



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA MOLECULAR

**Efecto de bloquear los receptores de estrógenos
sobre la expresión de IFN- γ e IL-10 en el cerebro
de ratones infectados con *P. berghei* ANKA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGO

P R E S E N T A:

Teresita de Jesús Nolasco Pérez

NÚMERO DE CUENTA: 41201241 – 1

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Martha Legorreta Herrera



Ciudad de México, Octubre 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo recibió financiamiento de DGAPA-UNAM, proyecto PAPIIT IN220417.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y al Laboratorio de Inmunología Molecular, por ser las instituciones donde desarrollé mi proyecto, aptitudes y capacidades.

Además, deseo expresar mi gratitud a la Dra. Martha Legorreta Herrera que como mi director y sinodal de tesis me brindó su apoyo, paciencia y experiencia a lo largo de todo el trabajo realizado en el laboratorio.

Quiero agradecer a mis sinodales: Dra. María Isabel Soto Cruz, Dra. Raquel Retana Ugalde, M. en C. Jesús Aguilar Castro y la Dra. Adriana Gutiérrez Hoya, por su tiempo dedicado durante la revisión de esta tesis.

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

Estoy agradecida con mis padres, Marcela Pérez Pérez y Bernabe Nolasco Herrera, que gracias a su gran apoyo, enseñanza y consejos me permitieron comprender que cada día requiere de los más grandes esfuerzos, responsabilidad, superación y respeto. Con mucho cariño y admiración, gracias.

Con gratitud especial para mis hermanos, Yanet y Eduardo Nolasco Pérez, por ser parte importante de mi vida y un gran ejemplo de perseverancia y coraje, por enseñarme a creer que los sueños se hacen realidad cuando los deseas con todo el corazón. También por ser ese gran apoyo y por compartir gratos momentos que me daban fuerzas día a día.

A mis amigos de laboratorio, a Luis Cervantes quien me mostró que la superación se logra con perseverancia, coraje y humildad, también a Fidel Buendía, Jesús Aguilar, Sofía López, Steven Méndez y Omar Fernández, que gracias a cada una de sus palabras me proporcionaron diferentes puntos de vista tanto para el trabajo en el laboratorio como apoyo personal e hizo mi trabajo divertido e interesante.

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. MARCO TEÓRICO	3
3.1 Malaria	3
3.2 Ciclo de vida del <i>Plasmodium sp.</i>	4
3.3 Malaria cerebral	6
3.4 Respuesta inmune en malaria	7
3.5 Estrógenos y su papel en la respuesta inmune	9
3.6 Importancia del interferón-gamma (IFN- γ).....	11
3.7 Importancia de la interleucina-10 (IL-10)	12
3.8 Tamoxifeno	13
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
5. HIPÓTESIS	16
6. OBJETIVO.....	17
6.1 Objetivo General	17
6.2 Objetivos Particulares	17
7. DISEÑO EXPERIMENTAL	18
7.1 Tipo de estudio.....	18
7.2 Población.....	18
7.3 Variables	18
7.3.1 Variables dependientes	18
7.3.2 Variables independientes	18
7.4 Análisis estadístico	18
7.5 Material.....	19
7.5.1 Materiales biológicos.....	19
7.5.2 Reactivos	19

7.5.3 Materiales	20
7.5.4 Equipos	20
7.5.5 Instrumentos.....	21
7.6 Métodos.....	21
7.6.1 Preparación de tamoxifeno	22
7.6.2 Activación e inoculación del parásito	22
7.6.3 Determinación de la parasitemia.....	22
7.6.4 Extracción del ARNm de cerebro.....	23
7.6.5 Cuantificación del ARN.....	23
7.6.6 Retrotranscripción de muestras de ARNm	23
7.6.7 Amplificación por PCR en tiempo real.....	24
7.6.8 Cálculo de la expresión relativa	26
7.6.9 Cuantificación de citocinas por CBA	27
8. RESULTADOS	28
8.1 Efecto de los estrógenos sobre la parasitemia en ratones CBA/Ca infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.....	28
8.2 Efecto de los estrógenos sobre la expresión de ARNm que codifica para IFN- γ en el cerebro de ratones CBA/Ca infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.....	29
8.3 Efecto de los estrógenos sobre la concentración sérica de IFN- γ en ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.....	31
8.4 Efecto de los estrógenos sobre la expresión de ARNm que codifica para IL-10 en el cerebro de ratones CBA/Ca infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.....	32
8.5 Efecto de los estrógenos sobre la concentración sérica de IL-10 en ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.....	33
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	34
10. CONCLUSIONES	37
11. PERSPECTIVAS	37
12. REFERENCIAS.....	38

1. RESUMEN

La malaria es la enfermedad parasitaria con mayor mortalidad en el mundo. La complicación más severa de esta enfermedad es la malaria cerebral y se presenta en infecciones con *Plasmodium falciparum* en humanos y con *Plasmodium berghei* ANKA en ratones. En la respuesta inmune inducida por el parásito, se sintetizan citocinas proinflamatorias, como el interferón gamma (IFN- γ), involucrado en la eliminación del parásito, sin embargo, las concentraciones elevadas de esta citocina se asocian al desarrollo de malaria cerebral. Las citocinas antiinflamatorias, como la interleucina 10 (IL-10), regulan la sobreproducción de citocinas proinflamatorias, como el IFN- γ y evitan el posterior desarrollo de malaria cerebral.

La incidencia de la malaria en ambos sexos es la misma, pero la sintomatología y mortalidad es más severa en los hombres, es decir, se presenta dimorfismo sexual. Debido a que las principales diferencias entre los sexos se deben a las hormonas sexuales y que los estrógenos constituyen la principal hormona sexual en las mujeres, es probable que estén involucrados en el dimorfismo sexual de la respuesta inmune en malaria. Los estrógenos poseen características antioxidantes, promueven la diferenciación de linfocitos B y estimulan la activación de macrófagos. Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el que los estrógenos al interactuar con sus receptores en las células de la respuesta inmune regulan la respuesta inmune en el cerebro de los ratones infectados con *Plasmodium*. Por lo que, en este trabajo se bloquearon los receptores de estrógenos con tamoxifeno, para conocer su efecto sobre la expresión de IFN- γ e IL-10 en cerebro y en la concentración sérica de ambas citocinas en ratones infectados con *P. berghei* ANKA.

Se demostró que bloquear los receptores de estrógenos con tamoxifeno, reduce la expresión de ARNm que codifica para IFN- γ e IL-10 en cerebro y aumenta la concentración en suero de IFN- γ e IL-10, eventos que se relacionan con el aumento en la parasitemia. Estos resultados sugieren que los estrógenos participan en la eliminación del parásito y que modulan de forma distinta la expresión génica en cerebro y la concentración en suero de IFN- γ e IL-10.

2. INTRODUCCIÓN

La malaria o paludismo es una enfermedad parasitaria que constituye un problema de salud pública en el mundo, ocasiona aproximadamente medio millón de muertes cada año, principalmente en niños menores de 5 años (1).

La complicación más severa asociada a una alta mortalidad es la malaria cerebral (2). En ella intervienen factores como la obstrucción microvascular por eritrocitos parasitados, las moléculas de adhesión e inflamación, además, se incrementa la síntesis de citocinas proinflamatorias como el IFN- γ y para contrarrestar su exceso se sintetizan citocinas antiinflamatorias, como la IL-10 (3, 4).

En nuestro grupo de investigación, se documentó que la infección de ratones CBA/Ca con *P. berghei* ANKA presenta dimorfismo sexual, la severidad en los síntomas y la mortalidad son mayores en machos que en hembras (5), de forma similar a los humanos (6). Debido a que las principales diferencias entre los sexos están dictadas por las hormonas sexuales y que las células de la respuesta inmune poseen receptores para estrógenos (7), es posible que los estrógenos modulen la respuesta inmune contra el parásito. Además, en nuestro grupo de investigación, se demostró que la disminución de hormonas sexuales originado por la gonadectomía, modula negativamente la expresión de citocinas proinflamatorias como el IFN- γ , el TNF- α y la IL-6 en el suero de ratones hembra infectados con *P. berghei* ANKA (8).

Se conoce que los estrógenos participan en la respuesta inmune, a través de la interacción con sus receptores (9). Los estrógenos también regulan el crecimiento, la diferenciación y la función de diferentes tejidos en el cuerpo, además poseen actividad antiinflamatoria (10). Por lo anterior, en este trabajo bloqueamos a los receptores de estrógenos con tamoxifeno para estudiar su efecto sobre la expresión de las citocinas involucradas en promover o controlar la inflamación, como el IFN- γ y la IL-10 respectivamente, en un modelo experimental de malaria cerebral.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Malaria

La malaria o paludismo, es una enfermedad infecciosa causada por protozoarios del género *Plasmodium*, se transmite por la picadura del mosquito hembra *Anopheles* infectada. Existen cinco especies que infectan al humano: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium knowlesi*, de las cuales, *P. vivax*, causa la mayoría de los casos y *P. falciparum* es el responsable del mayor número de muertes (11).

Según el reporte de la OMS del 2017, se registraron 216 millones de casos nuevos y 445 mil muertes en ese año (12). Es una enfermedad que se presenta en países con clima subtropical y se considera endémica en 91 países, entre los que destacan: África, la India y países de América Latina (1) [Figura 1]. En México, la principal especie que ocasiona malaria es *P. vivax*, y la mayor incidencia es en estados como Chiapas, Chihuahua, Quintana Roo y Tabasco (11, 13, 14).

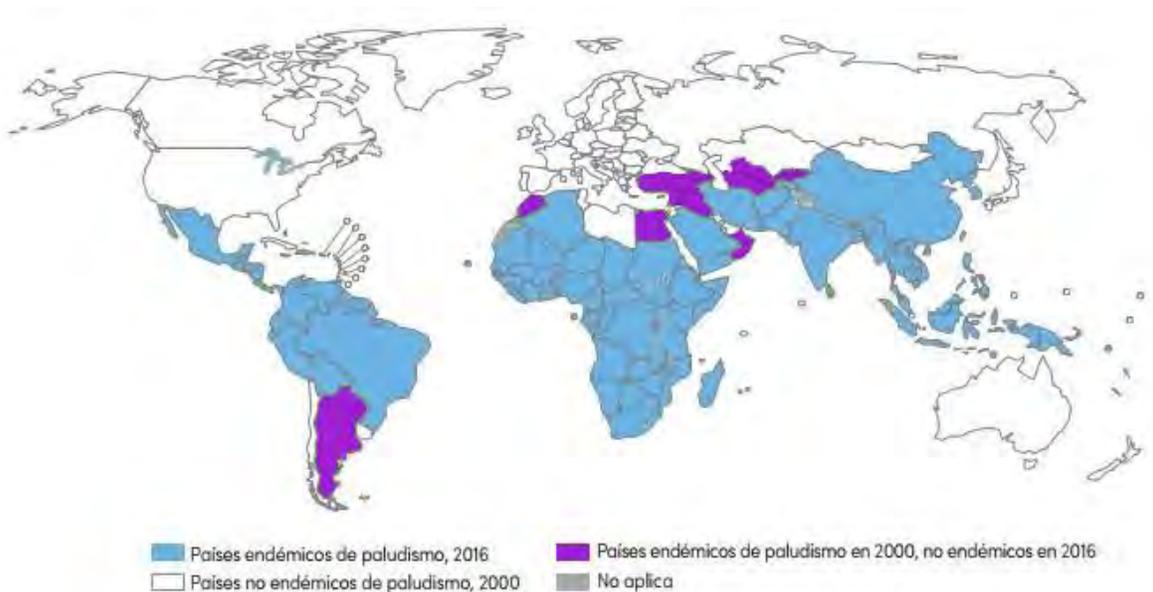


Figura 1. Países endémicos de paludismo en 2000 y 2016. Tomada y modificada de World Malaria Report 2017, WHO (1).

