



**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Posgrado en Ciencias Biológicas**

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Biología experimental

Efecto del  $17\beta$ -estradiol y la testosterona sobre la expresión de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en bazo y cerebro, su concentración en suero y la concentración de anticuerpos en ratones infectados con *P. berghei* ANKA.

**TESIS**

**Para optar por el grado de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

Fidel Orlando Buendía González

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Martha Legorreta Herrera

Fes. Zaragoza. U.N.A.M

COMITÉ TUTOR: Dra. María Isabel Soto Cruz

Fes. Zaragoza. U.N.A.M

COMITÉ TUTOR: Dr. Abraham Landa Piedra

Fac. de medicina U.N.A.M

MÉXICO, CD. MX.

Agosto, 2018



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.





**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Posgrado en Ciencias Biológicas**

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Biología experimental

Efecto del  $17\beta$ -estradiol y la testosterona sobre la expresión de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en bazo y cerebro, su concentración en suero y la concentración de anticuerpos en ratones infectados con *P. berghei* ANKA.

**TESIS**

**Para optar por el grado de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

Fidel Orlando Buendía González

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Martha Legorreta Herrera

Fes. Zaragoza. U.N.A.M

COMITÉ TUTOR: Dra. María Isabel Soto Cruz

Fes. Zaragoza. U.N.A.M

COMITÉ TUTOR: Dr. Abraham Landa Piedra

Fac. de medicina U.N.A.M

MÉXICO, CD. MX.

Agosto, 2018

OFICIO CPCB/509/2018

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.


Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 30 de abril del 2018, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS** del alumno, **BUENDÍA GONZÁLEZ FIDEL ORLANDO** con número de cuenta **307017552** con la tesis titulada "**Efecto del 17 $\beta$ -estradiol y la testosterona sobre la expresión de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en bazo y cerebro, su concentración en suero y la concentración de anticuerpos en ratones infectados con *P. berghei* ANKA.**", realizada bajo la dirección del Tutor Principal: DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA:

Presidente: DRA. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN  
Vocal: DRA. MIRIAM RODRÍGUEZ SOSA  
Secretario: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ  
Suplente: DR. RICARDO LASCURAIN LEDESMA  
Suplente: DRA. ADRIANA KARINA CHÁVEZ RUEDA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 02 de mayo de 2018.

  
DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA  
COORDINADOR DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

## **Agradecimientos institucionales**

Al posgrado en Ciencias Biológicas, por darme la oportunidad de estudiar en tan valioso posgrado.

Al laboratorio de Inmunología Molecular por brindarme las herramientas para poder desarrollar mi proyecto de investigación, formarme como investigador y darme la oportunidad de interaccionar con otras personas con perspectivas afines.

A la UNAM, La Facultad de Estudios Superiores Zaragoza ya que sus instalaciones contribuyeron al desarrollo del proyecto.

A la Dra. Martha Legorreta Herrera por su labor docente que me permitió formarme como investigador quien se preocupó por el mejoramiento mis habilidades como científico y me ayudo mejorar principalmente en los aspectos que más se me dificultan.

A la Dra. María Isabel Soto Cruz y al Dr. Abraham Landa Piedra por aportar su punto de vista al proyecto lo que enriqueció el análisis de los resultados del proyecto.

Al programa de becas Conacyt, CVU 43453, a los programas de DGAPA proyecto PAPIIT IN216914 y PAPIIT IN220417 por el apoyo financiero brindado.

## **Agradecimientos a título personal**

Agradezco a mi familia por su apoyo ya que sin ellos el término de la maestría no hubiera sido posible. A mi madre Guadalupe quien me ha educado, creído en mí y quien ha sido un ejemplo que seguir a quien realmente le debo mucho. A mis hermanas Goretti y Guadalupe a quienes valoro y me han ayudado cuando lo he necesitado.

A mis tías Edith, Verónica, Carmen y Concha, a mi tío Isidro y a mi primo Osvaldo quienes me han apoyado durante toda mi vida en los buenos y malos tiempos, me han dado su consejo, brindado su amistad, su confianza y con los que ha pasado buenos momentos.

A mis compañeros de laboratorio Omar que con su buen ánimo te alegra el día, a Luis del quien he aprendido a tener diferentes puntos de vista a la hora de afrontar una situación, a Jesús con el que he podido tener charlas muy amenas y me ha demostrado la importancia de la constancia, a Teresita, Sofia y Odra quienes han brindado su apoyo siempre que fue necesario. Y a todos les agradezco su amistad.

A los trabajadores del proyecto con especial énfasis en Adriana y Roman sin quienes la realización del proyecto no podría llevarse a cabo.

A mis compañeros de la universidad y anteriores compañeros de laboratorio que aunque ya no los frecuente a menudo continúan siendo un apoyo para mí.

# Contenido

Resumen .....	1
Abstract.....	3
1 Introducción.....	5
2. Antecedentes.....	5
2.1 Malaria .....	5
2.2 Malaria y bazo .....	6
2.3 Malaria y cerebro .....	7
2.4 Respuesta inmune contra Plasmodium .....	8
2.5 Las hormonas sexuales y el sistema inmune .....	9
2.6 Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ).....	12
2.7 Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) .....	13
2.8 Anticuerpos .....	13
2.9 Influencia de las hormonas sexuales en infecciones con Plasmodium .....	14
4 Hipótesis.....	16
5 Objetivo general .....	16
5.1 Objetivos específicos.....	16
6 Metodología .....	17
6.1 Grupos de ratones .....	17
6.2 Administración de esteroides .....	18
6.3 Cuantificación de la parasitemia .....	18
6.4 Extracción de RNA.....	19
6.5 Secado de RNA y cuantificación de RNA.....	19
6.6 Retrotranscripción.....	20
6.7 Cuantificación de los esteroides sexuales.....	20
6.8 Amplificación de los genes IFN- $\gamma$ y TNF- $\alpha$ para citocinas por PCR en tiempo real ..	21
6.9 Condiciones de amplificación para PCR tiempo real .....	22
6.10 Preparación de sueros hiperinmunes contra P. berghei ANKA.....	24
6.11 Cuantificación de IFN- $\gamma$ y TNF- $\alpha$ por citometría de Flujo .....	24
6.12 Cuantificación de anticuerpos .....	25
6.13 Análisis estadístico .....	25



7 Resultados .....	26
7.1 Efecto de la gonadectomía sobre la parasitemia de ratones CBA/Ca machos y hembras infectados con P. berghei ANKA.....	26
7.2 Análisis del dimorfismo sexual en la parasitemia de ratones CBA/Ca intactos y gonadectomizados infectados con P. berghei ANKA .....	26
7.3 Efecto del 17 $\beta$ -estradiol sobre la parasitemia .....	27
7.4 Efecto del estradiol sobre la expresión de IFN- $\gamma$ en bazo y cerebro de ratones infectados con P. berghei ANKA .....	28
7.5 Efecto del 17 $\beta$ -estradiol sobre la concentración de INF- $\gamma$ en suero de ratones intactos o gonadectomizados infectados con P. berghei ANKA .....	31
7.6 Efecto del 17 $\beta$ -estradiol sobre la expresión de TNF- $\alpha$ en bazo y cerebro de ratones infectados con P. berghei ANKA .....	32
7.7 Efecto del 17 $\beta$ -estradiol sobre la concentración de TNF- $\alpha$ en suero.....	35
7.8 Efecto de administrar 17 $\beta$ -estradiol sobre la concentración de IgG totales e IgM en suero .....	36
7.9 Efecto del 17 $\beta$ -estradiol sobre la concentración de esteroides en suero.....	38
7.10 Efecto de la testosterona sobre la parasitemia.....	40
7.11 Efecto de la testosterona sobre la expresión de IFN- $\gamma$ en bazo y cerebro de ratones infectados con P. berghei ANKA .....	41
7.12 Efecto de la testosterona sobre la concentración de IFN- $\gamma$ en suero .....	43
7.13 Efecto de la testosterona en la expresión de mRNA TNF- $\alpha$ en bazo y cerebro de ratones infectados con P. berghei ANKA.....	44
7.14 Efecto de la testosterona sobre la concentración de TNF- $\alpha$ en suero .....	46
7.15 Efecto de la administración testosterona sobre la concentración de IgG totales e IgM en suero .....	46
7.16 Efecto de administrar testosterona sobre la concentración de esteroides sexuales en suero .....	48
8 Discusión.....	50
9 Conclusiones .....	58
11 Perspectivas del trabajo.....	58
12 Bibliografía .....	59

## Resumen

La malaria es una enfermedad causada por un parásito del género *Plasmodium* (*P.*), en 2016 causó 445 mil muertes. Presenta dimorfismo sexual, los hombres desarrollan mayor severidad de la infección y mayor mortalidad que las mujeres. Dado que el estradiol y la testosterona son las hormonas responsables de las principales diferencias entre los sexos, es probable que intervengan en este dimorfismo sexual, al regular la respuesta de células inmunes como los linfocitos T los cuales sintetizan las citocinas pro-inflamatorias IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , importantes para la eliminación del *Plasmodium*. Por lo anterior, analizamos el efecto de administrar a ratones machos y hembras tanto intactos como gonadectomizados 17 $\beta$ -estradiol o testosterona, infectar a los ratones con *P. berghei* ANKA y evaluar el efecto sobre la expresión de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en cerebro y bazo.

Al octavo día de la infección, los ratones se sacrificaron, se tomaron muestras de suero, de bazo y de cerebro para extraer RNA que se retrotranscribió a DNA complementario (DNAc). El DNAc se utilizó para amplificar los genes IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  mediante PCR en tiempo real. En los sueros se cuantificó la concentración de anticuerpos IgM e IgG mediante la técnica de ELISA.

Se detectó que en los ratones gonadectomizados (Gx), la administración de estradiol disminuyó la parasitemia e incrementó la expresión de IFN- $\gamma$  en el cerebro de las hembras lo que podría promover el desarrollo de malaria cerebral. Por el contrario, la administración de 17 $\beta$ -estradiol en machos disminuyó la expresión de IFN- $\gamma$  lo que sugiere que el 17 $\beta$ -estradiol afecta de manera distinta a cada sexo, lo que contribuiría al dimorfismo sexual presente en la enfermedad, también incrementó la expresión de TNF- $\alpha$  en cerebro y la concentración de IgG en suero.

La administración de testosterona a ratones Gx incrementó la parasitemia, disminuyó la expresión de TNF- $\alpha$  en cerebro e incrementó la concentración de IFN- $\gamma$  sérica de los machos. Además, la expresión de TNF- $\alpha$  en el cerebro de los machos fue mayor que la de las hembras, lo que explicaría la mayor mortalidad en los machos, ya que el incremento de esta citocina se correlaciona con malaria cerebral.

Este trabajo demuestra que el  $17\beta$ -estradiol promueve la eliminación del parásito; sin embargo, incrementa la respuesta proinflamatoria. Por el contrario, la testosterona suprime la eliminación del parásito e incrementa la respuesta proinflamatoria en machos gonadectomizados (Gx) lo que sugiere mayor susceptibilidad al desarrollo de malaria cerebral lo que explicaría en parte su mayor mortalidad.

## **Abstract**

Malaria is an infectious disease caused by a parasite of the genus *Plasmodium*, in 2016 caused 445 thousand deaths. It shows sexual dimorphism, males develop higher severity of infection and mortality than females. Oestradiol and testosterone are responsible for the main differences among the sexes, thus it is probably that both hormones are responsible of this sexual dimorphism, by regulating the response of immune cells such as T lymphocytes which synthesize the pro-inflammatory cytokines IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  both cytokines are important for *Plasmodium* elimination. Therefore, we analyzed the effect of 17 $\beta$ -oestradiol or testosterone to male and female intact or gonadectomized mice on the mRNA expression of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in brain and spleen eight days post infection with *P. berghei* ANKA.

On the eighth day post infection mice were sacrificed, serum, spleen and brain samples were used to isolate RNA which were retrotranscribed to complementary DNA (cDNA). The cDNAs were used to amplify the IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  genes by quantitative PCR. In addition, IgM and IgG serum levels were quantified by ELISA.

Administration of 17 $\beta$ -oestradiol to gonadectomized mice (Gx), decreased parasitaemia and increased the mRNA expression of IFN- $\gamma$  in the brain of females what could promote the development of cerebral malaria.

In contrast, administration of 17 $\beta$ -estradiol in males decreased the expression of IFN- $\gamma$ , which suggests that 17 $\beta$ -estradiol affects each sex differently, which would contribute to the sexual dimorphism in the disease, also increased the expression of TNF- $\alpha$  in brain and the concentration of serum IgG.

The administration of testosterone to Gx mice increased parasitaemia, decreased the mRNA expression of TNF- $\alpha$  in the brain and increased the serum IFN- $\gamma$  concentration of males. Furthermore, the mRNA expression of TNF- $\alpha$  in the brain of males was higher than in females, which would explain at least in part the increased mortality in males, because elevated levels of TNF- $\alpha$  correlates with cerebral malaria.

This work demonstrates that  $17\beta$ -estradiol promotes *Plasmodium* elimination; however, also increases the proinflammatory response. On the other hand, testosterone suppressed parasite elimination and increases the proinflammatory response in Gx males which support, at least in part, the increased susceptibility of males to develop cerebral malaria associated with higher mortality.

## 1 Introducción

El paludismo o malaria es una enfermedad causada por el protozoario *Plasmodium*, en el año 2016 originó 216 millones de nuevos casos y 445 mil muertes (1). La principal complicación que pone en riesgo la vida es la malaria cerebral (MC) provocada por *P. falciparum*. A pesar de muchas décadas de intensa investigación sobre MC aún no se ha entendido completamente su patogenia (2). Una teoría del origen de la MC es que las citocinas IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$  inducen la inflamación que ocasiona los síntomas (3-5).

En las infecciones con *Plasmodium* los hombres desarrollan mayor gravedad y mortalidad que las mujeres, es decir se presenta dimorfismo sexual (6, 7). Dado que las hormonas sexuales son responsables de las principales diferencias biológicas entre los sexos, es posible que también sean responsables del dimorfismo sexual en malaria (8). A pesar de la intensa investigación durante décadas sobre la MC, se desconoce si las hormonas sexuales modulan la expresión y síntesis de las citocinas proinflamatorias IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  involucradas en el cerebro de individuos infectados con *Plasmodium*.

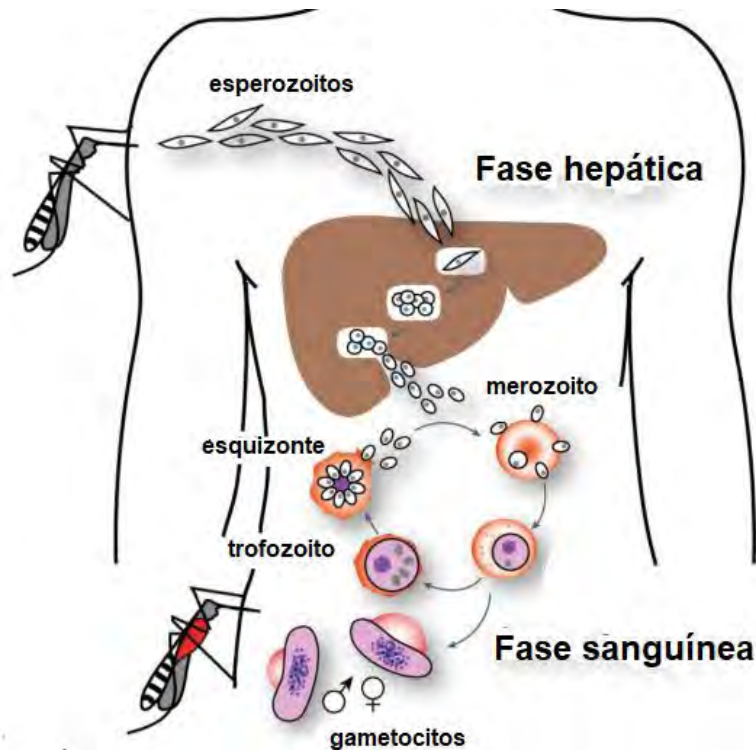
En este trabajo analizamos el efecto de las hormonas 17 $\beta$ -estradiol y testosterona sobre la expresión de IFN- $\gamma$  y de TNF- $\alpha$  en el bazo y el cerebro, así como su concentración en el suero de ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA. Además, evaluamos el efecto de ambos esteroides sobre la concentración de anticuerpos específicos contra *Plasmodium*.

## 2. Antecedentes.

### 2.1 Malaria

La malaria es una enfermedad causada por parásitos del género *Plasmodium*, las especies que infectan al hombre son *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. vivax* y *P. knowlesi*, de estas especies *P. falciparum* es la que causa el mayor número de muertes (9).

El parásito se transmite a través de la picadura del mosquito hembra del género *Anopheles* infectada que inyecta esporozoitos. Los esporozoitos pasan por la piel y llegan a la circulación sanguínea, migran al hígado donde maduran y originan a los merozoitos que invaden a los eritrocitos (fase sanguínea) tal como se esquematiza en la figura 1. Las principales complicaciones en la fase sanguínea son la anemia y la caquexia (10).



**Figura 1. Ciclo de vida de *Plasmodium*:** El *Plasmodium* se transmite a través del mosquito del género *Anopheles* hembra el cual inyecta esporozoitos que atraviesan la piel hasta llegar al torrente sanguíneo. En la sangre el parásito se dirige al hígado donde invade a los hepatocitos (fase hepática) posteriormente se desarrolla y genera la forma exaeritrocítica del parásito llamada merozoito. Los merozoitos infectan a eritrocitos donde se desarrolla a trofozoitos; los trofozoitos se alimentan de hemoglobina y se desarrollan a esquizontes. Los esquizontes liberan merozoitos al torrente sanguíneo donde infectarán a otros eritrocitos o se diferenciarán a gametocitos para continuar con una fase de reproducción sexual en el mosquito. Imagen modificada de Cowman AF et al (11).

## 2.2 Malaria y bazo

El bazo es uno de los órganos implicados en la eliminación de *Plasmodium* a través de la circulación sanguínea (12) y durante la infección se incrementa su tamaño. Contribuye a disminuir el grado de anemia durante la infección y en él se aíslan las

colonias hematopoyéticas e inmunogénicas importantes para la eliminación del *Plasmodium* (13).

El bazo presenta una barrera sanguínea dinámica que permite regular la circulación sanguínea y la síntesis de factores que favorecen la liberación de monocitos (14). En el existen poblaciones celulares como linfocitos T CD4+, que son relevantes para la eliminación del parásito ya que sintetizan citocinas proinflamatorias y favorecen la síntesis de anticuerpos por los linfocitos B (15).

### **2.3 Malaria y cerebro**

El cerebro es un órgano inmunoprivilegiado, ya que su reacción contra patógenos difiere de los demás tejidos (16). Presenta una restricción conocida como barrera hematocefálica que limita la entrada de eritrocitos y leucocitos (17), presenta células del sistema inmune propias como la microglía que juega un papel neuroprotector sobre todo durante daños a la barrera hematocefálica (18).

La MC es una complicación neuropatológica grave que se asocia con el aumento de moléculas de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) (19) y con la proteína inducible por interferón como IP-10 o la quimiocina CXCL10, que es una molécula quimiotáctica, ambas moléculas dirigen el tránsito de células efectoras CD4+ activadas, de linfocitos T CD8+ y células NK al cerebro (20).

Algunas de las características de la malaria cerebral son: la adhesión de eritrocitos en capilares, la hipoxia y la acidosis metabólica (21); así como las alteraciones en la distribución de proteínas como la ocludina de la barrera hematocefálica (22). Otro aspecto importante en MC es el daño a la barrera hematocefálica y la entrada de células presentes en el plasma. Lo anterior causa la activación de las células endoteliales del cerebro (23), y la generación de secuelas neurocognitivas que puede provocar la muerte (24).



## 2.4 Respuesta inmune contra *Plasmodium*

La respuesta inmune contra *Plasmodium* es mediada por células como T CD4+, T CD8+, T reguladoras (T reg), asesinas naturales (NK), macrófagos, dendríticas y células B (25).

Las células T CD4+ sintetizan citocinas como respuesta a las infecciones con *Plasmodium* (26), mantienen la memoria inmunológica de las células T CD8+ contra el parásito (27) y promueven su eliminación mediante IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , que a su vez activa a los macrófagos para que fagociten al parásito y se produzca el estallido respiratorio y estrés oxidativo que ayuda a eliminar al *Plasmodium* (28).

Las células T CD8+ son importantes en la respuesta inmune contra *Plasmodium* (29), su eliminación agrava la infección (30), se requieren para eliminar a *Plasmodium* durante la fase hepática (31). Sin embargo, en la fase sanguínea de la infección, las células T CD8+ no tienen actividad citotóxica (32), pero participan en la respuesta inmune ya que producen IFN- $\gamma$  en respuesta a óxido nítrico, lo que sugiere una actividad reguladora por parte de las células T CD8+ (33).

Las células T reg promueven la acumulación de eritrocitos parasitados en la vasculatura cerebral, por lo que promueven el desarrollo de MC (34). Sin embargo, son necesarias en la eliminación del *Plasmodium* (35).

Las células NK son importantes durante la fase sanguínea de la infección con *Plasmodium*, contribuyen a disminuir la parasitemia (36), reconocen a los eritrocitos parasitados y los eliminan; no obstante el mecanismo exacto de destrucción se desconoce (37).

Los macrófagos eliminan al parásito vía fagocitosis y la síntesis de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (38). Además contribuyen a la polarización de linfocitos T a tipo Th1 o Th2 durante la fase sanguínea aguda de la infección (39).

Las células dendríticas modulan la respuesta inmune y participan en el reconocimiento de lo propio y lo extraño (40). En las infecciones con *Plasmodium*, aumenta el número de las células dendríticas (41). El parásito inhibe la interacción de sus receptores tipo toll con sus ligandos (42), en la fase sanguínea el

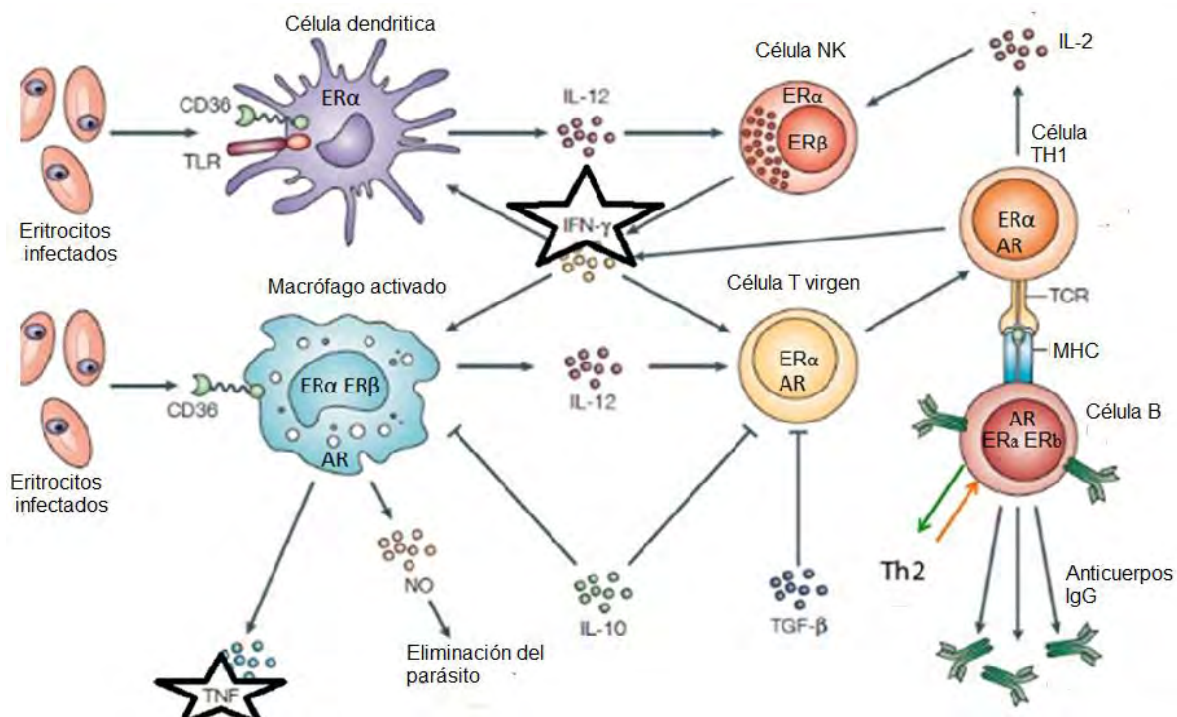
*Plasmodium*, induce la secreción de factores solubles que inhiben la activación de las células T CD8+ (43).

