



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Estudio de la actividad inmunomoduladora de los andrógenos  
como resultado de inhibir a la enzima p450 aromatasa de ratones  
CBA/Ca infectados con *Plasmodium berghei* ANKA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**TERESITA DE JESÚS NOLASCO PÉREZ**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS**

**DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

**COMITÉ TUTOR**

**DRA. LETICIA MORENO FIERROS**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

**DR. RICARDO LASCURAIN LEDESMA**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**MÉXICO, CD. MX.**

**JULIO, 2022**



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

**Estudio de la actividad inmunomoduladora de los andrógenos  
como resultado de inhibir a la enzima p450 aromatasa de ratones  
CBA/Ca infectados con *Plasmodium berghei* ANKA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**TERESITA DE JESÚS NOLASCO PÉREZ**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS**

**DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

**COMITÉ TUTOR**

**DRA. LETICIA MORENO FIERROS**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

**DR. RICARDO LASCURAIN LEDESMA**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**MÉXICO, CD. MX.**

**JULIO, 2022**

**COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**OFICIO CPCB/486/2022**

**ASUNTO: Oficio de Jurado**

**M. en C. Ivonne Ramírez Wence**  
**Directora General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **14 de febrero de 2022** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** de la estudiante **NOLASCO PEREZ TERESITA DE JESUS** con número de cuenta **412012411** con la tesis titulada **“Estudio de la actividad inmunomoduladora de los andrógenos como resultado de inhibir la enzima p450 aromatasasa de ratones CBA/Ca infectados con *Plasmodium berghei* ANKA”**, bajo la dirección de la **DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA  
Vocal: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ  
Vocal: DRA. ANA MARÍA CEVALLOS GAOS  
Vocal: DRA. LETICIA MORALES LEDESMA  
Secretaria: DRA. LETICIA MORENO FIERROS

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

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 26 de mayo de 2022

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



## **I. Agradecimientos institucionales**

- Con especial agradecimiento al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por el plan de estudios y la obtención del grado de Maestría en Ciencias Biológicas.
- Al sistema de becas de CONACYT por el apoyo económico asignado durante la maestría, número de apoyo 765791.
- Al financiamiento otorgado al proyecto de investigación PAPIIT IN228620 por DGAPA-UNAM que permitió obtener los recursos necesarios para la realización de proyecto
- A la Dra. Martha Legorreta Herrera que como mi director principal de tesis me brindó el apoyo necesario para la realización del proyecto, además de consejos para mi superación profesional.
- A los miembros de mi comité tutor: la Dra. Leticia Moreno Fierros y el Dr. Ricardo Lascurain Ledesma, que gracias a sus consejos me permitieron mejorar mi proyecto de investigación.

## II. Agradecimientos a título personal

- A mis padres: Marcela Pérez y Bernabé Nolasco que me brindaron comprensión, de quienes siempre recibo cariño y el apoyo necesario para cumplir con mis expectativas. Que, con sus enseñanzas de respeto y constancia, son clave para mi superación personal y profesional.
- A mi abuelita Lucía Herrera Ramírez, que siempre creyó en mí, que desde pequeña me dio todo lo que en ella fue posible. Le agradezco que siempre tenía un abrazo reconfortante y siempre me recibía con una gran sonrisa. De ella aprendí a dar todo por lo que queremos y tener fuerza en defender nuestros objetivos e ideas.
- A mi hermano Eduardo Nolasco Pérez, que siempre está presente para brindarme ayuda, me da ánimo día a día y que al reírnos de todo me da ese apoyo emocional necesario para pasar las dificultades.
- A mi compañero y amigo de laboratorio Luis Cervantes Candelas que, con su apoyo a cada momento, palabras de motivación y consejos, me ayudó a superar los momentos difíciles que se presentaron durante el posgrado.
- A cada uno de mis compañeros de laboratorio: Fidel Buendía, Sofía López, Omar Fernández y Jesús Aguilar que contribuyeron con ideas y apoyo importantes para la realización del proyecto.
- Finalmente, al software de BioRender.com donde realicé cada una de las figuras de esta tesis.

