadamente 25% más elevada en las mujeres que en los hombres (25). Son anticuerpos de baja afinidad porque las células B que los producen no han pasado por la etapa de maduración, son pentavalentes debido a que se unen entre sí en grupos de cinco, pueden ser muy eficaces en la unión al patógeno. Son eficaces para fijar complemento e inducen la lisis de los patógenos, tienen la capacidad de formar complejos de anticuerpo-antígeno (24).

2.9. Inmunoglobulina M en malaria

La inmunoglobulina M es eficaz en la neutralización y en la aglutinación de los plasmodios en la sangre. La IgM se une a la superficie de eritrocitos infectados con *Plasmodium* a través de la Fc y su concentración elevada correlaciona con la malaria severa y con la formación de rosetas ([25](#), [26](#)).

2.10. Inmunoglobulina G y subclases en el sistema inmune

La inmunoglobulina G (IgG) tiene una estructura monómerica, constituida por dos cadenas H y dos cadenas L, es una de las proteínas con mayor concentración en el suero de los mamíferos y representa aproximadamente el 75% del total de las inmunoglobulinas circulantes. Existen cuatro subclases distintas de IgG humana: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, que constituyen el 70, 20, 8 y 2%, respectivamente, de la IgG total ([23](#)). En el ratón, el isotipo de IgG se divide en las subclases IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 ([23](#)). Cada una posee funciones distintas. Todas las variantes de IgG se unen a receptores Fc y pueden aumentar la fagocitosis por macrófagos (opsonización) ([18](#)), la activación de complemento y la activación de células efectoras. Las IgG1 e IgG3 de humano son eficientes para fijar complemento. La IgG2a, IgG2b de ratón y la IgG1 de humano son eficaces para mediar la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo por las células NK ([23](#)).

Funciones	Inmunoglobulinas de ratón				
	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM
Citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)	+/-	++	++	+	+++
Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)	-	+++	+++	++	+
Peso molecular	160	160	160	160	900
Nivel medio en el suero de ratón (mg/ml)	0.3-0.5	0.1-4.0	0.1-5	0.1-0.2	0.1-1.6
Vida media (días)	8-11	3-12	2.6-3.5	4-8	0.5-1

Tabla 1. Características de las inmunoglobulinas de ratón. Información tomada de Álvarez-Vallina L. Anticuerpos monoclonales realidades y perspectivas: Editorial Complutense, S.A.; 2004 (23).

2.11. Inmunoglobulina G en malaria

La inmunoglobulina G juega un papel en la defensa del huésped contra las fases eritrocíticas de *Plasmodium*. Los anticuerpos IgG interactúan con receptores de la fracción constante (FcRs) de las células fagocíticas para controlar la parasitemia (27). El predominio de IgG1 e IgG3 que son anticuerpos citofílicos en humanos que viven en regiones endémicas de malaria, se ha asociado con parasitemia baja (28). El isotipo IgG2a e IgG2b en ratones proporciona protección contra *P. berghei* (27).

2.12. Efecto de las hormonas sobre la respuesta inmune

La interacción entre los sistemas endócrino e inmunológico se regula por mediadores inmunes y neuroendocrinos. Diversos sistemas hormonales influyen en la activación inmune y la función de la pituitaria, así como el sistema nervioso simpático (SNS) (29). La comunicación entre estos diferentes sistemas es multidireccional con hormonas específicas, péptidos, citocinas y factores de

crecimiento que sirven como mediadores para transmitir señales en momentos de estrés, lesión, enfermedad, infección, deterioro físico y estados de exceso de energía (29). La prolactina aparte de tener un papel como hormona se considera citocina, su síntesis se regula por medio del eje hipotálamo-hipófisis, mientras que la prolongación inadecuada de la síntesis de PRL podría conducir a enfermedades autoinmunes (30).

2.13. Prolactina

La prolactina (PRL) es una hormona, compuesta de una sola cadena con 199 aminoácidos y tres puentes disulfuro intramoleculares, tiene un peso molecular de 23 kDa. Por sus características genéticas, estructurales y funcionales, pertenece a la misma familia que la hormona de crecimiento y el lactógeno placentario, los cuales provienen de un mismo gen ancestral (31). El gen humano (hPRL) tiene aproximadamente 10kb de longitud, localizado en el cromosoma 6 (32).

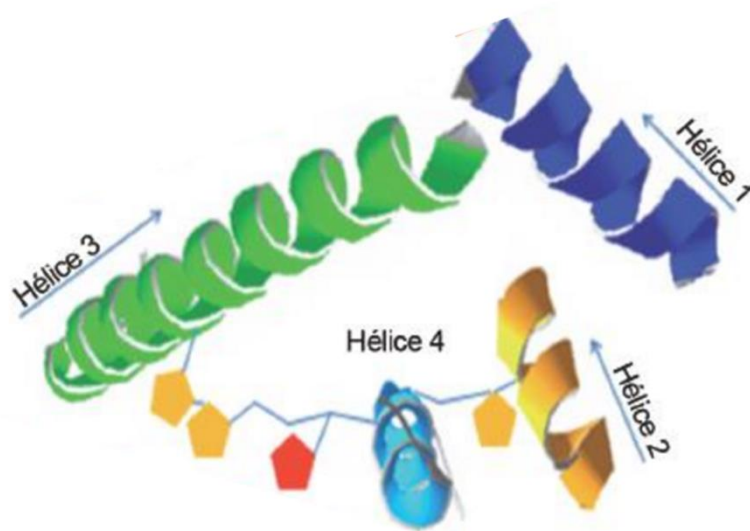


Figura 4. Estructura de la prolactina. Presenta cuatro dominios alfa-hélice y dos sitios de unión al receptor. Tomado y modificado (33).

La expresión de este gen se ha identificado en varias regiones del cerebro, miometrio, timo, bazo, médula ósea, células epiteliales mamarias, endometrio,

algunas líneas de células tumorales, células del sistema inmunológico como linfocitos T y B, en fibroblastos y glándulas sudoríparas (32).

La PRL es una hormona endócrina importante, secretada principalmente a partir de células lactótrofas de la glándula pituitaria anterior, se secreta de una manera pulsátil de acuerdo al ritmo circadiano, con un máximo durante el sueño y mínimo durante las horas de vigilia. Se secreta en la circulación y se transporta a sitios periféricos donde actúa sobre las células diana a través de receptores específicos localizados en la membrana plasmática (34), promueve la formación y la acción del cuerpo lúteo y se le han atribuido más de 300 funciones específicas en diferentes especies. Por lo tanto, la PRL afecta a más procesos fisiológicos que todas las hormonas pituitarias combinadas. Esas funciones incluyen: la regulación de la glándula mamaria, el desarrollo, iniciación y mantenimiento de la lactancia, modificación del comportamiento, modulación inmunológica y osmoregulación (31).

La expresión de la PRL hipofisaria se controla por un promotor proximal, que requiere la transcripción de Pit-1 Factor de transcripción 1. El promotor pituitario se regula principalmente por la dopamina. Por lo tanto, la homeostasis de la PRL depende del equilibrio entre la acción de la dopamina como inhibidor y factores locales que actúan como estimuladores: la hormona liberadora de tiroides (THR), estrógenos, neuropéptidos, etc.(35). La síntesis de PRL se inhibe por dopamina que se une a los receptores dopaminérgicos tipo 2 en la membrana que suprime la actividad secretora de los lactótrofos pituitarios (35, 36).

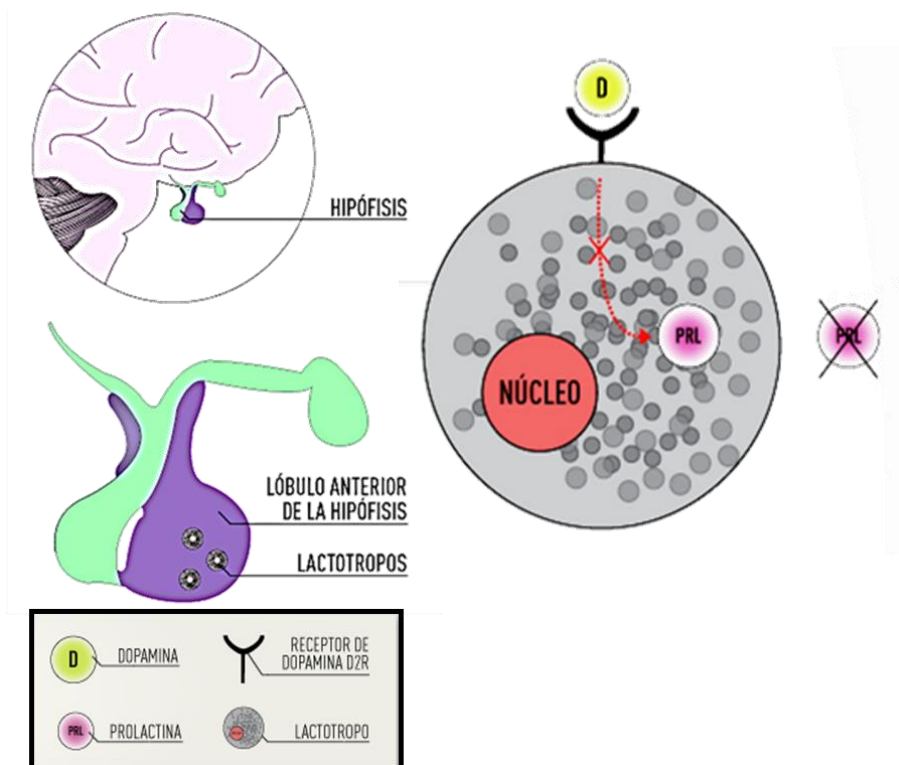


Figura 5. Síntesis de prolactina. Tomado y modificado (37).

2.14. Otros efectos de la prolactina

El aumento de PRL disminuye el transportador de glucosa 4 (GLUT4), que causa disminución en la captación de glucosa, además de activar a la piruvato deshidrogenasa cinasa 4, (PDK4) que disminuye la oxidación de glucosa. En general estos efectos de la PRL causan hiperglicemia (38, 39). La inhibición selectiva de los receptores D2 de dopamina en los lactótrofos pituitarios conduce a hiperprolactinemia, aumento de peso corporal y adiposidad en ratones hembras (40). La prolactina restaura la homeostasis hematopoyética bajo condiciones de desregulación (41). Además, el aumento de prolactina se relaciona con la temperatura en una respuesta de termorregulación (42).

2.15. Prolactina y sistema inmunológico

La PRL es modulador de la inmunidad humoral (43), participa en la diferenciación de las células NK, monocitos circulantes, aumenta la efectividad de la presentación del antígeno. La prolactina es un regulador importante de la diferenciación y la maduración de los linfocitos T y B (44).

La PRL también estimula la síntesis de INF- γ en los linfocitos T y en las células NK (44). La PRL aumenta la diferenciación de linfocitos Pre-B en el bazo, además de incrementar la viabilidad y la capacidad endocítica de las células dendríticas (44).

2.16. Prolactina y Malaria

La fisiología de machos y hembras es un factor determinante en la susceptibilidad en la malaria y de las interacciones de las hormonas y el sistema inmunológico. Es por eso que se han estudiado mujeres embarazadas en zonas endémicas, que son más susceptibles que las mujeres no embarazadas (45). Debido a que el embarazo se ha asociado a cambios en las concentraciones de prolactina, las mujeres embarazadas infectadas por *Plasmodium falciparum* tienen concentraciones séricas más bajas de prolactina (46). Por eso la importancia de la prolactina contra el *Plasmodium* al aumentar la actividad de las células NK que contribuyen a respuestas inmunes (47).

2.17. Metoclopramida (MTC)

La metoclopramida se utiliza para el tratamiento de las náuseas y vómitos inducidos por la quimioterapia y en aquellos desórdenes de tránsito digestivo disminuido (48). Su mecanismo de acción es como antagonista de la dopamina en los receptores D2 localizados en la membrana de los lactotrofos, permite la

liberación de la prolactina (49). Su uso prolongado puede provocar hiperprolactinemia (49).

En el área experimental, la metoclopramida administrada en animales eleva la síntesis de prolactina. La administración por vía subcutánea de 200 µg de metoclopramida, provoca aumento en la concentración de prolactina (33).