Los linfocitos B sintetizan anticuerpos específicos que se requieren para eliminar al *Plasmodium* (44). Necesitan la exposición continua con el parásito para que desarrollen memoria inmunológica (45). Los principales aspectos de la respuesta inmune se resumen en la figura 2.

## **2.5 Las hormonas sexuales y el sistema inmune**

El sistema inmune es complejo, en él participan diversas estirpes celulares, citocinas, quimiocinas y anticuerpos. Además, las células del sistema inmune interactúan con el sistema nervioso central y el endócrino (46, 47). Las hormonas sexuales constituyen un componente importante del sistema endócrino, son moléculas segregadas al torrente sanguíneo que actúan a distancia sobre diversos tejidos, tienen actividad reguladora y están estrechamente ligadas al sistema inmune (48).

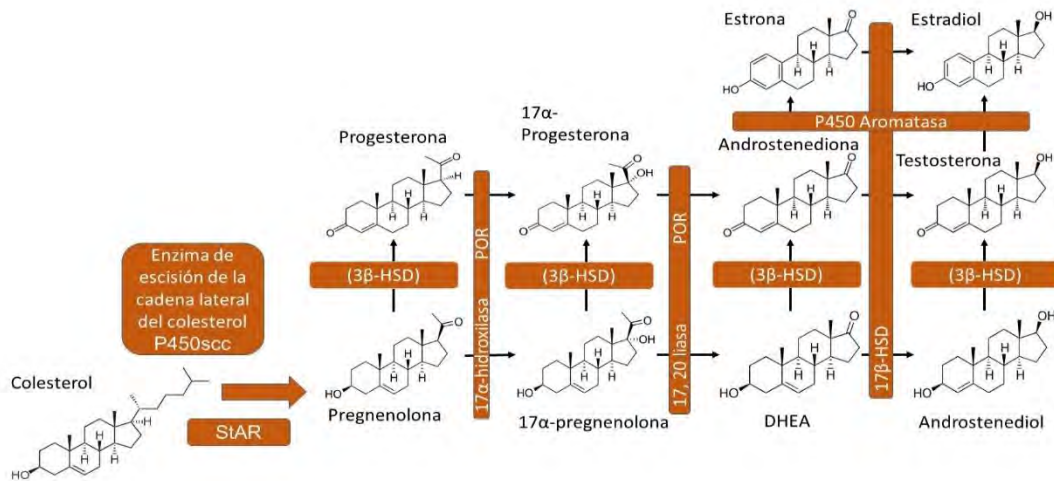
Las principales hormonas sexuales son el  $17\beta$ -estradiol en las hembras y la testosterona en los machos. Ambas hormonas derivan del colesterol, son liposolubles, pueden atravesar la barrera hematoencefálica y la membrana plasmática de las células (49). En la figura 2 se esquematiza la síntesis de las diferentes hormonas derivadas del colesterol.



**Figura 2. Respuesta inmune contra *Plasmodium*:** Se representan las principales células, citocinas y moléculas implicadas en la respuesta inmune contra *Plasmodium*. Abreviaturas: Receptor de andrógenos (AR), receptor de estrógenos alfa y beta (ER $\alpha$  y ER $\beta$ ), óxido nítrico (NO), receptor tipo TOLL (TLR), receptor de la célula T (TCR), complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Los macrófagos y las células dendríticas reconocen a los eritrocitos infectados y sintetizan IL-12 que activa a las células NK y a las células T vírgenes; Las células NK activadas y las células Th1 sintetizan IFN- $\gamma$  la cual promueve la maduración de células dendríticas, activación de macrófagos y la diferenciación de células T vírgenes. Las células NK, linfocitos T, células dendríticas, células NK y células B presentan receptores de andrógenos (AR) y de estrógenos (ER). Imagen modificada de Mary M. Stevenson y Deanor M (50).

El 17 $\beta$ -estradiol y la testosterona modulan la actividad de las células del sistema inmune mediante la interacción con sus receptores. Las hormonas sexuales se unen a receptores nucleares, y regulan la transcripción génica, la síntesis de citocinas (51) y de anticuerpos IgG (52). Los receptores nucleares para estradiol pueden translocarse al núcleo y unirse como un homodímero al elemento de respuesta al estrógeno, localizado en los promotores de un gen (53, 54).

Los monocitos, los macrófagos, los linfocitos B y las células NK poseen los receptores de estrógenos alfa (ER $\alpha$ ) y beta (ER $\beta$ ) (55, 56), mientras que las células T CD4+ y las células dendríticas poseen ER $\alpha$  (55). Los receptores de andrógenos (AR) están presentes en macrófagos, neutrófilos, células B y células CD4 y CD8 (57-59).



**Figura 3. Síntesis de las hormonas sexuales:** Principales vías de la esteroidogénesis, las principales enzimas y cofactores se muestran sobre las flechas. StAR (proteína de regulación rápida a esteroidogénesis), P450scc (desmolasa), 17 $\alpha$ -hidroxilasa, POR (P450 oxidoreductasa), P450aro (P450 aromatasa) 3 $\beta$ HSD (3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa), 17 $\beta$ -HSD (17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa). Las gónadas son los principales sitios de síntesis de 17 $\beta$ -estradiol y testosterona adicionalmente existen otros sitios con la capacidad de sintetizar 17 $\beta$ -estradiol como lo son el cerebro, el tejido graso y las glándulas suprarrenales. Los esteroides sexuales se sintetizan a partir del colesterol: P450scc mitocondrial es la enzima de escisión de la cadena lateral de colesterol, en el retículo endoplásmico, P450c17 cataliza la actividad de la 17 $\alpha$ -hidroxilasa y la 17, 20-liasa y P450aro cataliza la aromatización de andrógenos a estrógenos. Las enzimas P450 mitocondriales reciben electrones de NADPH a través de la proteína ferredoxina reductasa mientras que las enzimas P450 del retículo endoplásmico reciben electrones de NADPH a través de la proteína 450 oxido reductasa. Modificado de: Miller WL, Auchus RJ c (60).

El 17 $\beta$ -estradiol incrementa el número de células T CD8<sup>+</sup> (61); promueve la maduración y la activación de las células B (62, 63) e incrementa la secreción de anticuerpos (64); en las células mononucleares disminuye la síntesis de TNF- $\alpha$  (65); incrementa la concentración de IFN- $\gamma$  (66) y de IL-10 (67), la formación de células dendríticas funcionales y la síntesis de IL-12 (68); e inhibe la apoptosis mediada por TNF- $\alpha$  vía PI3K/Akt (69).

La testosterona participa en la regulación de las poblaciones de las células B ya que favorece su apoptosis (70), incrementa las poblaciones de CD8 (71) puede incrementar la expresión de TNF- $\alpha$  en macrófagos a través del incremento del receptor de quimiocina Ccr2 (72) e incrementar la concentración de IL-10 (73) y

puede disminuir la concentración de IFN- $\gamma$  (73), de IL-12 (74), la síntesis de TNF- $\alpha$  en células dendríticas (75) y la síntesis de anticuerpos IgG e IgM (76).

Ambos esteroides el 17 $\beta$ -estradiol y la testosterona influyen en la prevalencia, sintomatología y mortalidad de las enfermedades causadas por parásitos como *Toxoplasma* y *Leishmania* (77-79). En la infección con *Plasmodium* los machos desarrollan más gravedad en la sintomatología y mortandad que las hembras (6). No obstante, aún se desconocen los mecanismos precisos que expliquen las diferencias en la respuesta inmune entre ambos sexos durante las infecciones con *Plasmodium*.

## 2.6 Interferón gamma (IFN- $\gamma$ )

Las células T CD4+ y las NK así como la citocina IFN- $\gamma$  son importantes en la respuesta inmune contra el *Plasmodium* (80). El IFN- $\gamma$  en concentraciones bajas favorece la diferenciación de monocitos en células dendríticas e incluso se sugiere que determina si los linfocitos T presentaran actividad estimuladora o inhibidora (81). Además, incrementa la actividad microbicida de los macrófagos independiente de óxido nítrico a través de la autofagia vía proteínas cinasas P38 activadas por mitógeno (82), el IFN- $\gamma$  es necesario para promover la respuesta inmune contra protozoarios parásitos intracelulares como *Toxoplasma gondii* (83) y durante la infección de este parásito el IFN- $\gamma$  modula la expresión de las quimiocinas CXCL9 y CXCL10 en el cerebro (84) e incrementa la expresión y síntesis de la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS) y la actividad de los macrófagos (85).

El IFN- $\gamma$  se produce como respuesta a la infección con *Plasmodium* (86), se requiere para disminuir la parasitemia (87), evita la progresión de la enfermedad, el desarrollo de malaria grave (88) y su ausencia se relaciona con infecciones prolongadas (89). Por el contrario, las concentraciones altas de IFN- $\gamma$  promueven el desarrollo de MC y la inflamación en los vasos del cerebro (90).

La síntesis del IFN - $\gamma$  se regula por hormonas sexuales como la progesterona que inhibe sus síntesis vía la hipermetilación de la región promotora del gen IFN- $\gamma$  (91).

La expresión de  $\text{INF-}\gamma$  está bajo la regulación de las hormonas sexuales testosterona y  $17\beta$ -estradiol (66, 92). Sin embargo, se desconoce como ocurre esta modulación en individuos infectados con *Plasmodium* y su efecto en tejidos como el cerebro.

## **2.7 Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )**

Las células T CD4<sup>+</sup> y los macrófagos sintetizan TNF- $\alpha$  que es importante en la respuesta inmune contra el *Plasmodium* (80). El TNF- $\alpha$  disminuye la apoptosis de los eosinófilos (93), favorece la síntesis de IgG timo dependiente y modula la extensión y duración de la respuesta proinflamatoria, lo que permite la homeostasis (94). Se ha descrito que su síntesis en los macrófagos se estimula por el DNA de protozoarios parásitos como *Babesia bovis*, *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei* (95).

Los astrocitos sintetizan TNF- $\alpha$  en el cerebro como respuesta a estímulos como IL- $1\beta$  e IFN- $\gamma$  (96), favorece que las células de la microglía expresen CD40, importante para la activación de las células T (97).

El TNF- $\alpha$  contribuye a reducir rápidamente la parasitemia y la sintomatología de individuos infectados con *Plasmodium* (98, 99). Sin embargo, la pérdida en la regulación negativa de la concentración de TNF- $\alpha$  favorece el desarrollo de malaria grave (100), ya que las concentraciones elevadas de TNF- $\alpha$  que interaccionan con sus receptores (Tnfr2) en la microvasculatura cerebral se asocian al desarrollo de MC (101, 102). La síntesis de TNF- $\alpha$  disminuye por la testosterona (89). Sin embargo, se desconoce como ocurre esta modulación en individuos infectados con *Plasmodium* y su efecto en tejidos como el cerebro.

## **2.8 Anticuerpos**

Los anticuerpos tipo IgG son importantes para la generación de respuesta proinflamatoria (103), se incrementa su concentración ante infecciones con *Plasmodium* (104) y son importantes para la fagocitosis de eritrocitos infectados con

*Plasmodium* (105). La IgM limita la replicación de *Plasmodium* (106), se une a eritrocitos infectados (107), sin embargo aún se desconocen muchos aspectos de la participación de la IgM durante la infección con *Plasmodium* (108).

Las concentraciones elevadas de IgG se asocian con malaria asintomática y con la disminución de la parasitemia (109), además protegen contra subsecuentes infecciones (110). El cambio de isotipo a IgG depende de la madurez del sistema inmune, tipo y tiempo de exposición al antígeno (111). Una molécula importante que favorece la eliminación de parásito mediado por anticuerpos IgG es TNF- $\alpha$  (112).

Otras moléculas importantes en la modulación de los anticuerpos son las hormonas sexuales como el 17 $\beta$ -estradiol ya que incrementa las síntesis de anticuerpos IgG e IgM (113) y la maduración de las células B (62).

## **2.9 Influencia de las hormonas sexuales en infecciones con *Plasmodium***

Durante las infecciones con *Plasmodium* el 17 $\beta$ -estradiol incrementa la adhesión entre células endoteliales y leucocitos por medio de TNF- $\alpha$  y las moléculas ICAM-1 y VCAM-1 (114); incrementa el número de neutrófilos (115); y modula positivamente la síntesis de TNF- $\alpha$  por los macrófagos (116).

La testosterona incrementa el número de las células T maduras en bazo, la respuesta pro-inflamatoria (117), la susceptibilidad a infecciones con *Plasmodium* (118) y la mortalidad en ambos sexos, lo que sugiere que inhibe la expresión de genes asociados con la resistencia a la malaria (119). La testosterona suprime la vía de NF- $\kappa$ B (factor de transcripción importante para citocinas proinflamatorias) y disminuye el número de leucocitos (118).

Abatir la concentración de las hormonas sexuales por gonadectomía sobre la respuesta inmune contra *Plasmodium berghei* ANKA incrementa la parasitemia, el estrés oxidativo y el número de macrófagos y disminuye las células NK (120, 121).

Dada la relación de las hormonas sexuales con el sistema inmune, es probable que las hormonas sean responsables de la mayor mortandad de los hombres en las

infecciones con *Plasmodium*. Sin embargo, no se ha estudiado si el estradiol y la testosterona modulan la expresión de RNA mensajero que codifica para IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en cerebro, ambas citocinas son importantes para la eliminación del *Plasmodium*. Conocer si el 17 $\beta$ -estradiol y la testosterona regulan diferencialmente la expresión de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en ambos sexos ayudará a comprender el dimorfismo sexual en la MC.

### 3 Planteamiento del problema

La malaria es la enfermedad parasitaria con la mayor mortalidad en el mundo, en 2016 ocasionó 445 000 muertes. En esta enfermedad se presenta con mayor severidad sintomática y mortandad en los hombres que en las mujeres, es decir se presenta un marcado dimorfismo sexual.

Las hormonas sexuales son las principales moléculas responsables del dimorfismo sexual, generan diversos efectos fisiológicos. En particular, cuando interactúan con sus receptores sobre las células del sistema inmune modulan la expresión génica en los linfocitos T, linfocitos B, células dendríticas y monocitos. Algunas de estas células sintetizan citocinas como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  y anticuerpos, ambos tipos de moléculas: citocinas y anticuerpos son necesarios para eliminar al parásito *Plasmodium*. La síntesis de las citocinas requiere una regulación estricta de su concentración en relación con el tiempo de infección ya que la respuesta inflamatoria exacerbada puede provocar la muerte (122, 123).

En nuestro grupo de trabajo hemos documentado que la disminución en la concentración de las hormonas sexuales (mediante gonadectomía), en los ratones infectados con *P. berghei* ANKA disminuye la expresión de las citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  y aumenta la síntesis de anticuerpos IgG en las hembras (120). Sin embargo, se desconoce el efecto del 17 $\beta$ -estradiol o la testosterona sobre la expresión de ambas citocinas en el cerebro y sobre los anticuerpos,

Entender la participación de estas hormonas sobre la expresión de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  nos permitiría explicar al menos en parte el dimorfismo sexual en la respuesta



inmune contra *Plasmodium*. Por lo anterior, en este trabajo analizamos el efecto de administrar  $17\beta$ -estradiol o testosterona a ratones hembras y machos gonadectomizados para conocer el efecto que tienen ambos esteroides en la respuesta inmune contra *Plasmodium*; además analizamos el efecto de aumentar la concentración de las hormonas sexuales en los ratones intactos, con y sin infección para estudiar la participación del  $17\beta$ -estradiol y la testosterona en la expresión de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en bazo y cerebro, la concentración en suero de ambas citocinas, así como el efecto en la síntesis de anticuerpos.

#### **4 Hipótesis**

La administración de  $17\beta$ -estradiol tanto a las hembras intactas como Gx infectadas con *P. berghei* ANKA aumentará la expresión génica y la concentración en suero de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , además disminuirá la parasitemia y la concentración de los anticuerpos IgG específicos para *P. berghei* ANKA.

La administración de la testosterona en ratones machos y hembras intactos y Gx infectados con *P. berghei* ANKA disminuirá la expresión génica en bazo y cerebro y la concentración en suero de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , además incrementará la parasitemia disminuirá la concentración de anticuerpos IgG.

#### **5 Objetivo general**

Analizar el efecto de administrar  $17\beta$ -estradiol o testosterona sobre la expresión génica de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  y la concentración de anticuerpos de ratones infectados con *P. berghei* ANKA.

##### **5.1 Objetivos específicos**

- Evaluar el efecto del  $17\beta$ -estradiol y la testosterona sobre la parasitemia de ratones infectados con *P. berghei* ANKA.

- Evaluar el efecto de administrar  $17\beta$ -estradiol ó testosterona sobre la expresión de RNAm que codifica para los genes de las citocinas pro-inflamatorias IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en cerebro y bazo de ratones machos y hembras intactos o gonadectomizados e infectados con *P. berghei* ANKA por medio de RT-PCR en tiempo real.
- Estudiar el efecto de administrar  $17\beta$ -estradiol o testosterona sobre la concentración de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en el suero de ratones machos y hembras intactos o gonadectomizados e infectados con *P. berghei* ANKA por medio de la técnica de citometría de flujo.
- Evaluar el efecto de administrar  $17\beta$ -estradiol o testosterona sobre la concentración de anticuerpos específicos contra *P. berghei* ANKA en ratones CBA/Ca intactos o gonadectomizados hembras o machos mediante la técnica de ELISA.
- Cuantificar la concentración de estradiol y testosterona libre en suero por medio de la técnica de ELISA.

## 6 Metodología

### 6.1 Grupos de ratones

Se sincronizó un lote de hembras CBA/Ca de 4 semanas de edad y además se utilizó un lote de machos, los ratones se separaron en 12 grupos para cada sexo: A los grupos 1 y 2 se les administró  $17\beta$ -estradiol vía subcutánea; los grupos 3 y 4 se les administró testosterona y los grupos 5 y 6 se les trato con vehículo.

Los grupos 7 al 12 se gonadectomizaron posteriormente se les trató de la siguiente manera: grupos 7 y 8 se les administró  $17\beta$ -estradiol, grupos 9 y 10 se les administró testosterona; grupos 11 y 12 se les administró vehículo. Cada uno de estos grupos se infectaron vía intravenosa con  $1 \times 10^3$  eritrocitos infectados, *berghei* ANKA, adicionalmente por cada grupo infectado se utilizó un grupo no infectado como control como se describe en la Tabla 1.

	Tratamiento	Número de ratones infectados	Número de ratones no infectados	Grupo
<b>Machos Intactos</b>	Estradiol	11	5	1
	Testosterona	9	5	3
	Vehículo	5	5	5
<b>Machos Gonadectomizados</b>	Estradiol	7	5	7
	Testosterona	8	5	9
	Vehículo	7	5	11
<b>Hembras Intactas</b>	Estradiol	5	7	2
	Testosterona	9	5	4
	Vehículo	7	5	6
<b>Hembras Gonadectomizados</b>	Estradiol	7	5	8
	Testosterona	8	5	10
	Vehículo	6	5	12

**Tabla 1.** Descripción del número de ratones de cada grupo experimental.

## 6.2 Administración de esteroides

La dosis utilizada de  $17\beta$ -estradiol fue de 545  $\mu\text{g}$  de estradiol/Kg de peso de acuerdo a lo descrito por Benten WP. *Et al* (124) y la de testosterona fue de 40.905 mg//kg de peso. Las hormonas se diluyeron en 50  $\mu\text{L}$  de aceite de ajonjolí (125). El estradiol y la testosterona se administraron vía subcutánea dos veces por semana durante tres semanas y un día posterior a la última administración, los ratones se infectaron con  $1 \times 10^3$  glóbulos rojos parasitados con *P. berghei* ANKA.

## 6.3 Cuantificación de la parasitemia

La parasitemia se cuantificó diariamente a partir del tercer día post-infección mediante frotis sanguíneos teñidos con Giemsa y hasta el día del sacrificio (octavo día post-infección). Brevemente, se colocó una gota de sangre en un portaobjetos y se extendió de forma uniforme para obtener una película delgada. Se dejó secar a temperatura ambiente y se fijó con metanol absoluto, se tiñó con colorante Giemsa

diluido 1:10 durante 30 minutos. Se enjuagó con agua corriente y se dejó secar a temperatura ambiente. Los frotis se leyeron en un microscopio óptico Carl Zeiss con el objetivo 100X. Cuando se detectaron menos de 2 eritrocitos parasitados por campo, se evaluaron 50 campos y en las muestras con más de 2 eritrocitos parasitados por campo se contaron 200 eritrocitos totales. Los resultados de parasitemia se calcularon como el porcentaje de eritrocitos infectados en relación al número total de eritrocitos totales.

#### **6.4 Extracción de RNA**

En el día 8 post-infección todos los grupos de ratones se sacrificaron y se les extrajo el bazo y el cerebro. Los tejidos se colocaron en tubos cubiertos con una malla de nylon, se maceraron con el émbolo de una jeringa estéril, se agregaron 5 mL de PBS estéril, se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. El botón se resuspendió con agitación vigorosa con 500 µL de PBS estéril, se adicionaron 300 µL de Trizol y 300 µL de la mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (39:1 v/v). Las muestras se agitaron durante 10 minutos y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 15 minutos, se recuperó la fase acuosa y se precipitó con el mismo volumen de isopropanol frío, los RNAs obtenidos se almacenaron a -70°C.

#### **6.5 Secado de RNA y cuantificación de RNA**

Para recuperar el RNA precipitado, los tubos se centrifugaron a 14,000 rpm durante 15 minutos, los botones se lavaron con 400 µL de etanol al 80% en agua DEPC estéril y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante, los RNAs se evaporaron a temperatura ambiente. Las muestras se hidrataron con 30 µL de agua destilada estéril, se agitaron durante 5 minutos, se incubaron a 60 °C durante 5 minutos y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 5 minutos. Para cuantificar el RNA se realizó una dilución 1:200, se midió la absorbancia a 260 nm y se calculó la concentración de RNA en µg/µL de acuerdo con la siguiente formula

$$[\text{RNA } \mu\text{g}/\mu\text{L}] = \text{Abs } 260\text{nm} \times (40 \mu\text{g}/1000\mu\text{L}) \times 200$$

## 6.6 Retrotranscripción

Se utilizaron 1.5  $\mu\text{g}$  de RNA, se incubaron a 65°C por 10 minutos con 0.05  $\mu\text{g}$  de oligo dT. Se adicionaron 10  $\mu\text{L}$  de la mezcla de retrotranscripción (2  $\mu\text{L}$  de dNTP's 5 mM, 0.2  $\mu\text{L}$  de enzima MMLV-RT 40 U, 4  $\mu\text{L}$  de amortiguador de retrotranscripción 5x y 0.1  $\mu\text{L}$  de inhibidor de ribonucleasa) y se incubó a 37°C durante 1 hr. El DNAc obtenido se congeló a -70°C hasta que se utilizó para la amplificación por PCR en tiempo real.

## 6.7 Cuantificación de los esteroides sexuales

Se realizó una extracción en éter etílico (5 mL de éter por cada 100  $\mu\text{L}$  de suero), los tubos se agitaron en vortex vigorosamente y se colocaron sobre un baño de hielo seco con alcohol absoluto, se incubaron durante 30 segundos, se eliminó la fase acuosa y se transfirió la fase orgánica a un tubo de vidrio de 5 mL, se incubó en baño María a 35°C durante 48 horas. Hasta su completa evaporación. Las muestras se rehidrataron con 100  $\mu\text{L}$  de PBS/gelatina al 0.1%.