3.2 Ciclo de vida del *Plasmodium* sp.

El ciclo de vida del *Plasmodium* es muy complejo, involucra etapas críticas de desarrollo tanto en el huésped humano como en el mosquito. Consta de dos fases: una fase sexual (esporogonia) que tiene lugar en la hembra del mosquito *Anopheles*, vector y hospedero definitivo y una fase asexual que se desarrolla en un animal vertebrado (humano), el hospedero intermediario, incluye una etapa exoeritrocítica y otra intraeritrocítica (15, 16) [Figura 2].

El ciclo comienza con la fase exoeritrocítica cuando la hembra del mosquito del género *Anopheles* inocula esporozoítos al humano, el parásito llega al torrente sanguíneo e invade a los hepatocitos, ahí se reproduce asexualmente (15, 17). El hepatocito infectado origina miles de merozoítos hepáticos durante la fase preeritrocítica asintomática. Los merozoítos recién liberados ingresan al torrente sanguíneo, invaden rápidamente a los eritrocitos e inician la etapa eritrocitaria de la infección. Cada ciclo de invasión y replicación dura aproximadamente entre 24 y 72 horas, lo que depende de las especies de *Plasmodium* (18, 19). El merozoíto forma una vacuola, se desarrolla a la forma de anillo uninucleado, posteriormente madura y se transforma en un esquizonte multinucleado. Cuando el esquizonte se rompe, se liberan de 4 a 16 merozoítos en el torrente sanguíneo e infectan nuevos glóbulos rojos. Durante la etapa eritrocítica, una subpoblación de merozoítos se transforma en gametocitos que son ingeridos por el mosquito hembra *Anopheles* (20).

El ciclo esporogónico, que se lleva a cabo en el mosquito, consiste en la maduración de los gametocitos, proceso que comienza con su exflagelación en el intestino medio y origina a los micro y macrogametocitos. La formación del cigoto ocurre después de la fertilización de los micro y macrogametocitos y eventualmente se diferenciará en la forma móvil del parásito, conocido como oocineto por un proceso que dura aproximadamente de 16 a 24 horas, lo que depende de las especies de *Plasmodium*. Después de atravesar el epitelio del intestino, los oocinetos maduran. Los oocistos se rompen y liberan los esporozoítos. Cuando los esporozoítos invaden las glándulas salivales están listos para transmitir la enfermedad vía la picadura del mosquito en la piel de un nuevo huésped y así inician un nuevo ciclo (21).

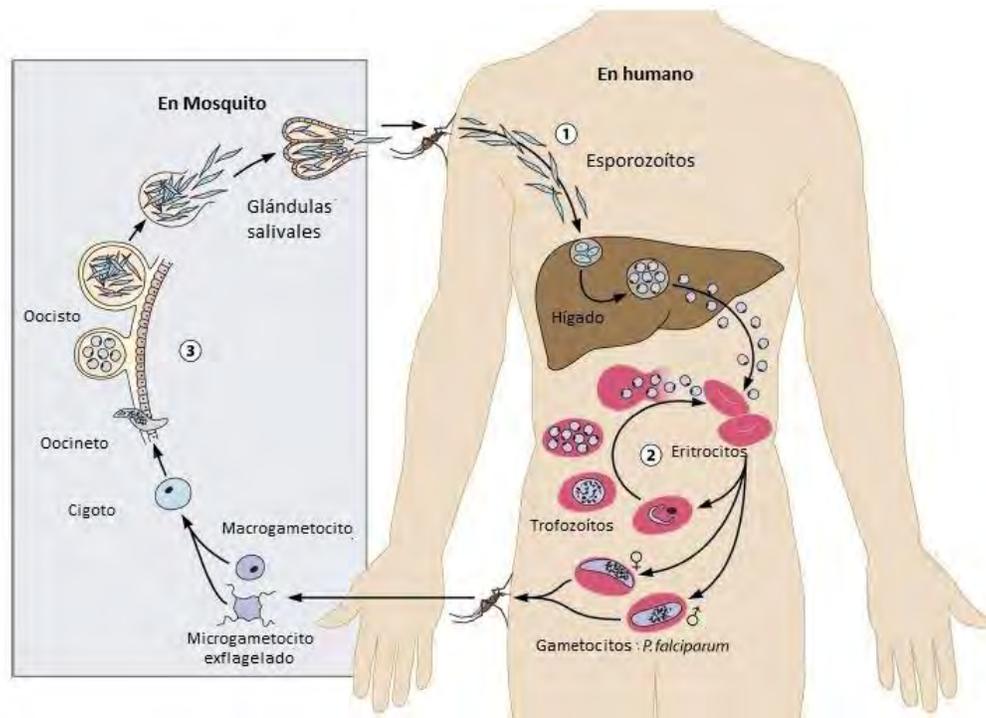


Figura 2. Ciclo de vida de *Plasmodium* sp. en el humano. Tomado y modificado de Bousema T y colaboradores. (22). 1) Ciclo exoeritrocítico: Un mosquito inocula los esporozoítos en el humano y se transportan por la sangre al hígado donde invaden a los hepatocitos y maduran a merozoítos. 2) Ciclo intraeritrocítico: Los merozoítos liberados al torrente sanguíneo invaden nuevos glóbulos rojos y se transforman en trofozoítos. Posteriormente maduran a esquizontes, se reproducen de forma asexual y forman merozoítos. Cuando el eritrocito estalla libera de nuevo merozoítos que invaden a nuevos eritrocitos. Algunos merozoítos se transforman en gametocitos y si los ingiere otro mosquito se infecta y transmite la enfermedad. 3) Ciclo esporogónico: en el estómago de los mosquitos, los gametocitos maduran a macrogametos y microgametos flagelados que, tras la fecundación, producen un oocineto móvil que atraviesa la pared gástrica para formar un oocisto que liberará miles de esporozoítos infectivos.

La patología de la enfermedad se presenta en la fase sanguínea del parásito, durante su periodo de multiplicación (22). Los síntomas de la malaria generalmente se desarrollan de 10 a 15 días después de la infección con el parásito. Incluyen fiebre, dolores musculares, escalofríos, anemia, dificultad respiratoria y pérdida de peso (20, 23). Las infecciones por *P. falciparum* ocasionan malaria severa que se caracteriza por un cuadro clínico grave con síntomas que van desde fiebre, anemia, alteraciones metabólicas, insuficiencia renal, disfunciones hepáticas y pulmonares, hasta coma y malaria cerebral (MC) (24).

3.3 Malaria cerebral

La malaria severa, es un conjunto de complicaciones sistémicas asociadas con la infección por *P. falciparum* que incluye el desarrollo de MC. Éste síndrome clínico agudo conduce al coma e incluso a la muerte (3). La obstrucción microvascular inducida por los glóbulos rojos parasitados por *P. falciparum*, la trombosis microvascular y la pérdida funcional de la barrera hematoencefálica se asocian con la patología de la enfermedad (25). Otros factores involucrados en la patogénesis de MC humana, es el aumento de la concentración plasmática de citocinas proinflamatorias, como TNF- α e IFN- γ (20).

Por razones éticas y técnicas, el estudio de MC en humanos es limitado, por lo que se utilizan modelos murinos de MC experimental, esta estrategia incrementa la comprensión y el conocimiento de la MC humana. La infección de ratones CBA/Ca con *Plasmodium berghei* ANKA es un modelo reconocido para MC experimental que comparte algunas características con la MC humana (9, 26).

Tanto la MC experimental como la MC humana se caracterizan por: el secuestro de glóbulos rojos parasitados y leucocitos, aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, activación y disfunción endotelial con expresión aumentada de moléculas de adhesión como ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina, incremento en la concentración de citocinas proinflamatorias, reducción del flujo sanguíneo, filtración vascular, edema agudo de origen citotóxico y microhemorragias que conducen a un deterioro neurológico. También se presenta activación plaquetaria, desregulación de la cascada de coagulación, trombocitopenia y acumulación de plaquetas en el cerebro (3, 27).

3.4 Respuesta inmune en malaria

Para facilitar su estudio, la respuesta inmune se divide en dos categorías: inespecífica y específica. La respuesta inmune inespecífica actúa como primera línea de defensa. Está constituida por monocitos, macrófagos, células asesinas naturales (NK), células dendríticas (DC's) y granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos). Estas células reconocen agentes extraños y promueven su eliminación, mediante fagocitosis, lisis celular y producción de citocinas que potencian la respuesta inmune específica e inespecífica. Las DC, los monocitos y los macrófagos actúan como células presentadoras de antígenos (CPA), captan antígenos extraños, los procesan y presentan péptidos antigénicos en su superficie a las células del sistema inmune específico (28, 29).

La respuesta inmune específica se divide en dos tipos, respuesta inmune mediada por células y la humoral. La respuesta inmune mediada por células, involucra linfocitos T y B, mientras que la respuesta inmune humoral está mediada por macromoléculas que se encuentran en el fluido extracelular como anticuerpos y citocinas (28).

La inmunidad contra la malaria es compleja y varía según la especie y el estadio de maduración del parásito. Los mecanismos de la respuesta inmune innata o adaptativa intervienen para la reducción de la parasitemia (30).

Cuando los patógenos ingresan al organismo, las células de la respuesta inmune innata detectan a los agentes extraños mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRR's) que reconocen patrones moleculares asociados en los patógenos (PAMP's). Algunos de los PRR's transmembrana son los receptores tipo toll (TLR) y los receptores de lectina tipo C (CLR). Las CPA poseen diversos PRR's que les permiten reconocer una gran variedad de PAMP e inducir respuestas específicas contra diferentes patógenos (31). Tras el reconocimiento de PAMP's del parásito, los PRR's desencadenan la activación de diversas vías de señalización como la vía NF- κ B, que activa a la proteína AP-1 y a factores reguladores de interferón (IRF) en el núcleo. Estos factores de transcripción modulan la producción de citocinas proinflamatorias, como el interferón gamma (IFN- γ) (32, 33).

Las células NK, los linfocitos T CD8⁺, T CD4⁺ y CD's producen IFN- γ y los macrófagos producen TNF- α , que son citocinas proinflamatorias, necesarias para inhibir la proliferación del parásito, ya que promueven la fagocitosis que elimina a los eritrocitos parasitados. A su vez, el proceso de inflamación que generan ambas citocinas se regula por citocinas antiinflamatorias, como la IL-10 y el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) (34, 35) [Figura 3].

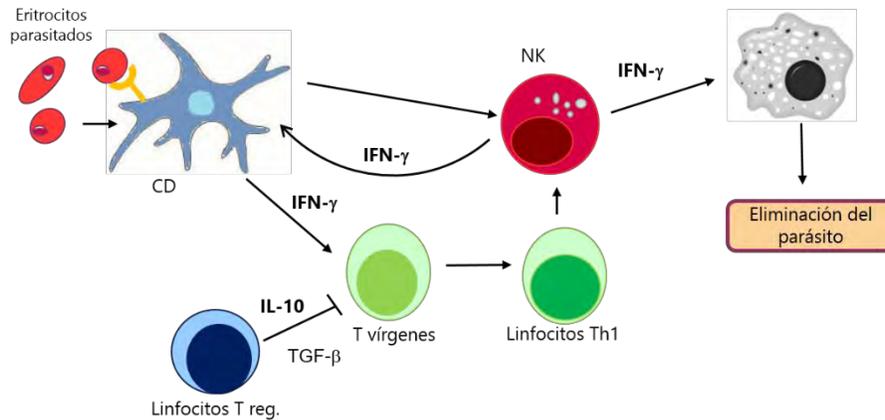


Figura 3. Relación entre la inmunidad innata y adaptativa frente a las fases sanguíneas del *Plasmodium*. Tomado y modificado de Stanisc DI, et. al. (29). Las CD reconocen eritrocitos parasitados, a través de PRR's. Estos receptores promueven la activación y secreción de citocinas proinflamatorias que facilitan la activación de células NK. Las células NK son críticas para la producción temprana de IFN- γ y promueven la respuesta inmune adaptativa y humoral. La producción de IFN- γ por células NK, células T CD8⁺ y diferenciación de células T CD4⁺ ayuda a la maduración de las CD's y también activa macrófagos, lo que promueve la fagocitosis y muerte de parásitos por la producción de especies reactivas de oxígeno. Los linfocitos T reguladores secretan citocinas antiinflamatorias como la IL-10 y TGF- β que suprimen la activación de linfocitos T vírgenes que resulta en inhibir el exceso de citocinas como el IFN- γ .