### III. Índice

1. Resumen .....	1
2. Abstract.....	2
3. Introducción .....	3
4. Marco teórico .....	4
4.1. Malaria .....	4
4.1.1. Ciclo de vida .....	5
4.1.2. Sintomatología en malaria .....	7
4.2. Dimorfismo sexual en malaria .....	8
4.2.1. Respuesta inmunitaria y hormonas sexuales en infecciones parasitarias .....	8
4.2.2. Andrógenos y respuesta inmunitaria en malaria.....	11
4.3. Síntesis de las hormonas sexuales.....	12
4.4. Aromatasa.....	13
4.5. Inhibidores de la enzima p450 aromatasa.....	14
4.5.1. Letrozol.....	15
5. Objetivos.....	17
5.1. Objetivo General .....	17
5.2. Objetivos Específicos .....	17
6. Materiales .....	18
6.1. Animales de experimentación .....	18
6.2. Parásito.....	18
6.3. Fármacos .....	18



7. Métodos.....	19
7.1. Diseño experimental.....	19
7.2. Administración con letrozol o testosterona.....	20
7.3. Infección con <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.....	21
7.4. Determinación de la parasitemia.....	21
7.5. Determinación de la concentración de hemoglobina.....	21
7.6. Determinación de masa y temperatura corporal .....	21
7.7. Determinación del tiempo de sobrevivida .....	22
7.8. Cuantificación de la concentración de testosterona libre, estradiol y DHEA .....	22
7.9. Sacrificio de ratones y obtención de muestras.....	22
7.10. Determinación del índice esplénico .....	22
7.11. Cuantificación de las poblaciones celulares de bazo.....	23
7.12. Determinación de la concentración plasmática de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$ y TNF- $\alpha$ .....	23
7.13. Determinación de la concentración de anticuerpos IgM e IgG específicos para <i>P. berghei</i> ANKA.....	24
8. Resultados.....	25
8.1. Efecto de las dosis y vías de administración del letrozol sobre la parasitemia, masa y temperatura corporal y concentración de hemoglobina en ratones CBA/Ca macho infectados con <i>P. berghei</i> ANKA .....	25
8.2. Efecto del tratamiento con letrozol o testosterona sobre la concentración plasmática de testosterona libre, 17 $\beta$ -estradiol y DHEA de ratones CBA/Ca macho tratados con Letrozol o Testosterona e infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.....	31

8.3. Efecto del letrozol y la testosterona sobre la parasitemia, la pérdida de peso, la temperatura y la concentración de hemoglobina de ratones macho CBA/Ca infectados con <i>P. berghei</i> ANKA .....	33
8.4. Efecto del letrozol y la testosterona sobre el índice esplénico y el porcentaje de poblaciones celulares CD3 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> , Mac-3 <sup>+</sup> , CD16 <sup>+</sup> /32 <sup>+</sup> en el bazo de ratones macho CBA/Ca infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.....	36
8.5. Efecto del letrozol y la testosterona sobre la concentración sérica de las citocinas: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$ y TNF- $\alpha$ .....	38
8.6. Efecto del letrozol y la testosterona sobre la concentración de anticuerpos IgM e IgG específicos contra <i>P. berghei</i> ANKA. ....	41
9. Discusión .....	42
10. Conclusiones .....	50
11. Perspectivas .....	51
12. Referencias.....	52