Se utilizó el equipo Immulate y el kit de detección para 17 $\beta$ -estradiol Emmulite 1000 marca Siemens el cual es un inmunoanálisis quimioluminiscente competitivo de fase sólida marcada con enzimas.

Se utilizaron 25  $\mu\text{L}$  de muestra del producto de la extracción, se incubó durante 60 minutos con una microesfera recubierta con un anticuerpo policlonal de conejo anti-estradiol (fase sólida) y con fosfatasa alcalina conjugada con 17 $\beta$ -estradiol (fase líquida). Durante la incubación el estradiol de la muestra compite con el 17 $\beta$ -estradiol conjugado con la enzima del reactivo por un número limitado de sitios de unión de anticuerpo de la microesfera. Posteriormente, la muestra no unida y el conjugado con la enzima se eliminaron mediante lavados por centrifugación. Finalmente, el sustrato quimioluminiscente se añadió a la unidad de análisis que contiene la microesfera y la señal se generó en proporción a la enzima unida (17 $\beta$ -Estradiol conjugado con fosfatasa alcalina).

Para cuantificar la testosterona se utilizaron los reactivos comerciales de EIA marca DRG EIA 2924, cuyo fundamento es una ELISA competitiva.

Se adicionaron 20  $\mu$ L del producto de la extracción o de los estándares y 100  $\mu$ L de enzima conjugada (testosterona conjugada con peroxidasa de rábano) en una placa con anticuerpos anti-testosterona y se incubó a 37°C por 60 minutos. Posteriormente, cada pozo se lavó 5 veces con 300  $\mu$ L de solución de lavado. Se adicionaron 100  $\mu$ L del sustrato tetrametilbencidina también conocido como TMB ( $H_2O_2$ -TMB 0.26 g/L), y se incubó a temperatura ambiente (22°C-28°C) por 15 minutos en la oscuridad, seguidamente se adicionaron 100  $\mu$ L de solución de paro, se agitó suavemente y se leyó la absorbancia a 450 nm (se debe considerar el blanco).

### **6.8 Amplificación de los genes IFN- $\gamma$ y TNF- $\alpha$ para citocinas por PCR en tiempo real**

Se cuantificó la expresión de los genes de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , y  $\beta$ -actina con oligos específicos con fluorocromos. Las secuencias para los primers de IFN- $\gamma$  fueron 5'CGG TGA GAA GAT GTT CCA TGC CAC [FAM] G3' (Sentido) y 5'TCT CCT TC GGA CAA TGT CAA ACA (Antisentido); para TNF- $\alpha$  CGG CTG TCT TTG AGA TCC ATG C [FAM] G 3'(Sentido) y 5'CGT CGT AGC AAA CCA CCA AGT G 3'(Antisentido); y para  $\beta$ -actina los primers fueron 5'CGG GTC AGG TAG TCT GTC AGG TCC [JOE] G3' (Sentido) y 5'CTA TGC TCT CCC TCA CGC CAT C3' (Antisentido).

La cuantificación se realizó con base en el valor obtenido del cycle threshold (ct) la amplificación del gene IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$  en relación al ct de la amplificación del gene constitutivo  $\beta$ -actina de la misma muestra. El procedimiento de PCR en tiempo real se realizó en una campana de flujo laminar se preparó la mezcla de reacción (tal como se indica en el apartado condiciones de amplificación). Se adicionaron 9  $\mu$ L mezcla de reacción y 1  $\mu$ L de DNAC a una concentración 15 ng/ $\mu$ L en tubos Eppendorf de 0.2 mL, posteriormente se adicionaron 5  $\mu$ L de mezcla de reacción con el DNAC por duplicado en una placa de 96 pozos, se utilizó un control negativo

sin DNAc y en cada corrida se evaluó la eficiencia de amplificación con una curva con las siguientes concentraciones de DNAc: 15 ng, 3 ng, 0.6 ng y 0.12 ng. La placa se protegió de la luz y se centrifugó a 2500 rpm a 4°C durante 5 minutos y después se colocó en el termociclador 7500 de Applied Biosystems.

El análisis de los datos se realizó con el software 7500 de Applied Biosystems. Se compararon los Ct con los grupos control tratados de la misma forma, pero sin infección y para realizar los cálculos se utilizó el método de  $2^{\Delta\Delta Ct}$  y la eficiencia de la reacción (126) como se describe a continuación:

Para utilizar el método de  $2^{\Delta\Delta Ct}$  se calculó la eficiencia de la reacción y los ciclos a los que se alcanzó el umbral de fluorescencia para cada muestra (CT) del gen a cuantificar y del gen constitutivo.

Cociente=

$$\frac{[(E \text{ del gen de interés})^{\Delta Ct \text{ Gen de interés}}]}{[(E \text{ del gen de referencia})^{\Delta Ct \text{ Gen de referencia}}]}$$

E=Eficiencia

$\Delta Ct$  del gen de interés = CT control – CT gen de interés

$\Delta Ct$  del gen de referencia = CT control -CT de referencia

## 6.9 Condiciones de amplificación para PCR tiempo real INF- $\gamma$

Reactivo	¶/RX	1 RX
Agua MQ	-	6.14 $\mu$ L
Mezcla de RX 10X	1x	1 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> (50 Mm)	6mM	1.2 $\mu$ L
ROX 50 X	1x	0.2 $\mu$ L
Oligo 10uM FW	0.2 $\mu$ M	0.2 $\mu$ L
Oligo 10Um rv	0.2 $\mu$ M	0.2 $\mu$ L
TAQ 5U/ $\mu$ L	0.03 U/ $\mu$ L	0.06 $\mu$ L
DNAc 15ng/ $\mu$ L	15ng	1 $\mu$ L

### Programa de amplificación.

- 1) 50°C 2 minutos
- 2) 95°C 2 minutos
- 3) 95°C 30 segundos
- 4) 60°C 45 segundos
- 5) 72°C 45 segundos

### TNF- $\alpha$

Reactivo	¶/RX	1 RX
Agua MQ	-	6.94 $\mu$ L
Mezcla de RX 10X	1x	1 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> (50 Mm)	3mM	0.6 $\mu$ L
ROX 50 x	1X	0.2 $\mu$ L
Oligo 10uM FW y RV	0.2 $\mu$ M	0.2 $\mu$ L
TAQ 5U/ $\mu$ L	0.03 U/ $\mu$ L	0.06 $\mu$ L
DNAc 15ng/ $\mu$ L	15 ng	1 $\mu$ L

### Programa de amplificación.

- 1) 50°C 2 minutos
  - 2) 95°C 2 minutos
  - 3) 95°C 30 segundos
  - 4) 65°C 45 segundos
  - 5) 72°C 45 segundos
- Repetir del 3 al 5 (45 veces).

### B-Actina

Reactivo	¶/RX	1 RX
Agua MQ	-	6.94 $\mu$ L
Mezcla de RX 10X	1x	1 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> (50 Mm)	3mM	0.6 $\mu$ L
ROX 50 x	1x	0.2 $\mu$ L
Oligo 10uM FW y RV	0.2 $\mu$ M	0.2 $\mu$ L
TAQ 5U/ $\mu$ L	0.03 U/ $\mu$ L	0.06 $\mu$ L
DNAc 15ng/ $\mu$ L	15ng	1 $\mu$ L



### **Programa de amplificación**

- 1) 50°C 2 minutos
- 2) 95°C 2 minutos
- 3) 95°C 30 segundos
- 4) 65°C 45 segundos
- 5) 72°C 45 segundos

Repetir del 3 al 5 (45 veces).

### **6.10 Preparación de sueros hiperinmunes contra *P. berghei* ANKA**

Grupos de ratones CBA/Ca se inyectaron con  $1 \times 10^3$  eritrocitos parasitados con *P. berghei* ANKA. Al séptimo día post-infección los ratones se trataron con pirimetamina (10 mg/Kg peso) durante 5 días para eliminar al parásito, la infección con  $1 \times 10^7$  eritrocitos parasitados con *P. berghei* ANKA y el tratamiento con pirimetamina se repitió una vez por mes durante 5 meses y el séptimo día después de la última reinfección los ratones se sacrificaron y se les extrajo el suero que se congeló en alícuotas.

### **6.11 Cuantificación de IFN- $\gamma$ y TNF- $\alpha$ por citometría de Flujo**

Para cuantificar la concentración de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en suero utilizamos el Kit "Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17" de la marca BD. El ensayo se basa en capturar el analito soluble mediante perlas de tamaño y fluorescencia conocidas. Las perlas están conjugadas con anticuerpos específicos para IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , el reactivo de detección es ficoeritrina conjugada con anticuerpos.

Las muestras de suero se incubaron con 50  $\mu$ L de una mezcla de perlas conjugadas con anticuerpos anti IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  y 50  $\mu$ L del reactivo de detección, durante 2 horas a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Posteriormente agregamos la solución de lavado, centrifugamos y eliminamos el sobrenadante. Al final las perlas se resuspendieron en 100  $\mu$ L de solución de lavado y ese mismo se leyeron las muestras en el citómetro de flujo. Para conocer la concentración exacta de IFN- $\gamma$  y

TNF- $\alpha$  en las muestras se utilizaron estándares de citocinas con las que se construyeron curvas estándar.

### **6.12 Cuantificación de anticuerpos**

Se utilizó la técnica de ELISA para cuantificar la concentración de anticuerpos en suero. Se utilizaron placas MaxiSorb donde se adicionaron 100  $\mu$ L de solución de proteína de antígeno *P. berghei* ANKA preparada en amortiguador de carbonatos a una concentración de 1  $\mu$ g/mL por pozo y se incubó por 2 horas a 37°C. La placa de ELISA se lavó con PBS tween 0.05 %. Se incubó con 200  $\mu$ L de solución de bloqueo (amortiguador de carbonatos + 3.5 % de leche descremada) durante 2 hrs. La placa se lavó con PBS-tween 0.05% y se adicionaron 100  $\mu$ L de suero de ratón diluido 1:20 en la solución PBS-tween + leche 0.02% y se incubó a 37°C durante 2 hrs. La placa se lavó con PBS-tween/0.05% y se adicionaron 100  $\mu$ L de las siguientes diluciones de los anticuerpos anti-ratón; IgG total (1:3500) e IgM (1:7000) (Laboratorios Zymed) y se incubó durante 1 hr a 37°C. La placa se lavó con PBS/tween 0.05% y se adicionaron 100  $\mu$ L de una solución streptavidina-peroxidasa diluida 1:1000 en PBS-tween 0.05% y se incubó 1 hr a 37°C. La placa se lavó 5 veces con solución PBS-tween 0.05%, se adicionaron 100  $\mu$ L del sustrato OPD-0.4 mg/mL con 0.03% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en amortiguador de citratos y se incubó durante 20 min protegido de la luz a temperatura ambiente, la reacción se detuvo con 100  $\mu$ L de una solución de ácido sulfúrico 0.1M. Se determinó la absorbancia de las placas en el lector de ELISA a una longitud de onda de 630nm con un filtro de 450 nm.

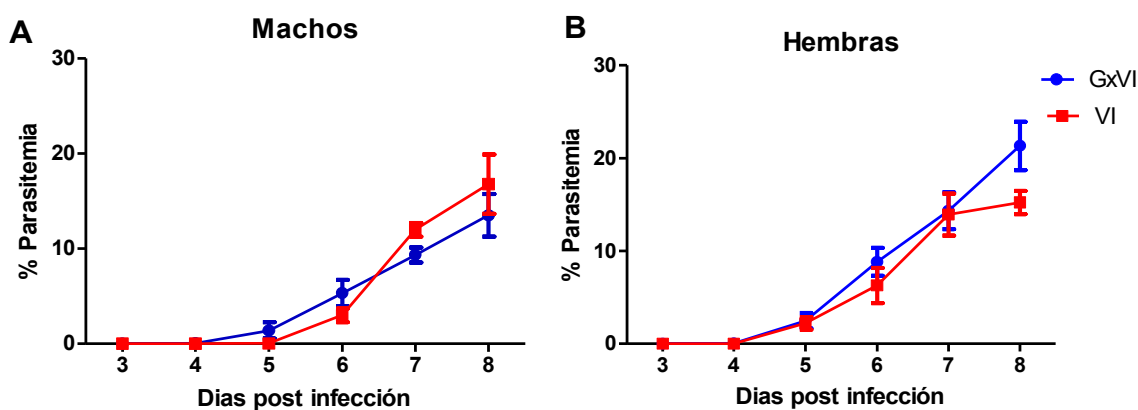
### **6.13 Análisis estadístico**

Para analizar los datos de la parasitemia se utilizó la prueba de ANOVA de dos vías y la prueba de Bonferroni. Para analizar los datos de la expresión génica, la concentración de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  y la concentración de esteroides en suero se utilizó la prueba de ANOVA de una vía y la prueba de Tukey, el valor de P fue  $\leq 0.05$ .

## 7 Resultados

### 7.1 Efecto de la gonadectomía sobre la parasitemia de ratones CBA/Ca machos y hembras infectados con *P. berghei* ANKA

Para analizar el efecto de las hormonas sexuales sobre la proliferación del parásito en sangre, a los ratones se les eliminaron las gónadas que es su principal sitio de síntesis, se infectaron con *P. berghei* ANKA y se evaluó la parasitemia. En los machos Gx la parasitemia reveló una tendencia de disminución los días 7 post-infección en comparación a los ratones intactos (Figura 4A). Mientras que en las hembras Gx la parasitemia tendió al incremento particularmente el día 8 post-infección (Figura 4B).

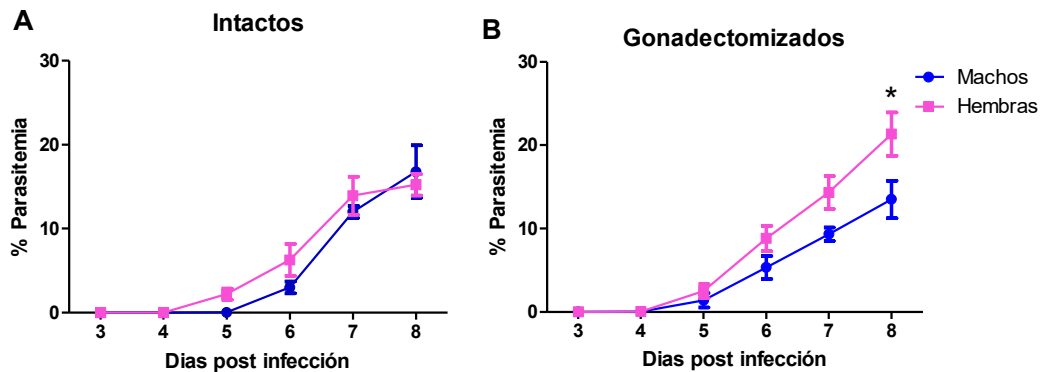


**Figura 4. Efecto de la gonadectomía sobre la parasitemia de los ratones machos y hembras infectados con *P. berghei* ANKA.** Ratones CBA/Ca machos o hembras se separaron en 2 grupos: Grupo 1 ratones que únicamente recibieron vehículo (VI); Grupo 2 ratones que se gonadectomizaron y recibieron el vehículo (GxVI). Todos los grupos se infectaron con *P. berghei* ANKA y a partir del día 3 post-infección se evaluó la parasitemia. Para el análisis estadístico se realizó una ANOVA de dos vías y la prueba de Bonferroni ( $P \leq 0.05$ ). El símbolo \* representa diferencia estadística entre los grupos  $n=7$ .

### 7.2 Análisis del dimorfismo sexual en la parasitemia de ratones CBA/Ca intactos y gonadectomizados infectados con *P. berghei* ANKA

Para determinar si existían diferencias entre la parasitemia que desarrollan los machos y las hembras, intactos o Gx, graficamos el número de eritrocitos infectados de machos y hembras juntos. No se detectó diferencia significativa en la parasitemia

de los machos intactos y las hembras intactas (Figura 5A). Los grupos Gx presentaron dimorfismo sexual ya que las hembras Gx desarrollaron mayor parasitemia que los machos Gx a los 8 días post-infección (Figura 5B).



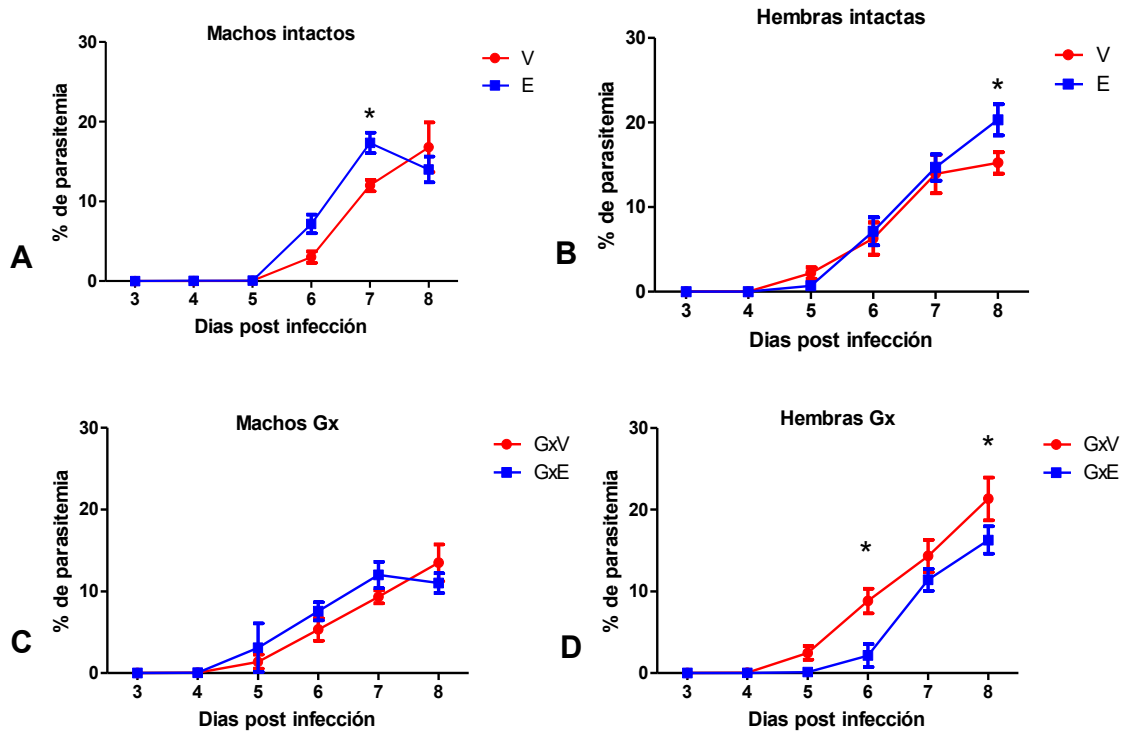
**Figura 5. Análisis del dimorfismo sexual en la parasitemia de los ratones intactos y gonadectomizados infectados con *P. berghei* ANKA.** Grupos de ratones CBA/Ca machos o hembras se separaron en 2 grupos: Grupo 1 ratones que únicamente recibieron vehículo machos (Machos); Grupo 2 ratones que únicamente recibieron vehículo hembras (Hembras), Los grupos se infectaron con *P. berghei* ANKA y a partir del día 3 post-infección se evaluó la parasitemia. Se realizó una ANOVA de dos vías y la prueba de Bonferroni para el análisis estadístico ( $P \leq 0.05$ ). El símbolo \* representa diferencia estadística entre los grupos  $n=6$ .

### 7.3 Efecto del $17\beta$ -estradiol sobre la parasitemia

Dado que la gonadectomía reduce la concentración de esteroides sexuales (127), analizamos si administrar  $17\beta$ -estradiol a los ratones gonadectomizados (machos y hembras) modificaba la parasitemia.

La administración de  $17\beta$ -estradiol a los machos intactos incrementó la parasitemia el día 7 post-infección en comparación con el grupo de machos intactos tratados con vehículo (Figura 6A), mientras que administrar  $17\beta$ -estradiol a las hembras intactas no modificó la parasitemia (Figura 6B). Contrario a lo esperado, la administración de  $17\beta$ -estradiol a los machos Gx no modificó la parasitemia en relación al grupo de machos Gx tratados con vehículo (Figura 6C). Por el contrario, la administración de  $17\beta$ -estradiol a las hembras Gx disminuyó significativamente la

parasitemia los días 6 y 8 post-infección en comparación con las hembras Gx tratadas con vehículo (Figura 6D).



**Figura 6 Efecto del estradiol sobre la parasitemia de ratones machos y hembras infectados con *P. berghei* ANKA.** Grupos de ratones CBA/Ca machos o hembras se separaron en 4 grupos: Grupo 1 ratones que únicamente recibieron vehículo (V); Grupo 2 ratones que se gonadectomizaron y recibieron el vehículo (GxV), Grupo 3 ratones intactos que recibieron estradiol (E); Grupo 4 ratones que se gonadectomizaron y recibieron estradiol (GxE). Los grupos se infectaron con *P. berghei* ANKA y a partir del día 3 post-infección se evaluó la parasitemia. Se realizó una ANOVA de dos vías y la prueba de Bonferroni para el análisis estadístico ( $P \leq 0.05$ ). El símbolo \* representa diferencia estadística entre grupos  $n=7$ .

#### 7.4 Efecto del estradiol sobre la expresión de IFN- $\gamma$ en bazo y cerebro de ratones infectados con *P. berghei* ANKA

Dado que detectamos dimorfismo sexual en la parasitemia de los ratones Gx tratados con  $17\beta$ -estradiol, decidimos analizar si esta hormona modula la expresión de las citocinas pro-inflamatorias, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , debido a que ambas moléculas están involucradas directamente con la eliminación del parásito (80, 87). Elegimos los tejidos de bazo y cerebro porque el bazo es importante en la eliminación del

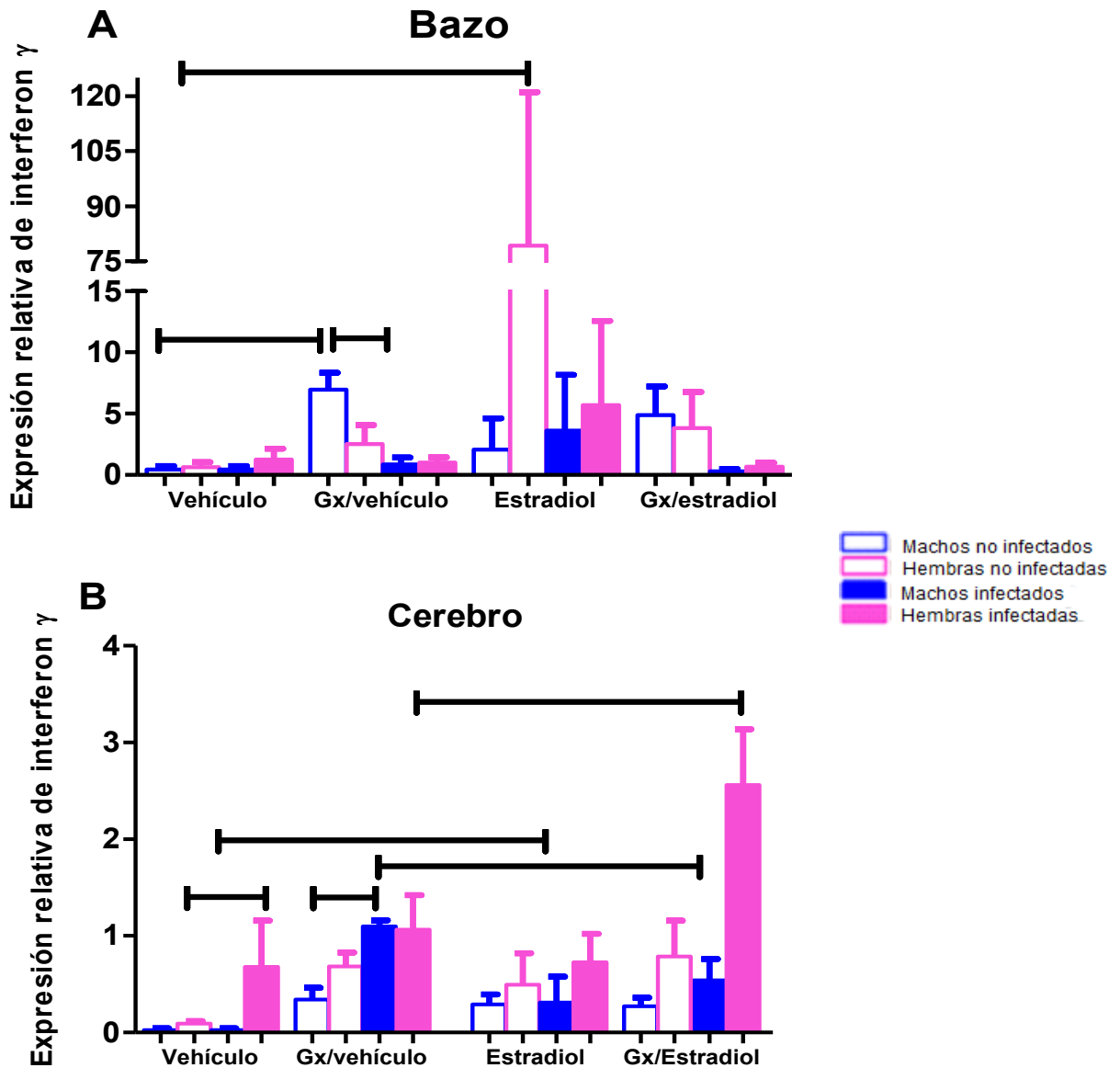
parásito y en el cerebro se genera MC que es responsable de la mayor severidad de la enfermedad.