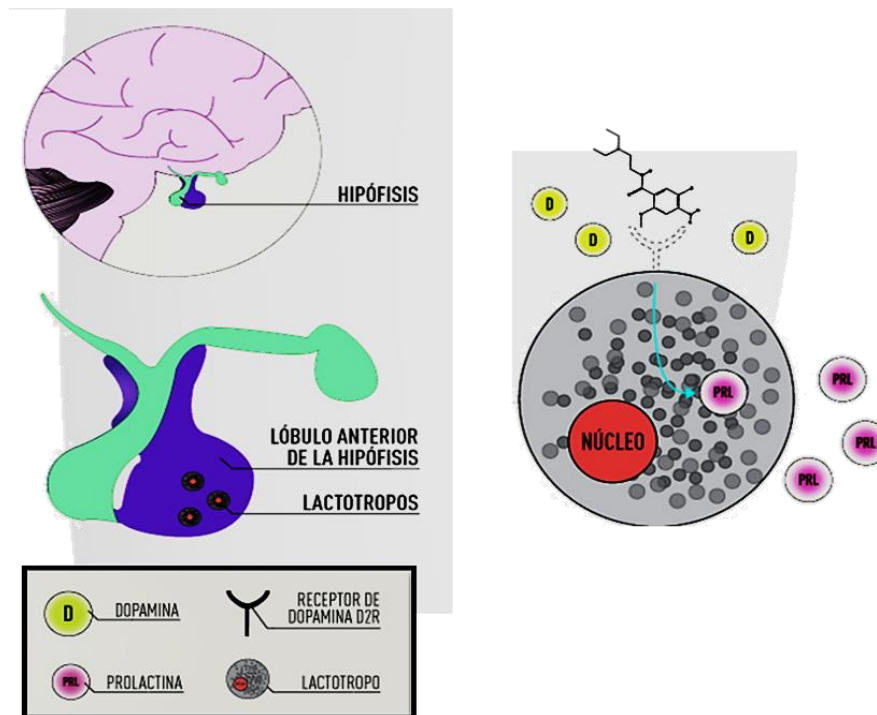


Figura 6. Producción de prolactina. Se lleva a cabo por la acción antagonista de la metoclopramida que es un fármaco, cuya función es aumentar las concentraciones de prolactina. **Tomado y modificado (37).**

2.18. Técnicas y fundamentos

ELISA

ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay), es un método para detectar y cuantificar antígenos y anticuerpos (51). Utiliza la especificidad del reconocimiento de un anticuerpo a su antígeno, acoplado con el marcaje químico de una enzima,

lo que permite la detección de complejos inmunes formados en fase sólida (52). Los reactivos que no reaccionan se eliminan con lavados y la adición del sustrato de la enzima genera productos coloridos que se pueden medir espectrofotométricamente. Esta prueba posee las características de un inmunoensayo ideal: es versátil, fácil de realizar, utiliza reactivos estables y además es sumamente sensible. Los ensayos no competitivos de captura de antígeno pueden detectar hasta una sola molécula (53), por lo que resulta ideal para cuantificar anticuerpos contra *Plasmodium*.

3. Planteamiento del problema.

La malaria es una enfermedad infecciosa que ocasiona el mayor número de muertes en el mundo. En esta enfermedad se presenta el dimorfismo sexual, dado que las principales diferencias entre sexos se deben a las hormonas sexuales, la severidad en la patología es mayor en hombres que en mujeres, por lo tanto las hormonas están implicadas en la respuesta inmune contra la malaria. Por lo que, la prolactina podría estar implicada en una respuesta inmune contra el parásito *Plasmodium*, ya que es una hormona que tiene propiedades inmunoreguladoras, relacionada con la síntesis de anticuerpos. Sin embargo, se desconoce el efecto de la prolactina en la patología y en la síntesis de anticuerpos en malaria. Por lo que consideramos importante evaluar el efecto de la prolactina sobre generación anticuerpos como: IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG total e IgM contra el parásito *Plasmodium*. La información de este proyecto contribuirá a detallar el conocimiento de la participación de la hormona prolactina sobre la patología y la regulación en la síntesis de anticuerpos contra *Plasmodium*.

4. Hipótesis

Si la prolactina está relacionada con la síntesis de anticuerpos, el incrementar su concentración con la administración prolongada de metoclopramida, aumentará la concentración de anticuerpos como: IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG total e IgM, específicos contra el parásito *Plasmodium*.

5. Objetivo

Evaluar el efecto de la prolactina sobre la concentración de anticuerpos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG total e IgM en suero de ratones machos y hembras infectados con *P. berghei* ANKA, tratados con y sin metoclopramida.

5.1. Objetivos particulares

- Estandarización de la técnica de ELISA para los anticuerpos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG total e IgM.
- Evaluar el efecto de la prolactina sobre la parasitemia, disminución de peso, hipotermia, hipoglucemia y la concentración de hemoglobina como medida de la anemia.
- Cuantificar la concentración de anticuerpos específicos para *P. berghei* ANKA por la técnica de ELISA en muestras de suero de ratones tratados con metoclopramida e infectados con *P. berghei* ANKA.

6. Material y métodos

6.1 Población de estudio

- Este estudio experimental consta de cuatro grupos de ratones machos y cuatro grupos de ratones hembras, de 5 ratones cada uno de la cepa C57Bl/6, mantenidos en condiciones libres de patógenos.

6.2. Parásito

- *Plasmodium berghei* ANKA, donado por el Doctor William Jarra del National Institute for Medical Reserch, Londres, Inglaterra.

6.3. Variables

6.3.1 Independientes

Sexo

Tratamiento con metoclopramida

Infección

6.3.2 Dependientes

Porcentaje de parasitemia

Temperatura en °C

Peso en gramos

Concentración de glucosa en mg/dL

Concentración de hemoglobina en g/dL

Concentración de anticuerpos: IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG total e IgM.

6.4. Material de laboratorio

- Pipetas Pasteur de vidrio
- Portaobjetos
- Tijeras de disección
- Guantes de hule de látex
- Gradillas para tubos Falcon
- Gradillas para tubos Eppendorf
- Gorros y botas para áreas estériles
- Tubos Falcon de: 15 mL, 50 mL, estériles.
- Puntas para micropipetas: 1.5 μ L, 2.5 μ L, 10 μ L, 200 μ L, 1000 μ L, con filtro, libres de nucleasas y estériles.
- Tubos Eppendorf de 1.5 mL
- Placas de poliestireno
- Tubos Falcon de 15 y 50 mL

6.5. Equipo

- Balanza analítica, Scientech
- Campana de flujo laminar, Veco
- Congelador Nieto
- Espectrofotómetro UV, WPA
- Microcentrifuga, Eppendorf 5415C
- Micropipetas Eppendorf: 2.5 μ L, 10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 1000 μ L
- Micropipetas Gilson: p20, p200, p1000
- Microscopio óptico, Carl Ziess Estandar 25.
- Refrigerador May Tag
- Tanque de nitrógeno líquido, 34XT, Taylor-Wharton.
- Vortex Genie 2, Daigger.
- Lector de placas

6.6. Reactivos

- Na_2HPO_4 Sigma
- KH_2PO_4 Sigma
- Agua destilada estéril
- Na_2CO_3
- Na_2HCO_3
- Tween 20
- Leche en polvo descremada
- Anticuerpos marcados
 - con biotina: IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG total e IgM
- Streptavidina-peroxidasa
- OPD O-fenilendiamina
- PBS 1X
- Solución amortiguadora de carbonatos pH 9.6
- Solución de PBS + 0.05% Tween 20
- Solución amortiguadora de carbonatos adicionada con 3% de leche (solución de bloqueo)
- Streptavidina-peroxidasa (Sigma) diluida 1:2500 en PBS
- Solución amortiguadora de citratos pH 5
- Agua destilada estéril

7. Diseño experimental

Para evaluar el efecto de la prolactina sobre la síntesis de anticuerpos, se utilizaron ocho grupos de cinco ratones de la cepa C57Bl/6 cuatro grupos de machos y cuatro de hembras.

Cepa: C57Bl/6	Tratamiento	Estado
5 ratones ♀	Vehículo	No infectado
	MTC	infectado
5 ratones ♀	Vehículo	No infectado
	MTC	infectado
5 ratones ♂	Vehículo	No infectado
	MTC	infectado
5 ratones ♂	Vehículo	No infectado
	MTC	infectado

Tabla 2. Distribución de grupos de ratones.

Diariamente se les administraron 100 µL de metoclopramida a una concentración de 2 mg/mL vía subcutánea, durante 6 semanas, después se infectaron con 1×10^3 eritrocitos parasitados con *P. berghei* ANKA. Diariamente se registró el peso, la temperatura, las concentraciones de glucosa y hemoglobina, así como la parasitemia a partir del tercer día post infección. Los ratones se sacrificaron en el día 8 post infección.

7.1. Determinación de hemoglobina.

Diariamente se evaluó la concentración de hemoglobina se agregaron 498 µL de Drabkin en tubos Eppendorf y se adicionaron 2 µL de sangre de la cola del ratón,

se mezcló hasta obtener una solución homogénea, la concentración de la hemoglobina se evaluó por espectrofotometría a una longitud de 540nm, para calcular la concentración de hemoglobina, se utilizó una curva patrón de hemoglobina.

7.2. 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.

7.3. Determinación de temperatura.

A partir del día anterior a la infección y diariamente post infección, se registró la temperatura corporal con un termómetro infrarrojo. El registro se realizó a 5 cm del abdomen de los ratones.

7.4. Cuantificación de glucosa

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 obtenida.

7.5. Parasitemia

Se extrajo una gota de sangre de la cola de los ratones y se preparó un frotis sanguíneo, se fijó con metanol y se tiñó con Giemsa. La parasitemia se evaluó en un microscopio óptico, con el objetivo de inmersión. Se contaron los eritrocitos parasitados por campo con relación a los eritrocitos sanos.

7.6. Sacrificio

El octavo día post infección los ratones se sacrificaron, para obtener la sangre, de la cual se separó el suero para la técnica de ELISA.

7.7. Metodología de ELISA

1) Sensibilizar la placa de ELISA

- a) Se adicionaron 100 μ L de solución de antígeno de *Plasmodium berghei* ANKA a una concentración de 10 μ g/mL de proteína en cada pozo de la placa de ELISA.
- b) Se Incubó a 37°C durante 2 hrs o 4°C en refrigeración toda la noche.
- c) Se eliminó el líquido de la placa por inversión.
- d) Se lavaron los pozos de la placa con 100 μ L de solución PBS/Tween 0.05%, este procedimiento se repitió 5 veces.

2) Bloqueo de la placa de ELISA

- a) Se adicionaron 200 μ L de solución de bloqueo (leche descremada al 3% en solución amortiguadora de carbonatos pH = 9.6)
- b) Se incubó 2 hrs. a 37°C o durante toda la noche a 4°C.
- c) Se eliminó el líquido de la placa por inversión.
- d) Se lavaron los pozos de la placa 5 veces con 200 μ L de solución PBS/Tween 0.05%.

3) Adición de los sueros problema.

- a) Se adicionaron 100 μ L del suero problema diluido 1:20 en PBS/Tween 0.05% a cada pozo de la placa de ELISA

- b) Se incubó la placa durante 2 hrs. a 37°C o toda la noche a 4°C.
- c) Se eliminó el líquido de la placa por inversión.
- d) Se lavaron los pozos de la placa con 100 µL de solución PBS/Tween 0.05%, 5 veces.

4) Adición del anticuerpo comercial anti-isotipo marcado con biotina.

- a) Se diluyó el anticuerpo comercial en tubos Falcon estériles (PBS/Tween 0.05%/leche descremada) como se indica a continuación:

Anticuerpo	Dilución	PBS	Tween 20	Leche descremada
IgG1	1:1000	1X	0.05%	0.02%
IgG2a	1:750			
IgG2b	1:1000			
IgG3	1:2000			
IgG totales	1:3500			
IgM	1:7000			

- b) Se adicionaron 100 µL de la dilución de los anticuerpos anti-isotipo marcados con biotina a la placa de ELISA en todos los pozos.
- c) Se incubo por 1 hora a 37°C.
- d) Se eliminó el líquido de la placa por inversión.
- e) Se lavó la placa 5 veces con 100 µL de solución PBS/Tween 0.05% por pozo.

5) Adición del complejo streptavidina-peroxidasa

- a) Se agregaron 100 µL de streptavidina-peroxidasa (dilución 1:2500 en PBS /Tween 0.05%) a todos los pozos.
- b) Se protegió de la luz con papel aluminio.
- c) Se incubó por 1 hora a 37°C.
- d) Se eliminó el líquido de la placa por inversión.

e) Se lavaron 5 veces los pozos con 100 μ L de solución PBS/Tween 0.05%.

6) Desarrollo de color.

- a) Se agregaron 100 μ L de O-fenilendiamina a una concentración de 0.4 mg/mL (en amortiguador de citratos con 0.03% de peróxido de hidrógeno) a cada uno de los pozos.
- b) Se incubo durante 20 minutos protegido de la luz a temperatura ambiente para permitir la reacción enzimática y el desarrollo de color (Nota: el cromógeno es fotosensible).
- c) Se detuvo la reacción con 100 μ L de H_2SO_4 1M en cada pozo.
- d) Se leyó la absorbancia en un lector de ELISA o en un lector de placas a 450 y 630 nm.