## IV. Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida de <i>Plasmodium sp.</i> en el humano. ....	6
<b>Figura 2.</b> Respuesta inmunitaria durante la infección por <i>Plasmodium sp.</i> .....	10
<b>Figura 3.</b> Ruta de síntesis principal de los andrógenos a partir del colesterol. ....	13
<b>Figura 4.</b> Efecto de administrar letrozol vía oral a la dosis de 1 mg/Kg de peso corporal sobre la sobrevida, parasitemia, masa corporal, temperatura y concentración de hemoglobina de ratones CBA/Ca infectados con <i>Plasmodium berghei</i> ANKA. ....	26
<b>Figura 5.</b> Efecto del letrozol por vía oral a dosis de 1, 2 y 4 mg/Kg de peso corporal sobre la sobrevida, la parasitemia, la masa corporal, la temperatura y la concentración de hemoglobina en ratones CBA/Ca infectados con <i>Plasmodium berghei</i> ANKA. ....	28
<b>Figura 6.</b> Efecto del letrozol por vía oral o subcutánea sobre la sobrevida, la parasitemia, la masa corporal, la temperatura y la concentración de hemoglobina en ratones CBA/Ca infectados con <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.....	30
<b>Figura 7.</b> Efecto del letrozol, y la testosterona sobre la concentración de testosterona libre, 17b-estradiol y DHEA en ratones infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.....	32
<b>Figura 8.</b> Efecto de los andrógenos sobre la parasitemia, la concentración de hemoglobina, la masa y la temperatura corporales de ratones CBA/Ca macho infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.....	35
<b>Figura 9.</b> Efecto de los andrógenos sobre el índice esplénico y el porcentaje de poblaciones celulares CD3 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> , Mac-3 <sup>+</sup> , CD16 <sup>+</sup> /32 <sup>+</sup> en el bazo de ratones CBA/Ca machos infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.....	37
<b>Figura 10.</b> Efecto de los andrógenos sobre la concentración sérica de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$ y TNF- $\alpha$ de ratones CBA/Ca machos infectados con <i>P. berghei</i> ANKA. .	40
<b>Figura 11.</b> Efecto de los andrógenos sobre la concentración de anticuerpos IgM e IgG específicos contra <i>P. berghei</i> ANKA. ....	41
<b>Figura 12.</b> Resumen de efecto de los andrógenos sobre la patología y respuesta inmunitaria desarrollada en la infección con <i>P. berghei</i> ANKA como resultado de inhibir a la enzima p450 aromatasa en un modelo de ratones macho CBA/Ca. ....	49

## 1. Resumen

La malaria es la parasitosis que ocasiona el mayor número de muertes en el mundo. La mortalidad y la gravedad de los síntomas es mayor en los hombres que en las mujeres. Dado que las hormonas sexuales son responsables de las principales diferencias fisiológicas entre los sexos, se han diseñado diferentes estrategias para estudiar la participación de la testosterona (con actividad inmunosupresora) en esa respuesta dimórfica en modelos experimentales de malaria; se ha incrementado su concentración administrando la hormona, o bien se han reconstituido con testosterona a ratones gonadectomizados previos a la infección con el *Plasmodium*. Sin embargo, en ambas estrategias no se consideró que la testosterona se transforma en estrógenos gracias a la enzima p450 aromatasa y que entonces los resultados se debieron a una combinación de estrógenos y testosterona. Por lo anterior, en este trabajo administramos testosterona, pero también inhibimos selectivamente a la enzima p450 aromatasa con letrozol previo a la infección con *P. berghei* ANKA. En primer lugar, se calibró la dosis efectiva del inhibidor de la enzima p450 aromatasa (7 mg/Kg de peso corporal) en nuestro modelo experimental de ratones CBA/Ca macho. Con esa dosis se realizaron experimentos que permitieron conocer los efectos de la testosterona sobre: la parasitemia, el peso corporal, la temperatura, la concentración de hemoglobina y sobre la respuesta inmunitaria (poblaciones celulares CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, NK y macrófagos; así como la concentración sérica de las citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ). La administración de letrozol (7 mg/Kg) y testosterona (30 mg/Kg) aumentaron la gravedad de la infección al aumentar la parasitemia, disminuir la concentración de hemoglobina y la masa corporal. Sin embargo, protegió a los ratones de la disminución en la temperatura provocada por la infección con *P. berghei* ANKA. Además, se inhibió la concentración de la IL-17 y el porcentaje de los linfocitos TCD4<sup>+</sup>, NK, linfocitos B y la síntesis de anticuerpos IgM e IgG. Además, aumentó la liberación de IFN- $\gamma$ , IL-10 y TNF- $\alpha$  que probablemente incrementó el porcentaje de macrófagos o linfocitos T CD8<sup>+</sup> en la infección con *P. berghei* ANKA.