Los machos Gx no infectados presentaron una mayor expresión de IFN- $\gamma$  en bazo en comparación con los machos intactos no infectados. La infección no modificó la expresión de IFN- $\gamma$  en el bazo en ambos sexos y contrario a lo esperado, la infección en los machos Gx disminuyó la expresión de IFN- $\gamma$  en bazo (Figura 7A).

Administrar 17 $\beta$ -estradiol a las hembras intactas no infectadas incrementó la expresión de IFN- $\gamma$  en bazo en comparación con las hembras intactas tratadas con vehículo no infectadas. Las hembras Gx tratadas con 17 $\beta$ -estradiol no infectadas presentaron una mayor expresión de IFN- $\gamma$  en bazo en comparación con los machos Gx tratados con 17 $\beta$ -estradiol no infectados lo que evidenció el dimorfismo sexual (Figura 7A).

En el tejido del cerebro, la infección incrementó la expresión de IFN- $\gamma$  de las hembras intactas y los machos Gx tratados con vehículo en comparación con las hembras intactas y machos Gx no infectados (Figura 7B). La administración de 17 $\beta$ -estradiol a hembras intactas no infectadas incrementó significativamente la expresión de IFN- $\gamma$  en comparación con las hembras intactas no infectadas tratadas con vehículo (Figura 7B).

Administrar 17 $\beta$ -estradiol a las hembras Gx e infectadas incrementó la expresión de IFN- $\gamma$  en cerebro en comparación con las hembras infectadas Gx tratadas con vehículo. (Figura 7B). Por el contrario, en los machos Gx infectados tratados con 17 $\beta$ -estradiol disminuyó la expresión de IFN- $\gamma$  en cerebro en comparación al grupo de machos Gx infectados tratados con vehículo (Figura 7B). La mayor expresión en las hembras Gx tratadas con 17 $\beta$ -estradiol e infectadas respecto a los machos Gx tratados con 17 $\beta$ -estradiol lo que confirma el dimorfismo sexual.



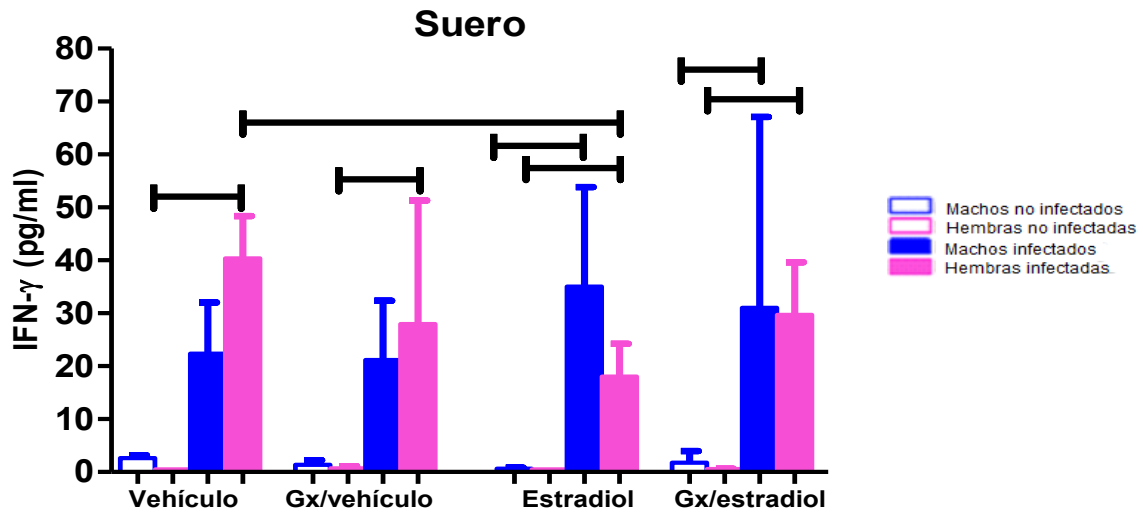
**Figura 7. Efecto del estradiol sobre la expresión relativa de RNAm que codifica para IFN- $\gamma$  en bazo y cerebro de ratones CBA/Ca machos y hembras infectados con *P. berghei* ANKA.** Grupos de ratones CBA/Ca machos o hembras se separaron en 4 grupos: Grupo 1 ratones que únicamente recibieron vehículo (Vehículo); Grupo 2 ratones que se gonadectomizaron y recibieron el vehículo (Gx/Vehículo), Grupo 3 ratones intactos que recibieron estradiol (Estradiol); Grupo 4 ratones gonadectomizados que recibieron estradiol (Gx/Estradiol). Los grupos se infectaron con *P. berghei* ANKA y como control se incluyó un grupo sin infección. Los ratones infectados se sacrificaron al 8° día post-infección y se obtuvieron los órganos bazo y cerebro a los que se extrajo el RNAm el cual se retrotranscribió y el DNA complementario obtenido se amplificó para el gen IFN- $\gamma$  por PCR tiempo real. En (A) se muestra la expresión relativa de RNAm que codifica para IFN- $\gamma$  con relación a la expresión de  $\beta$ -actina en bazo y en (B) en cerebro. Para el análisis estadístico se realizó ANOVA de una vía y posteriormente la prueba de Tukey, las líneas sobre los histogramas representan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $P \leq 0.05$ ), n infectados =7 y n no infectados=5.

### **7.5 Efecto del 17 $\beta$ -estradiol sobre la concentración de IFN- $\gamma$ en suero de ratones intactos o gonadectomizados infectados con *P. berghei* ANKA**

Debido a que la expresión de ARN mensajero pudiera no reflejar la concentración de IFN- $\gamma$  en circulación, cuantificamos la concentración de IFN- $\gamma$  en el suero de todos los grupos de ratones. No detectamos dimorfismo sexual en la concentración de IFN- $\gamma$  entre machos y hembras no infectados o infectados. La infección con *P. berghei* ANKA incrementó la concentración de IFN- $\gamma$  en machos y en hembras en los grupos analizados (Figura 8).

La gonadectomía no modificó la concentración de IFN- $\gamma$  en los ratones machos o hembras infectadas tratadas con vehículo. La administración de 17 $\beta$ -estradiol a las hembras intactas e infectadas disminuyó significativamente la expresión de IFN- $\gamma$  en comparación con las hembras intactas infectadas tratadas con vehículo. Finalmente, la administración con 17 $\beta$ -estradiol a los ratones machos o hembras Gx no modificó la concentración de IFN- $\gamma$  en comparación con los machos y hembras Gx tratados con vehículo (Figura 8).





**Figura 8. Efecto del estradiol sobre la concentración de IFN- $\gamma$  en el suero de ratones machos y hembras infectados con *P. berghei* ANKA.** Grupos de ratones CBA/Ca machos o hembras se separaron en 4 grupos: Grupo 1 ratones que únicamente recibieron vehículo (Vehículo); Grupo 2 ratones que se gonadectomizaron y recibieron vehículo (Gx/vehículo), Grupo 3 ratones intactos que recibieron estradiol (Estradiol); Grupo 4 ratones que se gonadectomizaron y recibieron estradiol (Gx/estradiol). Los grupos se infectaron con *P. berghei* ANKA y un grupo de ratones de cada sexo se dejó sin infección. En el suero se cuantificó la concentración de IFN- $\gamma$  mediante citometría de flujo. Las barras azules representan a los grupos de ratones machos y las barras rosas a los grupos de ratones hembras. Se realizó una ANOVA de una vía y posteriormente la prueba de Tukey, las líneas sobre los histogramas representan diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ), n infectados =7 y n no infectados=5.

### 7.6 Efecto del 17 $\beta$ -estradiol sobre la expresión de TNF- $\alpha$ en bazo y cerebro de ratones infectados con *P. berghei* ANKA

El TNF- $\alpha$  es una citocina importante en la eliminación del *Plasmodium*, no obstante, también está involucrada en la patogénesis de la malaria cerebral (128). Por lo anterior, en este trabajo estudiamos la influencia del 17 $\beta$ -estradiol sobre la expresión de esta citocina en bazo y en cerebro dado que son tejidos importantes involucrados tanto en la eliminación como en la patología respectivamente.

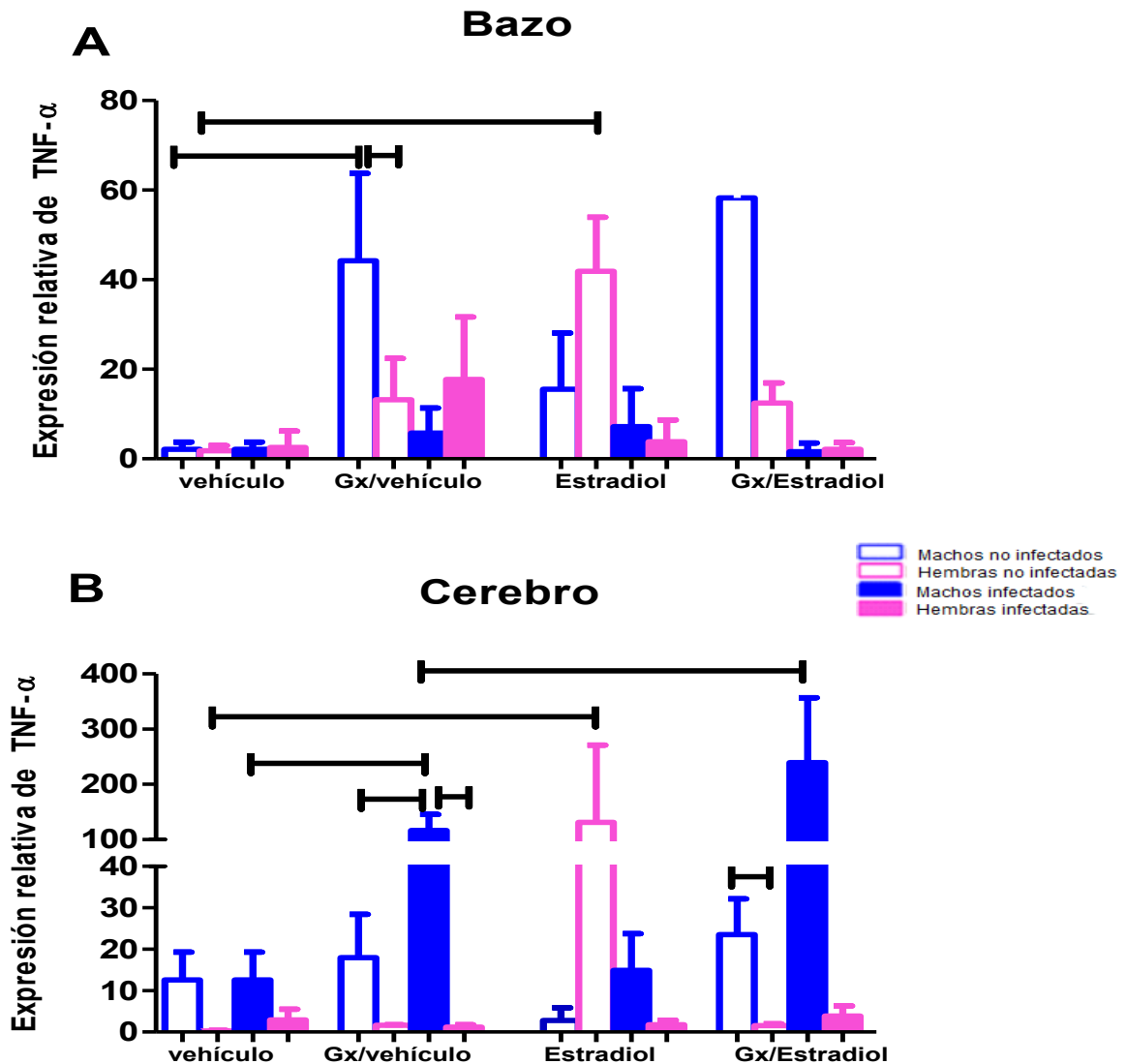
La infección no modificó la expresión de TNF- $\alpha$  en el bazo de los ratones machos o hembras intactos. La gonadectomía indicó dimorfismo sexual en los machos y hembras no infectados, los machos Gx expresaron más RNAm que las hembras en la misma condición (Figura 9A).

La administración de  $17\beta$ -estradiol indicó dimorfismo sexual ya que aumentó significativamente la expresión de  $TNF-\alpha$  en las hembras intactas no infectadas en comparación con las hembras intactas no infectadas tratadas con vehículo. En los infectados Gx no se observó dimorfismo sexual entre machos y hembras (Figura 9A).

En el cerebro, la infección en los machos Gx tratados con vehículo incrementó la expresión de  $TNF-\alpha$ . Los machos Gx infectados presentaron una mayor expresión de  $TNF-\alpha$  respecto a las hembras Gx infectadas lo que corrobora el dimorfismo sexual en cerebro (Figura 9B).

La administración de  $17\beta$ -estradiol a las hembras intactas no infectadas incrementó significativamente la expresión de  $TNF-\alpha$  en el cerebro respecto a las hembras intactas no infectadas tratadas con vehículo (Figura 9B).

La reconstitución de los machos Gx e infectados con  $17\beta$ -estradiol incrementó significativamente la expresión de RNAm que codifica para  $TNF-\alpha$  en cerebro en comparación con los machos Gx e infectados tratados con vehículo (Figura 9B). Los machos Gx tratados o no con  $17\beta$ -estradiol e infectados presentaron una mayor expresión de  $TNF-\alpha$  en comparación con las hembras Gx tratadas o no con  $17\beta$ -estradiol e infectados, lo anterior corrobora una respuesta dimórfica en cerebro (Figura 9B).

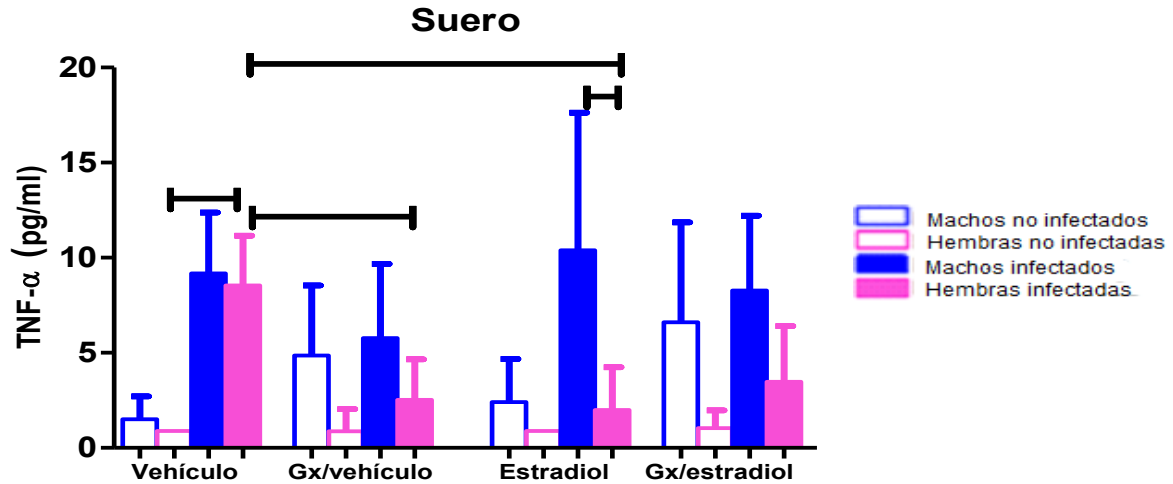


**Figura 9. Efecto del estradiol sobre la expresión relativa de RNAm que codifica para TNF- $\alpha$  en bazo y cerebro de ratones machos y hembras infectados con *P. berghei* ANKA.** Grupos de ratones CBA/Ca machos o hembras se separaron en 4 grupos: Grupo 1 ratones que únicamente recibieron vehículo (vehículo); Grupo 2 ratones que se gonadectomizaron y recibieron el vehículo (Gx/vehículo), Grupo 3 ratones intactos que recibieron 17 $\beta$ -estradiol (E); Grupo 4 ratones que se gonadectomizaron y recibieron 17 $\beta$ -estradiol (GxE). Los ratones se infectaron con *P. berghei* ANKA y como control se utilizó un grupo sin infección. Los ratones se sacrificaron al 8 $^{\circ}$  día post-infección y se obtuvieron los órganos de bazo y cerebro a los que se les extrajo el RNAm que se retrotranscribió y el DNA complementario obtenido se amplificó para el gen TNF- $\alpha$  mediante PCR en tiempo real. En (A) se muestra la expresión relativa de RNAm para TNF- $\alpha$  con relación a la expresión de  $\beta$ -actina en bazo y en (B) en cerebro. Para el análisis estadístico se realizó una ANOVA de una vía y posteriormente la prueba de Tukey, las líneas sobre los histogramas representan diferencias estadísticamente significativas entre grupos ( $P \leq 0.05$ ), n infectados =7 y n no infectados=5.

### **7.7 Efecto del 17 $\beta$ -estradiol sobre la concentración de TNF- $\alpha$ en suero**

Para determinar si el 17 $\beta$ -estradiol, además de regular la expresión de RNAm de TNF- $\alpha$  también afecta la concentración de la citocina en el suero, cuantificamos su concentración en el suero mediante citometría de flujo. La infección incrementó la concentración de TNF- $\alpha$  en ambos sexos. La gonadectomía disminuyó la concentración de TNF- $\alpha$  en las hembras infectadas en comparación a las hembras intactas infectadas (Figura 10). La administración de 17 $\beta$ -estradiol disminuyó la concentración de TNF- $\alpha$  en las hembras intactas e infectadas en comparación con las hembras intactas e infectadas, tratadas con vehículo. Las hembras intactas tratadas con 17 $\beta$ -estradiol e infectadas presentaron una menor concentración de TNF- $\alpha$  respecto a los machos intactos tratados con 17 $\beta$ -estradiol e infectados, lo que corrobora el dimorfismo sexual.

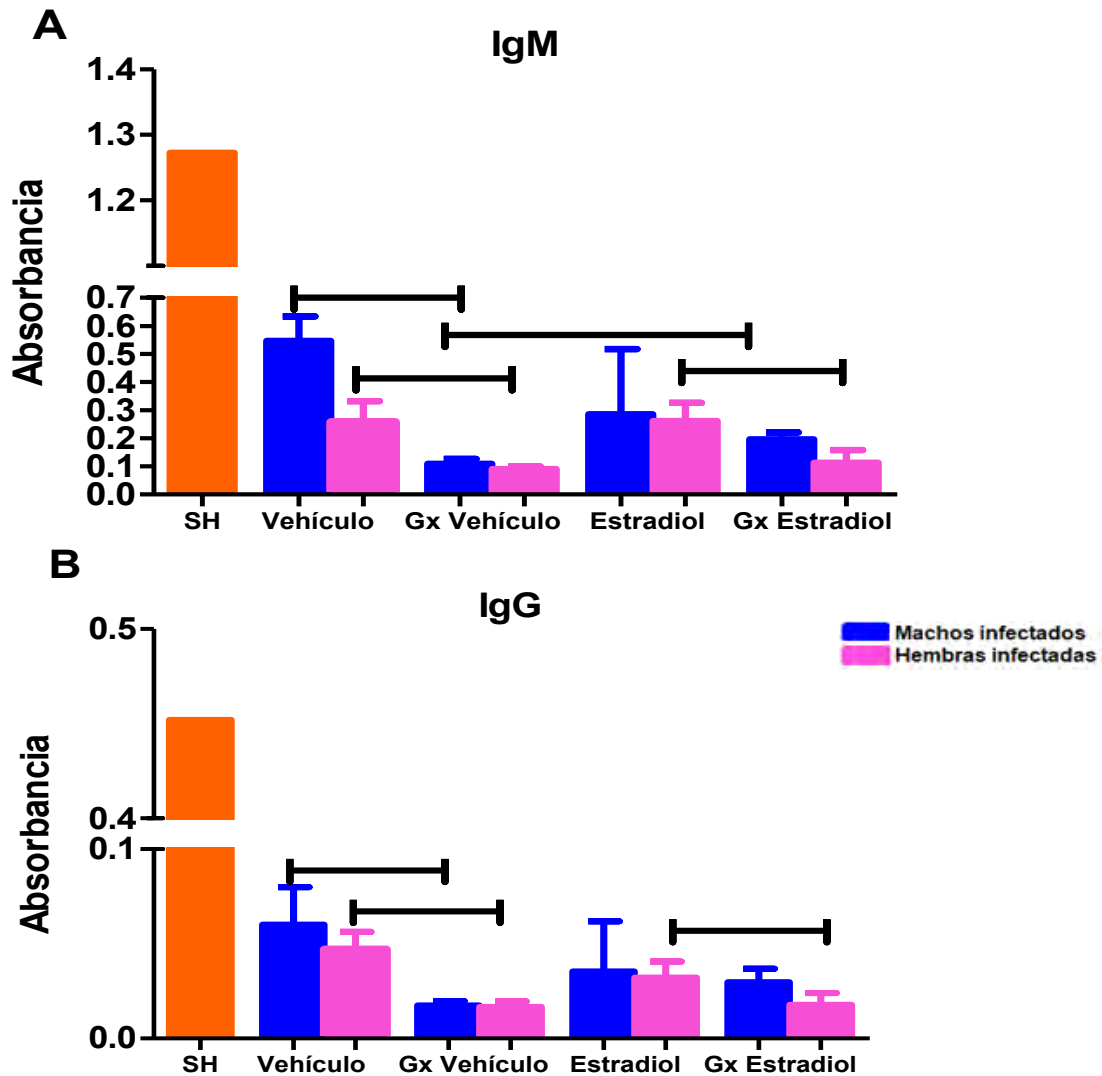
Administrar 17 $\beta$ -estradiol a los ratones Gx no modificó la concentración de TNF- $\alpha$  en comparación con los ratones Gx tratados con el vehículo e infectados con *P. berghei* ANKA (Figura 10).



**Figura 10. Efecto del 17 $\beta$ -estradiol sobre la concentración de TNF- $\alpha$  en el suero de ratones infectados con *P. berghei* ANKA.** Grupos de ratones CBA/Ca machos o hembras se separaron en 4 grupos: Grupo 1 ratones que únicamente recibieron vehículo (Vehículo); Grupo 2 ratones que se gonadectomizaron y recibieron el vehículo (Gx/vehículo), Grupo 3 ratones intactos que recibieron 17 $\beta$ -estradiol (Estradiol); Grupo 4 ratones que se gonadectomizaron y recibieron 17 $\beta$ -estradiol (Gx/estradiol). Los grupos se infectaron con *P. berghei* ANKA, como control se utilizó un grupo sin infección para cada sexo. Los ratones infectados se sacrificaron en el día 8 post-infección y se les extrajo el suero en el que se cuantificó la concentración de TNF- $\alpha$  por citometría de flujo. Las barras azules sin relleno representan a los grupos de ratones machos no infectados, las barras azules rellenas representan a los grupos infectados y las barras rosas sin relleno representan a las hembras no infectadas y las barras rellenas rosas representan a los grupos de ratones hembras infectadas. Se realizó una ANOVA de una vía y posteriormente la prueba de Tukey, las líneas sobre los histogramas representan diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ), n infectados =7 y n no infectados=5.