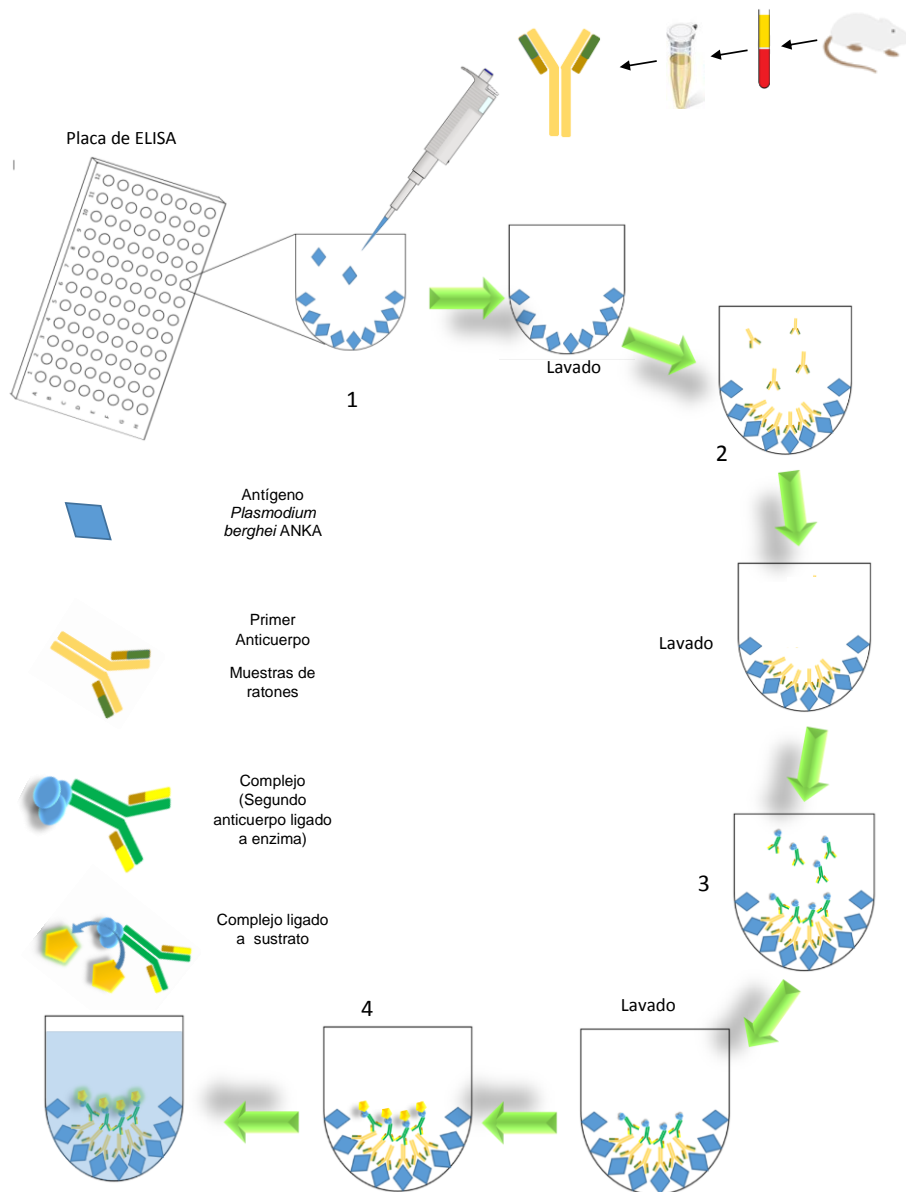


Figura 7. Esquema del desarrollo de la técnica de ELISA indirecta, modificado del Protocolo del manual de 8° Semestre Carrera de QFB, Laboratorio de Inmunología Clínica, de la FES ZARAGOZA.

8. Análisis estadístico

Se realizó ANOVA de dos vías para analizar los cambios en la parasitemia, el peso, la concentración de glucosa, la concentración de hemoglobina, la temperatura y los niveles de anticuerpos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG total e IgM, se usó una $P \leq 0.05$.

9. Resultados

9.1. Efecto de la prolactina sobre la parasitemia de ratones machos y hembras infectados con *P. berghei* ANKA

Los ratones hembras o machos tratados con MTC desarrollaron parasitemias menores que los tratados con el vehículo. Los machos tratados con MTC desarrollaron parasitemias significativamente menores que las hembras en la misma condición en el día 8 post infección (Figura 8).

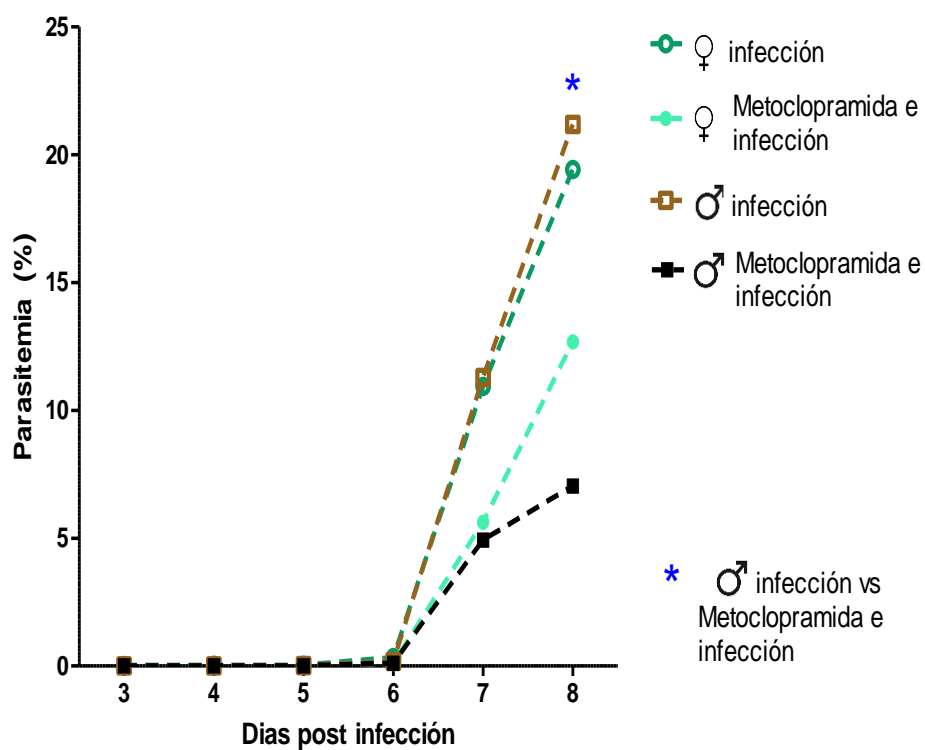


Figura 8. Efecto de la prolactina sobre la parasitemia en ratones infectados con *P. berghei* ANKA. Un grupo de machos y uno de hembras se trataron con MTC y a otros dos grupos de cada sexo se les administró vehículo, los cuatro grupos se infectaron con *P. berghei* ANKA. Cada punto representa la media geométrica de 5 ratones \pm el error estándar medio (SEM) y el * indica la diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) se utilizó ANOVA de dos vías.

9.2. Efecto de la prolactina sobre la concentración de glucosa en ratones machos y hembras

La infección en las hembras tratadas con vehículo disminuyó significativamente la concentración de glucosa los días 5 y 8 (Figura 9).

La administración de MTC en las hembras ya sea infectadas o no, disminuyó significativamente la concentración de glucosa únicamente los días 5 y 8 en comparación con las hembras tratadas con el vehículo (Figura 9).

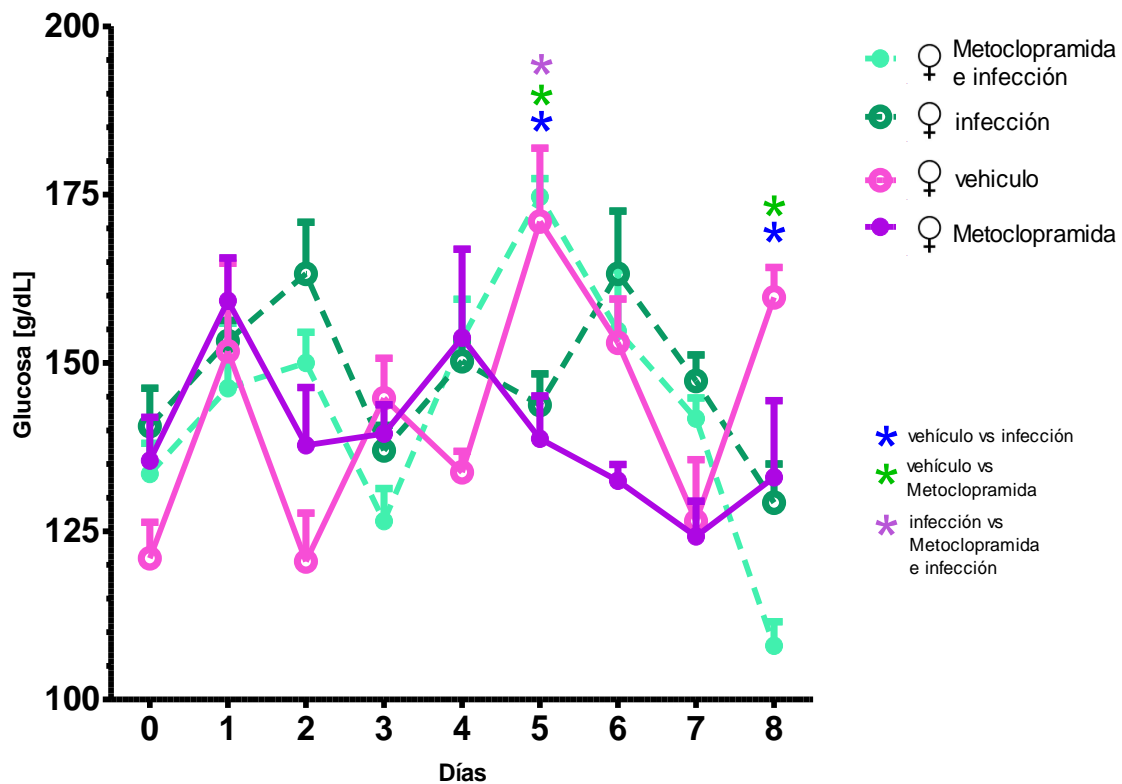


Figura 9. Efecto de la prolactina sobre la concentración de glucosa en ratones hembra. Dos lotes de hembras C57Bl/6 se trataron con: metoclopramida y dos con vehículo. Los grupos se subdividieron en dos subgrupos uno se infectó con *P. berghei* ANKA y el otro se dejó sin infectar como grupo control. * Señala la diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) se usó ANOVA de dos vías. Cada punto representa la media del grupo \pm el error estándar medio (SEM).

La infección en los machos tratados con vehículo disminuyó la concentración de glucosa en los días 1, 4 y 5 en comparación con los machos no infectados (Figura 10).

La administración de MTC en los machos no infectados no modificó significativamente la concentración de glucosa, en comparación con los machos tratados con vehículo; mientras que la MTC en los machos infectados disminuyó significativamente la concentración de glucosa los días 4, 6 y 8 en comparación con los machos infectados y tratados con el vehículo (Figura 10).

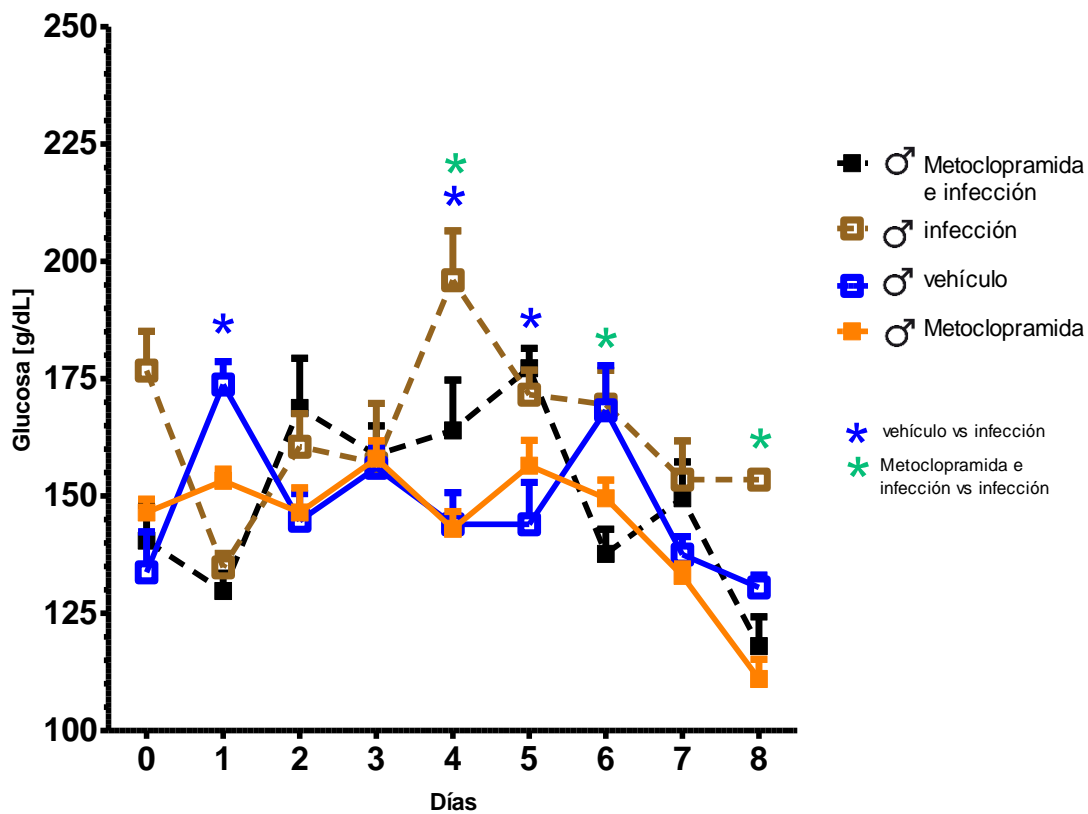


Figura 10. Efecto de la prolactina sobre la concentración de glucosa en ratones macho. Dos lotes de machos C57Bl/6 se trataron con: metoclopramida y dos con vehículo. Los grupos se subdividieron en dos subgrupos uno se infectó con *P. berghei* ANKA y el otro se dejó sin infectar como grupo control. * Señala la diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) se usó ANOVA de dos vías. Cada punto representa la media del grupo \pm el error estándar medio (SEM).