## 2. Abstract

Malaria is the parasitic disease that causes the highest number of deaths in the world. Mortality and severity of symptoms is higher in men than in women. Given those sexual hormones are responsible for the main physiological differences between the sexes, different strategies have been designed to study the participation of testosterone (with immunosuppressive activity) in this dimorphic response in experimental models of malaria; administering the hormone to increase its concentration, or gonadectomized mice prior to infection with *Plasmodium* have been reconstituted with testosterone. However, in either of these strategies it isn't considered that testosterone is converted into estrogens by the enzyme p450 aromatase and that the results obtained are then due to a combination of estrogens and testosterone. Therefore, in this work we administered testosterone, but we also selectively inhibited the enzyme p450 aromatase with letrozole prior to infection with *P. berghei* ANKA. First, the dose of the inhibitor of the enzyme p450 aromatase effective in our experimental model (7 mg/Kg of body weight) was calibrated. With this dose, experiments were carried out that allowed knowing the effects of testosterone on: parasitaemia, body weight, temperature, hemoglobin concentration and on the immune response (cell populations CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD-19<sup>+</sup>, NK and macrophages, as well as the serum concentration of the cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ). The administration of letrozole (7 mg/Kg) and testosterone (30 mg/Kg) increased the severity of the infection by increasing parasitaemia, decreasing hemoglobin concentration and body mass. However, it did protect the mice from decreased temperature caused by infection with *P. berghei* ANKA. In addition, androgens inhibited the level of IL-17 and the percentage of TCD4<sup>+</sup> lymphocytes, NK, B lymphocytes and the synthesis of IgM and IgG antibodies. In addition, increased the release of IFN- $\gamma$ , IL-10 and TNF- $\alpha$ , it probably increased the percentage of macrophages or CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in infection with *P. berghei* ANKA.

### 3. Introducción

La malaria es la enfermedad parasitaria con mayor mortalidad en el mundo (1). La incidencia de la infección en los humanos es similar en los hombres y en las mujeres. Sin embargo, la severidad de los síntomas y la mortalidad es mayor en los hombres (2). Debido a que las principales diferencias fisiológicas entre los sexos se deben a las distintas concentraciones de los esteroides sexuales; en las mujeres predominan los estrógenos, mientras que en los hombres los andrógenos, ambas hormonas modulan la respuesta inmunitaria de forma diferente. La testosterona posee actividad inmunosupresora, mientras que los estrógenos promueven la inmunidad (3-6).

En general, los andrógenos median sus efectos al interactuar con sus receptores en la membrana plasmática o en el núcleo de las células de la respuesta inmunitaria, al translocarse en el núcleo se unen a elementos de respuesta que regulan la expresión de diversos genes, por lo que modifican la respuesta celular o humoral e incluso la activación o diferenciación de linfocitos T, B, células NK, macrófagos, células dendríticas, etc (7, 8). En los modelos murinos, se ha documentado que los andrógenos poseen actividad supresora (9-11). Estas conclusiones se han obtenido tanto en nuestro equipo de investigación como en otros en los que se disminuye la concentración de los andrógenos mediante gonadectomía (que reduce la concentración de todos los esteroides sexuales), o bien se aumenta su concentración vía la administración de testosterona en las infecciones con *Plasmodium* (12). Sin embargo, no se considera que los andrógenos se transforman en estrógenos por acción de la enzima p450 aromatasa y que reconstituir a ratones gonadectomizados con testosterona o administrar testosterona exógena aumenta la concentración de estradiol, lo que compromete los efectos atribuidos a los andrógenos por interferencia de los estrógenos.

Por lo anterior, inhibir a la enzima p450 aromatasa y la administración de testosterona permite conocer el efecto inmunomodulador de los andrógenos en ratones CBA/Ca infectados con *Plasmodium berghei* ANKA.