### 7.8 Efecto de administrar 17 $\beta$ -estradiol sobre la concentración de IgG totales e IgM en suero

Los machos y hembras Gx tuvieron una menor concentración de IgM e IgG que los machos y hembras intactos (Figura 11A y 11B). La administración de 17 $\beta$ -estradiol incrementó la concentración de anticuerpos IgM en los machos Gx en comparación con los machos Gx tratados con vehículo (Figura 11A).

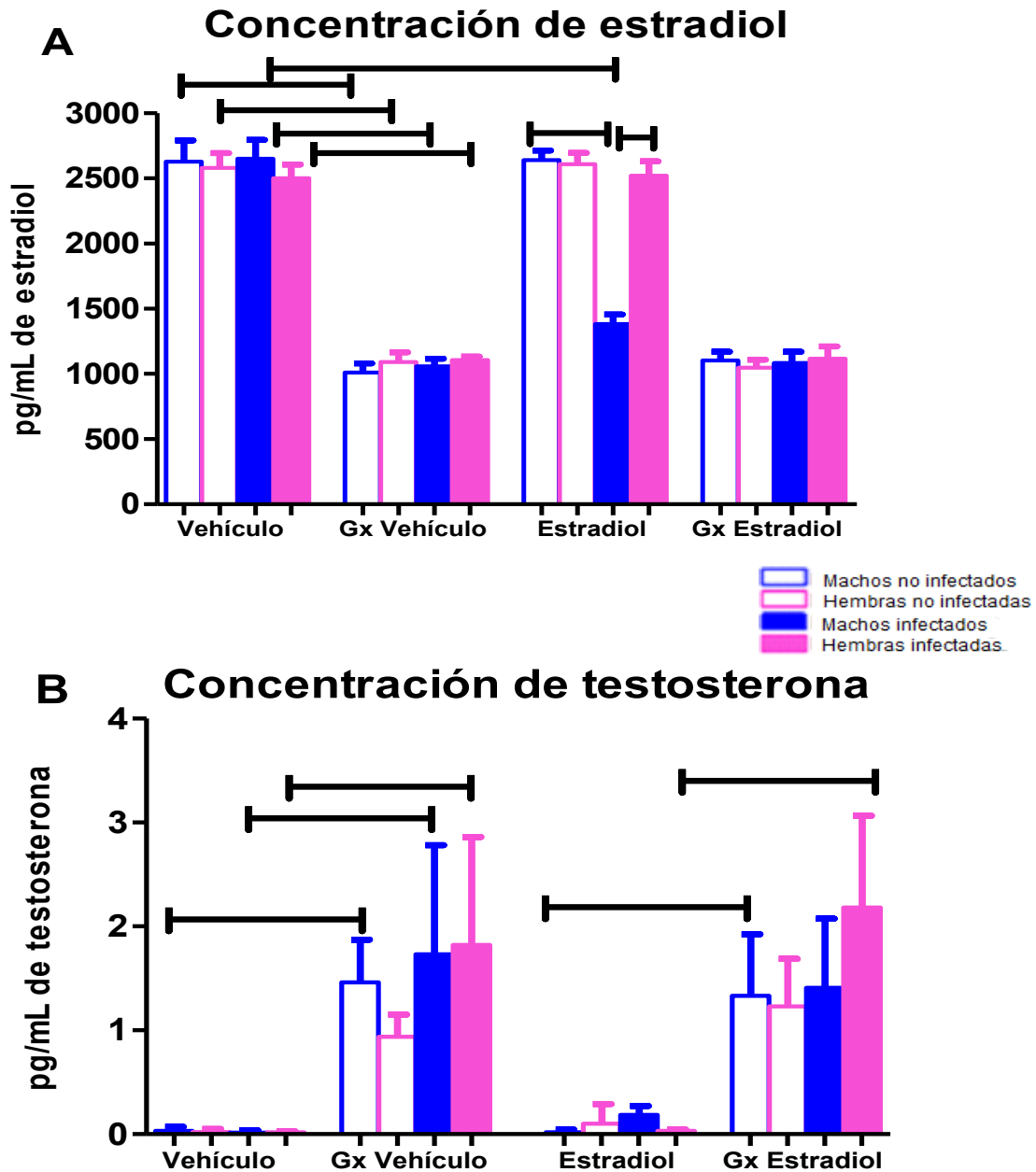


**Figura 11. Efecto de administrar estradiol sobre la concentración de anticuerpos IgG e IgM en suero de ratones infectados con *P. berghei* ANKA.** Grupos de ratones CBA/Ca machos y hembras se separaron en 6 grupos: Grupo 1, ratones que recibieron vehículo y se infectaron (Vehículo); Grupo 2 ratones que se gonadectomizaron, recibieron el vehículo y se infectaron (Gx Vehículo); Grupo 3 ratones intactos que recibieron 17 $\beta$ -estradiol y se infectaron (Estradiol) y Grupo 4 ratones que se gonadectomizaron, se reconstituyeron con estradiol y se infectaron (Gx Estradiol). Los ratones infectados se sacrificaron en el día 8 post-infección, se les extrajo el suero y se cuantificó la concentración de IgG totales e IgM por medio de la técnica de ELISA. Para el análisis estadístico, se realizó una ANOVA de una vía y posteriormente la prueba de Tukey, las líneas sobre los histogramas representan diferencias significativas entre los grupos ( $P \leq 0.05$ )  $n=7$ .

### **7.9 Efecto del-17 $\beta$ -estradiol sobre la concentración de esteroides en suero**

La administración de 17 $\beta$ -estradiol a machos o hembras intactos no modificó la concentración de estradiol libre en suero a excepción del grupo de machos intactos infectados quienes disminuyeron significativamente la concentración de 17 $\beta$ -estradiol en comparación con los ratones intactos infectados tratados con vehículo. Los grupos de machos intactos tratados con 17 $\beta$ -estradiol presentaron una mayor concentración de 17 $\beta$ -estradiol que las hembras intactas tratadas con 17 $\beta$ -estradiol lo que evidenció dimorfismo sexual (Figura 12A).

Interesantemente, la gonadectomía incrementó la concentración de testosterona en machos y hembras infectadas o no, mientras que administrar 17 $\beta$ -estradiol a los ratones intactos no infectados no modificó la concentración de testosterona. Finalmente, la administración de 17 $\beta$ -estradiol a los ratones Gx no modificó la concentración de testosterona en comparación con los ratones Gx tratados con vehículo (Figura 12B).



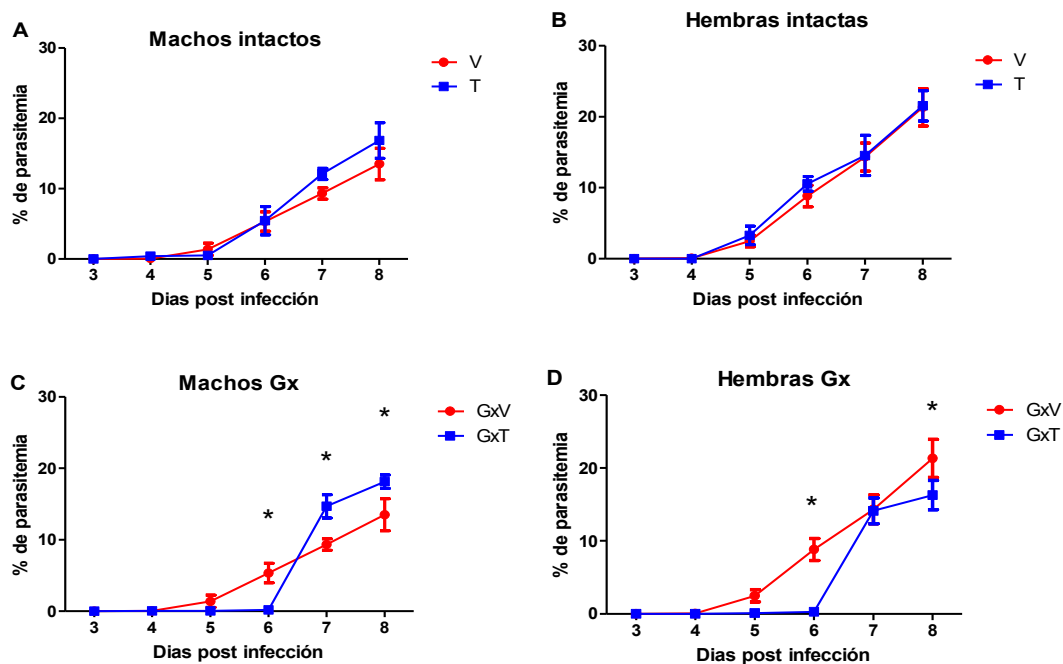
**Figura 12. Efecto de administrar estradiol sobre la concentración de estradiol y testosterona en el suero de ratones infectados con *P. berghei* ANKA.** Grupos de ratones CBA/Ca machos o hembras se separaron en 4 grupos: Grupo 1 ratones que únicamente recibieron vehículo (Vehículo); Grupo 2 ratones que se gonadectomizaron y recibieron el vehículo (Gx Vehículo), Grupo 3 ratones intactos que recibieron 17 $\beta$ -estradiol (Estradiol); Grupo 4 ratones que se gonadectomizaron y recibieron 17 $\beta$ -estradiol (Gx Estradiol). Los grupos se infectaron con *P. berghei* ANKA y como control se utilizó un grupo sin infección de cada sexo. Los ratones infectados se sacrificaron en el día 8 post-infección, se les extrajo el suero y se cuantificó la concentración de testosterona libre en suero por medio de la técnica de ELISA. Se realizó una ANOVA de una vía y posteriormente la prueba de Tukey, las líneas sobre los histogramas representan diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ), n infectados =7 y n no infectados=5.



## 7.10 Efecto de la testosterona sobre la parasitemia

Debido a que la testosterona tiene actividad supresora (129), también se estudió el efecto de la testosterona ya que es el principal esteroide sexual en los machos sobre las mismas variables que analizamos para el  $17\beta$ -estradiol.

La administración de testosterona a hembras y a machos intactos no modificó la parasitemia (Figura 13A). Administrar testosterona a los machos Gx disminuyó la parasitemia el día 6 post-infección e incrementó la parasitemia los días 7 y 8 post-infección en comparación con los machos Gx tratados con vehículo (Figura 13C). En las hembras disminuyó la parasitemia los días 6 y 8 post-infección en comparación con las hembras Gx tratadas con vehículo (Figura 13D).



**Figura 13. Efecto de la testosterona sobre la parasitemia de ratones machos y hembras infectados con *P. berghei* ANKA.** Grupos de ratones CBA/Ca machos o hembras se separaron en 4 grupos: Grupo 1 ratones que únicamente recibieron vehículo (V); Grupo 2 ratones que se gonadectomizaron y recibieron el vehículo (GxV), Grupo 3 ratones intactos que recibieron testosterona (T); Grupo 4 ratones que se gonadectomizaron y recibieron testosterona (GxT). Los grupos se infectaron con *P. berghei* ANKA y a partir del día 3 post-infección se evaluó la parasitemia. Para el análisis se realizó una ANOVA de dos vías y la prueba de Bonferroni estadístico ( $P \leq 0.05$ ). El símbolo \* representa diferencia estadística entre grupos,  $n=7$ .

### **7.11 Efecto de la testosterona sobre la expresión de IFN- $\gamma$ en bazo y cerebro de ratones infectados con *P. berghei* ANKA**

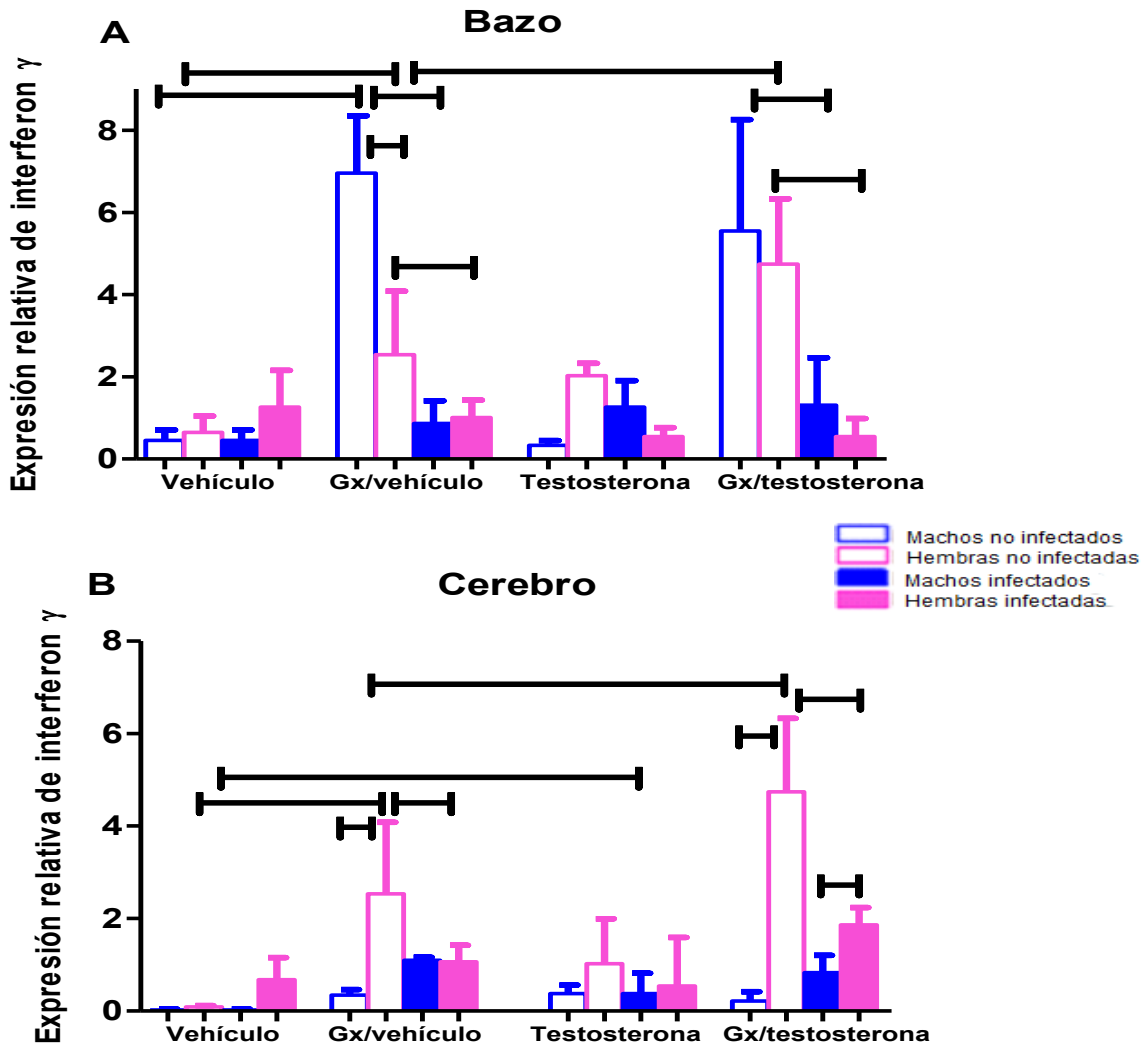
La infección no modificó la expresión de IFN- $\gamma$  en el bazo de machos y hembras intactos (Figura 14A). La gonadectomía incrementó la expresión de INF- $\gamma$  en el bazo de los machos y hembras no infectados en comparación con los machos y hembras intactos no infectados. Las hembras Gx intactas tratadas con vehículo no infectadas tuvieron una mayor expresión relativa de IFN- $\gamma$  en comparación a los machos Gx intactos tratados con vehículo lo que evidencia el dimorfismo sexual (Figura 14A). Administrar testosterona a las hembras Gx no infectados incrementó la expresión de RNAm que codifica para IFN- $\gamma$  en comparación a las hembras Gx tratadas con vehículo. La infección disminuyó la expresión de IFN- $\gamma$  en machos y hembras Gx tratados con vehículo o testosterona, así como en las hembras intactas. Administrar testosterona a las hembras y machos Gx no reconstituyó la expresión de IFN- $\gamma$  (Figura 14A).

En el cerebro, la gonadectomía incrementó la expresión de INF- $\gamma$  de las hembras no infectadas. Las hembras Gx tratadas con vehículo o con testosterona no infectadas presentaron una mayor expresión de IFN- $\gamma$  en cerebro respecto a los machos Gx tratados con vehículo o testosterona no infectados, lo que evidencia la existencia del dimorfismo sexual (Figura 14B).

La infección en las hembras Gx disminuyó la expresión de IFN- $\gamma$ , mientras que en los machos la incrementó (Figura 14B). La administración de testosterona a las hembras intactas o Gx no infectadas incrementó la expresión de INF- $\gamma$  en cerebro en comparación con las hembras intactas o Gx tratadas con vehículo. (Figura 14B).

La administración de testosterona a los machos intactos e infectados incremento la expresión de IFN- $\gamma$  en el cerebro en comparación a los machos intactos e infectados que recibieron vehículo (Figura 14B). Interesantemente, la infección en las hembras Gx reconstituidas con testosterona disminuyó la expresión relativa de IFN- $\gamma$  en comparación con las hembras Gx no infectadas Gx reconstituidas con testosterona. Las hembras Gx tratadas con testosterona e infectadas presentaron una mayor

expresión de IFN- $\gamma$  en comparación con los machos Gx tratados con estradiol e infectados, lo que demuestra la existencia de dimorfismo sexual (Figura 14B).

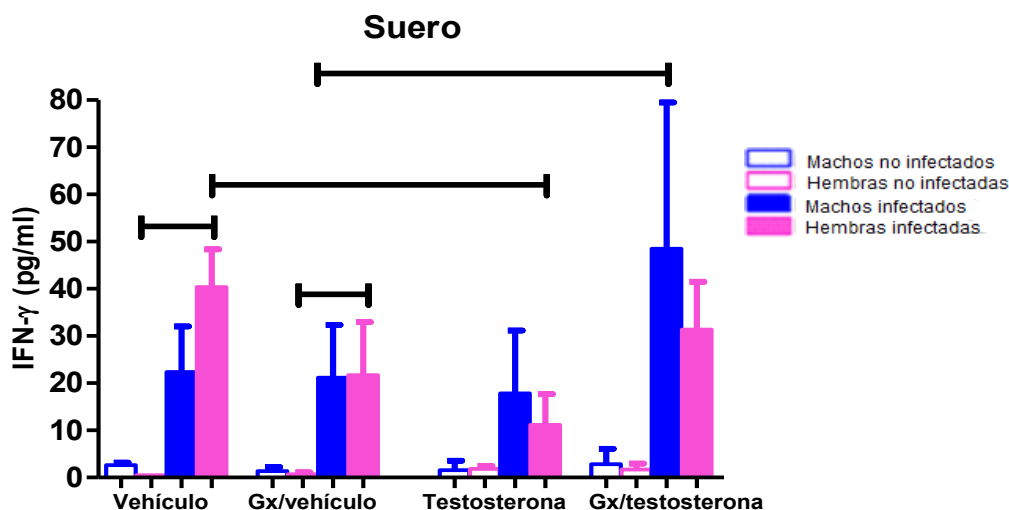


**Figura 14. Efecto de la testosterona sobre la expresión relativa de RNAm que codifica para IFN- $\gamma$  en bazo y cerebro de ratones hembras y machos infectados con *P. berghei* ANKA.** Grupos de ratones CBA/Ca machos o hembras se separaron en 4 grupos: Grupo 1 ratones que únicamente recibieron vehículo (Vehículo); Grupo 2 ratones que se gonadectomizaron y recibieron el vehículo (Gx/vehículo), Grupo 3 ratones intactos que recibieron testosterona (Testosterona); Grupo 4 ratones que se gonadectomizaron y recibieron testosterona (Gx/testosterona). Los grupos se infectaron con *P. berghei* ANKA y como control se utilizó un grupo sin infección. Los ratones infectados se sacrificaron el día 8 post-infección y se extrajeron los tejidos de bazo y cerebro, se les aisló RNAm el cual se retrotranscribió y el DNA complementario obtenido se amplificó para el gen IFN- $\gamma$  mediante PCR tiempo real. En (A) se muestra la expresión relativa de RNAm que codifica para IFN- $\gamma$  con relación a la expresión de  $\beta$ -actina en bazo y en (B) de cerebro. Se realizó una ANOVA de una vía y posteriormente la prueba de Tukey, las líneas sobre los histogramas representan diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ )  $n$  infectados = 7 y  $n$  no infectados = 5.

## 7.12 Efecto de la testosterona sobre la concentración de IFN- $\gamma$ en suero

Para determinar si administrar testosterona modifica la concentración de IFN- $\gamma$  en suero en los ratones infectados con *P. berghei* ANKA, cuantificamos su concentración sérica en todos los grupos estudiados.

La infección con *P. berghei* ANKA incrementó la concentración de IFN- $\gamma$  en suero de machos y hembras intactos y gonadectomizados, sin embargo, el aumento solo fue significativo en las hembras (Figura 15). La gonadectomía no modificó la concentración de IFN- $\gamma$  en los grupos de ratones no infectados. La administración de testosterona a las hembras intactas infectadas disminuyó la concentración de IFN- $\gamma$  en comparación con las hembras intactas e infectadas tratadas con vehículo. La administración de testosterona a machos Gx e infectados incremento la expresión de IFN- $\gamma$  en comparación a machos Gx tratados con vehículo (Figura 15).



**Figura 15. Efecto de la testosterona sobre la concentración de IFN- $\gamma$  en suero de ratones machos y hembras infectados con *P. berghei* ANKA.** Grupos de ratones CBA/Ca machos o hembras se separaron en 4 grupos: Grupo 1 ratones que únicamente recibieron vehículo (Vehículo); Grupo 2 ratones que se gonadectomizaron y recibieron el vehículo (Gx/vehículo), Grupo 3 ratones intactos que recibieron testosterona (Testosterona); Grupo 4 ratones que se gonadectomizaron y recibieron testosterona (Gx/testosterona). Los grupos se infectaron con *P. berghei* ANKA y se utilizaron como controles los respectivos grupos de ratones en las mismas condiciones sin infección. Los ratones infectados se sacrificaron en el día 8 post-infección, se les extrajo el suero y se cuantificó la concentración de IFN- $\gamma$  por medio de citometría de flujo. Las barras azules representan a los grupos de ratones machos y las barras rosas a los grupos de ratones hembras. Se realizó una ANOVA de una vía y posteriormente la prueba de Tukey, las líneas sobre los histogramas representan diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ), n infectados = 7 y n no infectados = 5.