Para evaluar si la MTC induce modificaciones en glucemia en relación a los sexos, se compararon las concentraciones de glucosa en los ratones machos y hembras infectados y tratados con MTC. La MTC no generó una respuesta dimórfica en la glucemia, únicamente el día 3 detectamos un aumento significativo en la concentración de glucosa de los machos. (Figura 11).

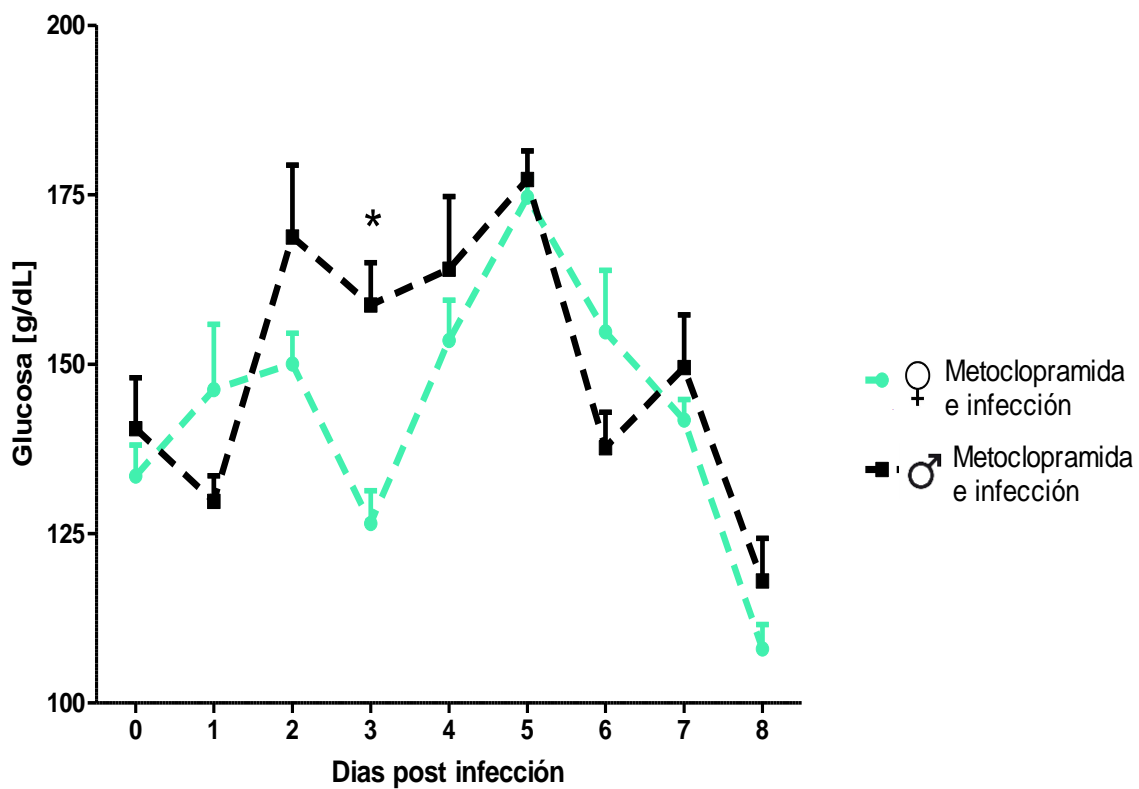


Figura 11. Efecto de la prolactina sobre la concentración de glucosa en ratones machos y hembras infectados con *P. berghei* ANKA. Dos grupos de ratones, machos y hembras se les administro metoclopramida e infecto con *P. berghei* ANKA. * Señala la diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) se usó ANOVA de dos vías. Cada punto representa la media del grupo \pm el error estándar medio (SEM).

9.3. Efecto de la prolactina sobre la concentración de hemoglobina en ratones machos y hembras

La infección no modificó significativamente la concentración de hemoglobina en las hembras (Figura 12). La administración de MTC en las hembras ya sea infectadas o no, aumentó significativamente la concentración de hemoglobina los días 6 y 7 en comparación con las hembras tratadas con el vehículo (Figura 12).

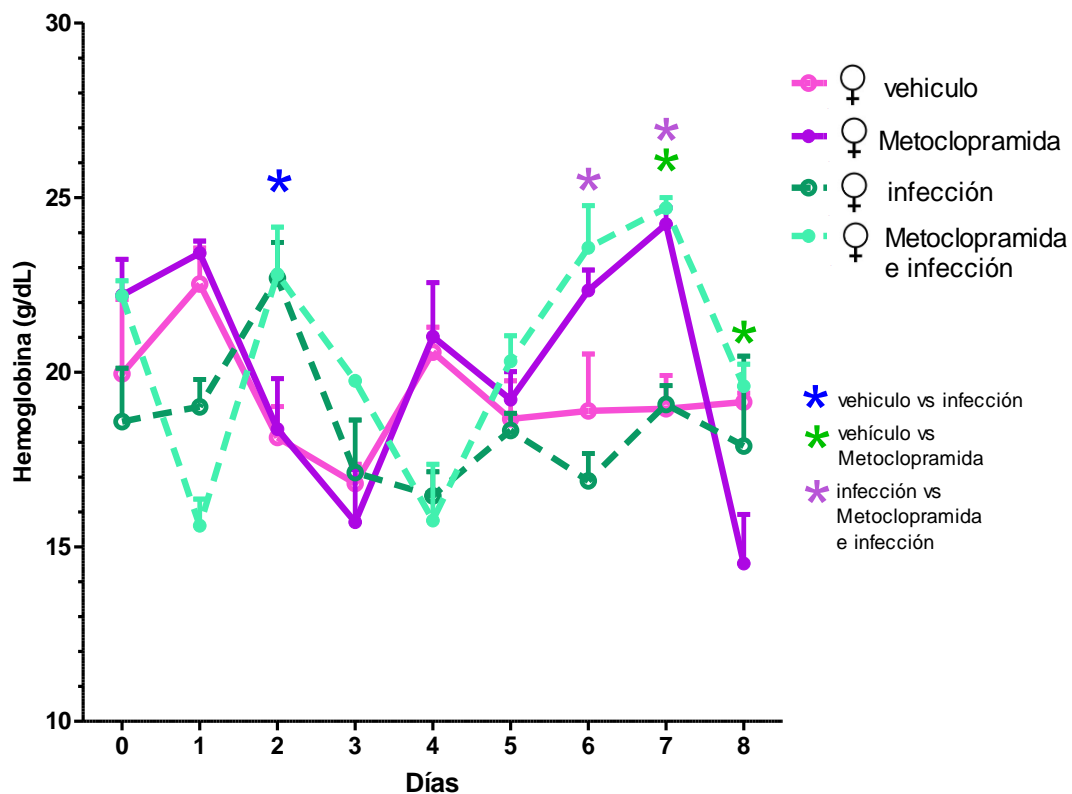


Figura 12. Efecto de la prolactina sobre la concentración de hemoglobina en ratones hembra. Dos lotes de hembras C57Bl/6 se trataron con: metoclopramida y dos con vehículo. Los grupos se subdividieron en dos subgrupos uno se infectó con *P. berghei* ANKA y el otro se dejó sin infectar como grupo control. * Señala la diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) se usó ANOVA de dos vías. Cada punto representa la media del grupo \pm el error estándar medio (SEM).

La administración de MTC en los machos no infectados aumentó significativamente la concentración de hemoglobina los días 2, 6 y 7, en comparación con los machos no infectados tratados con vehículo. La administración de MTC en los machos infectados aumentó significativamente la concentración de hemoglobina los días 1 y 8 post infección en comparación con los machos infectados (Figura 13).

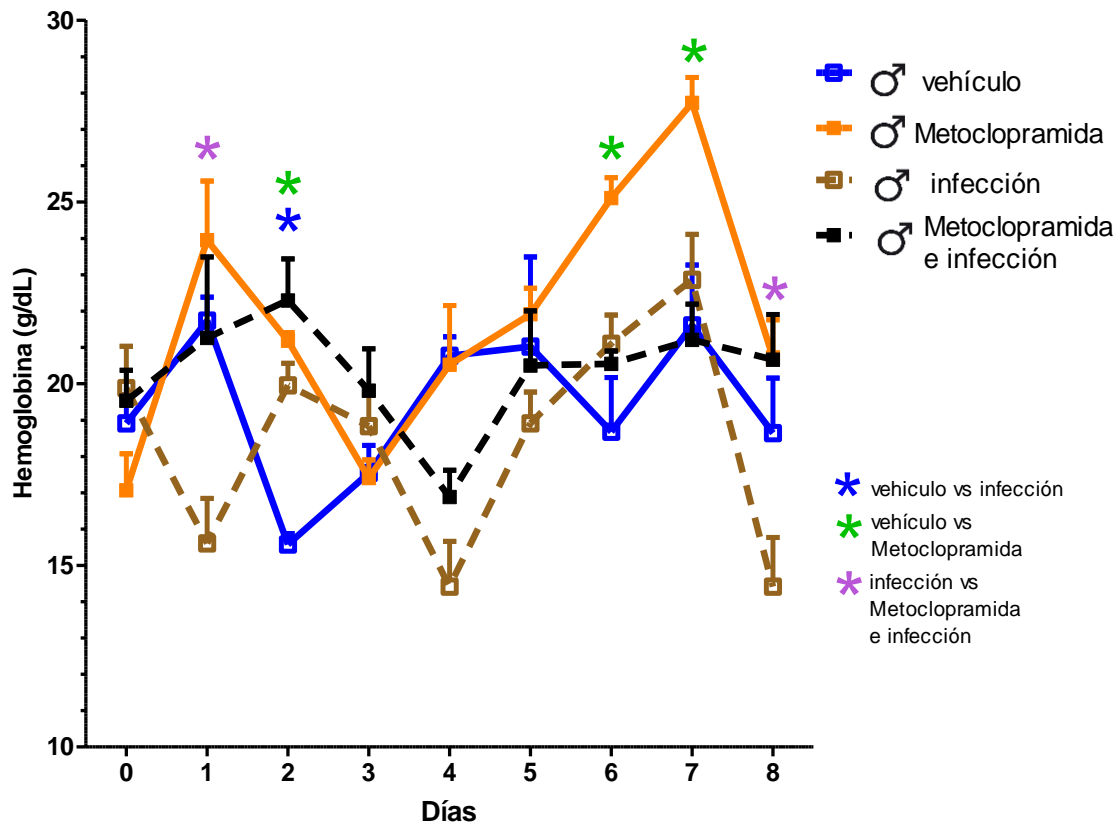


Figura 13. Efecto de la prolactina sobre la concentración de hemoglobina en ratones macho. Dos lotes de machos C57Bl/6 se trataron con: metoclopramida y dos con vehículo. Los grupos se subdividieron en dos subgrupos uno se infectó con *P. berghei* ANKA y el otro se dejó sin infectar como grupo control. * Señala la diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) se usó ANOVA de dos vías. Cada punto representa la media del grupo \pm el error estándar medio (SEM).

Para evaluar si la prolactina afecta la concentración de hemoglobina de forma diferente entre los sexos se comparó la concentración de hemoglobina en machos

y hembras tratadas con MTC, los ratones machos no infectados desarrollaron concentraciones más altas de hemoglobina que las hembras no infectadas aunque solo se detectó diferencia significativa en el día 8. Los ratones infectados y tratados con MTC, únicamente el día 1 aumentó significativamente la concentración de hemoglobina en los machos en comparación con las hembras infectadas y tratadas con MTC (Figura 14).