## 4. Marco teórico

### 4.1. Malaria

La malaria es la enfermedad parasitaria que ocasiona el mayor número de muertes en el planeta. El informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) del 2021, estimó 241 millones de casos nuevos de malaria y 627 mil muertes en el mundo (13). La mayoría de los casos se presentan en África Subsahariana y en regiones de Asia y América (14-16).

La malaria se transmite por la picadura del mosquito hembra *Anopheles* infectado con el parásito *Plasmodium* (14). Se conocen 5 especies del *Plasmodium* que infectan al humano; *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium knowlesi* (17-19). De estas especies, *P. vivax* y *P. falciparum* constituyen el 95% de los casos totales en el mundo (1). La infección por *P. vivax* se distribuye ampliamente; se extiende a regiones tropicales, subtropicales y zonas templadas. La infección por *P. falciparum* generalmente se limita a los trópicos y es la especie más virulenta responsable de las complicaciones más severas (20, 21).

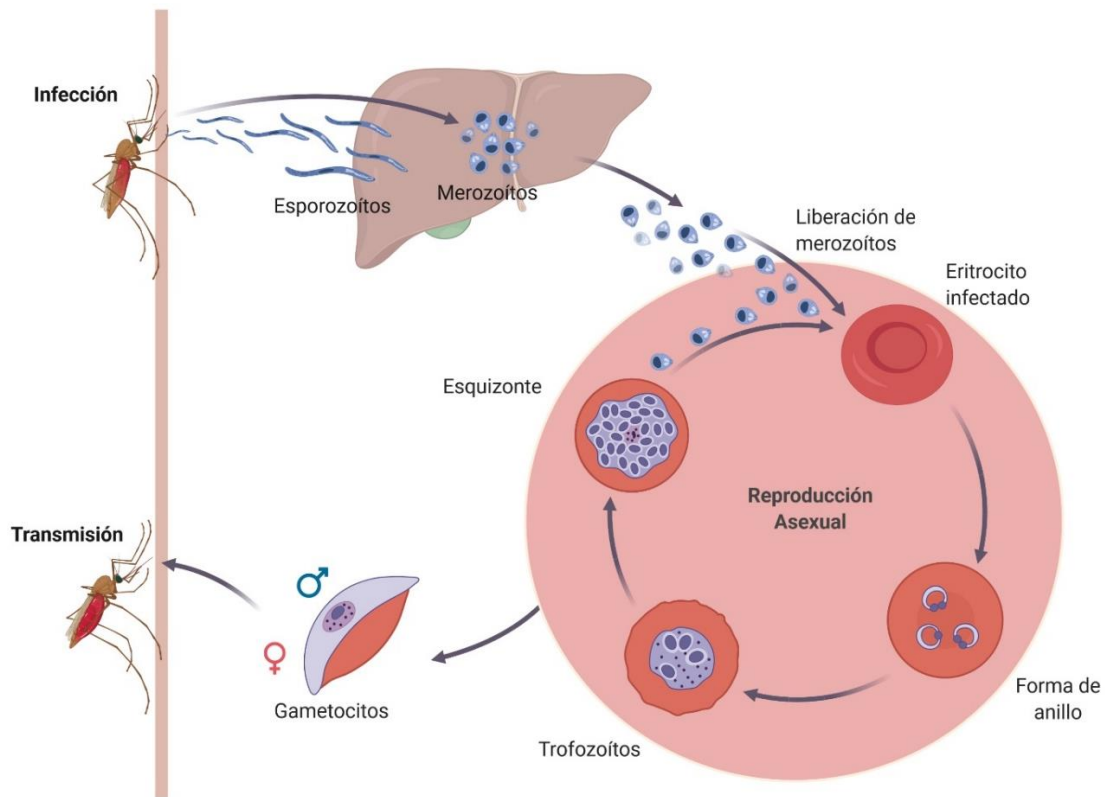
El estudio de la respuesta inmunitaria en la malaria humana se dificulta por razones técnicas y éticas; por lo anterior, se utilizan modelos murinos que han aportado la mayor parte del conocimiento actual sobre la respuesta inmunitaria frente al parásito *Plasmodium* (21). Las principales combinaciones de parásitos y hospederos que se utilizan en estos modelos son: *P. berghei*, *P. chabaudi*, *P. yoelii* o *P. vinckei*, que infectan a las cepas de ratón CBA/Ca, C57BL/6, BALB/c o DBA/2 (22, 23). La diversidad de cepas de ratón disponibles y que su sistema inmune es muy similar al del humano, hacen del ratón un excelente modelo experimental. El modelo de *P. berghei* ANKA que infecta a ratones C57BL/6 o a ratones CBA/Ca produce una patología multiorgánica que emula a la malaria cerebral que ocurre en la infección de *P. falciparum* en el humano (21, 24, 25). Los síntomas que se desarrollan en la infección con *Plasmodium* es el resultado de la replicación asexual constante del parásito dentro de los eritrocitos (26).