La respuesta inmune y las hormonas sexuales tienen una estrecha relación en la infección por protozoos. La infección por *Plasmodium* genera una respuesta dimórfica, si bien, la susceptibilidad a la infección es la misma entre hombres y mujeres, la sintomatología y mortalidad son mayores en los hombres (36). En nuestro grupo de investigación describimos que al disminuir los niveles de hormonas sexuales por gonadectomía, aumenta la parasitemia y disminuye la actividad antiinflamatoria en la respuesta inmune (5, 8). Dado que las hormonas sexuales son responsables de diferencias fisiológicas entre sexos, es probable que los estrógenos, que se encuentran en mayor concentración en las mujeres, sean responsables del dimorfismo sexual que se presenta en malaria.

3.5 Estrógenos y su papel en la respuesta inmune

Las hormonas sexuales se clasifican en tres clases: andrógenos (como la testosterona), estrógenos (como el 17β -estradiol) y progesterona, las cuales tienen una estrecha relación con el sistema inmune (28).

Los estrógenos son esteroides de 18 carbonos y consisten en un anillo de benceno, un grupo hidroxilo fenólico en el carbono 3 y un grupo hidroxilo (17β -estradiol) o un grupo cetona (estrona) en el carbono 17 (37). Los principales estrógenos que circulan en el cuerpo humano son el 17β -estradiol y la estrona, así como el 16-hidroxiestradiol (estriol) (38). Las hormonas esteroidales se originan del colesterol (esteroidogénesis), la principal fuente requerida es el colesterol LDL (lipoproteína de baja densidad). El colesterol se metaboliza por una serie de vías enzimáticas y se convierte en las hormonas esteroidales de 21, 19 y 18 carbonos [Figura 4] (38). En el ovario, la síntesis de estrógenos comienza en las células teca con la síntesis de andrógenos y finaliza con la conversión de andrógenos y estrógenos en las células de la granulosa por la enzima aromatasa (10, 37).

Los estrógenos son hormonas sexuales que regulan el desarrollo y la función de los órganos reproductores, principalmente en las hembras. Sin embargo, también tienen funciones importantes en los tejidos extragonadales, incluidos el hígado, el corazón, los músculos y el cerebro, así como, en el tejido adiposo, la piel y el páncreas (10, 37).

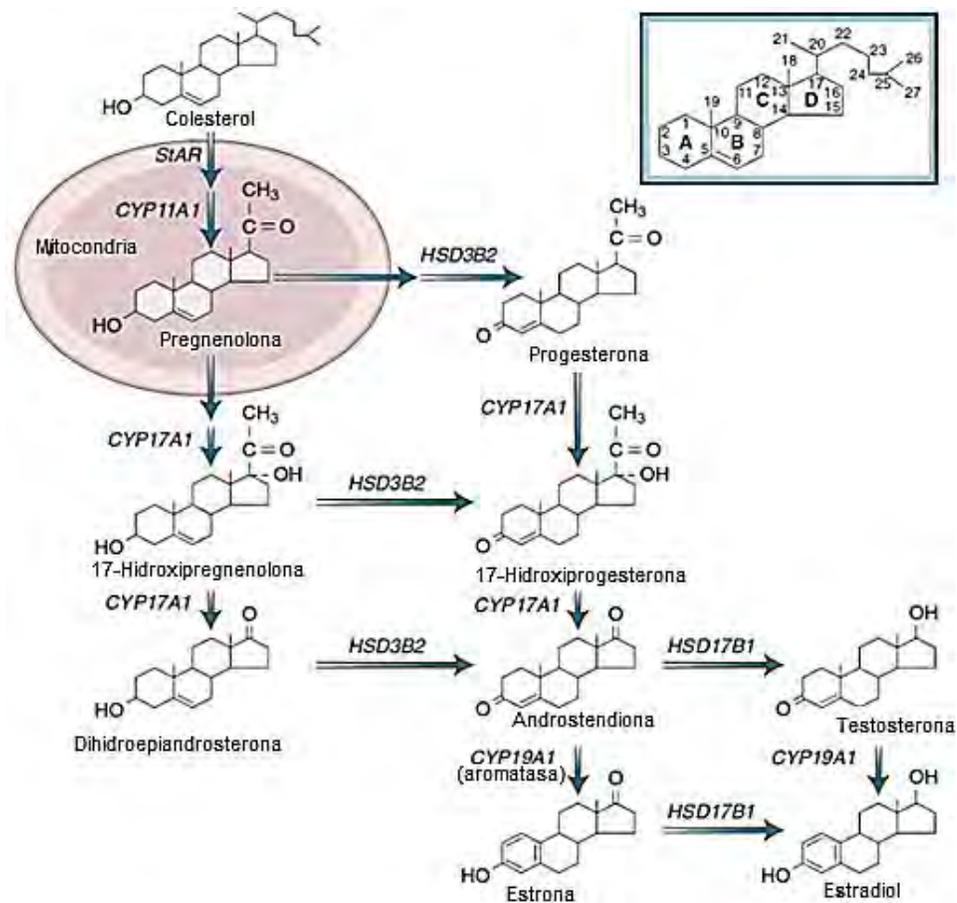


Figura 4. Vía de síntesis de estrógenos. Tomado y modificado de Samavat H y colaboradores (38). El primer paso en la esteroidogénesis ovárica es el movimiento del colesterol a la mitocondria. Este paso está regulado por StAR, codificada por el gen StAR, que después es catalizada por CYP11A1 para la conversión de colesterol en pregnenolona, que actúa como precursor de todas las hormonas esteroides. StAR: proteína reguladora aguda esteroidogénica; CYP11A1, escisión de la cadena lateral de P450. CYP17A1: 17-hidroxilasa/17,20-liasa; HSD3B2: 3 β -5 Δ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, 4-isomerasa tipo 2; CYP19A1: aromatasa; HSD17B1: 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1.

Los estrógenos desempeñan un papel importante en la respuesta inflamatoria al regular el desarrollo, proliferación, migración y la apoptosis de las células de la respuesta inmune (39). Se conoce que los linfocitos expresan receptores de estrógenos alfa (ER α) y receptores de estrógenos beta (ER β), pero los niveles de expresión de ambos receptores dependen de la estirpe celular. Los linfocitos T CD4⁺ expresan ER α mientras que los linfocitos B expresan ER β . En contraparte, los linfocitos T CD8⁺ expresan ambos receptores a niveles bajos pero equivalentes (7, 10).

Los estrógenos entran pasivamente dentro de las células e interaccionan con su receptor y luego regulan la transcripción de diversos genes (10). Los receptores de estrógenos (ER) se expresan en mayor cantidad durante el desarrollo del cerebro. En ese período, las hormonas sexuales como el estradiol inducen la diferenciación sexual en este tejido. En los cerebros de hombres y mujeres, el estradiol proporciona un efecto neuroprotector (10). El estradiol regula la expresión génica, la diferenciación neuronal y glial y tiene propiedades antiinflamatorias, protectoras y reparadoras en el cerebro (40).

3.6 Importancia del interferón-gamma (IFN- γ)

La infección por *Plasmodium sp.* induce la síntesis de IFN- γ en los linfocitos T y en los macrófagos, desempeña un papel protector en la eliminación del parásito. Sin embargo, sus concentraciones elevadas en suero durante la fase sanguínea del parásito promueven el desarrollo de malaria severa (31). El IFN- γ es una citocina proinflamatoria, que tiene un peso molecular de 45 KDa, se codifica en el cromosoma 12 en humanos y en el cromosoma 10 en ratones (3). Es la única forma de IFN de tipo II, tiene efectos sobre diversos tipos celulares de la respuesta inmune innata, adaptativa y en la inflamación (41).

El IFN- γ es un factor activador de macrófagos, se sintetiza principalmente por los linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺ en la respuesta inmune específica y por las células NK en una respuesta inmune no específica. Tiene acción sobre los monocitos/macrófagos, aumenta su capacidad fagocítica, estimula la producción de radicales libres de oxígeno e incrementa la expresión de la enzima óxido nítrico-sintetasa inducible (iNOS), lo que aumenta la concentración de óxido nítrico (NO) y, por lo tanto, ayuda a la eliminación del *Plasmodium*. (33, 42).

La señalización de IFN- γ en el cerebro regula la expresión de moléculas de adhesión que influyen en el secuestro de parásitos y leucocitos en la microvasculatura cerebral. También, promueve el tráfico de leucocitos, que incluye células T CD8⁺ al cerebro (3).

Dado que la influencia del el sexo afecta la incidencia, la gravedad y la respuesta inmune para diversas enfermedades infecciosas, el estudio de la participación de las hormonas sexuales, como los estrógenos y los andrógenos, ganan una singular importancia (43). En comparación con los machos, los ratones hembra muestran respuestas proliferativas de células T aumentadas y por lo tanto, una elevada producción de IFN- γ (44).

En nuestro grupo de investigación estudiamos el efecto de los diferentes esteroides sexuales en un modelo de ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA y se determinó que los ratones machos gonadectomizados expresan significativamente menos ARNm que codifica para IFN- γ y producen menos anticuerpos ante la infección que las hembras (9), lo que demuestra que las hormonas pueden modular respuestas proinflamatorias en la malaria. Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el que los estrógenos modulan positiva o negativamente la expresión y síntesis de IFN- γ , específicamente en el cerebro de los individuos infectados con *Plasmodium*.

3.7 Importancia de la interleucina-10 (IL-10)

La IL-10 se incrementa en el plasma de pacientes con malaria cerebral (45). Es una citocina antiinflamatoria que se sintetiza en los monocitos, células Th2, y linfocitos B, inhibe la síntesis de citocinas en células Th1 y T CD8⁺, pero no en las células tipo Th2. La IL-10 induce la proliferación de células B, y la síntesis de inmunoglobulinas (33).

La IL-10 es un inmunoregulador importante en las infecciones causadas por *Plasmodium* ya que neutraliza los efectos de citocinas producidas por células Th1 y T CD8⁺, las cuales son responsables de diversas inmunopatologías asociadas con la sobreproducción de IFN- γ (46).

El estradiol ocasiona una disminución de las citocinas IL-4 e IL-10, propias de las respuestas tipo Th2. Por el contrario, concentraciones elevadas inducen un aumento en las citocinas: IL-5, IL-6 e IL-10, lo que favorece una respuesta de tipo Th2 y por lo tanto, una disminución en la respuesta de tipo Th1 (47). También, activa a linfocitos T reguladores y así aumenta la síntesis IL-10 (39). Además, en nuestro grupo de investigación, documentamos que la gonadectomía en ratones CBA/Ca e infectados con *P. berghei* ANKA disminuye la expresión relativa del ARNm que codifica para la IL-10, por lo que se demuestra que las hormonas sexuales modulan positivamente la expresión de IL-10 (8).

Para analizar más a fondo si los estrógenos pueden modular citocinas, como el IFN- γ o la IL-10 en el cerebro ante la infección con *P. berghei* ANKA, utilizamos el tamoxifeno como un bloqueador de los receptores de estrógenos, estrategia que nos permite observar el efecto de esta hormona al impedir la interacción con su elemento de respuesta.

3.8 Tamoxifeno

Los moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERM), son compuestos no esteroides químicamente diversos, sintéticos que se unen a los ER α y/o ER β y ejercen actividades estrogénicas o antiestrogénicas de una manera específica de tipo tejido-célula (48, 49). El primer SERM que se utilizó con éxito para prevenir y tratar el cáncer de mama, es el tamoxifeno (49, 50).