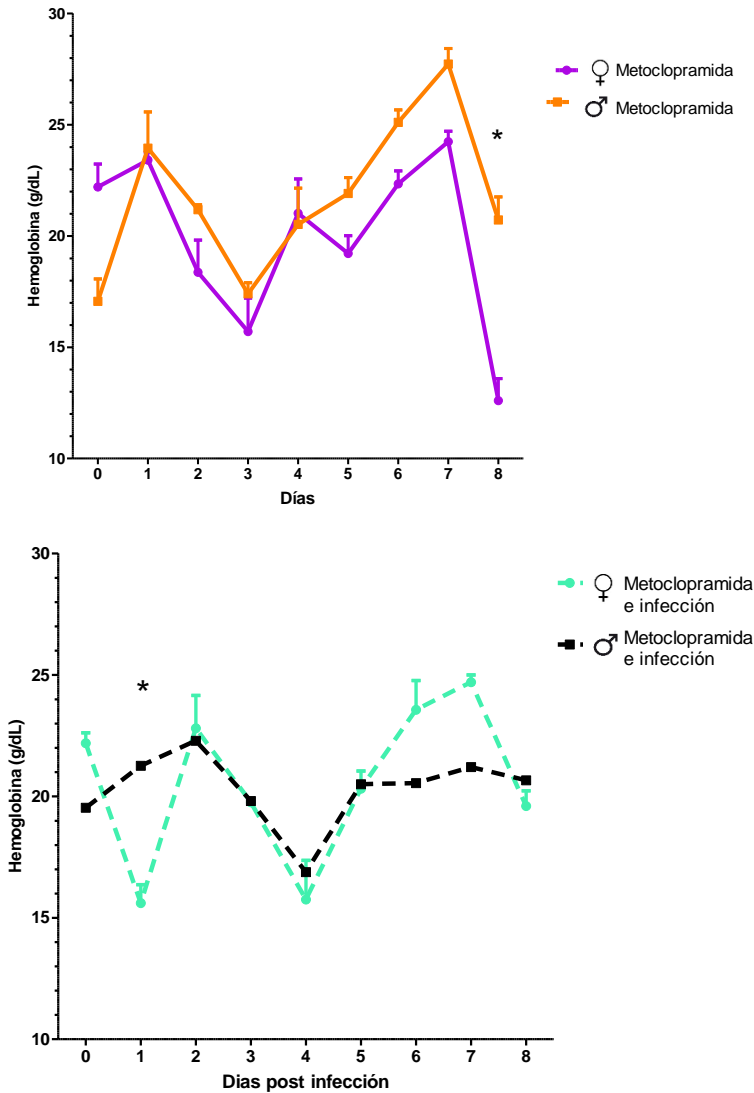


Figura 14. Efecto de la prolactina sobre la concentración de hemoglobina en ratones machos y hembras infectados con *P. berghei* ANKA. Dos lotes de hembras y de machos C57Bl/6 se trataron con: metoclopramida y dos con vehículo. Los grupos se subdividieron en dos subgrupos uno se infectó con *P. berghei* ANKA y el otro se dejó sin infectar como grupo control. * Señala la diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) se usó ANOVA de dos vías. Cada punto representa la media del grupo \pm el error estándar medio (SEM).

9.4. Efecto de la prolactina sobre el peso de ratones machos y hembras

La infección disminuyó significativamente el peso corporal el día 1 en las hembras (Figura 15). La administración de MTC en las hembras aumento significativamente el peso corporal en comparación con las hembras que recibieron vehículo, las hembras infectadas y tratadas con MTC no modificaron el peso corporal en comparación a las hembras infectadas que recibieron vehículo (Figura 15).

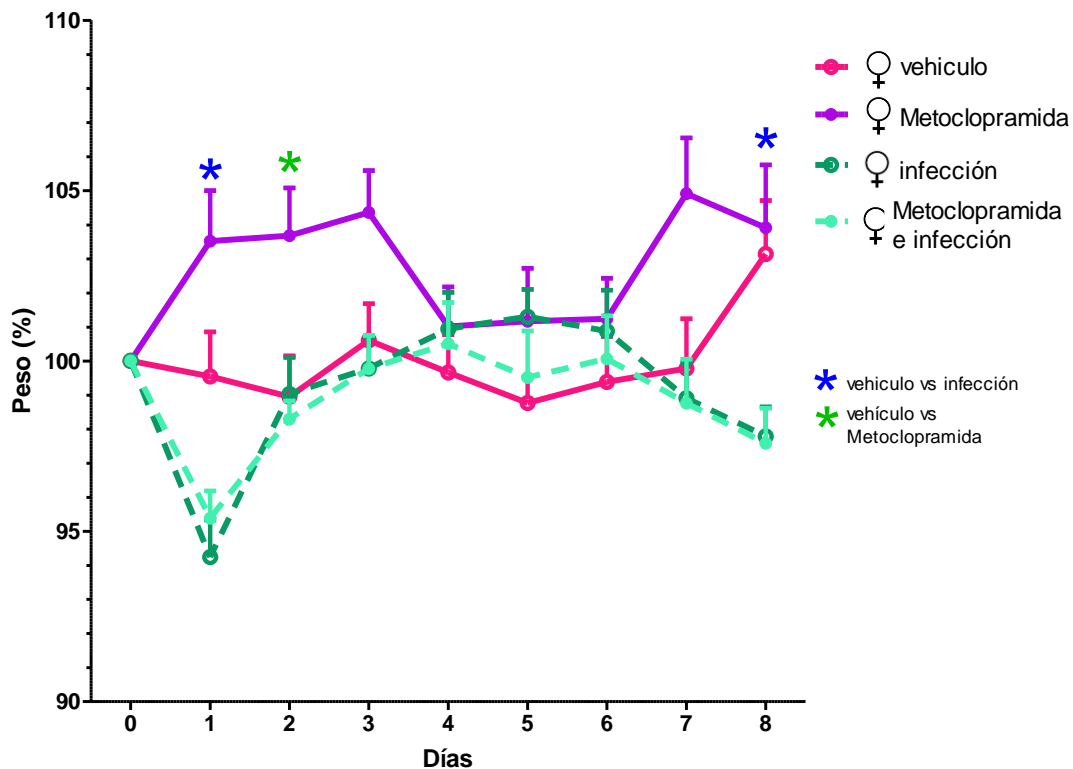


Figura 15. Efecto de la prolactina sobre el peso corporal en ratones hembra. Dos lotes de hembras C57Bl/6 se trataron con: metoclopramida y dos con vehículo. Los grupos se subdividieron en dos subgrupos uno se infectó con *P. berghei* ANKA y el otro se dejó sin infectar como grupo control. Se consideró el 100% del peso el día en que se infectó. * Señala la diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) se usó ANOVA de dos vías. Cada punto representa la media del grupo \pm el error estándar medio (SEM).

La infección disminuyó significativamente el peso corporal el día 1 en los machos (Figura 16). La administración de MTC en los machos no infectados disminuyó significativamente el peso corporal, en comparación con los machos tratados con vehículo. Mientras que en los ratones machos infectados y tratados con MTC el peso corporal aumento significativamente el día 7, en comparación con los machos infectados y tratados con el vehículo (Figura 16).

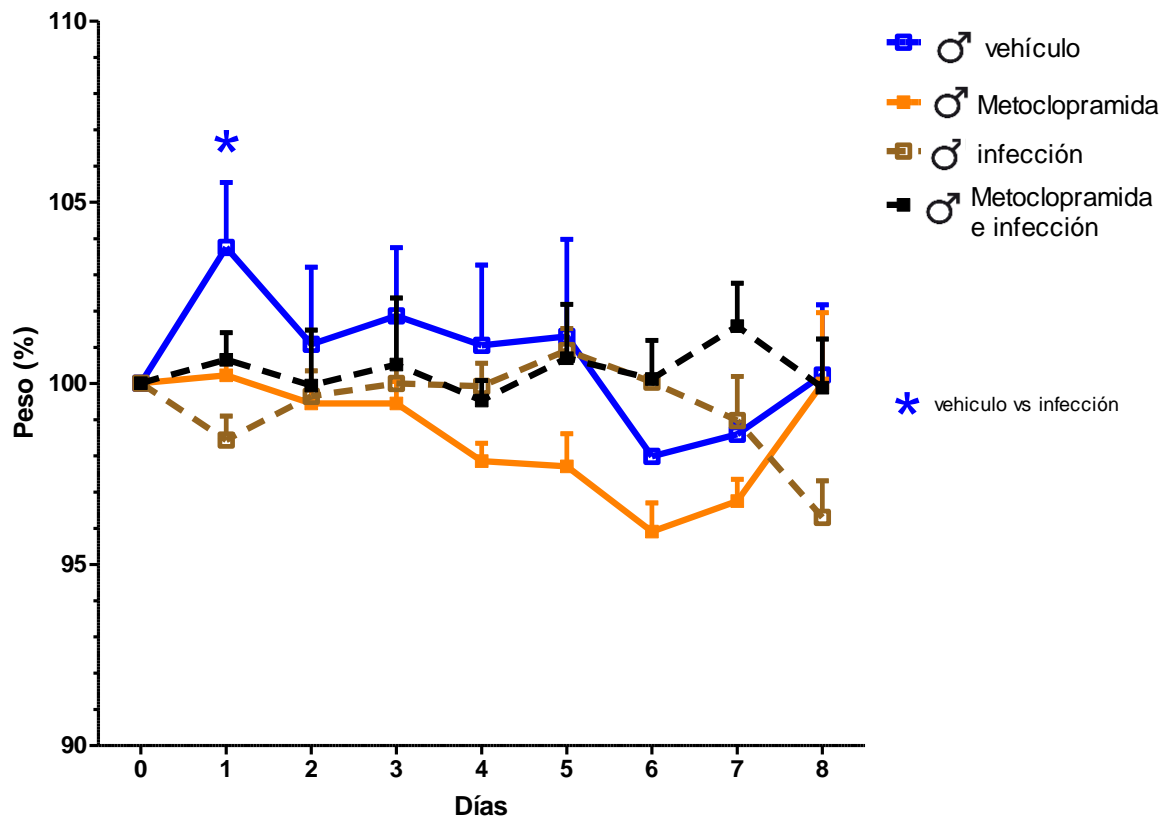


Figura 16. Efecto de la prolactina sobre el peso corporal en ratones macho. Dos lotes de machos C57Bl/6 se trataron con: metoclopramida y dos con vehículo. Los grupos se subdividieron en dos subgrupos uno se infectó con *P. berghei* ANKA y el otro se dejó sin infectar como grupo control. Se consideró el 100% del peso el día en que se infectó. * Señala la diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) se usó ANOVA de dos vías. Cada punto representa la media del grupo \pm el error estándar medio (SEM).

Para evaluar si la prolactina induce un efecto dimórfico en el peso corporal comparamos los grupos de machos y hembras tratados con MTC sin infección, las hembras aumentaron significativamente su peso corporal únicamente los días, 3, 6 y 7, en comparación con los machos tratados con MTC. Mientras que los ratones infectados y tratados con MTC no presentaron diferencias significativas en el peso excepto el día 1 en el que las hembras tuvieron menor peso que los machos (Figura 17).

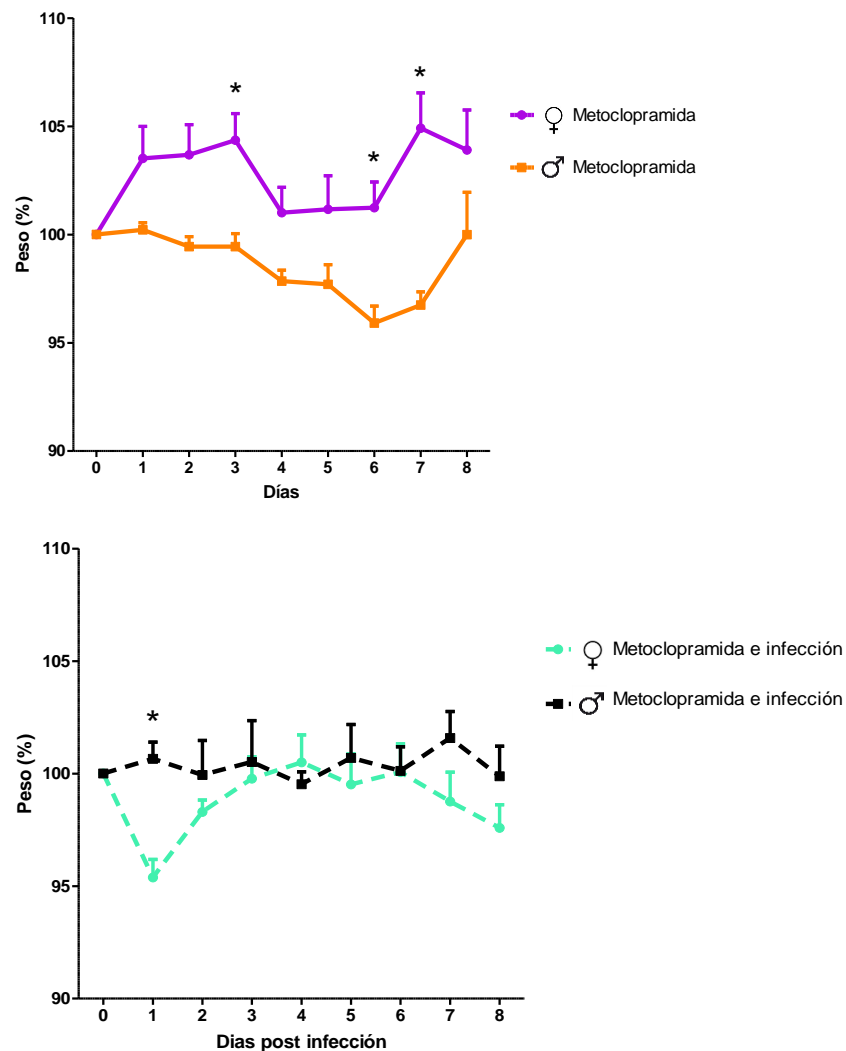


Figura 17. Efecto de la prolactina sobre el peso corporal en ratones machos y hembras. Dos lotes de machos y hembras C57Bl/6 se trataron con: metoclopramida y dos con vehículo. Los grupos se subdividieron en dos subgrupos uno se infectó con *P. berghei* ANKA y el otro se dejó sin infectar como grupo control. Se consideró el 100% del peso el día en que se infectó. * Señala la diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) se usó ANOVA de dos vías. Cada punto representa la media del grupo \pm el error estándar medio (SEM).