#### 4.1.1. Ciclo de vida

En el humano, el desarrollo del *Plasmodium*, se divide en dos etapas; asexual y sexual. La fase asexual se desarrolla en el humano, el hospedero intermediario; esta fase incluye una etapa exoeritrocítica y otra intraeritrocítica. La fase sexual, tiene lugar en la hembra del mosquito *Anopheles*, vector y hospedero definitivo (27, 28).

En el inicio del ciclo la hembra del mosquito *Anopheles* inocula esporozoítos al torrente sanguíneo del humano. Estos esporozoítos llegan al hígado e infectan a los hepatocitos, donde se reproducen asexualmente (28). Cada esporozoíto da lugar a múltiples merozoítos. Durante la etapa eritrocítica, los merozoítos liberados a la circulación sanguínea invaden los eritrocitos por un proceso llamado endocitosis (29). El merozoíto se desarrolla dentro del eritrocito a través de tres etapas: anillo, trofozoíto y esquizonte (27). El trofozoíto temprano que, por su morfología característica, se conoce como “forma de anillo” aumenta de tamaño para dar lugar a un trofozoíto. En esta etapa el parásito se caracteriza por poseer un metabolismo altamente activo, donde consume glucosa y hemoglobina obtenidas del hospedero (27). A medida que crece hasta su madurez, asume una forma ameboide en la que se divide en 20 a más merozoítos para invadir más eritrocitos no infectados, en esta etapa el parásito se denomina esquizonte (29). En la lisis del eritrocito infectado, el esquizonte también libera pigmentos y productos de desecho que, junto con los merozoítos, son responsables de la condición febril causada en los humanos. En esta fase, los productos de la lisis de los eritrocitos infectados estimulan la producción de factor de necrosis tumoral y otras citocinas, que son responsables de las manifestaciones clínicas de la enfermedad (28, 29). El tiempo de maduración de los gametocitos varía en las diferentes especies de *Plasmodium*. En el caso de *P. vivax* o *P. ovale*, el tiempo de maduración es cada 48 horas, mientras que en la infección por *P. malariae* ocurre cada 72 horas (30). Durante la etapa eritrocítica, una subpoblación de merozoítos se transforma en gametocitos, que maduran en microgametocitos (macho) o macrogametocitos (hembra), que ingiere el mosquito hembra *Anopheles* (29, 31) (Figura 1).





**Figura 1. Ciclo de vida de *Plasmodium sp.* en el humano.** El mosquito hembra inocula esporozoítos en el humano y se transportan por la circulación sanguínea al hígado. En los hepatocitos, el *Plasmodium* madura a merozoítos, que después de liberarse nuevamente al torrente sanguíneo, infectan a los eritrocitos. El inicio de la etapa eritrocítica da lugar al desarrollo del parásito en las tres fases (forma de anillo, trofozoítos y esquizontes). Una porción de esquizontes se transforma a gametocitos, que después se diferencian en microgametocitos o macrogametocitos para iniciar la reproducción sexual en el mosquito, nuevamente (28, 29, 31). Figura original creada en BioRender.com

Los microgametocitos y macrogametocitos de *Plasmodium* son las etapas sexuales del parásito responsables de la transmisión del humano al mosquito. Los microgametocitos se exflagelan para moverse rápidamente y fertilizar un macrogameto, este proceso desarrollará un cigoto (31). El cigoto no móvil se transforma en un oocisto móvil que atraviesa el epitelio del intestino, madura y se transforma en ooquiste. Después de la ruptura del ooquiste se liberan los esporozoítos que viajan a las glándulas salivales del mosquito, que en la siguiente ingesta de sangre humana inocularán a los esporozoítos y así se reinicia el ciclo de vida del *Plasmodium* en otro individuo (27, 28).