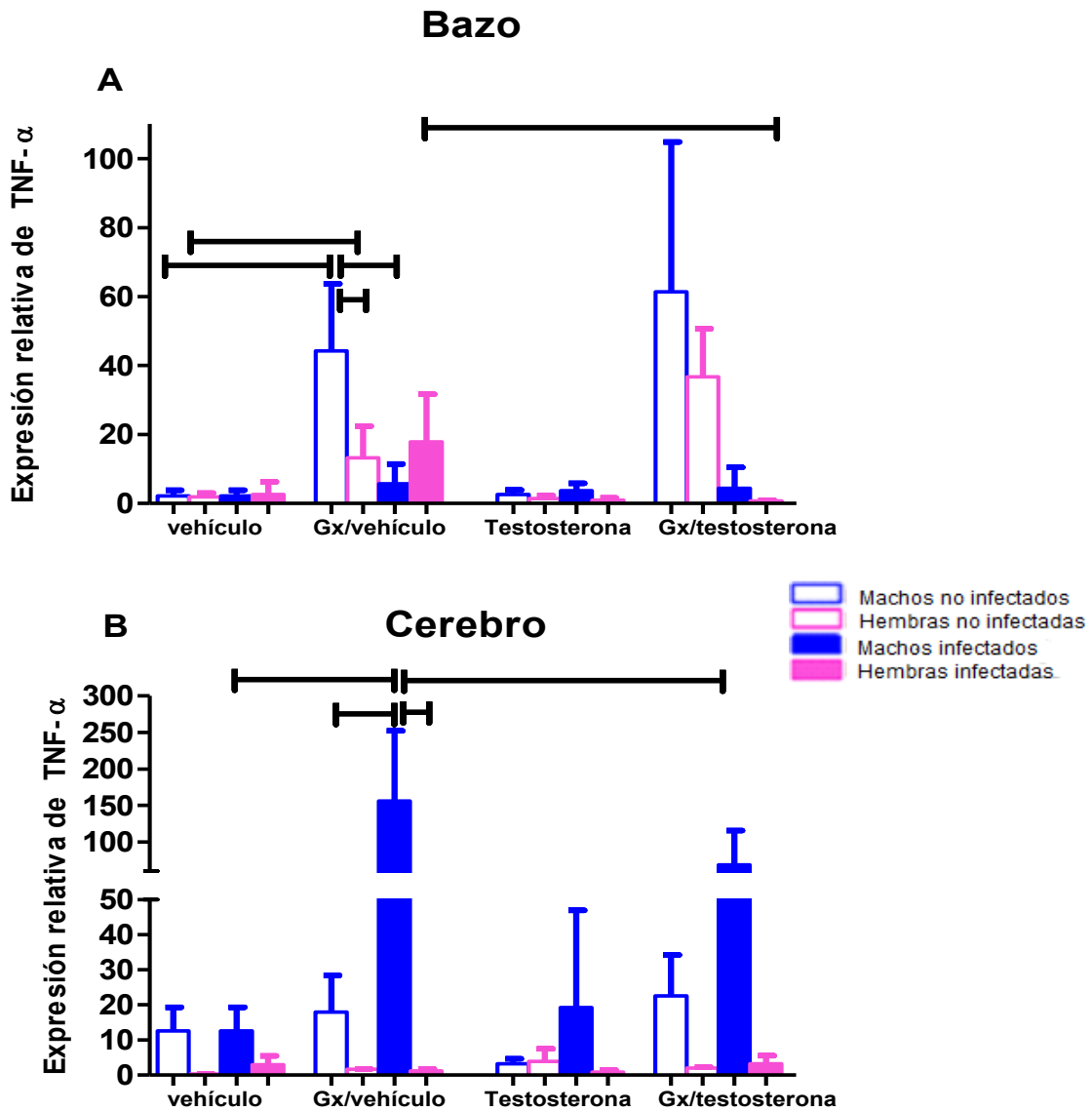
### **7.13 Efecto de la testosterona en la expresión de mRNA TNF- $\alpha$ en bazo y cerebro de ratones infectados con *P. berghei* ANKA**

La infección de las hembras y machos intactos no incrementó la expresión de TNF- $\alpha$  en el bazo. La gonadectomía incrementó la expresión de TNF- $\alpha$  en el bazo de los ratones sin infección. Los machos Gx tratados con vehículo sin infección presentaron una mayor expresión de TNF- $\alpha$  en el bazo respecto a las hembras Gx tratadas con vehículo sin infección (Figura 16A).

La infección en los ratones Gx disminuyó la expresión de TNF- $\alpha$  únicamente en los machos. La administración de testosterona a las hembras Gx e infectadas disminuyó la expresión de TNF- $\alpha$  en comparación con las hembras Gx tratadas con vehículo e infectadas (Figura 16A).

En el cerebro la infección no modificó la expresión de TNF- $\alpha$  en los ratones intactos. Sin embargo, la infección de los ratones machos Gx aumentó significativamente la expresión de TNF- $\alpha$  en el cerebro. Los machos Gx tratados con vehículo o testosterona e infectados presentaron una mayor expresión de TNF- $\alpha$  en comparación con las hembras Gx tratadas con vehículo o testosterona e infectadas, lo que es una evidencia del dimorfismo sexual (Figura 16A y 16B respectivamente).

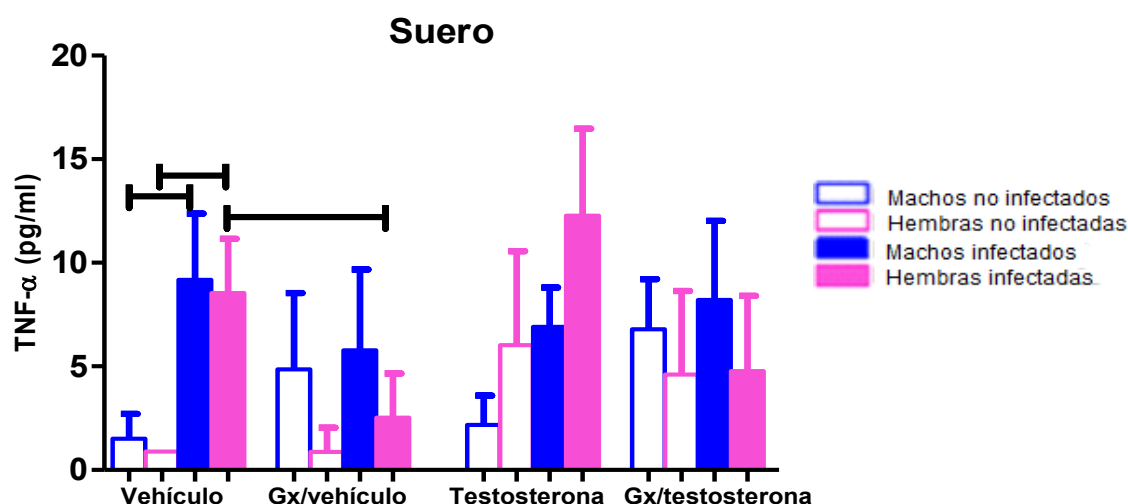
La administración de testosterona a los machos Gx infectados disminuyó la expresión de TNF- $\alpha$  en cerebro en comparación con los machos Gx infectados tratados con vehículo (Figura 16B).



**Figura 16. Efecto de la testosterona sobre la expresión relativa de RNAm que codifica para TNF- $\alpha$  en bazo y cerebro de ratones hembras y machos infectados con *P. berghei* ANKA.** Grupos de ratones CBA/Ca machos o hembras se separaron en 4 grupos: Grupo 1 ratones que únicamente recibieron vehículo (vehículo); Grupo 2 ratones que se gonadectomizaron y recibieron el vehículo (Gx/vehículo), Grupo 3 ratones intactos que recibieron testosterona (Testosterona); Grupo 4 ratones que se gonadectomizaron y recibieron testosterona (Gx/ testosterona). Los grupos se infectaron con *P. berghei* ANKA y como control se utilizó un grupo sin infección para cada sexo. Los ratones infectados se sacrificaron al 8° día post-infección y se obtuvieron los tejidos de bazo y cerebro a los que se les extrajo el RNAm el cual se retrotranscribió y el DNA complementario obtenido se amplificó para el gen TNF- $\alpha$  mediante PCR tiempo real. En (A) se muestra la expresión relativa de RNAm que codifica para TNF- $\alpha$  en bazo y en (B) en cerebro con relación a la expresión de  $\beta$ -actina. Se realizó una ANOVA de una vía y posteriormente la prueba de Tukey, las líneas sobre los histogramas representan diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ), n infectados =7 y n no infectados=5.

### 7.14 Efecto de la testosterona sobre la concentración de TNF- $\alpha$ en suero

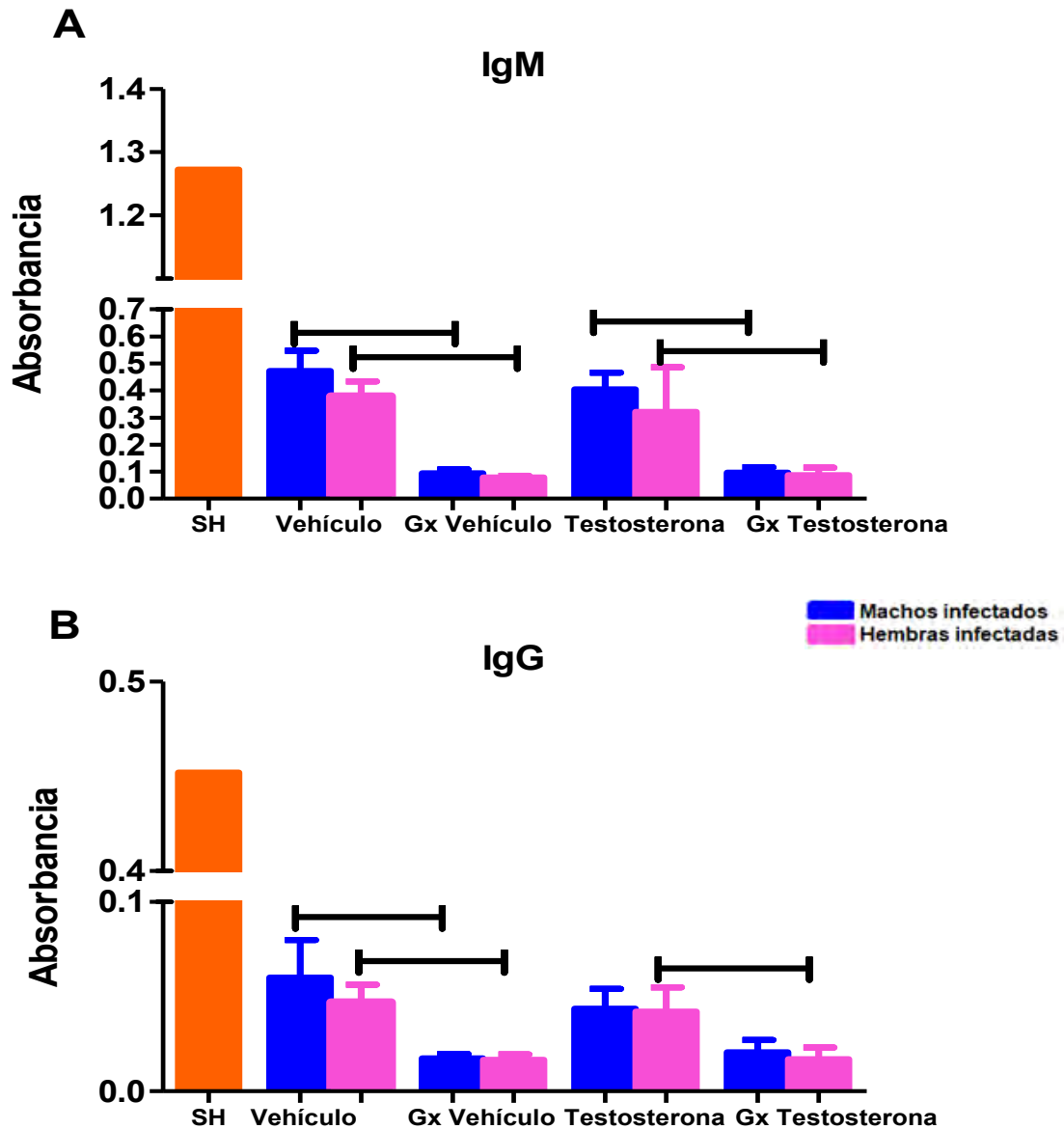
La infección en machos y hembras intactos incrementó la concentración de TNF- $\alpha$  en suero en comparación con los machos y hembras sin infección (Figura 16). La gonadectomía disminuyó la concentración de TNF- $\alpha$  en las hembras intactas. La administración de testosterona a machos y hembras intactos no modificó la concentración de TNF- $\alpha$  en suero en comparación a machos y hembras tratados con vehículo (Figura 16).



**Figura 16. Efecto de la testosterona sobre la concentración de TNF- $\alpha$  en suero de ratones infectados con *P. berghei* ANKA.** Grupos de ratones CBA/Ca machos y hembras se separaron en 4 grupos: Grupo 1 ratones que únicamente recibieron vehículo (Vehículo); Grupo 2 ratones que se gonadectomizaron y recibieron vehículo (Gx/vehículo); Grupo 3 ratones intactos que recibieron testosterona (Testosterona); Grupo 4 ratones que se gonadectomizaron y que recibieron testosterona (Gx/testosterona). Los ratones infectados se sacrificaron en el día 8 post-infección, se les extrajo el suero y se cuantificó la concentración de TNF- $\alpha$  por citometría de flujo. Las barras azules representan a los grupos de ratones machos y las barras rosas a los grupos de ratones hembras. Se realizó una ANOVA de una vía y posteriormente la prueba de Tukey, las líneas sobre los histogramas representan diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ), n infectados =7 y n no infectados=5.

### 7.15 Efecto de la administración testosterona sobre la concentración de IgG totales e IgM en suero

Los ratones Gx presentaron una menor concentración de IgG e IgM en comparación con los ratones intactos (Figura 17A y 17B). Administrar testosterona no modificó la concentración de IgG o IgM en los ratones machos y hembras intactos en comparación con los grupos tratados con vehículo.



**Figura 17. Efecto de administrar testosterona sobre la concentración de anticuerpos IgG e IgM en suero de ratones infectados con *P. berghei* ANKA.** Grupos de ratones CBA/Ca machos y hembras se separaron en 6 grupos: Grupo 1, ratones que recibieron vehículo (Vehículo); Grupo 2 ratones que se gonadectomizaron, recibieron el vehículo (Gx vehículo); Grupo 3 ratones intactos que recibieron testosterona (Testosterona) y Grupo 4 ratones que se gonadectomizaron y que recibieron testosterona (Gx testosterona); adicionalmente incluimos un grupo control positivo correspondiente a suero hiperinmune. Los ratones infectados se sacrificaron en el día 8 post-infección, se les extrajo el suero y se cuantificó la concentración de IgG totales e IgM en suero por medio de la técnica de ELISA. Se realizó una ANOVA de una vía y posteriormente la prueba de Tukey, las líneas sobre los histogramas representan diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ),  $n=7$ .

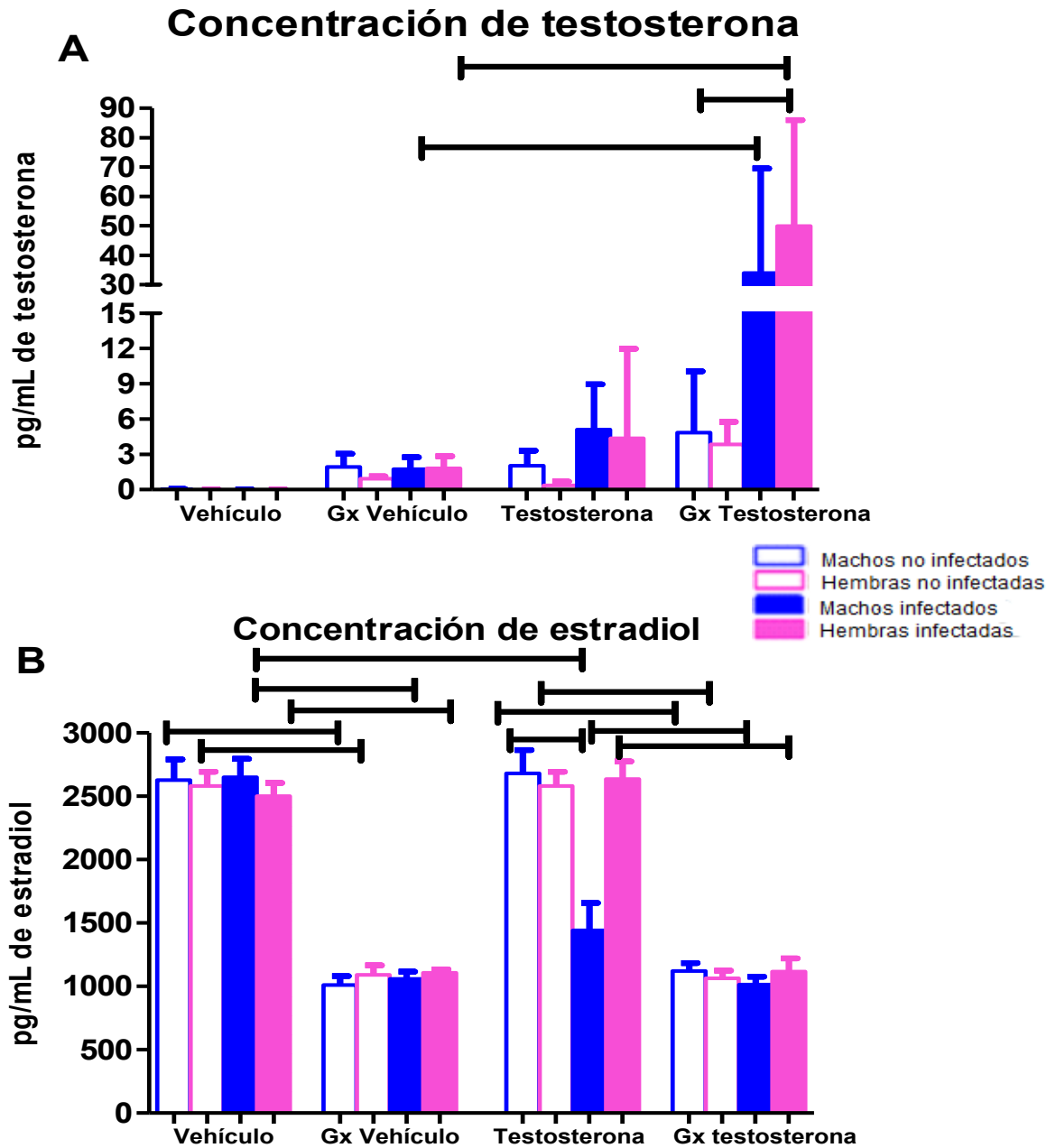


### **7.16 Efecto de administrar testosterona sobre la concentración de esteroides sexuales en suero**

La infección no modificó la concentración de testosterona en machos y hembras. La administración de testosterona a los ratones Gx incrementó su concentración en suero en ambos sexos en comparación con los ratones Gx tratados con vehículo (Figura 18A).

La gonadectomía disminuyó la concentración de  $17\beta$ -estradiol en machos y hembras. Administrar testosterona a las hembras intactas infectadas o sin infección no modificó la concentración de estradiol respecto a las hembras tratadas con vehículo. Interesantemente, la administración de testosterona en los machos intactos infectados disminuyó la concentración de  $17\beta$ -estradiol en comparación a los machos intactos infectados administrados con testosterona (Figura 18B).

La reconstitución con testosterona de los ratones Gx no modificó la concentración de  $17\beta$ -estradiol en comparación de los ratones Gx tratados con vehículo (Figura 18A).



**Figura 18. Efecto de administrar testosterona sobre la concentración de testosterona y estradiol en suero de ratones infectados con *P. berghei* ANKA.** Grupos de ratones CBA/Ca machos o hembras se separaron en 4 grupos: Grupo 1 ratones que únicamente recibieron vehículo (Vehículo); Grupo 2 ratones que se gonadectomizaron y recibieron el vehículo (Gx vehículo), Grupo 3 ratones intactos que recibieron testosterona (Testosterona); Grupo 4 ratones que se gonadectomizaron y recibieron testosterona (Gx testosterona). Los grupos se infectaron con *P. berghei* ANKA y como control se contó con un grupo sin infección. Los ratones infectados se sacrificaron en el día 8 post-infección, y se les extrajo el suero y se cuantificó la concentración de testosterona libre en suero por medio de la técnica de ELISA. Se realizó una ANOVA de una vía y posteriormente la prueba de Tukey, las líneas sobre los histogramas representan diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ), n infectados = 7 y n no infectados = 5.

## 8 Discusión

En este trabajo estudiamos si el  $17\beta$ -estradiol y la testosterona son responsables del dimorfismo sexual en malaria. Para ello reconstituimos ratones Gx únicamente con  $17\beta$ -estradiol o con testosterona, además administramos esos esteroides a ratones intactos machos y hembras y analizamos su efecto sobre la expresión de  $INF-\gamma$  y  $TNF-\alpha$  en el bazo y cerebro de ratones infectados con *P. berghei* ANKA. Ambas citocinas están involucradas directamente en la eliminación del parásito y en la patología de la enfermedad (80).

Administrar  $17\beta$ -estradiol a las hembras Gx disminuyó la parasitemia en comparación con las hembras Gx tratadas con vehículo (Figura 6), lo anterior sugiere que el  $17\beta$ -estradiol participa en los mecanismos de eliminación del parásito. Probablemente el  $17\beta$ -estradiol favoreció el desarrollo y la respuesta de las células dendríticas lo que activo a las células T  $CD4+$  (130) y por lo tanto a los macrófagos vía las citocinas pro-inflamatorias  $TNF-\alpha$  e  $INF-\gamma$  como lo describe Riches et al (131).

Se ha descrito que el  $17\beta$ -estradiol aumenta la actividad de las células T  $CD4+$  y NK, ambas estirpes celulares sintetizan  $INF-\gamma$ , que aumenta la actividad citotóxica de las células NK y la fagocitosis de los macrófagos (132) lo que probablemente promovió la eliminación del parásito.

La administración de  $17\beta$ -estradiol a las hembras Gx incrementó la expresión de  $INF-\gamma$  en cerebro en comparación con las hembras Gx tratadas con vehículo lo que demuestra su participación en la expresión de  $INF-\gamma$ .

Administrar  $17\beta$ -estradiol a las hembras intactas infectadas no modificó la expresión de  $INF-\gamma$  en bazo, probablemente el  $17\beta$ -estradiol presente en las hembras intactas compite por la unión a los receptores para estrógenos con el  $17\beta$ -estradiol administrado.

Las diferencias en la expresión de  $INF-\gamma$  entre las hembras Gx reconstituidas con  $17\beta$ -estradiol y las hembras intactas (Figura 7B) pueden deberse a que la expresión

de esta citocina es diferente en cada tejido. Además, en las gónadas se sintetizan otras hormonas como la progesterona que suprimen la expresión de IFN- $\gamma$  a través de inducir la hipermetilación del gen (91).

El 17 $\beta$ -estradiol disminuyó la expresión de IFN- $\gamma$  en cerebro de los machos Gx respecto los grupos tratados con vehículo, una explicación es que el 17 $\beta$ -estradiol inhiba la actividad de P65 un factor de transcripción pro-inflamatorio como lo describe Ghisletti S et al. (133).

El 17 $\beta$ -estradiol incrementó la expresión de IFN- $\gamma$  en el cerebro de los machos intactos (Figura 7B), una posible explicación es que el 17 $\beta$ -estradiol potencie el incremento de la respuesta inmune en el cerebro como lo describe Soucy G et al. (134).

El 17 $\beta$ -estradiol moduló la respuesta proinflamatoria de los machos, sin embargo, el efecto del 17 $\beta$ -estradiol difirió entre ambos sexos lo que podría explicar al menos en parte el dimorfismo sexual en malaria.

Dado que la expresión del RNA mensajero que codifica para un gen no necesariamente refleja la concentración de la proteína en circulación, cuantificamos la concentración de IFN- $\gamma$  en el suero de todos los grupos tratados con 17 $\beta$ -estradiol

Interesantemente, los resultados de expresión de IFN- $\gamma$  (Figura 7) corresponden con la concentración de esta citocina en suero (Figura 8). Sin embargo, el reconstituir a las hembras Gx únicamente con 17 $\beta$ -estradiol incrementó significativamente la expresión de IFN- $\gamma$  en el cerebro (Figura 7B) diferencia que no se detectó en la concentración sérica en el grupo de hembras Gx. Una probable explicación es que la síntesis de IFN- $\gamma$  también este bajo la regulación de otras hormonas producidas en las gónadas como progesterona (135). Otra posibilidad es que el 17 $\beta$ -estradiol modula de forma distinta la síntesis de IFN- $\gamma$  en cada tejido (136).

El administrar 17 $\beta$ -estradiol disminuyó la concentración de IFN- $\gamma$  en las hembras intactas. Una probable explicación es que los factores de transcripción como NF-kB

involucrados en la síntesis de IFN- $\gamma$  disminuyen como consecuencia del incremento de 17 $\beta$ -estradiol (137).