9.5. Efecto de la prolactina sobre la temperatura de ratones machos y hembras

La administración de MTC en las hembras disminuyó significativamente la temperatura corporal únicamente el día 8, en comparación con las hembras tratadas con el vehículo. Las hembras infectadas y tratadas con MTC no modificaron su temperatura corporal en comparación con las hembras infectadas tratadas con el vehículo (Figura 18).

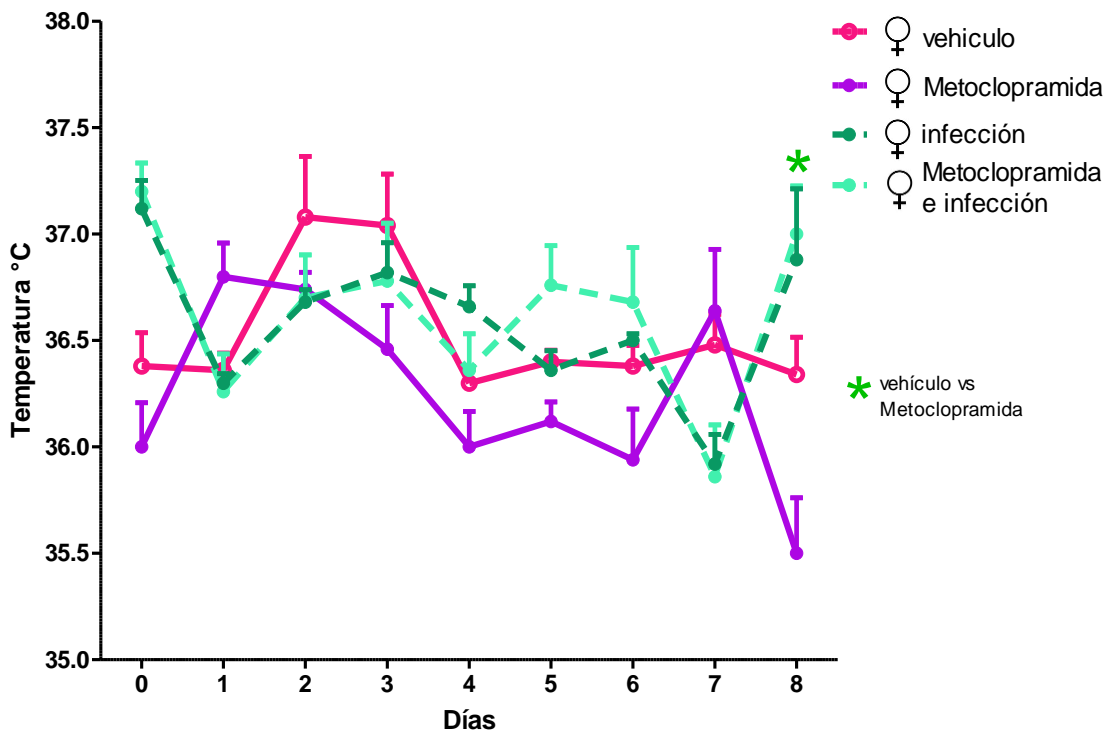


Figura 18. Efecto de la prolactina sobre la temperatura en ratones hembra. Dos lotes de hembras C57Bl/6 se trataron con: metoclopramida y dos con vehículo. Los grupos se subdividieron en dos subgrupos uno se infectó con *P. berghei* ANKA y el otro se dejó sin infectar como grupo control. * Señala la diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) se usó ANOVA de dos vías. Cada punto representa la media del grupo \pm el error estándar medio (SEM).

La administración de MTC en los machos ya sea infectados o no aumento la temperatura corporal, en comparación con los machos tratados con vehículo, (Figura 19).

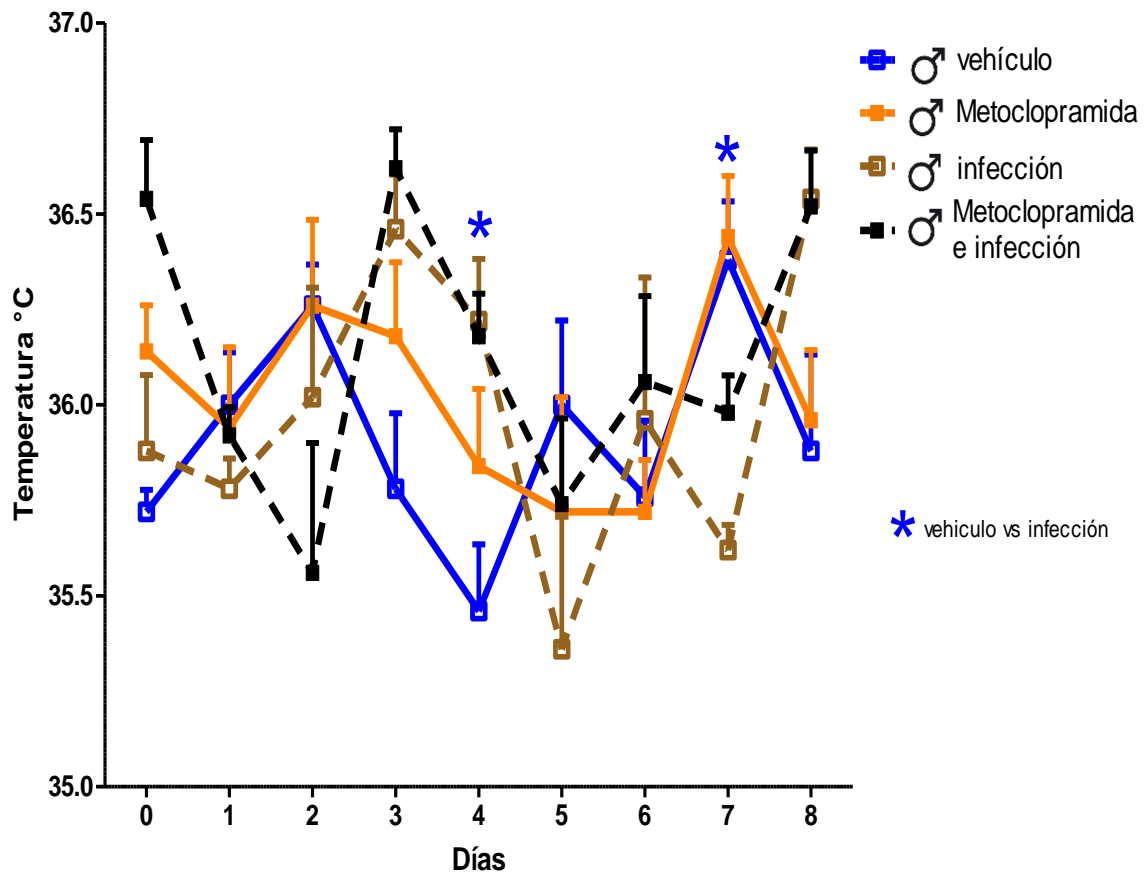


Figura 19. Efecto de la prolactina sobre la temperatura en ratones macho. Dos lotes de machos C57Bl/6 se trataron con: metoclopramida y dos con vehículo. Los grupos se subdividieron en dos subgrupos uno se infectó con *P. berghei* ANKA y el otro se dejó sin infectar como grupo control. * Señala la diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) se usó ANOVA de dos vías. Cada punto representa la media del grupo \pm el error estándar medio (SEM).

Para evaluar si la prolactina ejerce un efecto dimórfico en la temperatura se compararon las gráficas de machos y hembras tratados con MTC, las hembras aumentaron significativamente su temperatura corporal únicamente el día 1, en comparación con los machos. Mientras que las hembras infectadas y tratadas con MTC presentaron temperaturas significativamente altas los días 2 y 5 en comparación con los machos (Figura 20).

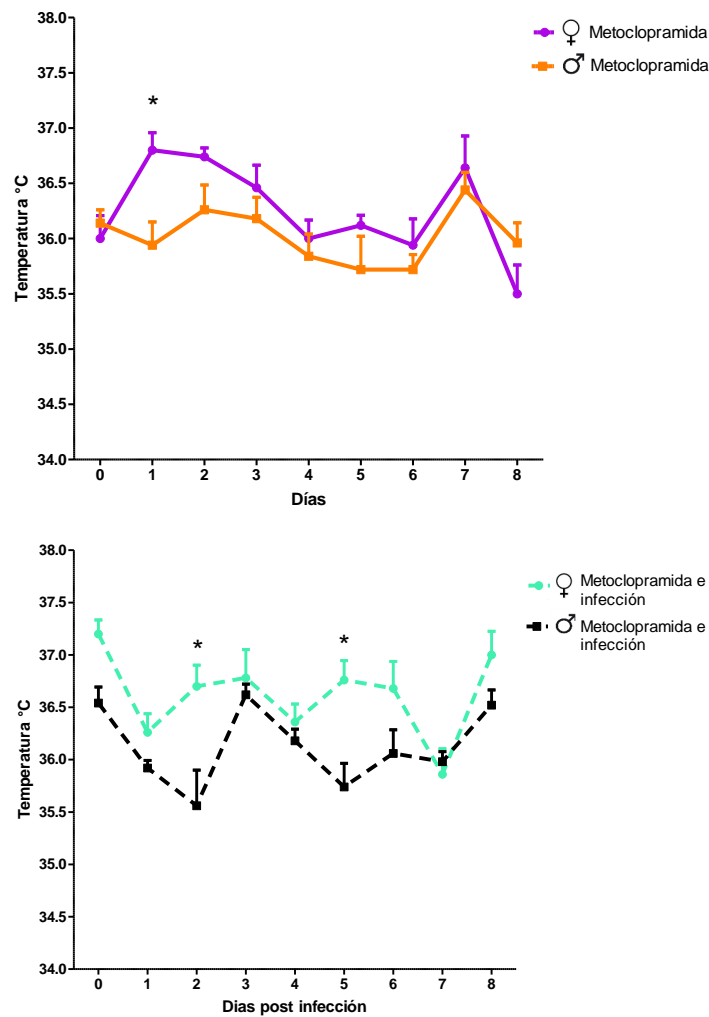


Figura 20. Efecto de la prolactina sobre la temperatura en ratones machos y hembras. Dos lotes de machos y hembras C57Bl/6 se trataron con: metoclopramida y dos con vehículo. Los grupos se subdividieron en dos subgrupos uno se infectó con *P. berghei* ANKA y el otro se dejó sin infectar como grupo control. * Señala la diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) se usó ANOVA de dos vías. Cada punto representa la media del grupo \pm el error estándar medio (SEM).

9.6. Efecto de la prolactina sobre la concentración de anticuerpos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG total, IgM de ratones machos y hembras

La infección no modificó significativamente la concentración de IgG1 e IgG2a, pero se detectó una tendencia de aumento en las hembras en comparación con los machos. Las hembras infectadas y tratadas con MTC aumentaron significativamente las concentraciones de IgG1 e IgG2a en comparación con los machos infectados y tratados con MTC (Figura 21).