#### 4.1.2. Sintomatología en malaria

Los síntomas de la enfermedad se presentan principalmente durante la fase sanguínea del parásito. En la infección por *P. vivax*, *P. malariae* o *P. ovale* el malestar indefinido y la fiebre, aumentan después de algunos días del inicio de la infección; además, de escalofríos y en el pico de la reproducción asexual del parásito, se presenta un aumento rápido de la temperatura que se acompaña con dolor de cabeza, náusea y abundante sudoración (32). Esta sintomatología se repite en un periodo de 1 a 3 días, lo cual varía de acuerdo a la especie de *Plasmodium* que causó la infección (27).

En la patogénesis que genera la infección con *Plasmodium* se identifican tres puntos clave característicos de la malaria grave: a) Elevada eliminación de eritrocitos parasitados y macrófagos en bazo, lo que conduce a la anemia. b) Adherencia de glóbulos rojos parasitados a la pared de los vasos capilares y a las vénulas, esto interrumpe el flujo sanguíneo y causa lesiones de las células endoteliales, diapédesis leucocitaria e inflamación local de los tejidos, así como la obstrucción de capilares. c) Síntesis elevada de citocinas proinflamatorias que conduce a paroxismos febriles característicos de la enfermedad (33). De las citocinas proinflamatorias, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) induce la expresión de factores de adhesión en las células endoteliales, que promueven la adherencia de los eritrocitos infectados a los capilares (32).

La acumulación y secuestro de los eritrocitos infectados por *Plasmodium* en el cerebro es un rasgo característico de la malaria cerebral que puede conducir a la muerte, complicación característica en la infección por *P. falciparum* (29). Adicionalmente, afecta a diversos órganos como el corazón, los pulmones, los riñones, la placenta y los tejidos subcutáneos en los individuos infectados con el parásito por lo que suelen experimentar tos, dificultad respiratoria, dolor en las articulaciones, dolor de cabeza, diarrea acuosa, vómitos y convulsiones. Finalmente, se presenta ictericia, insuficiencia renal y anemia grave que pueden combinarse para causar los cuadros clínicos más graves de la enfermedad que a menudo son mortales (28).

## **4.2. Dimorfismo sexual en malaria**

En diversos estudios clínicos así como en investigaciones realizadas con modelos murinos de malaria, se informa que una característica principal es que se presenta dimorfismo sexual, es decir, que los hombres presentan mayor mortalidad causada por la infección con *Plasmodium* que las mujeres (34). Se ha documentado que existe un sesgo sexual y mayor incidencia de malaria en los hombres después de la pubertad que las mujeres, lo que sugiere que las hormonas sexuales participan en este dimorfismo sexual (2). En los modelos murinos, la severidad de las infecciones con *Plasmodium* difiere entre machos y hembras (35), los machos exhiben mayor parasitemia, menor temperatura, menor tiempo de sobrevivida y mayor pérdida de peso que las hembras cuando se infectan con *P. berghei* o con *P. chabaudi* (36, 37).

Además, los eritrocitos parasitados con *Plasmodium* se eliminan principalmente en el bazo por lo que, los pacientes desarrollan esplenomegalia (38, 39). Adicionalmente, el bazo es importante en la respuesta inmunitaria, ya que contiene poblaciones de linfocitos T, linfocitos B y macrófagos (40). De tal manera, el tamaño del bazo se afecta con relación a la severidad de la infección. Además, se ha descrito que la gonadectomía incrementa el índice esplénico (medida del tamaño del bazo) únicamente en los ratones macho infectados con *P. berghei* ANKA en comparación con los ratones hembra en la misma condición (36).