Los resultados de la concentración de IFN- $\gamma$  en suero contrastan con los de expresión de RNA mensajero en el bazo porque la infección no incrementó la expresión de IFN- $\gamma$  en los ratones intactos o gonadectomizados. Es probable que en el día 8 post-infección se haya suprimido la expresión de RNAm que codifica para IFN- $\gamma$  debido a la acción de mecanismos reguladores que suprimen su expresión una vez que se alcanzó una elevada concentración de la proteína como lo describen Hodge *et al.* (138).

La administración de 17 $\beta$ -estradiol a las hembras intactas o Gx no modificó la expresión de TNF- $\alpha$  de bazo ni de cerebro. Por el contrario, el administrar 17 $\beta$ -estradiol incrementó la expresión de TNF- $\alpha$  en cerebro de los machos gonadectomizados, lo que contrasta con sus propiedades anti-inflamatorias (139).

La expresión de TNF- $\alpha$  en cerebro fue significativamente mayor en los machos que en las hembras (Figura 8B), lo que corrobora el dimorfismo sexual y ese incremento podría al menos en parte explicar la mayor mortalidad de los machos con respecto a las hembras, dado que el incremento de TNF- $\alpha$  está asociado con el desarrollo de malaria cerebral (128).

Debido a que la expresión de RNA mensajero no necesariamente corresponde con la concentración de la proteína (140) se cuantificó la concentración de TNF- $\alpha$  en el suero de los ratones de todos los grupos estudiados.

La administración de 17 $\beta$ -estradiol moduló negativamente la concentración de TNF- $\alpha$  en suero en las hembras intactas infectadas, lo que evidenció el dimorfismo sexual, lo que corrobora lo descrito por Pacifici R. *et al* quienes reportaron que el 17 $\beta$ -estradiol disminuye la síntesis de TNF- $\alpha$  (65). Una posible explicación es que el 17 $\beta$ -estradiol incrementa la expresión del receptor TNF1 como lo describe Zaldivar V. *et al.* (141) lo que disminuiría la concentración de TNF- $\alpha$  libre en suero.

La concentración de TNF- $\alpha$  en suero de los grupos intactos difiere con la expresión génica de TNF- $\alpha$  en bazo, una posible explicación son los cambios en el procesamiento post-transcripcional como la proteína TTP implicada en la estabilidad del RNAm que codifica para TNF- $\alpha$  o la regulación de la vía de MAPK (140).

Debido a que los anticuerpos específicos contra el parásito son responsables de completar la eliminación del *Plasmodium*, en este trabajo analizamos el efecto del 17 $\beta$ -estradiol sobre la concentración de anticuerpos IgG e IgM

La gonadectomía de machos y hembras disminuyó significativamente la concentración de IgG en suero en ambos sexos, este hallazgo sugiere que las hormonas que se producen en las gónadas modulan la síntesis de anticuerpos.

La disminución de la concentración de anticuerpos IgG en ausencia de gónadas contrasta con los antecedentes de nuestro grupo de investigación donde la gonadectomía en hembras incrementó la concentración de IgG totales (120). Una posible explicación es que el experimento anterior se tomó la muestra de suero el día 9 post infección y en este experimento fue el día 8, lo que pudo haber generado mayor estimulación antigénica en el primer experimento que en el presente trabajo. Otra explicación podría ser que en el presente experimento los ratones Gx presentaron una menor concentración de IL-10 que en nuestros antecedentes (resultado no mostrado), y la IL-10 favorece la diferenciación de células B a células plasmáticas (142).

La administración de 17 $\beta$ -estradiol no modificó la concentración de IgG en suero en el día 8 post infección. El incremento de la concentración de IgM mediado por estradiol en machos Gx corrobora los resultados de Erlandsson MC *et al.*, quienes describieron que el estradiol es necesario para la síntesis de anticuerpos IgM (143), el 17 $\beta$ -estradiol promueve la maduración de células B (62). Una posible explicación es que el 17 $\beta$ -estradiol afecta de manera diferente a ambos sexos.

La disminución de IgM mediada por el estradiol podría agravar la enfermedad, ya que la IgM incrementa la generación de células inmunes de memoria contra *Plasmodium* (106).

Debido a que las concentraciones de esteroides sexuales están sumamente reguladas en el organismo (144), en este trabajo cuantificamos la concentración de  $17\beta$ -estradiol libre en suero de todos los grupos de ratones estudiados

La administración de  $17\beta$ -estradiol a hembras intactas o Gx no modificó la concentración del esteroide en suero en las hembras intactas es probable que se disparen mecanismos de regulación negativa y se inhiba su síntesis (145), no obstante este argumento no aplica a las hembras Gx ya que no producen el esteroide en las gónadas y administrarles  $17\beta$ -estradiol no modificó su concentración, una probable explicación es que el esteroide esté unido a sus receptores y por ello no detectamos un incremento en su concentración en el suero. Por el contrario, la administración  $17\beta$ -estradiol modificó la expresión y concentración en suero de las citocinas TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Lo anterior sugiere que, aunque no encontramos cambios en la concentración de estradiol efectivamente existe una modulación de  $17\beta$ -estradiol sobre la respuesta pro-inflamatoria especialmente en cerebro. Una posible explicación a las diferencias es que la concentración de  $17\beta$ -estradiol en cerebro puede diferir de la concentración en  $17\beta$ -estradiol suero como lo describen Hoyo *et al.* (146).

Contrario a lo esperado la administración de estradiol a machos intactos infectados disminuyó la concentración del estradiol en suero, una posible explicación es que administrar  $17\beta$ -estradiol provoque la activación de mecanismos reguladores que disminuyan la concentración de  $17\beta$ -estradiol o bien que se una a sus receptores y que entonces su concentración libre en suero disminuya.

La testosterona es un esteroide que participa en la modulación del sistema inmune sin embargo su participación en la respuesta inmune contra *Plasmodium* ha sido poco estudiada.

La gonadectomía en los machos no modificó la parasitemia. Contrario a lo esperado, las hembras Gx tratadas con testosterona disminuyeron su parasitemia respecto a las hembras Gx que recibieron vehículo (Figura 13D), una probable explicación es que la testosterona se transforme en  $17\beta$ -estradiol (60) lo que podría contribuir a una menor parasitemia ya que se ha reportado que la testosterona puede

transformarse a  $17\beta$ -estradiol en sitios extragonadales como el tejido adiposo el bazo, el cerebro y glándulas suprarrenales (147).

Administrar testosterona indujo un incremento en la parasitemia de los machos Gx en comparación con los machos Gx tratados con vehículo (Figura 13C) una probable explicación es que la testosterona genero inmunosupresión como lo describen Lotter *et al.* (148) y confirma los resultados de Krucken, *et al.*, quienes describieron que la testosterona aumenta la mortalidad en ratones infectados con *Plasmodium chabaudi* (125).

La gonadectomía en ratones machos incrementó la expresión de IFN- $\gamma$  en cerebro (Figura 13B) una posible explicación es que al disminuir la síntesis de testosterona disminuyeran sus propiedades inmunosupresoras (149).

La infección o la administración de testosterona no modificaron la expresión de INF- $\gamma$  en bazo de los ratones infectados con *P. berghei* ANKA. Sin embargo, la administración de testosterona a las hembras no infectadas aumentó la expresión de IFN- $\gamma$  en cerebro lo que sugiere que la testosterona modula la expresión de IFN- $\gamma$  diferencialmente de acuerdo con el tejido analizado.

La administración de testosterona incrementó la expresión de IFN- $\gamma$  en cerebro de los machos intactos comparado con los machos tratados con vehículo (Figura 14B) lo que contrasta con lo descrito por Lotter H. *et al* quienes reportaron que la testosterona suprime la síntesis de IFN- $\gamma$  (148). Dado que IFN- $\gamma$  en cerebro se relaciona con las complicaciones como la MC (150) su incremento explicaría en parte el dimorfismo sexual y la mayor mortandad en los machos infectados con *Plasmodium*.

Interesantemente, la administración de testosterona a los machos intactos y la gonadectomía no presentaron efectos contrarios sobre la expresión de IFN- $\gamma$  en cerebro. Una explicación es que los efectos de la testosterona en la respuesta inmune del cerebro dependen de su concentración tal como lo describen Tripathi *et al* (151).



Debido a que la expresión de RNAm y la concentración de una proteína pueden no corresponder, también cuantificamos la concentración de IFN- $\gamma$  en suero. La concentración de IFN- $\gamma$  incrementó con la infección, pero no modificó la expresión de IFN- $\gamma$  en bazo, una posible explicación es que la expresión de IFN- $\gamma$  disminuyera para evitar el daño al organismo por la respuesta proinflamatoria (123). No obstante, también se han descrito modificaciones en la concentración de IFN- $\gamma$  sin que detecten cambios relevantes en la expresión de IFN- $\gamma$  (138).

La administración con testosterona a los machos Gx incrementó la concentración de IFN- $\gamma$  en suero lo que contrasta con su actividad inmunosupresora, una posible explicación es el incremento de la parasitemia en este grupo lo cual causaría un incremento de IFN- $\gamma$ . El incremento de la concentración de IFN- $\gamma$  mediado por la testosterona explicaría en parte la mayor mortandad del sexo masculino, ya que la respuesta pro-inflamatoria puede incrementar la mortalidad en infecciones con *Plasmodium* (152).

La administración de testosterona a las hembras intactas e infectadas disminuyó la expresión de IFN- $\gamma$  en comparación con los grupos tratados con vehículo lo que confirma las propiedades antiinflamatorias de la testosterona descritas por Lotter *et al* (148).

La administración de testosterona a las hembras Gx disminuyó la expresión de TNF- $\alpha$  en bazo en comparación con las hembras Gx tratadas con vehículo (Figura 15A) una posible explicación es que la testosterona suprime la síntesis (153) así como inhiba la respuesta de los macrófagos (154) quienes son los principales productores de TNF- $\alpha$  como lo describen Friedl *et al.* (154).

La administración de testosterona a los machos Gx e infectados disminuyó la expresión de TNF- $\alpha$  en cerebro, lo que contrasta con los estudios de Posma *et al* quienes describieron que la testosterona a concentración fisiológica no afecta la síntesis de TNF- $\alpha$  *in vitro* (74). Una posible explicación es que la testosterona disminuye la actividad de la microglía (células del cerebro que sintetizan TNF- $\alpha$ ) como lo describen Barreto G. *et al.* (155).

Interesantemente, al comparar la expresión de machos y hembras infectados encontramos que la expresión de TNF- $\alpha$  en cerebro fue mayor en machos que en hembras lo que podría explicar al menos en parte la mayor mortalidad de los machos, vía el desarrollo de malaria cerebral (128).

Debido a que la expresión y la concentración de una proteína pueden variar cuantificamos la concentración de TNF- $\alpha$  en suero. La administración con testosterona a los ratones machos Gx no modificó la concentración de TNF- $\alpha$  en suero ni la expresión de TNF- $\alpha$  en bazo, pero si en cerebro. Debido a que la testosterona solo tuvo efecto en cerebro es probable que la síntesis de TNF- $\alpha$  en este tejido no modifique la concentración de TNF- $\alpha$  en suero significativamente.

Una parte importante de la respuesta inmune son los anticuerpos IgG por lo anterior analizamos el efecto de la testosterona sobre la concentración de IgG e IgM en suero. La gonadectomía en los machos disminuyó la concentración de anticuerpos IgG e IgM (Figura 18A y 18B) lo que demuestra que las hormonas sexuales masculinas intervienen en modular la síntesis de anticuerpos contra *Plasmodium* y contrasta con los estudios de Eidinger D. *et al* quienes reportaron que la gonadectomía en machos inmunizados incrementa la concentración de IgM (156).

Ese resultado podría deberse a la concentración de hormonas sexuales en suero por lo que para conocer si la administración de testosterona modificaba la concentración sérica de esteroides cuantificamos la concentración de testosterona y estradiol en suero, encontramos que la administración de testosterona a los ratones intactos y Gx incrementó su concentración en comparación con los grupos tratados con vehículo (Figura 19), la concentración de testosterona en ratones Gx infectados fue mayor que en los ratones intactos. Dado que la testosterona posee propiedades inmunosupresoras podría disminuir la síntesis de anticuerpos IgG como lo describieron Kanda *et al* (76), lo que explicaría la razón de que los grupos de ratones Gx presentaron una menor concentración de anticuerpos IgG.

## 9 Conclusiones

El  $17\beta$ -estradiol disminuyó la concentración de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en suero en hembras intactas, mientras que en las hembras Gx favoreció la expresión de IFN- $\gamma$  en cerebro y la eliminación del parásito. En los machos Gx el  $17\beta$ -estradiol promovió la expresión TNF- $\alpha$  en el cerebro.

La testosterona incrementó la expresión de IFN- $\gamma$  en cerebro en los machos intactos, mientras que en los machos Gx la testosterona incrementó la parasitemia, la mayor concentración de IFN- $\gamma$  en suero y estimuló la disminución de TNF- $\alpha$  en bazo.

$17\beta$ -estradiol moduló la expresión de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en cerebro en ambos sexos lo que podría indicar su gran relevancia en el dimorfismo sexual.

## 11 Perspectivas del trabajo

Analizar el efecto del  $17\beta$ -estradiol y de la testosterona sobre: a) las citocinas anti-inflamatorias IL-10 y TGF- $\beta$ , b) cuantificar la expresión de los receptores de estrógenos y andrógenos en bazo y cerebro, c) evaluar el efecto del  $17\beta$ -estradiol y la testosterona sobre las poblaciones de linfocitos T, B, células NK y macrófagos en el bazo para así conocer el efecto de ambas hormonas sobre la respuesta inmune contra *Plasmodium*.

## 12 Bibliografia

1. Organization WH. World malaria report 2015: World Health Organization; 2016.
2. Hunt NH, Golenser J, Chan-Ling T, Parekh S, Rae C, Potter S, et al. Immunopathogenesis of cerebral malaria. *International journal for parasitology*. 2006;36(5):569-82.
3. Grau GE, Heremans H, Piguët PF, Pointaire P, Lambert PH, Billiau A, et al. Monoclonal antibody against interferon gamma can prevent experimental cerebral malaria and its associated overproduction of tumor necrosis factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86(14):5572-4.
4. Yanez DM, Manning DD, Cooley AJ, Weidanz WP, van der Heyde HC. Participation of lymphocyte subpopulations in the pathogenesis of experimental murine cerebral malaria. *Journal of immunology*. 1996;157(4):1620-4.
5. Amani V, Vigario AM, Belnoue E, Marussig M, Fonseca L, Mazier D, et al. Involvement of IFN-gamma receptor-mediated signaling in pathology and anti-malarial immunity induced by *Plasmodium berghei* infection. *European journal of immunology*. 2000;30(6):1646-55.
6. Pathak S, Rege M, Gogtay NJ, Aigal U, Sharma SK, Valecha N, et al. Age-dependent sex bias in clinical malarial disease in hypoendemic regions. *PloS one*. 2012;7(4):e35592.
7. Moon JJ, Cho SY. Incidence patterns of vivax malaria in civilians residing in a high-risk county of Kyonggi-do (province), Republic of Korea. *The Korean journal of parasitology*. 2001;39(4):293-9.
8. Benten WP, Ulrich P, Kuhn-Velten WN, Vohr HW, Wunderlich F. Testosterone-induced susceptibility to *Plasmodium chabaudi* malaria: persistence after withdrawal of testosterone. *The Journal of endocrinology*. 1997;153(2):275-81.
9. WHO. World malaria report 2017. Geneva: World Health Organization: 2017.
10. Haldar K, Mohandas N. Malaria, erythrocytic infection, and anemia. *Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2009:87-93.
11. Cowman AF, Berry D, Baum J. The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *The Journal of cell biology*. 2012;198(6):961-71.
12. Chotivanich K, Udomsangpetch R, McGready R, Proux S, Newton P, Pukrittayakamee S, et al. Central role of the spleen in malaria parasite clearance. *The Journal of infectious diseases*. 2002;185(10):1538-41.
13. Alves HJ, Weidanz W, Weiss L. The spleen in murine *Plasmodium chabaudi* adami malaria: stromal cells, T lymphocytes, and hematopoiesis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1996;55(4):370-8.
14. Weiss L, Geduldig U, Weidanz W. Mechanisms of splenic control of murine malaria: reticular cell activation and the development of a blood-spleen barrier. *The American journal of anatomy*. 1986;176(3):251-85.
15. Muxel SM, Freitas do Rosario AP, Zago CA, Castillo-Mendez SI, Sardinha LR, Rodriguez-Malaga SM, et al. The spleen CD4+ T cell response to blood-stage *Plasmodium chabaudi* malaria develops in two phases characterized by different properties. *PloS one*. 2011;6(7):e22434.
16. Matyszak MK. Inflammation in the CNS: balance between immunological privilege and immune responses. *Progress in neurobiology*. 1998;56(1):19-35.
17. Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*. 2008;57(2):178-201.
18. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*. 2005;308(5726):1314-8.
19. Adukpo S, Kusi KA, Ofori MF, Tetteh JK, Amoako-Sakyi D, Goka BQ, et al. High plasma levels of soluble intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 are associated with cerebral malaria. *PloS one*. 2013;8(12):e84181.

20. Campanella GS, Tager AM, El Khoury JK, Thomas SY, Abrazinski TA, Manice LA, et al. Chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9 and CXCL10 are required for the development of murine cerebral malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(12):4814-9.
21. Cabrales P, Martins YC, Ong PK, Zanini GM, Frangos JA, Carvalho LJ. Cerebral tissue oxygenation impairment during experimental cerebral malaria. *Virulence*. 2013;4(8):686-97.
22. Brown H, Hien TT, Day N, Mai NT, Chuong LV, Chau TT, et al. Evidence of blood-brain barrier dysfunction in human cerebral malaria. *Neuropathology and applied neurobiology*. 1999;25(4):331-40.
23. Brown H, Rogerson S, Taylor T, Tembo M, Mwenechanya J, Molyneux M, et al. Blood-brain barrier function in cerebral malaria in Malawian children. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2001;64(3-4):207-13.
24. Mishra SK, Newton CR. Diagnosis and management of the neurological complications of falciparum malaria. *Nature reviews Neurology*. 2009;5(4):189-98.
25. Frevert U, Nacer A, Cabrera M, Movila A, Leberl M. Imaging Plasmodium immunobiology in the liver, brain, and lung. *Parasitology international*. 2014;63(1):171-86.
26. Villegas-Mendez A, Shaw TN, Inkson CA, Strangward P, de Souza JB, Couper KN. Parasite-Specific CD4(+) IFN- $\gamma$ (+) IL-10(+) T Cells Distribute within Both Lymphoid and Nonlymphoid Compartments and Are Controlled Systemically by Interleukin-27 and ICOS during Blood-Stage Malaria Infection. *Infect Immun*. 2016;84(1):34-46.
27. Overstreet MG, Chen YC, Cockburn IA, Tse SW, Zavala F. CD4+ T cells modulate expansion and survival but not functional properties of effector and memory CD8+ T cells induced by malaria sporozoites. *PloS one*. 2011;6(1):e15948.
28. Xu H, Wipasa J, Yan H, Zeng M, Makobongo MO, Finkelman FD, et al. The mechanism and significance of deletion of parasite-specific CD4(+) T cells in malaria infection. *The Journal of experimental medicine*. 2002;195(7):881-92.
29. Weiss WR, Sedegah M, Beaudoin RL, Miller LH, Good MF. CD8+ T cells (cytotoxic/suppressors) are required for protection in mice immunized with malaria sporozoites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(2):573-6.
30. Schofield L, Villaquiran J, Ferreira A, Schellekens H, Nussenzweig R, Nussenzweig V. Gamma interferon, CD8+ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites. *Nature*. 1987;330(6149):664-6.
31. Jobe O, Donofrio G, Sun G, Liepinsh D, Schwenk R, Krzych U. Immunization with radiation-attenuated Plasmodium berghei sporozoites induces liver cCD8 $\alpha$ +DC that activate CD8+T cells against liver-stage malaria. *PloS one*. 2009;4(4):e5075.
32. Vinetz JM, Kumar S, Good MF, Fowlkes BJ, Berzofsky JA, Miller LH. Adoptive transfer of CD8+ T cells from immune animals does not transfer immunity to blood stage Plasmodium yoelii malaria. *Journal of immunology*. 1990;144(3):1069-74.
33. Legorreta-Herrera M, Rivas-Contreras S, Ventura-Gallegos J, Zentella-Dehesa A. Nitric oxide is involved in the upregulation of IFN-gamma and IL-10 mRNA expression by CD8(+) T cells during the blood stages of P. chabaudi AS infection in CBA/Ca mice. *International journal of biological sciences*. 2011;7(9):1401-11.
34. Amante FH, Stanley AC, Randall LM, Zhou Y, Haque A, McSweeney K, et al. A role for natural regulatory T cells in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *The American journal of pathology*. 2007;171(2):548-59.

35. Couper KN, Blount DG, Wilson MS, Hafalla JC, Belkaid Y, Kamanaka M, et al. IL-10 from CD4CD25Foxp3CD127 adaptive regulatory T cells modulates parasite clearance and pathology during malaria infection. *PLoS pathogens*. 2008;4(2):e1000004.
36. Mohan K, Moulin P, Stevenson MM. Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. *Journal of immunology*. 1997;159(10):4990-8.
37. Chen Q, Amaladoss A, Ye W, Liu M, Dummler S, Kong F, et al. Human natural killer cells control *Plasmodium falciparum* infection by eliminating infected red blood cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(4):1479-84.
38. Couper KN, Blount DG, Hafalla JC, van Rooijen N, de Souza JB, Riley EM. Macrophage-mediated but gamma interferon-independent innate immune responses control the primary wave of *Plasmodium yoelii* parasitemia. *Infect Immun*. 2007;75(12):5806-18.
39. Sam H, Stevenson MM. Early IL-12 p70, but not p40, production by splenic macrophages correlates with host resistance to blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS malaria. *Clinical and experimental immunology*. 1999;117(2):343-9.
40. Coquerelle C, Moser M. DC subsets in positive and negative regulation of immunity. *Immunological reviews*. 2010;234(1):317-34.
41. Urban BC, Cordery D, Shafi MJ, Bull PC, Newbold CI, Williams TN, et al. The frequency of BDCA3-positive dendritic cells is increased in the peripheral circulation of Kenyan children with severe malaria. *Infect Immun*. 2006;74(12):6700-6.
42. Bettiol E, Carapau D, Galan-Rodriguez C, Ocana-Morgner C, Rodriguez A. Dual effect of *Plasmodium*-infected erythrocytes on dendritic cell maturation. *Malaria journal*. 2010;9:64.
43. Ocana-Morgner C, Mota MM, Rodriguez A. Malaria blood stage suppression of liver stage immunity by dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*. 2003;197(2):143-51.
44. Courtin D, Oesterholt M, Huismans H, Kusi K, Milet J, Badaut C, et al. The quantity and quality of African children's IgG responses to merozoite surface antigens reflect protection against *Plasmodium falciparum* malaria. *PloS one*. 2009;4(10):e7590.
45. Weiss GE, Traore B, Kayentao K, Ongoiba A, Doumbo S, Doumtabe D, et al. The *Plasmodium falciparum*-specific human memory B cell compartment expands gradually with repeated malaria infections. *PLoS pathogens*. 2010;6(5):e1000912.
46. Sternberg EM, Hill JM, Chrousos GP, Kamilaris T, Listwak SJ, Gold PW, et al. Inflammatory mediator-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation is defective in streptococcal cell wall arthritis-susceptible Lewis rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86(7):2374-8.
47. Millet I, Phillips RJ, Sherwin RS, Ghosh S, Voll RE, Flavell RA, et al. Inhibition of NF-kappaB activity and enhancement of apoptosis by the neuropeptide calcitonin gene-related peptide. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(20):15114-21.
48. Fox SI. *Fisiología humana*: McGraw-Hill Interamericana de España; 2003.
49. Hernandez AGD. *Tratado de nutrición/Nutrition Treatise: Composición Y Calidad Nutritiva De Los Alimentos/Composition and Nutritional Quality of Foods*: Ed. Médica Panamericana; 2010.
50. Stevenson MM, Riley EM. Innate immunity to malaria. *Nature reviews Immunology*. 2004;4(3):169-80.
51. Verthelyi D, Klinman DM. Sex hormone levels correlate with the activity of cytokine-secreting cells in vivo. *Immunology*. 2000;100(3):384-90.
52. Lu FX, Ma Z, Moser S, Evans TG, Miller CJ. Effects of ovarian steroids on immunoglobulin-secreting cell function in healthy women. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2003;10(5):944-9.