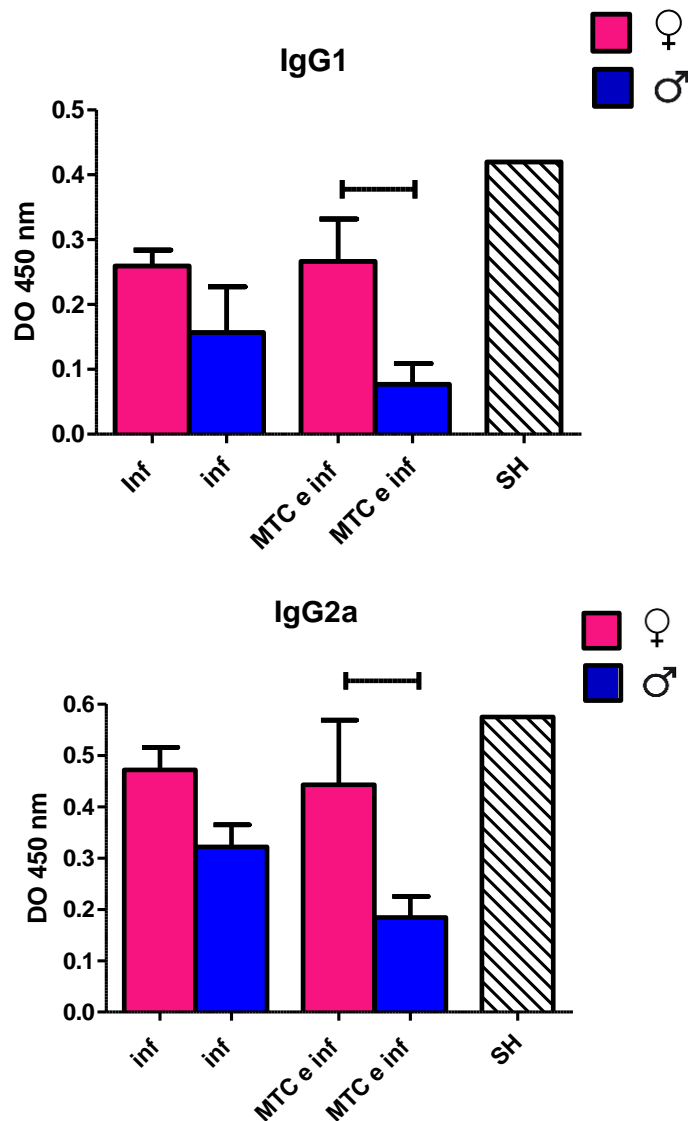


Figura 21. Efecto de la prolactina sobre la concentración de anticuerpos IgG1 e IgG2a en ratones machos y hembras infectados con *P. berghei* ANKA. Dos lotes de machos y de hembras C57Bl/6 se trataron con: metoclopramida e infecto y dos con vehículo e infectó con *P. berghei* ANKA. ← Señala la diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) se usó ANOVA de dos vías. Cada barra representa la media del grupo \pm el error estándar medio (SEM).

La infección aumento significativamente la concentración de IgG2b e IgG3 en hembras en comparación con los machos. Los ratones hembras infectadas y tratadas con MTC aumentaron las concentraciones de IgG2b e IgG3 en comparación con los machos (Figura 22).

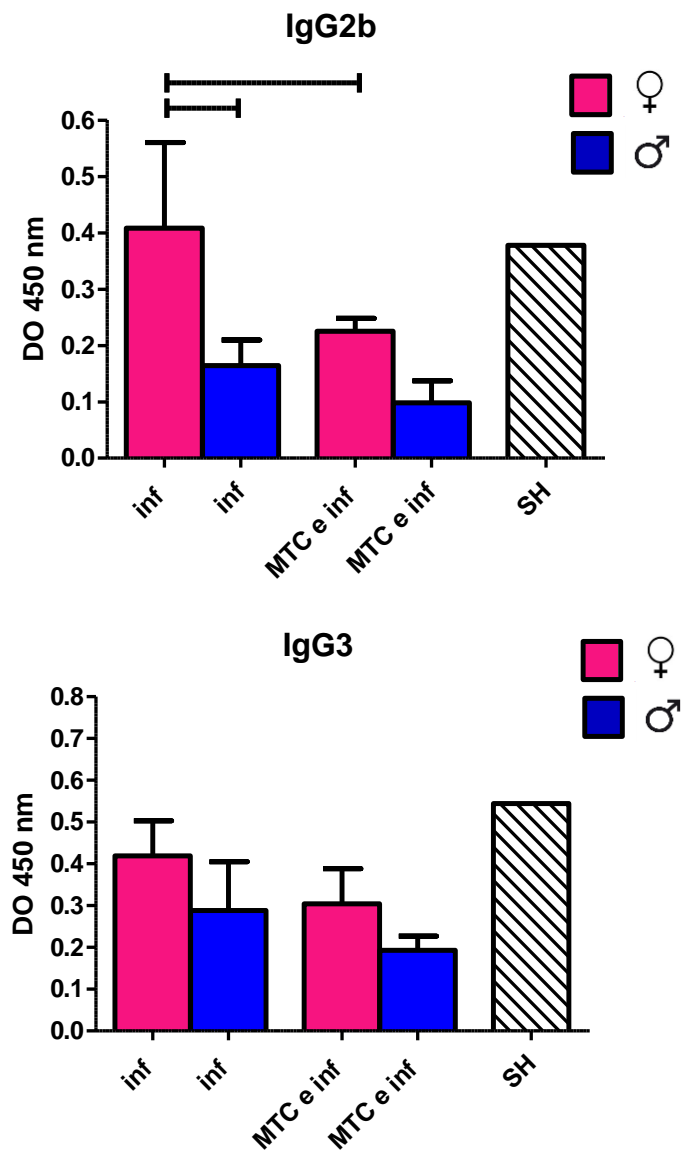


Figura 22. Efecto de la prolactina sobre la concentración de anticuerpos IgG2b e IgG3 en ratones machos y hembras infectados con *P. berghei* ANKA. Dos lotes de machos y de hembras C57Bl/6 se trataron con: metoclopramida e infecto y dos con vehículo e infecto con *P. berghei* ANKA. ← Señala la diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) se usó ANOVA de dos vías. Cada barra representa la media del grupo \pm el error estándar medio (SEM).

La infección no modificó significativamente la concentración de IgG total de machos y hembras. Respecto a la concentración de IgM se detectó tendencia a aumentar en machos en comparación a las hembras. La administración de MTC aumento significativamente las concentraciones de IgG total e IgM en hembras en comparación con los machos (Figura 23).

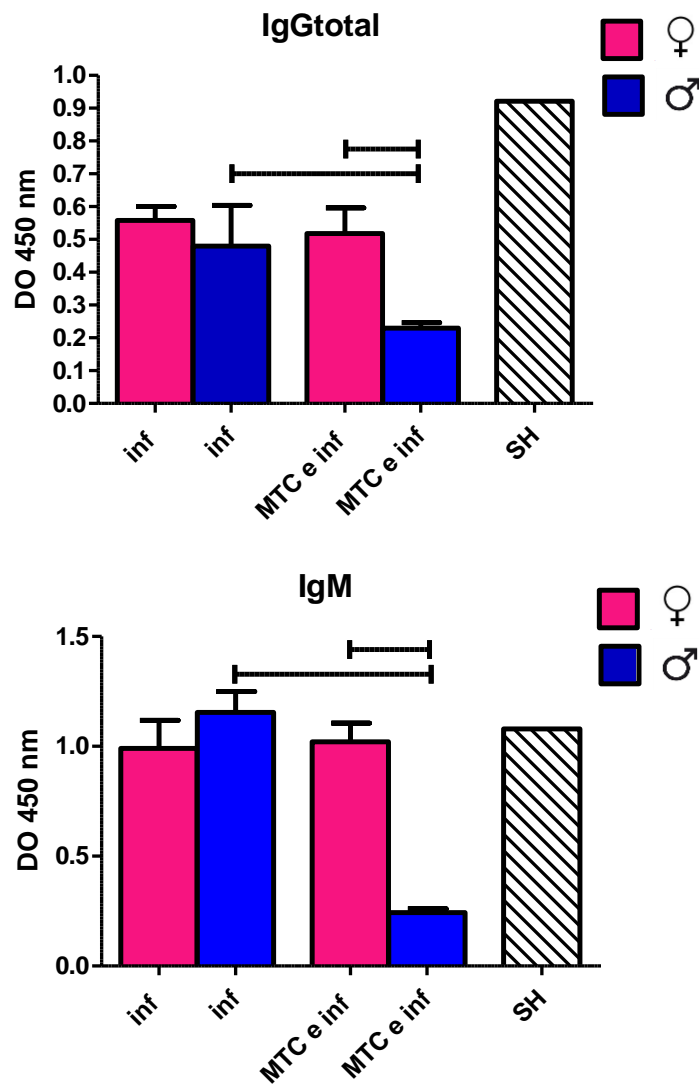


Figura 23. Efecto de la prolactina sobre la concentración de anticuerpos IgG total e IgM en ratones machos y hembras infectados con *P. berghei* ANKA. Dos lotes de machos y de hembras C57Bl/6 se trataron con: metoclopramida e infecto y dos grupos con vehículo, un grupo se infectó con *P. berghei* ANKA. — Señala la diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) se usó ANOVA de dos vías. Cada barra representa la media del grupo \pm el error estándar medio (SEM).

10. Análisis de resultados

10.1. Efecto de la prolactina sobre la parasitemia de ratones machos y hembras C57BL/6 infectados con *P. berghei* ANKA

La parasitemia refleja la intensidad de la infección, por lo que una mayor parasitemia corresponde a mayor severidad en la patología (10), en los grupos de ratones infectados y tratados con MTC disminuyó la parasitemia (Figura 8), esto podría deberse a la acción inmunoreguladora de la prolactina, al aumentar la concentración de esta hormona promueve la proliferación de linfocitos B, lo que podría facilitar la eliminación del parásito en machos en comparación con las hembras, vía participación de anticuerpos (44). Es probable que la prolactina tenga actividad diferente dependiendo del parásito, o bien que la actividad de la prolactina sobre la parasitemia intervengan otros mecanismos distintos a los que se abordaron en este trabajo.

10.2. Efecto de la prolactina sobre la concentración de glucosa en ratones machos y hembras C57BL/6

En los individuos que sufren malaria se desarrolla hipoglucemia debido al consumo de glucosa por el parásito (12). En este trabajo detectamos que los grupos de machos y hembras, infectados y tratados con metoclopramida disminuyeron significativamente la concentración de glucosa los días 5 y 8 en comparación con los ratones infectados (Figura 11). Interesantemente, se ha reportado que el aumento de la prolactina disminuye el transportador de glucosa 4 (GLUT4), que causa disminución en la captación de glucosa (38, 39) por lo tanto un aumento en la concentración de glucosa, es probable que la prolactina tenga una actividad diferente dependiendo de la especie y del parásito, por lo tanto la disminución en la concentración glucosa, se deba a mecanismos distintos a los que se abordaron en este trabajo.

10.3. Efecto de la prolactina sobre la concentración de hemoglobina en ratones machos y hembras C57BL/6

La anemia en malaria se debe principalmente a la destrucción acelerada de eritrocitos y a una eritropoyesis poco eficiente (12). En este trabajo determinamos la concentración de hemoglobina como una medida indirecta de la anemia. Los ratones infectados y tratados con MTC aumentaron la concentración de hemoglobina en comparación a los ratones infectados, (Figuras 12 y 13), una probable explicación es que la menor parasitemia en esos ratones ocasionó menor destrucción de eritrocitos, o la participación de la prolactina este regulando la eritropoyesis (41), o bien, se ha reportado que la metahemoglobinemia inducida por la metoclopramida, tenga actividad sobre el aumento de la concentración de hemoglobina, la cual se refiere a una condición en la que el hierro de la hemoglobina se oxida de Fe^{2+} a Fe^{3+} , lo que altera la capacidad de captación de carga del oxígeno y dióxido de carbono (54). Interesantemente la MTC evita que disminuya la hemoglobina en ambos sexos.

10.4. Efecto de la prolactina sobre el peso de ratones machos y hembras C57BL/6

Respecto al peso corporal en malaria la caquexia es un marcador de la severidad de la enfermedad que se caracteriza por debilitamiento del organismo la pérdida de peso corporal puede ser consecuencia de la reducción en la ingesta de alimento (55, 56). En los grupos control de infección, tanto ratones machos y hembras disminuyeron su peso corporal esto corrobora lo descrito en la literatura (12). Las hembras tratadas con MTC aumentaron su peso corporal en comparación a los machos tratados con MTC (Figuras 15 y 16), esto podría deberse a que el aumento de la prolactina altera el estado metabólico, por lo tanto esto produce un aumento de peso corporal y adiposidad (37).

Las hembras tratadas con metoclopramida e infectadas con *P. berghei* ANKA el día 1 post infección disminuyeron su peso corporal y mostraron tendencia a la baja a partir del día 6, mientras que los machos estabilizaron su peso corporal (Figura 17). Probablemente la prolactina suprime el almacenamiento de lípidos, así como la liberación de adipocinas tales como adiponectina y posiblemente leptina que son moléculas directamente asociadas con la regulación del peso corporal (37).

10.5. Efecto de la prolactina sobre la temperatura de ratones machos y hembras C57BL/6

La temperatura corporal es una variable que se afecta en los individuos que sufren malaria, en humanos se presentan fiebres intermitentes, mientras que en los ratones se manifiesta hipotermia (11). Se ha reportado que el aumento de prolactina se relaciona con la temperatura en una respuesta de termorregulación (42). Esto indica que la elevación de la prolactina generaría una respuesta aclimatadora ante el estrés térmico (42). En este trabajo se detectó que las hembras infectadas con *P. berghei* ANKA tratadas con metoclopramida desarrollaron temperaturas más altas en comparación con los machos (Figura 20). Los incrementos o disminuciones en la temperatura podrían deberse a que la infección con el *Plasmodium* induce fiebre y al tratar de regresar al equilibrio térmico, se inducen mecanismos reguladores como la sudoración que disminuye la temperatura y la prolactina circulante podría regular el control de consumo de agua, para la disipación del aumento de temperatura, ya que se ha demostrado que la prolactina aumenta la absorción de líquidos que garantizan un suministro de líquidos adecuado al compartimiento vascular (42).