El tamoxifeno se compone de la estructura de la cadena principal de trifeniletileno y actúa por bloqueo de las acciones del ER α (51). Se convirtió en el tratamiento de elección y como una alternativa para reducir el riesgo a padecer cáncer de mama (52). El tamoxifeno ejerce efectos agonistas y antagonistas variables dependientes

del contexto sobre las células diana que expresan los ER (53). La expresión tisular relativa de ER α y ER β son determinantes importantes de la respuesta de un tejido al estrógeno. Los ER α y ER β ejercen efectos diferenciales en tejidos como hueso, colon, útero, hígado, cerebro y glándula mamaria (50). Ciertos tejidos como los hepatocitos y las células neuronales en el hipocampo, expresan niveles altos de ER α , mientras que en tejidos como próstata, ovario y pulmón se expresa en mayor cantidad (54).

El tamoxifeno se metaboliza en el hígado por el citocromo P450 a metabolitos activos, 4-hidroxitamoxifeno y *N*-desmetil-4-hidroxitamoxifeno (DMT) [Figura 5]. El 4-hidroxitamoxifeno se une a los ER α o ER β con una afinidad igual al estradiol, que es 25-50 veces mayor que la afinidad del tamoxifeno, mientras que el DMT une al receptor con <1 % de afinidad del tamoxifeno (55).

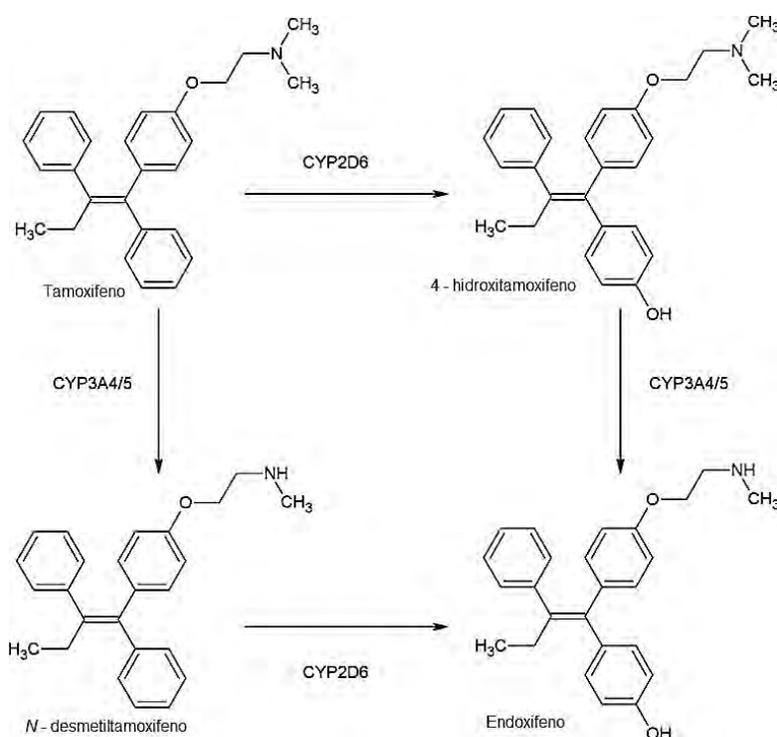


Figura 5. Metabolitos del tamoxifeno. Tomado y modificado de Morad, Samy AF & Cabot, Myles C. (56) El tamoxifeno se metaboliza en humanos principalmente a 4-hidroxitamoxifeno, *N*-desmetiltamoxifeno, 4-hidroxi-*N*-desmetiltamoxifeno (endoxifeno). EL metabolismo está dirigido por el sistema enzimático citocromo P450. El 4-hidroxitamoxifeno se considera el metabolito más activo.

El mecanismo molecular de los SERM implica la unión a su ER nuclear dependiente del ligando. Los ER poseen un sitio de unión amplio y flexible que permite la unión de múltiples ligandos. Los ER unidos a ligando experimentan un cambio conformacional en su dominio de unión hormonal que promueve la dimerización y activación del receptor para que ejerza sus efectos ya sea uniéndose directamente al elemento de respuesta de estrógeno, generalmente localizado en la región promotora de genes diana o uniéndose a proteínas correguladoras en sus respectivos sitios promotores (48).

El uso de este fármaco antiestrogénico en ratones C57Bl/10 aumenta la supervivencia de ratones infectados con *P. chabaudi* (57). Además, disminuye la proliferación de los protozoarios *Leishmania sp*, *Trypanosoma sp* y *Taenia sp* (52). La expresión de los ER α y β se redujo mediante el tratamiento con tamoxifeno en el bazo de ratones hembras BALB/c infectados con *Taenia crassiceps*, además de que disminuyó la carga parasitaria y aumentó la expresión de ARNm para IL-2 e IL-4 y sin modificar a IL-10 (58).

En este trabajo utilizamos el tamoxifeno como un bloqueador de los receptores de estrógenos como estrategia para estudiar el efecto de los estrógenos sobre la patología y respuesta inmune en el cerebro de ratones CBA/Ca infectados con *Plasmodium berghei* ANKA.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La malaria es una enfermedad infecciosa que constituye un problema de salud mundial, la complicación más severa es la malaria cerebral, que se asocia a una excesiva producción de citocinas proinflamatorias, como el IFN- γ . La mortalidad y la severidad de la patología son diferentes en hombres que en mujeres. Dado que las hormonas sexuales son las responsables de las diferencias fisiológicas entre los sexos es probable que las hormonas sexuales, en particular los estrógenos intervengan en la patología y en la respuesta inmune contra la malaria. Actualmente se desconoce la participación de los estrógenos en el cerebro de individuos infectados con *Plasmodium*. Se describió que los estrógenos tienen actividad antiinflamatoria e incrementan la respuesta inmune, por lo que, en este trabajo se bloqueó a los receptores de estrógenos con tamoxifeno y se evaluó si modulan la expresión y la concentración sérica de IFN- γ e IL-10.

Por lo tanto, en este trabajo nos hicimos la siguiente pregunta: ¿Los estrógenos regulan la expresión de ARNm y la concentración de IFN- γ y la IL-10 en un modelo murino de malaria cerebral?

5. HIPÓTESIS

Bloquear a los receptores de estrógenos elevará la concentración sérica y la expresión de IFN- γ e IL-10 en el cerebro de ratones hembras CBA/Ca infectadas con *P. berghei* ANKA.

6. OBJETIVO

6.1 Objetivo General

- Evaluar el efecto de los estrógenos sobre la expresión en cerebro y concentración sérica de IFN- γ e IL-10 en un modelo experimental de malaria cerebral.

6.2 Objetivos Particulares

- Evaluar el efecto de bloquear los receptores de estrógenos sobre la parasitemia de los ratones infectados con *P. berghei* ANKA.
- Evaluar el efecto de bloquear los receptores de estrógenos sobre la expresión del ARNm que codifica para IFN- γ e IL-10 en el cerebro de ratones infectados con *P. berghei* ANKA.
- Evaluar el efecto de bloquear los receptores de estrógenos sobre la concentración sérica de IFN- γ e IL-10 en ratones infectados con *P. berghei* ANKA.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL

7.1 Tipo de estudio

Experimental, transversal

7.2 Población

5 grupos de 10 ratones hembras CBA/Ca de 1 a 3 meses de edad

7.3 Variables

7.3.1 Variables dependientes

- Porcentaje de parasitemia
- Expresión de IFN- γ
- Expresión de IL-10
- Concentración de IFN- γ
- Concentración de IL-10

7.3.2 Variables independientes

- Infección
- Tratamiento (Tamoxifeno o vehículo)

7.4 Análisis estadístico

ANOVA de dos vías y análisis post-hock de Bonferroni o Tukey

Software: GraphPad Prism v.5.0

7.5 Material

7.5.1 Materiales biológicos

- 40 ratones hembra CBA/Ca de 4 meses de edad.
- Párasito *Plasmodium berghei* ANKA, donado por el Doctor William Jarra del National Institute for Medical Research, Londres, Inglaterra, criopreservado en nitrógeno líquido.

7.5.2 Reactivos

- Colorante de Giemsa Merck®
- Metanol Merck®
- Aceite de inmersión Sigma Aldrich®
- Amortiguador de fosfatos salino (PBS)
- Trizol® LS Reagent Invitrogen®
- Cloroformo / Alcohol isoamílico (49:1)
- Alcohol isopropílico Merck®
- Etanol 85%
- Amortiguador First Strand Promega®
- dNTP's 200 µM Invitrogen®
- Enzima MMLV-RT 20,000 U/mL Promega®
- Ditioeritritol (dTT) Promega®
- Agua con dietilpirocarbamato (DEPC)
- Tris / HCl 20 mM
- Acrilamida/bisacrilamida 10%
- *N-N-N-N'*- tetrametiletilendiamina (TEMED) Sigma Aldrich®
- Tris-Borato- EDTA (TBE) 10x y 1x
- Persulfato de amonio 10% Sigma Aldrich®
- Bromuro de etidio 10%

- Marcador de peso molecular, 50 pares de bases Promega®
- Cloruro de Magnesio (MgCl₂) Sigma Aldrich®
- AmpliTaq DNA Polimerasa 5 U/μL Promega®
- ROX 50x Invitrogen®
- Agua grado Milli-Q estéril
- Dimetilsulfóxido (DMSO) Sigma Aldrich®
- Sonda TaqMan de IFN-γ Sigma Aldrich®
- Oligonucleótidos sentido y antisentido de IFN-γ, IL-10 y β-actina Sigma Aldrich®
- Kit de citocinas de ratón Th1/Th2/Th17 por matriz de perlas citométricas (CBA) BD®

7.5.3 Materiales

- Tubos Eppendorf 0.2, 0.6, 1,5 μL AXYGEN®
- Puntas para micropipeta 10, 30, 10-100, 20-200, 500 μL, nuevas, estériles y libres de nucleasas AXYGEN®
- Tubos Falcon 15 y 50 μL AXYGEN®
- Portaobjetos esmerilados Corning®
- Pipetas Pasteur de vidrio
- Tubos para citometría de flujo AXYGEN®
- Placas de 96 pocillos para PCR AXYGEN®
- Tubos FACS BD®

7.5.4 Equipos

- Balanza granataria Sartorius-OHAUS®
- Microscopio óptico Carl Zeiss Estándar 25®
- Micropipetas de 1000, 200, 50, 10 y 1 μL Gilson® y Eppendorf®
- Centrífuga refrigerada Eppendorf 5804®
- Microcentrífuga Eppendorf 5415C®
- Ultracongelador REVCO®

- Cámara para electroforesis BioRad®
- Campana de flujo laminar Veco®
- Autoclave Tuttnauer Brinkmann 2540 M®
- Trans-iluminador Gel Doc 1000 BioRad®

7.5.5 Instrumentos

- Balanza analítica Scientech®
- Espectrofotómetro Multiskan GO ThermoScientific®
- Termociclador Eppendorf®
- Termociclador Applied Biosystems 7500®
- Citómetro de flujo FACSAria II BD®

7.6 Métodos

Se organizaron 5 grupos de 10 ratones hembra CBA/Ca de 4 meses de edad. A dos grupos se les administró DMSO y solución salina (1:20) como vehículo y otros dos grupos se les administró tamoxifeno. La mitad de los grupos que recibieron tratamiento o únicamente vehículo y un grupo adicional sin tratamiento se les infectó vía intravenosa con 1×10^3 eritrocitos parasitados con *P. berghei* ANKA (Tabla 1).