53. Klinge CM. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic acids research*. 2001;29(14):2905-19.
54. Deegan BJ, Bhat V, Seldeen KL, McDonald CB, Farooq A. Genetic variations within the ERE motif modulate plasticity and energetics of binding of DNA to the ERalpha nuclear receptor. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2011;507(2):262-70.
55. Kovats S. Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. *Cellular immunology*. 2015;294(2):63-9.
56. Murphy AJ, Guyre PM, Wira CR, Pioli PA. Estradiol regulates expression of estrogen receptor ERalpha46 in human macrophages. *PloS one*. 2009;4(5):e5539.
57. Mantalaris A, Panoskaltis N, Sakai Y, Bourne P, Chang C, Messing EM, et al. Localization of androgen receptor expression in human bone marrow. *The Journal of pathology*. 2001;193(3):361-6.
58. Viselli SM, Reese KR, Fan J, Kovacs WJ, Olsen NJ. Androgens alter B cell development in normal male mice. *Cellular immunology*. 1997;182(2):99-104.
59. Kovacs WJ, Olsen NJ. Androgen receptors in human thymocytes. *Journal of immunology*. 1987;139(2):490-3.
60. Miller WL, Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine reviews*. 2011;32(1):81-151.
61. Lamason R, Zhao P, Rawat R, Davis A, Hall JC, Chae JJ, et al. Sexual dimorphism in immune response genes as a function of puberty. *BMC immunology*. 2006;7:2.
62. Paavonen T, Andersson LC, Adlercreutz H. Sex hormone regulation of in vitro immune response. Estradiol enhances human B cell maturation via inhibition of suppressor T cells in pokeweed mitogen-stimulated cultures. *The Journal of experimental medicine*. 1981;154(6):1935-45.
63. Fu Y, Li L, Liu X, Ma C, Zhang J, Jiao Y, et al. Estrogen promotes B cell activation in vitro through down-regulating CD80 molecule expression. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*. 2011;27(8):593-6.
64. Lu FX, Abel K, Ma Z, Rourke T, Lu D, Torton J, et al. The strength of B cell immunity in female rhesus macaques is controlled by CD8+ T cells under the influence of ovarian steroid hormones. *Clinical and experimental immunology*. 2002;128(1):10-20.
65. Pacifici R, Brown C, Puscheck E, Friedrich E, Slatopolsky E, Maggio D, et al. Effect of surgical menopause and estrogen replacement on cytokine release from human blood mononuclear cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(12):5134-8.
66. Karpuzoglu-Sahin E, Hissong BD, Ansar Ahmed S. Interferon-gamma levels are upregulated by 17-beta-estradiol and diethylstilbestrol. *Journal of reproductive immunology*. 2001;52(1-2):113-27.
67. Matalka KZ. The effect of estradiol, but not progesterone, on the production of cytokines in stimulated whole blood, is concentration-dependent. *Neuro endocrinology letters*. 2003;24(3-4):185-91.
68. Siracusa MC, Overstreet MG, Housseau F, Scott AL, Klein SL. 17beta-estradiol alters the activity of conventional and IFN-producing killer dendritic cells. *Journal of immunology*. 2008;180(3):1423-31.
69. Wang T, Yang SD, Liu S, Wang H, Liu H, Ding WY. 17beta-Estradiol Inhibites Tumor Necrosis Factor-alpha Induced Apoptosis of Human Nucleus Pulposus Cells via the PI3K/Akt Pathway. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2016;22:4312-22.

70. Altuwaijri S, Chuang KH, Lai KP, Lai JJ, Lin HY, Young FM, et al. Susceptibility to autoimmunity and B cell resistance to apoptosis in mice lacking androgen receptor in B cells. *Molecular endocrinology*. 2009;23(4):444-53.
71. Aboudkhil S, Zaid A, Henry L, Bureau JP. Influence of age, castration, and testosterone on T cell subsets in healthy and leukemia grafted mice. *Biology of the cell*. 2003;95(1):9-16.
72. Lai JJ, Lai KP, Chuang KH, Chang P, Yu IC, Lin WJ, et al. Monocyte/macrophage androgen receptor suppresses cutaneous wound healing in mice by enhancing local TNF-alpha expression. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(12):3739-51.
73. Angele MK, Knoferl MW, Ayala A, Bland KI, Chaudry IH. Testosterone and estrogen differently effect Th1 and Th2 cytokine release following trauma-haemorrhage. *Cytokine*. 2001;16(1):22-30.
74. Posma E, Moes H, Heineman MJ, Faas MM. The effect of testosterone on cytokine production in the specific and non-specific immune response. *American journal of reproductive immunology*. 2004;52(4):237-43.
75. Corrales JJ, Almeida M, Burgo R, Mories MT, Miralles JM, Orfao A. Androgen-replacement therapy depresses the ex vivo production of inflammatory cytokines by circulating antigen-presenting cells in aging type-2 diabetic men with partial androgen deficiency. *The Journal of endocrinology*. 2006;189(3):595-604.
76. Kanda N, Tsuchida T, Tamaki K. Testosterone inhibits immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells. *Clinical and experimental immunology*. 1996;106(2):410-5.
77. Hodkova H, Kolbekova P, Skalova A, Lindova J, Flegr J. Higher perceived dominance in Toxoplasma infected men--a new evidence for role of increased level of testosterone in toxoplasmosis-associated changes in human behavior. *Neuro endocrinology letters*. 2007;28(2):110-4.
78. Lezama-Davila CM, Isaac-Marquez AP, Barbi J, Oghumu S, Satoskar AR. 17Beta-estradiol increases Leishmania mexicana killing in macrophages from DBA/2 mice by enhancing production of nitric oxide but not pro-inflammatory cytokines. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2007;76(6):1125-7.
79. Duneau D, Ebert D. Host sexual dimorphism and parasite adaptation. *PLoS biology*. 2012;10(2):e1001271.
80. De Souza JB, Williamson KH, Otani T, Playfair JH. Early gamma interferon responses in lethal and nonlethal murine blood-stage malaria. *Infect Immun*. 1997;65(5):1593-8.
81. Kerkar SP, Chinnasamy D, Hadi N, Melenhorst J, Muranski P, Spyridonidis A, et al. Timing and intensity of exposure to interferon-gamma critically determines the function of monocyte-derived dendritic cells. *Immunology*. 2014;143(1):96-108.
82. Matsuzawa T, Fujiwara E, Washi Y. Autophagy activation by interferon-gamma via the p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway is involved in macrophage bactericidal activity. *Immunology*. 2014;141(1):61-9.
83. Suzuki Y, Orellana MA, Schreiber RD, Remington JS. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against Toxoplasma gondii. *Science*. 1988;240(4851):516-8.
84. Wen X, Kudo T, Payne L, Wang X, Rodgers L, Suzuki Y. Predominant interferon-gamma-mediated expression of CXCL9, CXCL10, and CCL5 proteins in the brain during chronic infection with Toxoplasma gondii in BALB/c mice resistant to development of toxoplasmic encephalitis. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2010;30(9):653-60.
85. Salim T, Sershen CL, May EE. Investigating the Role of TNF-alpha and IFN-gamma Activation on the Dynamics of iNOS Gene Expression in LPS Stimulated Macrophages. *PloS one*. 2016;11(6):e0153289.



86. Jagannathan P, Nankya F, Stoyanov C, Eccles-James I, Sikyomu E, Naluwu K, et al. IFN $\gamma$  Responses to Pre-erythrocytic and Blood-stage Malaria Antigens Exhibit Differential Associations With Past Exposure and Subsequent Protection. *The Journal of infectious diseases*. 2015;211(12):1987-96.
87. Goncalves RM, Scopel KK, Bastos MS, Ferreira MU. Cytokine balance in human malaria: does *Plasmodium vivax* elicit more inflammatory responses than *Plasmodium falciparum*? *PloS one*. 2012;7(9):e44394.
88. Torre D, Speranza F, Giola M, Matteelli A, Tambini R, Biondi G. Role of Th1 and Th2 cytokines in immune response to uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2002;9(2):348-51.
89. van der Heyde HC, Pepper B, Batchelder J, Cigel F, Weidanz WP. The time course of selected malarial infections in cytokine-deficient mice. *Experimental parasitology*. 1997;85(2):206-13.
90. Grau GE, Heremans H, Piguat P-F, Pointaire P, Lambert P-H, Billiau A, et al. Monoclonal antibody against interferon gamma can prevent experimental cerebral malaria and its associated overproduction of tumor necrosis factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86(14):5572-4.
91. Yao Y, Li H, Ding J, Xia Y, Wang L. Progesterone impairs antigen-non-specific immune protection by CD8 T memory cells via interferon-gamma gene hypermethylation. *PLoS pathogens*. 2017;13(11):e1006736.
92. Chen CW, Jian CY, Lin PH, Chen CC, Lieu FK, Soong C, et al. Role of testosterone in regulating induction of TNF- $\alpha$  in rat spleen via ERK signaling pathway. *Steroids*. 2016;111:148-54.
93. Kankaanranta H, Ilmarinen P, Zhang X, Adcock IM, Lahti A, Barnes PJ, et al. Tumour necrosis factor- $\alpha$  regulates human eosinophil apoptosis via ligation of TNF-receptor 1 and balance between NF- $\kappa$ B and AP-1. *PloS one*. 2014;9(2):e90298.
94. Marino MW, Dunn A, Grail D, Inglese M, Noguchi Y, Richards E, et al. Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(15):8093-8.
95. Shoda LK, Kegerreis KA, Suarez CE, Roditi I, Corral RS, Bertot GM, et al. DNA from protozoan parasites *Babesia bovis*, *Trypanosoma cruzi*, and *T. brucei* is mitogenic for B lymphocytes and stimulates macrophage expression of interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide. *Infect Immun*. 2001;69(4):2162-71.
96. Chung IY, Benveniste EN. Tumor necrosis factor- $\alpha$  production by astrocytes. Induction by lipopolysaccharide, IFN- $\gamma$ , and IL-1  $\beta$ . *Journal of immunology*. 1990;144(8):2999-3007.
97. Nguyen VT, Benveniste EN. Critical role of tumor necrosis factor- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B in interferon- $\gamma$  -induced CD40 expression in microglia/macrophages. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(16):13796-803.
98. Cruz LN, Wu Y, Ulrich H, Craig AG, Garcia CR. Tumor necrosis factor reduces *Plasmodium falciparum* growth and activates calcium signaling in human malaria parasites. *Biochimica et biophysica acta*. 2016;1860(7):1489-97.
99. Mordmuller BG, Metzger WG, Juillard P, Brinkman BM, Verweij CL, Grau GE, et al. Tumor necrosis factor in *Plasmodium falciparum* malaria: high plasma level is associated with fever, but high production capacity is associated with rapid fever clearance. *European cytokine network*. 1997;8(1):29-35.
100. Perera MK, Herath NP, Pathirana SL, Phone-Kyaw M, Alles HK, Mendis KN, et al. Association of high plasma TNF- $\alpha$  levels and TNF- $\alpha$ /IL-10 ratios with TNF2 allele in severe *P. falciparum* malaria patients in Sri Lanka. *Pathogens and global health*. 2013;107(1):21-9.

101. Kwiatkowski D, Sambou I, Twumasi P, Greenwood B, Hill A, Manogue K, et al. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated Plasmodium falciparum malaria. *The Lancet*. 1990;336(8725):1201-4.
102. Lucas R, Lou J-N, Juillard P, Moore M, Bluethmann H, Grau GE. Respective role of TNF receptors in the development of experimental cerebral malaria. *J Neuroimmunol*. 1997;72(2):143-8.
103. Sylvestre D, Clynes R, Ma M, Warren H, Carroll MC, Ravetch JV. Immunoglobulin G-mediated inflammatory responses develop normally in complement-deficient mice. *The Journal of experimental medicine*. 1996;184(6):2385-92.
104. Tobie JE, Abele DC, Wolff SM, Contacos PG, Evans CB. Serum immunoglobulin levels in human malaria and their relationship to antibody production. *Journal of immunology*. 1966;97(4):498-505.
105. Shear HL, Nussenzweig RS, Bianco C. Immune phagocytosis in murine malaria. *The Journal of experimental medicine*. 1979;149(6):1288-98.
106. Harte PG, Cooke A, Playfair JH. Specific monoclonal IgM is a potent adjuvant in murine malaria vaccination. *Nature*. 1983;302(5905):256-8.
107. Rowe JA, Shafi J, Kai OK, Marsh K, Raza A. Nonimmune IgM, but not IgG binds to the surface of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes and correlates with rosetting and severe malaria. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2002;66(6):692-9.
108. Czajkowsky DM, Salanti A, Ditlev SB, Shao Z, Ghumra A, Rowe JA, et al. IgM, Fc mu Rs, and malarial immune evasion. *Journal of immunology*. 2010;184(9):4597-603.
109. Stanisic DI, Richards JS, McCallum FJ, Michon P, King CL, Schoepflin S, et al. Immunoglobulin G subclass-specific responses against Plasmodium falciparum merozoite antigens are associated with control of parasitemia and protection from symptomatic illness. *Infect Immun*. 2009;77(3):1165-74.
110. Cavanagh DR, Dodoo D, Hviid L, Kurtzhals JA, Theander TG, Akanmori BD, et al. Antibodies to the N-terminal block 2 of Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 are associated with protection against clinical malaria. *Infect Immun*. 2004;72(11):6492-502.
111. Tongren JE, Drakeley CJ, McDonald SL, Reyburn HG, Manjurano A, Nkya WM, et al. Target antigen, age, and duration of antigen exposure independently regulate immunoglobulin G subclass switching in malaria. *Infect Immun*. 2006;74(1):257-64.
112. Bouharoun-Tayoun H, Oeuvray C, Lunel F, Druilhe P. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of Plasmodium falciparum asexual blood stages. *The Journal of experimental medicine*. 1995;182(2):409-18.
113. Kanda N, Tamaki K. Estrogen enhances immunoglobulin production by human PBMCs. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1999;103(2 Pt 1):282-8.
114. Cid MC, Kleinman HK, Grant DS, Schnaper HW, Fauci AS, Hoffman GS. Estradiol enhances leukocyte binding to tumor necrosis factor (TNF)-stimulated endothelial cells via an increase in TNF-induced adhesion molecules E-selectin, intercellular adhesion molecule type 1, and vascular cell adhesion molecule type 1. *The Journal of clinical investigation*. 1994;93(1):17-25.
115. Robinson DP, Hall OJ, Nilles TL, Bream JH, Klein SL. 17beta-estradiol protects females against influenza by recruiting neutrophils and increasing virus-specific CD8 T cell responses in the lungs. *Journal of virology*. 2014;88(9):4711-20.
116. Chao TC, Van Alten PJ, Greager JA, Walter RJ. Steroid sex hormones regulate the release of tumor necrosis factor by macrophages. *Cellular immunology*. 1995;160(1):43-9.
117. Viselli SM, Stanziale S, Shults K, Kovacs WJ, Olsen NJ. Castration alters peripheral immune function in normal male mice. *Immunology*. 1995;84(2):337-42.

118. Kamis AB, Ibrahim JB. Effects of testosterone on blood leukocytes in plasmodium berghei-infected mice. *Parasitology research*. 1989;75(8):611-3.
119. Wunderlich F, Mossmann H, Helwig M, Schillinger G. Resistance to Plasmodium chabaudi in B10 mice: influence of the H-2 complex and testosterone. *Infect Immun*. 1988;56(9):2400-6.
120. 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.
121. Mosqueda-Romo NA, Rodriguez-Morales AL, Buendia-Gonzalez FO, Aguilar-Sanchez M, Morales-Montor J, Legorreta-Herrera M. Gonadal steroids negatively modulate oxidative stress in CBA/Ca female mice infected with P. berghei ANKA. *BioMed research international*. 2014;2014:805495.
122. Grau GE. Essential role of tumor necrosis factor and other cytokines in the pathogenesis of cerebral malaria: experimental and clinical studies. *Verhandelingen - Koninklijke Academie voor Geneeskunde van België*. 1992;54(2):155-75.
123. Villegas-Mendez A, Greig R, Shaw TN, de Souza JB, Gwyer Findlay E, Stumhofer JS, et al. IFN-gamma-producing CD4+ T cells promote experimental cerebral malaria by modulating CD8+ T cell accumulation within the brain. *Journal of immunology*. 2012;189(2):968-79.
124. Benten WP, Wunderlich F, Mossmann H. Plasmodium chabaudi: estradiol suppresses acquiring, but not once-acquired immunity. *Experimental parasitology*. 1992;75(2):240-7.
125. Krucken J, Dkhil MA, Braun JV, Schroetel RM, El-Khadragy M, Carmeliet P, et al. Testosterone suppresses protective responses of the liver to blood-stage malaria. *Infect Immun*. 2005;73(1):436-43.
126. Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN, Jr. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC bioinformatics*. 2006;7:85.
127. Stahl F, Gotz F, Dorner G. Plasma testosterone levels in rats under various conditions. *Experimental and clinical endocrinology*. 1984;84(3):277-84.
128. Gimenez F, Barraud de Lagerie S, Fernandez C, Pino P, Mazier D. Tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of cerebral malaria. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2003;60(8):1623-35.
129. Kissick HT, Sanda MG, Dunn LK, Pellegrini KL, On ST, Noel JK, et al. Androgens alter T-cell immunity by inhibiting T-helper 1 differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(27):9887-92.
130. Laffont S, Seillet C, Guery JC. Estrogen Receptor-Dependent Regulation of Dendritic Cell Development and Function. *Frontiers in immunology*. 2017;8:108.
131. Riches DW, Chan ED, Winston BW. TNF-alpha-induced regulation and signalling in macrophages. *Immunobiology*. 1996;195(4-5):477-90.
132. Bastos KR, Barboza R, Sardinha L, Russo M, Alvarez JM, Lima MR. Role of endogenous IFN-gamma in macrophage programming induced by IL-12 and IL-18. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2007;27(5):399-410.
133. Ghisletti S, Meda C, Maggi A, Vegeto E. 17beta-estradiol inhibits inflammatory gene expression by controlling NF-kappaB intracellular localization. *Molecular and cellular biology*. 2005;25(8):2957-68.
134. Soucy G, Boivin G, Labrie F, Rivest S. Estradiol is required for a proper immune response to bacterial and viral pathogens in the female brain. *Journal of immunology*. 2005;174(10):6391-8.
135. Maeda Y, Ohtsuka H, Tomioka M, Oikawa M. Effect of progesterone on Th1/Th2/Th17 and regulatory T cell-related genes in peripheral blood mononuclear cells during pregnancy in cows. *Veterinary research communications*. 2013;37(1):43-9.

136. Murphy HS, Sun Q, Murphy BA, Mo R, Huo J, Chen J, et al. Tissue-specific effect of estradiol on endothelial cell-dependent lymphocyte recruitment. *Microvascular research*. 2004;68(3):273-85.
137. Murphy AJ, Guyre PM, Pioli PA. Estradiol suppresses NF-kappa B activation through coordinated regulation of let-7a and miR-125b in primary human macrophages. *Journal of immunology*. 2010;184(9):5029-37.
138. Hodge DL, Martinez A, Julias JG, Taylor LS, Young HA. Regulation of nuclear gamma interferon gene expression by interleukin 12 (IL-12) and IL-2 represents a novel form of posttranscriptional control. *Molecular and cellular biology*. 2002;22(6):1742-53.
139. Vegeto E, Benedusi V, Maggi A. Estrogen anti-inflammatory activity in brain: a therapeutic opportunity for menopause and neurodegenerative diseases. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2008;29(4):507-19.
140. MacKenzie S, Fernandez-Troy N, Espel E. Post-transcriptional regulation of TNF-alpha during in vitro differentiation of human monocytes/macrophages in primary culture. *Journal of leukocyte biology*. 2002;71(6):1026-32.
141. Zaldivar V, Magri ML, Zarate S, Jaita G, Eijo G, Radl D, et al. Estradiol increases the expression of TNF-alpha and TNF receptor 1 in lactotropes. *Neuroendocrinology*. 2011;93(2):106-13.
142. Itoh K, Hirohata S. The role of IL-10 in human B cell activation, proliferation, and differentiation. *Journal of immunology*. 1995;154(9):4341-50.
143. Erlandsson MC, Jonsson CA, Islander U, Ohlsson C, Carlsten H. Oestrogen receptor specificity in oestradiol-mediated effects on B lymphopoiesis and immunoglobulin production in male mice. *Immunology*. 2003;108(3):346-51.
144. Dorrington JH, Bendell JJ, Khan SA. Interactions between FSH, estradiol-17 beta and transforming growth factor-beta regulate growth and differentiation in the rat gonad. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 1993;44(4-6):441-7.
145. Prange-Kiel J, Schmutterer T, Fester L, Zhou L, Imholz P, Brandt N, et al. Endocrine regulation of estrogen synthesis in the hippocampus? *Progress in histochemistry and cytochemistry*. 2013;48(2):49-64.
146. Hojo Y, Higo S, Ishii H, Ooishi Y, Mukai H, Murakami G, et al. Comparison between hippocampus-synthesized and circulation-derived sex steroids in the hippocampus. *Endocrinology*. 2009;150(11):5106-12.
147. Simpson E, Rubin G, Clyne C, Robertson K, O'Donnell L, Jones M, et al. The role of local estrogen biosynthesis in males and females. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2000;11(5):184-8.
148. Lotter H, Helk E, Bernin H, Jacobs T, Prehn C, Adamski J, et al. Testosterone increases susceptibility to amebic liver abscess in mice and mediates inhibition of IFN-gamma secretion in natural killer T cells. *PLoS one*. 2013;8(2):e55694.
149. Rettew JA, Huet-Hudson YM, Marriott I. Testosterone reduces macrophage expression in the mouse of toll-like receptor 4, a trigger for inflammation and innate immunity. *Biology of reproduction*. 2008;78(3):432-7.
150. Hunt NH, Ball HJ, Hansen AM, Khaw LT, Guo J, Bakmiwewa S, et al. Cerebral malaria: gamma-interferon redux. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2014;4:113.
151. Tripathi MK, Singh R. Differential suppressive effects of testosterone on immune function in fresh water snake, *Natrix piscator*: an in vitro study. *PLoS one*. 2014;9(8):e104431.
152. Claser C, Malleret B, Gun SY, Wong AY, Chang ZW, Teo P, et al. CD8+ T cells and IFN-gamma mediate the time-dependent accumulation of infected red blood cells in deep organs during experimental cerebral malaria. *PLoS one*. 2011;6(4):e18720.

153. Wichmann MW, Zellweger R, DeMaso CM, Ayala A, Chaudry IH. Mechanism of immunosuppression in males following trauma-hemorrhage. Critical role of testosterone. Archives of surgery. 1996;131(11):1186-91; discussion 91-2.
154. Friedl R, Brunner M, Moeslinger T, Spieckermann PG. Testosterone inhibits expression of inducible nitric oxide synthase in murine macrophages. Life sciences. 2000;68(4):417-29.
155. Barreto G, Veiga S, Azcoitia I, Garcia-Segura LM, Garcia-Ovejero D. Testosterone decreases reactive astroglia and reactive microglia after brain injury in male rats: role of its metabolites, oestradiol and dihydrotestosterone. The European journal of neuroscience. 2007;25(10):3039-46.
156. Eiding D, Garrett TJ. Studies of the regulatory effects of the sex hormones on antibody formation and stem cell differentiation. The Journal of experimental medicine. 1972;136(5):1098-116.