10.6. Efecto de la prolactina sobre los niveles de anticuerpos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG total, IgM de ratones machos y hembras C57BL/6

El usar un modelo experimental de malaria cerebral permite analizar la respuesta humoral específica importante en el control del desarrollo asexual del *Plasmodium*. Evaluar la concentración de los anticuerpos es importante ya que inhiben la proliferación del parásito en la sangre (31). En este trabajo se detectó que los ratones de ambos sexos infectados y tratados con MTC, disminuyó la concentración de anticuerpos IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG1 e IgM en comparación a los ratones infectados y tratados con el vehículo (Figura 21, 22). Interesantemente, aumentar la concentración de prolactina con el tratamiento de metoclopramida en ratones de ambos sexos, disminuyó la concentración de los anticuerpos ligeramente en hembras y significativamente en ratones machos, este hallazgo podría deberse a los mecanismos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y citotoxicidad dependiente del complemento (23) contra el parásito *Plasmodium* y por lo tanto favorece la disminución de la parasitemia en ratones machos, además de los anticuerpos existen otros mecanismos involucrados en la eliminación del *Plasmodium*, como el estrés oxidativo.

11. Conclusiones

La prolactina modifico la parasitemia, la concentración de glucosa, la concentración de hemoglobina, el peso corporal, la temperatura corporal y la concentración de anticuerpos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG total, IgM durante la infección con *Plasmodium berghei* ANKA. La prolactina disminuyó la parasitemia en los machos en comparación con las hembras. La concentración de glucosa disminuyó y la concentración de hemoglobina aumentó en ambos sexos. La prolactina evito la disminución de peso corporal en los machos en comparación a las hembras y aumentó la temperatura corporal de las hembras en comparación a los ratones machos. La prolactina disminuyo la concentración de anticuerpos en la infección contra *Plasmodium berghei* ANKA, pero está fuertemente implicada en el dimorfismo sexual que se presenta en la malaria. Es evidente que los mecanismos involucrados en la regulación de la respuesta inmune humoral son complejos y la hormona prolactina es solo una variable involucrada en la modulación de la respuesta inmune.

12. Perspectivas

Con el fin de realizar un análisis más complejo es necesario determinar las diferentes citocinas pro y anti-inflamatorias, para generar un perfil de repuesta inmune en malaria. Por otra parte, este trabajo contribuye a entender el efecto de la prolactina sobre la malaria, ya que a pesar de su relevancia en la respuesta inmune no se conocen con precisión los mecanismos por los cuales regule enfermedades infecciosas en particular a la malaria.

13. Referencias

1. Organization WH. Malaria 2016 [cited 2017 Paludismo]. Available from: <http://www.who.int/malaria/es/>.
2. Legorreta-Herrera M, Mosqueda-Romo NA, Nava-Castro KE, Morales-Rodriguez AL, Buendia-Gonzalez FO, Morales-Montor J. Sex hormones modulate the immune response to Plasmodium berghei ANKA in CBA/Ca mice. *Parasitology research*. 2015;114(7):2659-69.
3. Romero Cabello RRR. Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias 2007.
4. Stevenson MM, Riley EM. Innate immunity to malaria. *Nature reviews Immunology*. 2004;4(3):169-80.
5. Greenwood BM, Fidock DA, Kyle DE, Kappe SH, Alonso PL, Collins FH, et al. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(4):1266-76.
6. Chester P, Rodney B, Jung C, Wayne E. *Parasitología Clínica de Craig Faust*. 3ª. Edición revisada. 2003.
7. Michalakis Y, Renaud F. Malaria: Evolution in vector control. *Nature*. 2009;462(7271):298-300.
8. Steel RW, Kappe SH, Sack BK. An expanding toolkit for preclinical pre-erythrocytic malaria vaccine development: bridging traditional mouse malaria models and human trials. *Future microbiology*. 2016.
9. Huang BW, Pearman E, Kim CC. Mouse Models of Uncomplicated and Fatal Malaria. *Bio-protocol*. 2015;5(13):e1514.
10. Hearn J, Rayment N, Landon DN, Katz DR, de Souza JB. Immunopathology of cerebral malaria: morphological evidence of parasite sequestration in murine brain microvasculature. *Infection and immunity*. 2000;68(9):5364-76.
11. Mendiola BJ. Modelos animales para la malaria cerebral y su aplicabilidad para la investigación de nuevos fármacos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. 2012;33(2):189-97.
12. Gramaglia I, Sahlin H, Nolan JP, Frangos JA, Intaglietta M, van der Heyde HC. Cell- Rather Than Antibody-Mediated Immunity Leads to the Development of

Profound Thrombocytopenia during Experimental *Plasmodium berghei* Malaria. *The Journal of Immunology*. 2005;175(11):7699-707.

13. Soder O. Sexual dimorphism of gonadal development. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2007;21(3):381-91.

14. De León-Nava MA, Morales-Montor J. Dimorfismo sexual inmunitario: ¿pueden los esteroides sexuales polarizar el perfil de citocinas Th1/Th2? *Revista de investigación clínica*. 2006;58:161-9.

15. Perlmann P, Troye-Blomberg M. Malaria blood-stage infection and its control by the immune system. *Folia biologica*. 2000;46(6):210-8.

16. Engwerda CR, Good MF. Interactions between malaria parasites and the host immune system. *Current opinion in immunology*. 2005;17(4):381-7.

17. de Kossodo S, Grau GE. Role of cytokines and adhesion molecules in malaria immunopathology. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 1993;11(1):41-8.

18. Doll KL, Pewe LL, Kurup SP, Harty JT. Discriminating Protective from Nonprotective Plasmodium-Specific CD8+ T Cell Responses. *J Immunol*. 2016;196(10):4253-62.

19. Gomes PS, Bhardwaj J, Rivera-Correa J, Freire-De-Lima CG, Morrot A. Immune Escape Strategies of Malaria Parasites. *Frontiers in microbiology*. 2016;7:1617.

20. Wipasa J, Elliott S, Xu H, Good MF. Immunity to asexual blood stage malaria and vaccine approaches. *Immunol Cell Biol*. 2002;80(5):401-14.

21. Hunt NH, Grau GE. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends in immunology*. 2003;24(9):491-9.

22. Taylor-Robinson AW. Regulation of immunity to Plasmodium: implications from mouse models for blood stage malaria vaccine design. *Experimental parasitology*. 2010;126(3):406-14.

23. Barfod L, Dalgaard MB, Pleman ST, Ofori MF, Pleass RJ, Hviid L. Evasion of immunity to Plasmodium falciparum malaria by IgM masking of protective IgG epitopes in infected erythrocyte surface-exposed PfEMP1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(30):12485-90.

24. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, Kuby J. Immunology: W.H. Freeman; 2007.
25. Czajkowsky DM, Salanti A, Ditlev SB, Shao Z, Ghumra A, Rowe JA, et al. IgM, Fc μ -receptors and malarial immune evasion. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2010;184(9):4597-603.
26. Álvarez-Vallina L. Anticuerpos monoclonales: realidades y perspectivas: Editorial Complutense, S.A.; 2004.
27. Yoneto T, Waki S, Takai T, Tagawa Y, Iwakura Y, Mizuguchi J, et al. A critical role of Fc receptor-mediated antibody-dependent phagocytosis in the host resistance to blood-stage *Plasmodium berghei* XAT infection. *J Immunol*. 2001;166(10):6236-41.
28. Saylor CA, Dadachova E, Casadevall A. Murine IgG1 and IgG3 isotype switch variants promote phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* through different receptors. *J Immunol*. 2010;184(1):336-43.
29. Parham P. Inmunología: Editorial El Manual Moderno; 2016.
30. Brandebourg T, Hugo E, Ben-Jonathan N. Adipocyte prolactin: regulation of release and putative functions. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2007;9(4):464-76.
31. Mendez I, Carino C, Diaz L. [Prolactin in the immunological system: synthesis and biological effects]. *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion*. 2005;57(3):447-56.
32. McClellan KA, Robertson FG, Kindblom J, Wennbo Hk, Törnell J, Bouchard B, et al. Investigation of the role of prolactin in the development and function of the lacrimal and Harderian glands using genetically modified mice. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2001;42(1):23-30.
33. Blanco-Favela F, Legorreta-Haquet MV, Huerta-Villalobos YR, Chávez-Rueda K, Montoya-Díaz E, Chávez-Sánchez L, et al. Participación de la prolactina en la respuesta inmune. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*. 2012;69:329-36.
34. Mohammed I. Prolactin And Other Hormonal Profiles In Sudanese Infertile Females: UOFK; 2015.

35. Walker SE, Allen SH, McMurray RW. Prolactin and autoimmune disease. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 1993;4(5):147-51.
36. KINDBLOM J. ROLE OF PROLACTIN IN THE PROSTATE GLAND.
37. La prolactina, asociada con la obesidad [Internet]. 2017. Available from: <http://www.conicet.gov.ar/la-prolactina-asociada-con-la-obesidad/>.
38. Wang T, Lu J, Xu Y, Li M, Sun J, Zhang J, et al. Circulating Prolactin Associates With Diabetes and Impaired Glucose Regulation. *Diabetes care*. 2013;36(7):1974-80.
39. Fleenor DE, Freemark M. Prolactin induction of insulin gene transcription: roles of glucose and signal transducer and activator of transcription 5. *Endocrinology*. 2001;142(7):2805-10.
40. Carré N, Binart N. Prolactin and adipose tissue. *Biochimie*. 2014;97:16-21.
41. Welniak L, Richards S, Murphy W. Effects of prolactin on hematopoiesis. *Lupus*. 2001;10(10):700-5.
42. Alamer M. The role of prolactin in thermoregulation and water balance during heat stress in domestic ruminants. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2011;6(12):1153-69.
43. Shelly S, Boaz M, Orbach H. Prolactin and autoimmunity. *Autoimmunity reviews*. 2012;11(6):A465-A70.
44. Méndez I, Cariño C, Díaz L. La prolactina en el sistema inmunológico: aspectos de síntesis y efectos biológicos. *Revista de investigación clínica*. 2005;57:447-56.
45. López-Meza JE, Lara-Zárate L, Ochoa-Zarzosa A. Effects of prolactin on innate immunity of infectious diseases. *The Open Neuroendocrinology Journal*. 2010;3:175-9.
46. Robinson DP, Klein SL. Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis. *Hormones and behavior*. 2012;62(3):263-71.
47. Bayoumi N, Elhassan E, Elbashir M, Adam I. Cortisol, prolactin, cytokines and the susceptibility of pregnant Sudanese women to *Plasmodium falciparum* malaria. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. 2009;103(2):111-7.

48. Alfonso Orta I, Jiménez López G, Chao Cardeso A, Ávila Pérez J. La metoclopramida y sus reacciones adversas sobre el sistema nervioso central. *Revista Cubana de Medicina General Integral*. 2011;27:197-206.
49. Gomes RCT, Verna C, Simoes RS, Wolff RB, Baracat EC, Soares-Jr JM. Effects of metoclopramide on the mouse anterior pituitary during the estrous cycle. *Clinics*. 2011;66(6):1101-4.
50. Verna C, Soares Júnior JM, Martins FW, Teixeira RC, Mosquette R, Simões RS, et al. Efeito da hiperprolactinemia induzida pela metoclopramida na córnea de camundongos. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. 2006;69:645-9.
51. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. 1971;8(9):871-4.
52. Ruelas C. D, Rosadio A. R. Desarrollo y estandarización de una prueba de ELISA indirecta para Brucelosis ovina. 2014. 2014;10(2):13.
53. Gutiérrez OA, Salas E, Hernández Y, Lissi EA, Castrillo G, Reyes O, et al. An immunoenzymatic solid-phase assay for quantitative determination of HIV-1 protease activity. *Analytical Biochemistry*. 2002;307(1):18-24.
54. Amaral VC, Maciel GA, Carvalho KC, Marcondes RR, Soares JM, Baracat EC. Metoclopramide-induced hyperprolactinemia effects on the pituitary and uterine prolactin receptor expression. *General and comparative endocrinology*. 2013;189:105-10.
55. Crepaldi-Alves S, Carneiro E, Bosqueiro JR, Boschero A. Synergistic effect of glucose and prolactin on GLUT2 expression in cultured neonatal rat islets. *Brazilian journal of medical and biological research*. 1997;30:359-61.
56. Howes OD, Smith S, Gaughran FP, Amiel SA, Murray RM, Pilowsky LS. The relationship between prolactin levels and glucose homeostasis in antipsychotic treated schizophrenic patients. *Journal of clinical psychopharmacology*. 2006;26(6):629.