Tabla 1. Organización de grupos en diseño experimental

Grupo	Infección con <i>P. berghei</i> ANKA	Tratamiento	No. de ratones
Vehículo	No	Vehículo	10
Sólo infectados	Si	No	10
Vehículo e infectados	Si	Vehículo	10
Tamoxifeno	No	Tamoxifeno (1 mg/kg)	10
Tamoxifeno e infectados	Si	Tamoxifeno (1 mg/kg)	10

7.6.1 Preparación de tamoxifeno

Se preparó una solución concentrada 20X con tamoxifeno diluido en dimetilsulfóxido (DMSO), se diluyó a 1X con solución salina isotónica.

El fármaco se administró a dosis de 1 mg/Kg de peso, vía subcutánea durante 28 días consecutivos antes de la infección.

7.6.2 Activación e inoculación del parásito

Se descongeló un criovial preservado en nitrógeno líquido y el contenido se inoculó vía intraperitoneal en dos ratones, en un primer ratón 1/3 y en el segundo 2/3 del total del criovial. Cuando la parasitemia alcanzó el 25% se tomó una muestra de sangre para preparar el inóculo de 1×10^3 eritrocitos parasitados por ratón por vía intravenosa.

Al día 8 post-infección, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, para la extracción de cerebro.

7.6.3 Determinación de la parasitemia

A todos los ratones infectados se les cuantificó la parasitemia a partir del día 4 post-infección. Se tomó una gota de sangre de la cola del ratón y se realizó un frotis, se fijó con metanol y se tiñó con Giemsa (dilución 1:10 en agua destilada) durante 1 hora. Se observaron por microscopía óptica y se determinó el porcentaje de eritrocitos parasitados.

7.6.4 Extracción del ARNm de cerebro

El tejido extraído de cerebro se colocó en tubos Eppendorf con 600 µL de PBS y se sonicó, posteriormente se adicionaron 300 µL de Trizol®. Se agitó por 10 minutos y adicionaron 300 µL de una mezcla cloroformo/alcohol isoamílico 49:1. La mezcla se agitó por 15 minutos y se centrifugó a 13000 rpm (revoluciones por minuto) por 15 minutos.

Se separó el ARN soluble en la fase acuosa, se precipitó con un volumen igual de isopropanol frío se mezcló suavemente y se congeló a -20°C hasta su uso. Se centrifugó y se eliminó el sobrenadante, se adicionaron 500 µL de etanol al 85% en agua DEPC frío. La mezcla se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante, se secó a temperatura ambiente y el botón se hidrató en 100 µL de agua libre de RNAsas.

7.6.5 Cuantificación del ARN

Se preparó una dilución 1:200 del ARN obtenido y se determinó la concentración espectrofotométricamente a 260nm. Se calculó la concentración de ARN (µg/µL) con la siguiente fórmula:

$$[ARN] = (Abs_{260\text{ nm}}) (\epsilon)(FD)$$

Donde:

ϵ = Coeficiente de absortividad molar de ARN = 0.040 µg/µL

FD = Factor de dilución = 200

7.6.6 Retrotranscripción de muestras de ARNm

Se adicionaron 1.5 µg de ARN y 1 µL de oligo dT y se incubaron en el termociclador durante 10 minutos a 65°C, posteriormente se adicionó la mezcla de reacción que contiene: agua destilada estéril, Amortiguador First Strand 4µL, DTT (0.1 M) 2 µL, dNTP's (5 mM) 2 µL, enzima MMLV-RT (200 U/µL) 0.2 µL y 0.1 µL de inhibidor de

RNAsa en un volumen total de 10 μ L. Se ajustó el volumen a 20 μ L con agua libre de RNAsas y se incubó nuevamente en el termociclador durante una hora a 37°C. A continuación, se incubaron a 95°C durante 10 minutos para inactivar la enzima. Se adicionaron 80 μ L de agua DEPC para obtener la concentración de 15 ng/ μ L de DNAc.

7.6.7 Amplificación por PCR en tiempo real

Se preparó la mezcla de reacción específica para cada gen en un volumen final de 10 μ L, que contiene: Agua calidad MilliQ estéril, cloruro de magnesio (3 mM), DMSO (3%), ROX 0.25x, oligonucleótidos forward (150 nM), reverse (150 nM) y Sonda TaqMan (200 nM) para cada gen (Tabla 2), así como la mezcla casera (1x) reacción preparada con: dNTP's 2mM, cloruro de potasio 2M, gelatina 20 mg/mL y Tris ácido a pH 8.3 2M. Después se adicionaron 2 μ L de DNAc [15 ng/ μ L], se colocó en el termociclador de tiempo real (Applied Biosystems 7500) y se programó con las temperaturas de amplificación previamente calibradas.

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos y sonda para cada gen

Gen	Oligonucleótidos y Sonda	
β -actina	Sentido	CGG GTC AGG TAG TCT GTC AGG TCC [JOE] G
	Antisentido	CTA TGC TCT CCC TCA CGC CAT C
IFN- γ	Sentido	TCA AGT GGC ATA GAT GTG GAA GAA
	Antisentido	TGG CTC TGC AGG ATT TTC ATG
	Sonda TaqMan	[6FAM] TCA CCA TCC TTT TGC CAG TTC CTC CAG [BHQ1]
IL-10	Sentido	CGG TTC TGG ACA ACA TAC TGC TAA C [FAM] G
	Antisentido	TGG ATC ATT TCC GAT AAG GCT TG

Los programas para la amplificación que se utilizaron fueron los siguientes:

- **Para β -actina** (control endógeno utilizado):

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

Repetir de los pasos 3 al 5 por 45 veces. Se realizó una curva de fusión con las siguientes temperaturas:

1. 95 °C 15 segundos
2. 60 °C 1 minuto
3. 95 °C 30 segundos
4. 60 °C 1 minuto

- **Para IFN- γ**

1. 94 °C 5 minutos
2. 94 °C 30 segundos
3. 60 °C 45 segundos

Se repiten los pasos 2 y 3 por 45 veces y se añade una etapa de enfriamiento por 30 segundos a 40 °C.

- **Para IL-10**

1. 50 °C 2 minutos
2. 95 °C 2 minutos
3. 95 °C 30 segundos
4. 60 °C 45 segundos

Se repiten los pasos 2 a 4 por 40 veces y se añade curva de fusión con las siguientes temperaturas:

1. 95 °C 15 segundos
2. 60 °C 1 minuto
3. 95 °C 30 segundos
4. 60 °C 15 segundos

7.6.8 Cálculo de la expresión relativa

La expresión relativa del gen con respecto a β -actina, se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Expresión relativa} = \frac{(\text{Eficiencia del gen} + 1)^{\Delta CT_{\text{gen}}}}{(\text{Eficiencia de } \beta - \text{actina} + 1)^{\Delta CT_{\beta - \text{actina}}}}$$

Donde:

Eficiencia del gen: Eficiencia obtenida para IFN- γ o para IL-10

ΔCT_{gen} = Diferencia entre el CT de IFN- γ / IL-10 de las muestras obtenidas contra el CT de las muestras del grupo control

$\Delta CT_{\beta - \text{actina}}$ = Diferencia entre el CT de β -actina de las muestras contra el CT de las muestras del grupo control.

7.6.9 Cuantificación de citocinas por CBA

Se reconstituyeron los estándares de citocinas y se mezclaron con las perlas de captura y con el reactivo de detección PE.

Se etiquetaron 11 tubos con las diluciones 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024 y 1:2048 (la concentración inicial fue de 20,000 pg/mL y la final de 20 pg/mL) a cada tubo se le adicionaron 100 μ L de diluyente. Se adicionaron 100 μ L del estándar al tubo etiquetado con la dilución correspondiente a 1:2 y a partir de este tubo, se realizaron diluciones seriadas hasta la dilución 1:2048.

Se adicionaron 3.4 μ L de cada perla por muestra. Se añadieron 25 μ L de suero o de estándar a cada tubo. Se incubó a temperatura ambiente por dos horas en la oscuridad. Se realizó un lavado, se eliminó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 100 μ L de solución de lavado. El contenido de cada tubo se transfirió a tubos FACS y se leyó en el citómetro de flujo.

8. RESULTADOS

Para evaluar el efecto de los estrógenos sobre la expresión del IFN- γ e IL-10 en el cerebro de ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA, se bloquearon los receptores de estrógenos con tamoxifeno y otro grupo de ratones se trató con vehículo por 28 días consecutivos. Al día siguiente de la última administración, la mitad de los grupos se infectaron con *P. berghei* ANKA, por lo que un grupo tratado con tamoxifeno y uno con vehículo se utilizaron como controles negativos. A los grupos de ratones infectados se les evaluó la parasitemia y a todos los grupos se les analizó la expresión de IFN- γ e IL-10 en cerebro y la concentración sérica de ambas citocinas.

8.1 Efecto de los estrógenos sobre la parasitemia en ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA

Dado que la severidad de la patología depende de la parasitemia, a los ratones infectados con *P. berghei* ANKA y tratados con tamoxifeno o vehículo se les evaluó la parasitemia por microscopía óptica.

La administración de vehículo aumentó significativamente la parasitemia desde el día 5 post-infección con respecto al grupo de ratones que únicamente se infectaron. La administración de tamoxifeno incrementó significativamente la parasitemia desde el día 5 post-infección en comparación con el grupo de ratones que únicamente se infectaron [Figura 6].

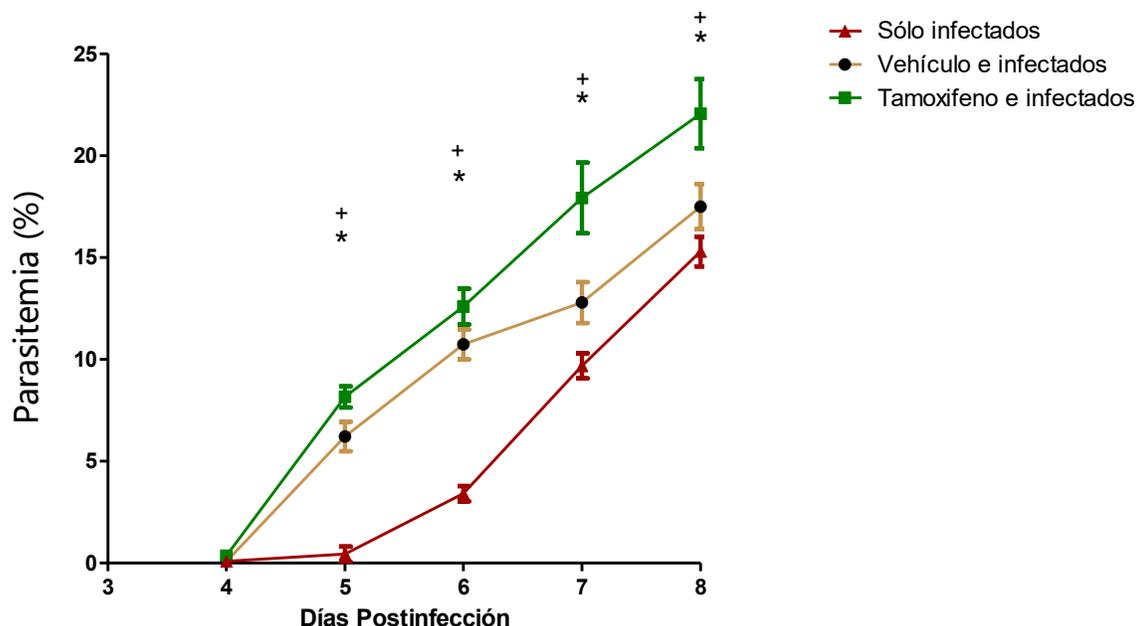


Figura 6. Efecto del tamoxifeno sobre la parasitemia en ratones CBA/Ca infectadas con *Plasmodium berghei* ANKA. Tres grupos de ratones hembra: el primero no recibió tratamiento únicamente se infectó, el segundo se trató con vehículo (DMSO y solución salina) y el tercero se trató con tamoxifeno (1 mg/Kg de peso). Todos los grupos se infectaron por vía intravenosa con 1×10^3 eritrocitos parasitados con *P. berghei* ANKA. A partir del 4º día post-infección se prepararon frotis sanguíneos, se fijaron y tiñeron con Giemsa. Se contaron al microscopio óptico 200 eritrocitos totales y se graficó la media geométrica del porcentaje de la parasitemia. (*) Representa la diferencia estadísticamente significativa entre ratones tratados con vehículo e infectados vs ratones únicamente infectados. (+) Representa la diferencia estadísticamente significativa entre ratones tratados con tamoxifeno e infectados vs ratones solo infectados ($p < 0,05$). Se utilizó análisis ANOVA de dos vías, prueba Bonferroni. Cada punto representa la media geométrica del grupo \pm el error estándar medio.

8.2 Efecto de los estrógenos sobre la expresión de ARNm que codifica para IFN- γ en el cerebro de ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA

El IFN- γ es una citocina proinflamatoria cuyas concentraciones incrementan significativamente en ratones que desarrollan malaria cerebral, su síntesis ocurre como parte de la respuesta inmune contra el *Plasmodium* en humanos y ratones. En este trabajo, para evaluar si la expresión de IFN- γ en el cerebro de ratones infectados con *Plasmodium* se regula por los estrógenos, se bloquearon los receptores de estrógenos con y se analizó la expresión de IFN- γ en cerebro de ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA.

La expresión de IFN- γ en el grupo de ratones infectados y tratados con vehículo disminuyó significativamente en comparación con los que únicamente se infectaron con *P. berghei* ANKA. Además, al bloquear los receptores de estrógenos en los ratones infectados, disminuyó la expresión relativa de IFN- γ en comparación a los grupos de ratones que únicamente se infectaron con *P. berghei* ANKA [Figura 7].

La infección con *P. berghei* ANKA reguló negativamente la expresión relativa de IFN- γ en los grupos de ratones tratados con tamoxifeno [Figura 7].

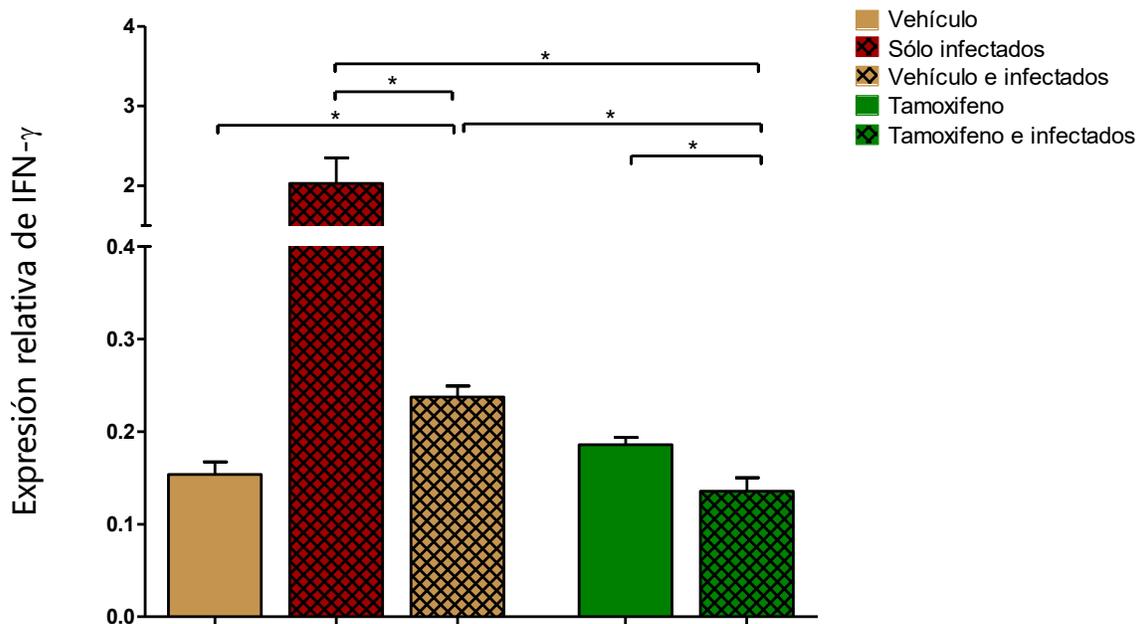


Figura 7. Efecto del tamoxifeno sobre la expresión de interferón gamma (IFN- γ) en el cerebro de ratones hembras CBA/Ca infectadas con *P. berghei* ANKA. Dos grupos de ratones hembra se trataron con tamoxifeno o con vehículo, durante 28 días antes de la infección. La mitad del número de los ratones en cada grupo y un grupo adicional de ratones hembra se infectaron con *P. berghei* ANKA. En el día 8 post-infección, se extrajo el cerebro. Se obtuvo el ARN, se retrotranscribió a DNAc y se amplificó el gen que codifica a IFN- γ por PCR en tiempo real. Cada barra representa el valor promedio de cada grupo \pm SEM. *Indica la diferencia estadísticamente significativa analizada con ANOVA de una vía y prueba de Tukey ($p < 0.05$).

8.3 Efecto de los estrógenos sobre la concentración sérica de IFN- γ en ratones infectados con *P. berghei* ANKA

Para determinar si los estrógenos modulan la expresión de IFN- γ en el cerebro análogamente a su proteína en suero, se cuantificó la concentración de IFN- γ en el suero de ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA mediante citometría de flujo.

La concentración sérica de IFN- γ disminuyó significativamente en los ratones infectados y tratados con el vehículo en comparación con el grupo de ratones que únicamente se infectaron [Figura 8]. Asimismo, disminuyó significativamente en el grupo de ratones tratados con tamoxifeno en comparación con el grupo de ratones que únicamente se infectaron. En contraste, la concentración sérica de IFN- γ en los ratones tratados con tamoxifeno e infectados aumentó significativamente en comparación con los ratones que recibieron vehículo e infección [Figura 8].

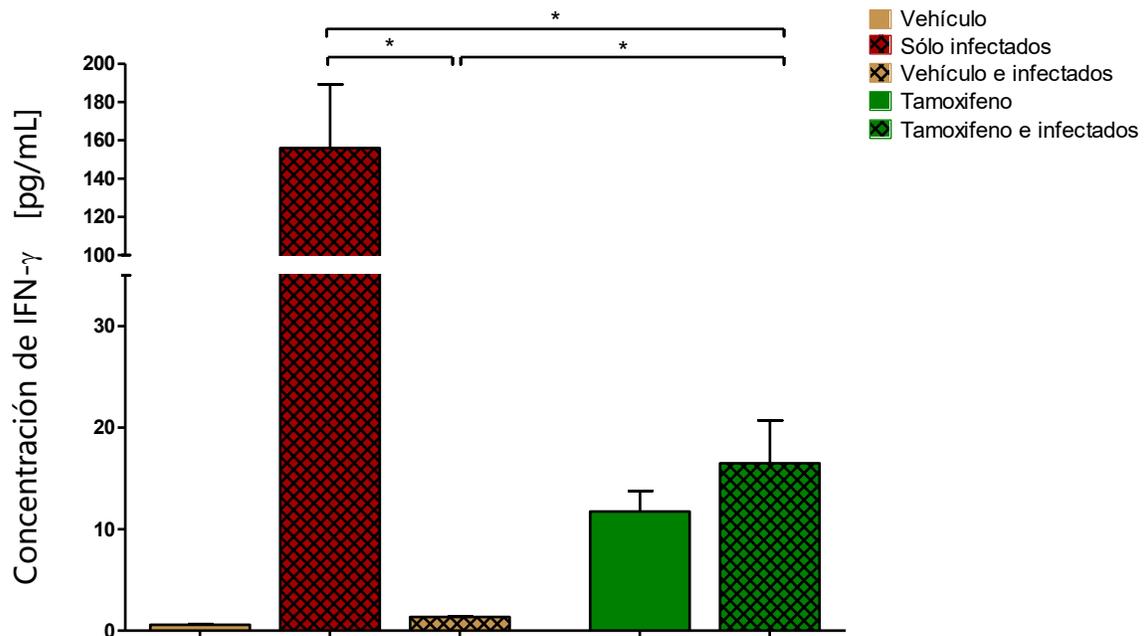


Figura 8. Efecto del tamoxifeno sobre la concentración sérica de interferón-gamma (IFN- γ) en ratones hembras CBA/Ca infectadas con *P. berghei* ANKA. Dos grupos de ratones hembra se trataron con tamoxifeno o con vehículo durante 28 días consecutivos previos a la infección. La mitad de los ratones en cada grupo y un grupo adicional de ratones hembra se infectaron con *P. berghei* ANKA. En el día 8 post-infección, se sacrificaron, se extrajo sangre y se cuantificó IFN- γ en suero por citometría de flujo. Cada barra representa el valor promedio de la concentración de IFN- γ por grupo \pm SEM. * Representa la diferencia estadísticamente significativa calculada con ANOVA de una vía y prueba de Tukey ($p < 0.05$).

8.4 Efecto de los estrógenos sobre la expresión de ARNm que codifica para IL-10 en el cerebro de ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA

La IL-10 es una citocina que suprime o regula negativamente la respuesta inflamatoria (46). En este trabajo se evaluó si bloquear a los receptores de estrógenos, modifica la expresión de la IL-10 en cerebro de ratones infectados con *P. berghei* ANKA.

La expresión de IL-10 disminuyó significativamente en el cerebro de ratones hembra tratadas con tamoxifeno e infectadas con *Plasmodium berghei* ANKA en comparación con los grupos de ratones que únicamente se infectaron y el grupo tratado con tamoxifeno no infectado [Figura 9]. Interesantemente, la expresión del ARNm que codifica para IL-10 aumentó significativamente en los ratones sin infección tratados con tamoxifeno en comparación con los ratones que se les administró vehículo y no se infectaron [Figura 9].

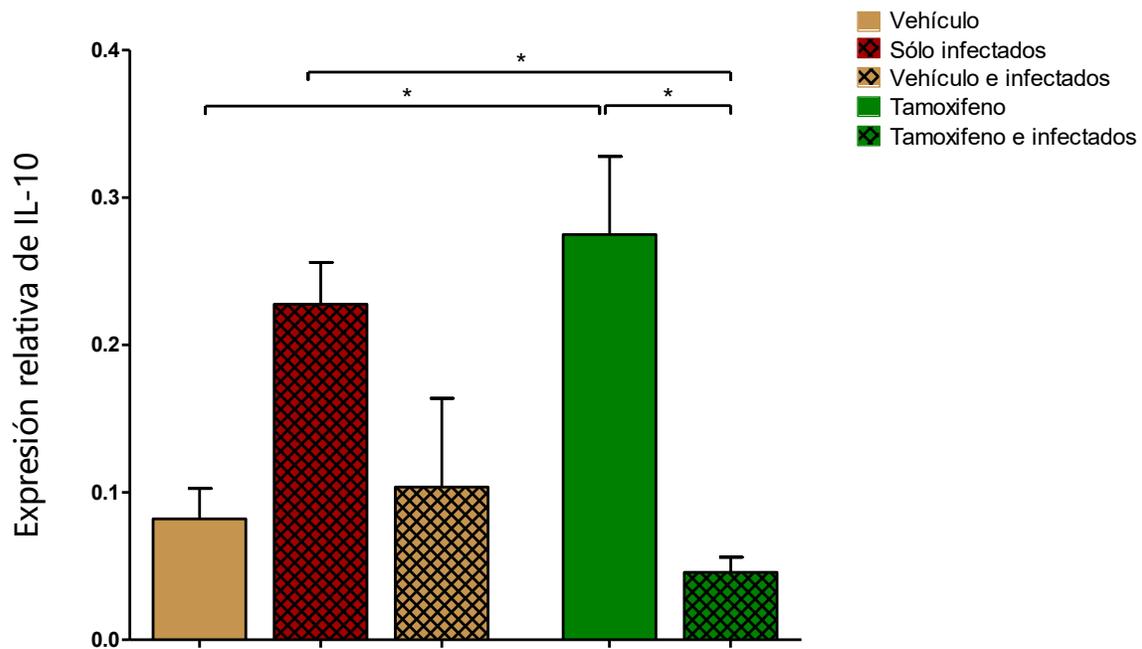


Figura 9. Efecto del tamoxifeno sobre la expresión de interleucina 10 (IL-10) en el cerebro de ratones hembras CBA/Ca infectadas con *P. berghei* ANKA. Dos grupos de ratones hembra se trataron con tamoxifeno o con vehículo, durante 28 días antes de la infección. La mitad de los ratones en cada grupo y un grupo adicional de ratones hembra se infectaron con *P. berghei* ANKA. En el día 8 post-infección, se extrajo el cerebro. Se aisló el ARN, se retrotranscribió a DNAc y se amplificó el gen que codifica para IL-10 por PCR en tiempo real. Cada barra representa el valor promedio por grupo \pm SEM. * Indica la diferencia estadísticamente significativa calculada con ANOVA de una vía y prueba de Tukey ($p < 0.05$).

8.5 Efecto de los estrógenos sobre la concentración sérica de IL-10 en ratones infectados con *P. berghei* ANKA

Para determinar si los estrógenos modifican la expresión de la IL-10 y la concentración de la proteína en suero en los ratones infectados con *P. berghei* ANKA se cuantificó su concentración en suero por citometría de flujo.

El grupo tratado con vehículo e infectado con *P. berghei* ANKA disminuyó significativamente la concentración de IL-10, con respecto a los ratones que solo se infectaron o que solo recibieron vehículo [Figura 10]. Bloquear a los receptores de estrógenos aumentó significativamente la concentración de IL-10 en suero en comparación con los ratones tratados con vehículo. Sin embargo, la concentración en suero de IL-10 resultó significativamente menor con relación a los ratones que únicamente se infectaron [Figura 10].

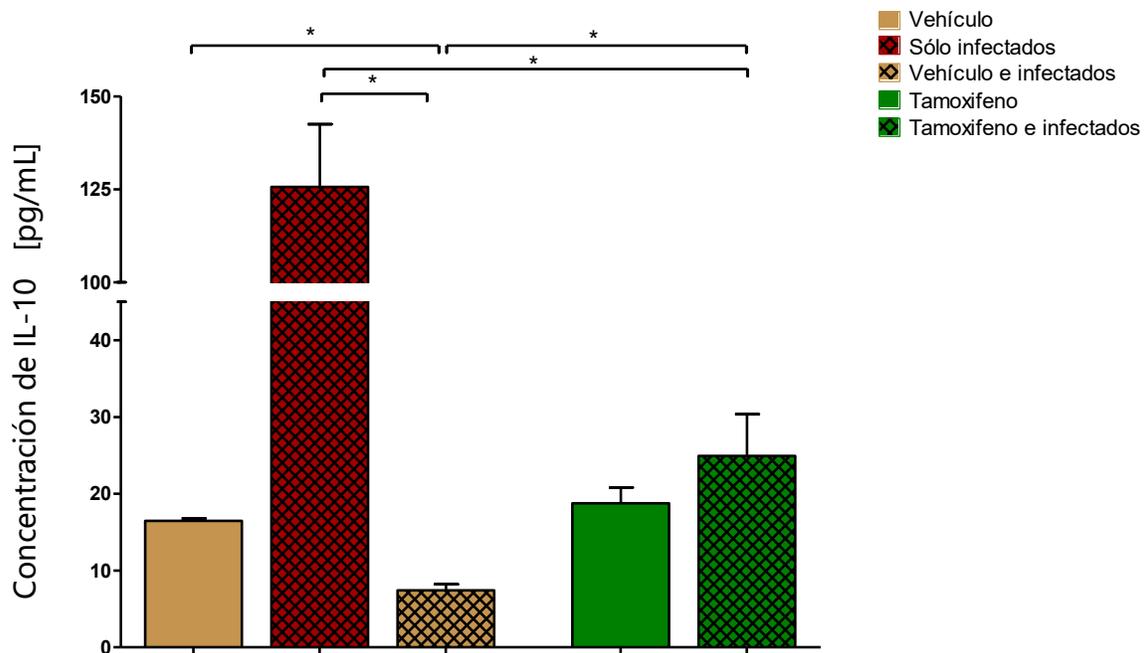


Figura 10. Efecto del tamoxifeno sobre la concentración sérica de interleucina 10 (IL-10) en ratones hembras CBA/Ca infectadas con *P. berghei* ANKA. Dos grupos de ratones hembra se trataron con tamoxifeno o con vehículo durante 28 días consecutivos previo a la infección. La mitad de los ratones en cada grupo y un grupo adicional de ratones hembra CBA/Ca se infectaron con *P. berghei* ANKA. En el día 8 post-infección, se sacrificaron, se extrajo sangre y se cuantificó IL-10 en suero por citometría de flujo. Cada barra representa la media de cada grupo \pm SEM. * Representa la diferencia estadísticamente significativa entre los grupos, calculada con ANOVA de una vía y prueba de Tukey ($p < 0.05$).

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este trabajo se utilizó la estrategia de bloquear a los receptores de estrógenos con tamoxifeno para estudiar la participación del estradiol en el proceso inflamatorio en el cerebro de ratones infectados con *P. berghei* ANKA, ya que la teoría del incremento en las citocinas inflamatorias es la más aceptada para explicar el origen de la malaria cerebral (2-4).

Detectamos que bloquear a los receptores de estrógenos con tamoxifeno incrementó significativamente la parasitemia con relación al grupo de ratones que únicamente se infectaron [Figura 6], lo que sugiere que los estrógenos son responsables de promover mecanismos que eliminen el parásito. Esto corrobora los resultados ya reportados en nuestro grupo de investigación en el que se determinó que una disminución en la concentración de estrógenos por gonadectomía, incrementa significativamente la parasitemia (8), lo que sugiere que las hormonas sexuales promueven la eliminación del parásito y particularmente en este trabajo, los estrógenos. Además, es notable que la parasitemia incrementó en el grupo de ratones hembra CBA/Ca que recibieron DMSO y solución salina como vehículo, la parasitemia aumentó significativamente con relación al grupo de ratones que únicamente se infectaron [Figura 6]. Una posible explicación para éste hallazgo se deba es que por su estructura química y capacidad antioxidante, el DMSO es capaz de secuestrar especies reactivas de oxígeno [ERO] (59) que contribuyen a la eliminación del parásito (60); por lo tanto, sugerimos que el DMSO puede ser responsable del incremento en la parasitemia.

Otro mecanismo necesario para promover la eliminación de *Plasmodium*, es por medio del IFN- γ , ya que activa a los macrófagos y a las células NK (61). Pero, su exceso se asocia con el desarrollo de la malaria cerebral (3, 31).

La administración de tamoxifeno en el grupo infectado disminuyó la expresión de IFN- γ en comparación con el grupo que únicamente se infectó o el que se trató con vehículo y se infectó [Figura 7]. Éste resultado sugiere que los estrógenos modulan positivamente la expresión de esta citocina en cerebro de ratones infectados con *P.*

berghei ANKA. Esto corrobora los resultados de Cernetich et. al. quienes describieron que los estrógenos influyen positivamente en la expresión del ARNm para IFN- γ durante la infección por *Plasmodium* (36). Estos resultados sugieren que los estrógenos al interactuar con sus receptores activan a los astrocitos o a las células de la microglía en cerebro durante la infección por *Plasmodium*, que son células que sintetizan IFN- γ en el cerebro (62).

Además, la expresión del IFN- γ disminuyó significativamente en el grupo de ratones que recibieron infección y vehículo, en comparación con el grupo de ratones únicamente infectados [Figura 7], posiblemente porque el vehículo contenía DMSO, una sustancia antiinflamatoria que disminuye la expresión de citocinas proinflamatorias como el IFN- γ (63).

Adicionalmente, se determinó la concentración sérica para IFN- γ e IL-10. Interesantemente, se encontró que los estrógenos aumentan la concentración sérica de IFN- γ en los ratones infectados [Figura 8]. Nuevamente, detectamos que el vehículo interfirió por sus propiedades antiinflamatorias. No obstante, dado que tanto el grupo tratado con tamoxifeno como el que se trató únicamente con el vehículo disminuyeron la concentración de IFN- γ , inferimos que los estrógenos modulan positivamente la concentración sérica de IFN- γ .

El desarrollo de la malaria cerebral se asocia con el aumento de IFN- γ y para regular ese exceso se sintetiza IL-10 (64). Nuestros resultados demuestran que bloquear a los receptores de estrógenos disminuyó significativamente la expresión de ARNm que codifica para IL-10 en ratones infectados con *P. berghei* ANKA [Figura 9], lo que sugiere que los estrógenos aumentan la expresión de IL-10, probablemente para impedir el exceso de IFN- γ y así evitar el desarrollo a malaria cerebral. En contraste, la expresión de ARNm que codifica para IL-10 se eleva en el grupo de ratones tratados con tamoxifeno y no infectados, en comparación a los ratones sin infección y tratados con vehículo [Figura 9], por lo que inferimos que los estrógenos inducen un aumento en la expresión génica para IL-10 si no existe el estímulo de la infección con *P. berghei* ANKA.

Cabe destacar que la expresión de IL-10 se modificó por la administración de DMSO como vehículo [Figura 9], pero no generó un cambio significativo, por lo que el efecto observado es propio del tamoxifeno.

Además, bloquear a los receptores de estrógenos disminuyó la concentración sérica de IL-10 en ratones infectados con *P. berghei* ANKA lo que sugiere que los estrógenos modulan la síntesis de IL-10 [Figura 10]. La reducción en la concentración de IL-10 que se detectó en los ratones tratados con vehículo podría deberse a que el DMSO suprime la proliferación de las linfocitos T reguladores, y por lo tanto, también inhibió la síntesis de IL-10 (63). Además, debido a que el IFN- γ disminuyó en los ratones infectados que recibieron vehículo, entonces la IL-10 no necesita elevarse para regular la concentración del IFN- γ . Nuestros resultados sugieren que los estrógenos modulan negativamente la concentración sérica de IL-10, lo cual corrobora la información descrita por León-Nava y colaboradores, quienes describieron que el estradiol regula negativamente a la IL-10 por respuestas de tipo Th2 (47).

Debido a que el DMSO interfiere con los resultados, es recomendable utilizar un diluyente que no tenga estas propiedades antiinflamatorias, en el cual sea soluble el tamoxifeno para su posible administración vía oral. Un posible vehículo es el etanol al 95%, en el que el tamoxifeno es soluble a una concentración de 20 mg/mL (65).

10. CONCLUSIONES

Los estrógenos intervienen en la eliminación del parásito y modulan negativamente la concentración de IFN- γ e IL-10 en suero. Por el contrario, modulan positivamente la expresión del ARNm que codifica para las mismas citocinas, por lo tanto, los mecanismos que regulan la expresión génica en cerebro de las citocinas: IFN- γ e IL-10, difieren de los que regulan su concentración en suero en los ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA.

El DMSO, diluído con solución salina empleado como vehículo influye en la expresión y en la concentración de citocinas pro y antiinflamatorias en el cerebro y suero de ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA.

11. PERSPECTIVAS

Para realizar un análisis más integral en este tejido es importante cuantificar otras citocinas proinflamatorias como la IL-1 β , el TNF- α e IL-6, y antiinflamatorias, como el TGF- β . Así como cuantificar capacidad antioxidante de enzimas como: catalasa, superóxido-dismutasa y glutatión peroxidasa, que participan en la regulación de las especies reactivas de oxígeno. Además, se debe utilizar otro vehículo que no tenga propiedades antiinflamatorias.

12. REFERENCIAS

1. Organization WH. World malaria report 2016. Geneva: WHO Embargoed until. 2016;13.
2. Dunst J, Kamena F, Matuschewski K. Cytokines and chemokines in cerebral malaria pathogenesis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2017;7:324.
3. 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.
4. Storm J, Craig AG. Pathogenesis of cerebral malaria—inflammation and cytoadherence. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2014;4:100.
5. Legorreta-Herrera M, Mosqueda-Romo NA, Rodríguez-Morales AL, Buendía-González FO, Aguilar-Sánchez M, Morales-Montor J. Gonadal steroids negatively modulate oxidative stress in CBA/Ca female mice infected with *P. berghei* ANKA. *BioMed research international*. 2014;2014.
6. Ahmed SA, Penhale W, Talal N. Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. *Mechanisms of sex hormone action. The American journal of pathology*. 1985;121(3):531.
7. Phiel KL, Henderson RA, Adelman SJ, Elloso MM. Differential estrogen receptor gene expression in human peripheral blood mononuclear cell populations. *Immunology letters*. 2005;97(1):107-113.
8. Legorreta-Herrera M, Mosqueda-Romo NA, Nava-Castro KE, Morales-Rodríguez AL, Buendía-González FO, Morales-Montor J. Sex hormones modulate the immune response to *Plasmodium berghei* ANKA in CBA/Ca mice. *Parasitology research*. 2015;114(7):2659-2669.
9. Klein PW, Easterbrook JD, Lalime EN, Klein SL. Estrogen and progesterone affect responses to malaria infection in female C57BL/6 mice. *Gender medicine*. 2008;5(4):423-433.
10. Barakat R, Oakley O, Kim H, Jin J, Ko CJ. Extra-gonadal sites of estrogen biosynthesis and function. *BMB reports*. 2016;49(9):488.
11. Wassmer SC, Taylor TE, Rathod PK, Mishra SK, Mohanty S, Arevalo-Herrera M, et al. Investigating the pathogenesis of severe malaria: a multidisciplinary and cross-geographical approach. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2015;93(3 Suppl):42-56.
12. Organization WH. World malaria report 2017. Geneva: WHO Embargoed until. 2017:196.
13. Gonzalez-Ceron L, Mu J, Santillán F, Joy D, Sandoval MA, Camas G, et al. Molecular and epidemiological characterization of *Plasmodium vivax* recurrent infections in southern Mexico. *Parasites & vectors*. 2013;6(1):109.
14. Salud Sd. Boletín Epidemiológico Nacional. Dirección General de Epidemiología; 2018.
15. González Azcárate I. Inmunidad a la malaria letal en modelos murinos: adquisición espontánea o mediada por tratamiento quimioterapéutico. *Immunity to tethal malaria in murine models: natural and chemotherapy-mediated acquisition [Experimental]*: Universidad Complutense de Madrid; 2013.

16. Frédérich M, Dogné J-M, Angenot L, Mol P. New trends in anti-malarial agents. *Current medicinal chemistry*. 2002;9(15):1435-1456.
17. Shio MT, Kassa FA, Bellemare M-J, Olivier M. Innate inflammatory response to the malarial pigment hemozoin. *Microbes and Infection*. 2010;12(12):889-899.
18. White NJ. Malaria parasite clearance. *Malaria Journal*. 2017;16:14.
19. Langhorne J, Ndungu FM, Sponaas A-M, Marsh K. Immunity to malaria: more questions than answers. *Nature immunology*. 2008;9(7):725-732.
20. Rénia L, Howland SW, Claser C, Gruner AC, Suwanarusk R, Teo T-H, et al. Cerebral malaria: mysteries at the blood-brain barrier. *Virulence*. 2012;3(2):193-201.
21. Pimenta PF, Orfano AS, Bahia AC, Duarte AP, Ríos-Velásquez CM, Melo FF, et al. An overview of malaria transmission from the perspective of Amazon *Anopheles* vectors. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2015;110(1):23-47.
22. Bousema T, Drakeley C. Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination. *Clinical microbiology reviews*. 2011;24(2):377-410.
23. Perkins DJ, Were T, Davenport GC, Kempaiah P, Hittner JB, Ong'echa JM. Severe malarial anemia: innate immunity and pathogenesis. *Int J Biol Sci*. 2011;7(9):1427-1442.
24. Vásquez AM, Tobón A. Mecanismos de patogenia en la malaria por *Plasmodium falciparum*. *Biomédica*. 2012;32(sup1):106-120.
25. Sahu PK, Satpathi S, Behera PK, Mishra SK, Mohanty S, Wassmer SC. Pathogenesis of cerebral malaria: new diagnostic tools, biomarkers, and therapeutic approaches. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2014;5:75.
26. De Souza JB, Hafalla JC, Riley EM, Couper KN. Cerebral malaria: why experimental murine models are required to understand the pathogenesis of disease. *Parasitology*. 2010;137(5):755-772.
27. Nacer A, Movila A, Sohet F, Girgis NM, Gundra UM, Loke Pn, et al. Experimental cerebral malaria pathogenesis—hemodynamics at the blood brain barrier. *PLoS pathogens*. 2014;10(12).
28. Bhatia A, Sekhon HK, Kaur G. Sex hormones and immune dimorphism. *The Scientific World Journal*. 2014;2014.
29. Staniscic DI, Barry AE, Good MF. Escaping the immune system: how the malaria parasite makes vaccine development a challenge. *Trends in parasitology*. 2013;29(12):612-622.
30. Stevenson MM, Riley EM. Innate immunity to malaria. *Nature Reviews Immunology*. 2004;4(3):169-180.
31. Gun SY, Claser C, Tan KSW, Rénia L. Interferons and interferon regulatory factors in malaria. *Mediators of inflammation*. 2014;2014.
32. Casas LA, Gutiérrez AG. Asociación de polimorfismos genéticos de TNF- α e IL-10, citocinas reguladoras de la respuesta inmune en enfermedades infecciosas, alérgicas y autoinmunes. *Asociación Colombiana de Infectología*. 2008;12(1):274-279.
33. Malaguarnera L, Musumeci S. The immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. *The Lancet infectious diseases*. 2002;2(8):472-478.
34. Gómez Marrugo DC, Moneriz Pretell CE. Perfil de citoquinas y anticuerpos en respuesta a la infección por *plasmodium vivax* en una población del sur de Bolívar, Colombia: Universidad de Cartagena; 2013.

35. Torre D, Speranza F, Martegani R. Role of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in the immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. *The Lancet infectious diseases*. 2002;2(12):719.
36. Cernetich A, Garver LS, Jedlicka AE, Klein PW, Kumar N, Scott AL, et al. Involvement of gonadal steroids and gamma interferon in sex differences in response to blood-stage malaria infection. *Infection and immunity*. 2006;74(6):3190-3203.
37. Cui J, Shen Y, Li R. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends in molecular medicine*. 2013;19(3):197-209.
38. Samavat H, Kurzer MS. Estrogen metabolism and breast cancer. *Cancer letters*. 2015;356(2):231-243.
39. Giannoni E, Guignard L, Reymond MK, Perreau M, Roth-Kleiner M, Calandra T, et al. Estradiol and progesterone strongly inhibit the innate immune response of mononuclear cells in newborns. *Infection and immunity*. 2011;79(7):2690-2698.
40. DonCarlos LL, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. Neuroprotective actions of selective estrogen receptor modulators. *Psychoneuroendocrinology*. 2009;34:S113-S122.
41. Weerd NA, Nguyen T. The interferons and their receptors—distribution and regulation. *Immunology & Cell Biology*. 2012;90(5):483-491.
42. Zapata Zapata CH, Blair Trujillo S. Malaria cerebral. *Iatreia*. 2003;16(3):202-16.
43. Grossman CJ. The role of sex steroids in immune system regulation. *Bilateral communication between the endocrine and immune systems*: Springer; 1994. p. 1-11.
44. Gourdy P, Araujo LM, Zhu R, Garmy-Susini B, Diem S, Laurell H, et al. Relevance of sexual dimorphism to regulatory T cells: estradiol promotes IFN- γ production by invariant natural killer T cells. *Blood*. 2005;105(6):2415-20.
45. De Souza JB, Riley EM. Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. *Microbes and Infection*. 2002;4(3):291-300.
46. Medina TS, Costa SP, Oliveira MD, Ventura AM, Souza JM, Gomes TF, et al. Increased interleukin-10 and interferon- γ levels in malaria suggest a reciprocal regulation which is not altered by IL-10 gene promoter polymorphism. *Malaria journal*. 2011;10(1):264.
47. León-Nava D, Marco A, Morales-Montor J. Dimorfismo sexual inmunitario: ¿pueden los esteroides sexuales polarizar el perfil de citocinas Th1/Th2? *Revista de investigación clínica*. 2006;58(2):161-9.
48. Riggs BL, Hartmann LC. Selective estrogen-receptor modulators—mechanisms of action and application to clinical practice. *New England Journal of Medicine*. 2003;348(7):618-629.
49. Peng J, Sengupta S, Jordan VC. Potential of selective estrogen receptor modulators as treatments and preventives of breast cancer. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*. 2009;9(5):481-499.
50. Martinkovich S, Shah D, Planey SL, Arnott JA. Selective estrogen receptor modulators: tissue specificity and clinical utility. *Clinical interventions in aging*. 2014;9:1437.

51. Jordan VC. Tamoxifen: a most unlikely pioneering medicine. *Nature reviews Drug discovery*. 2003;2(3):205.
52. Escobedo G, Palacios-Arreola MI, Olivos A, López-Griego L, Morales-Montor J. Tamoxifen treatment in hamsters induces protection during taeniosis by *Taenia solium*. *BioMed research international*. 2012;2013.
53. Lonard DM, Smith CL. Molecular perspectives on selective estrogen receptor modulators (SERMs): progress in understanding their tissue-specific agonist and antagonist actions. *Steroids*. 2002;67(1):15-24.
54. Taylor A, Al-Azzawi F. Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *Journal of molecular endocrinology*. 2000;24(1):145-155.
55. Gjerde J, Gandini S, Guerrieri-Gonzaga A, Moi LLH, Aristarco V, Mellgren G, et al. Tissue distribution of 4-hydroxy-N-desmethyltamoxifen and tamoxifen-N-oxide. *Breast cancer research and treatment*. 2012;134(2):693-700.
56. Morad SA, Cabot MC. Tamoxifen regulation of sphingolipid metabolism—therapeutic implications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2015;1851(9):1134-1145.
57. Benten W, Wunderlich F, Mossmann H. *Plasmodium chabaudi*: estradiol suppresses acquiring, but not once-acquired immunity. *Experimental parasitology*. 1992;75(2):240-247.
58. Vargas-Villavicencio JA, Larralde C, De León-Nava MA, Escobedo G, Morales-Montor J. Tamoxifen treatment induces protection in murine cysticercosis. *Journal of Parasitology*. 2007;93(6):1512-1517.
59. Santos NC, Figueira-Coelho J, Martins-Silva J, Saldanha C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochemical pharmacology*. 2003;65(7):1035-1041.
60. Percário S, Moreira DR, Gomes BA, Ferreira ME, Gonçalves ACM, Laurindo PS, et al. Oxidative stress in malaria. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012;13(12):16346-16372.
61. Miller JL, Sack BK, Baldwin M, Vaughan AM, Kappe SH. Interferon-mediated innate immune responses against malaria parasite liver stages. *Cell reports*. 2014;7(2):436-447.
62. Hanisch UK. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*. 2002;40(2):140-55.
63. Kloverpris H, Fomsgaard A, Handley A, Ackland J, Sullivan M, Goulder P. Dimethyl sulfoxide (DMSO) exposure to human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) abolish T cell responses only in high concentrations and following coincubation for more than two hours. *Journal of immunological methods*. 2010;356(1-2):70-78.
64. Kossodo S, Monso C, Juillard P, Velu T, Goldman M, Grau GE. Interleukin-10 modulates susceptibility in experimental cerebral malaria. *Immunology*. 1997;91(4):536-540.
65. Chemical C. Tamoxifen. Data Sheet. Company CC; 2015 04 Jul 2015.