### **4.2.1. Respuesta inmunitaria y hormonas sexuales en infecciones parasitarias**

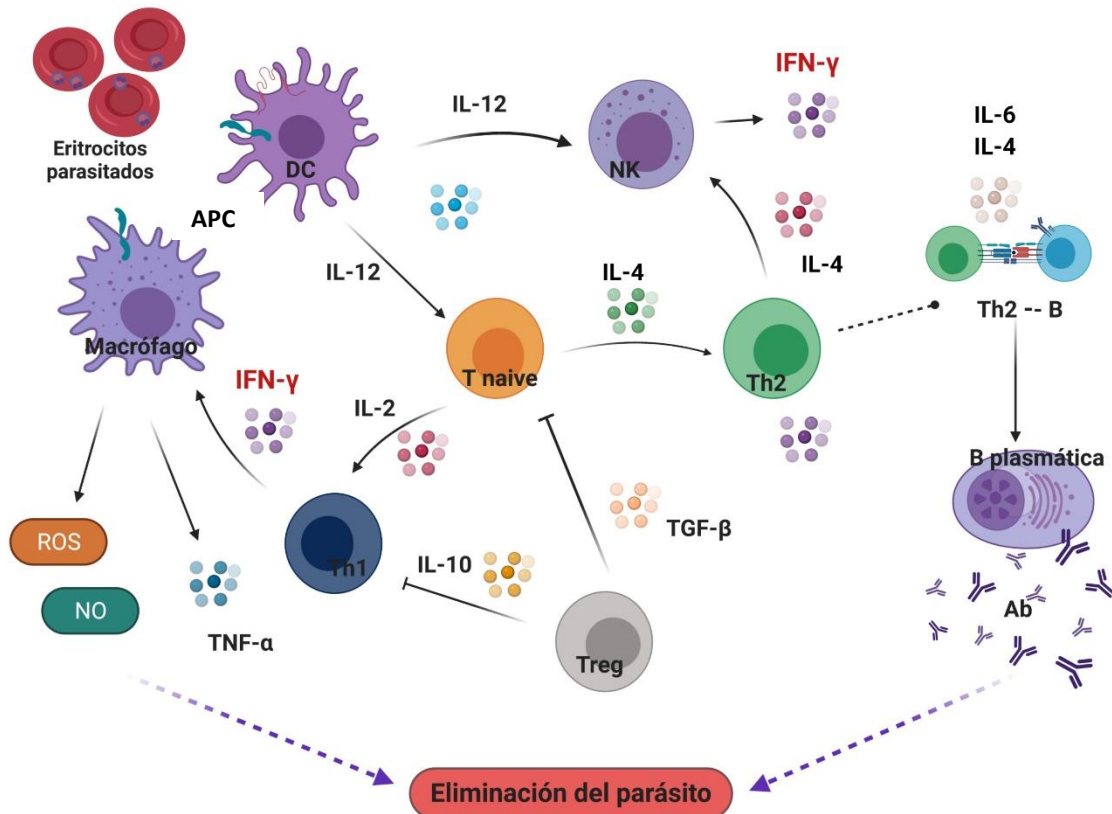
Las hormonas sexuales ejercen sus efectos a través de mecanismos genómicos y no genómicos por la interacción con receptores de superficie o citoplasmáticos y desencadenan distintas vías de señalización. La principal actividad biológica resulta de la activación de receptores específicos intracelulares cuya función consiste en activar o suprimir factores de transcripción para la expresión de genes (41).

Diferentes células de la respuesta inmunitaria, incluidos los macrófagos, los mastocitos, los neutrófilos, los basófilos y las diferentes poblaciones de linfocitos poseen receptores para los andrógenos (7, 42). Estas células responden a los andrógenos en función de la concentración de la hormona y del número de receptores que posean (43). La unión hormona-receptor induce un cambio conformacional acompañado de fosforilación del receptor, que al translocar al núcleo funciona como factor de transcripción, éste se une a secuencias reguladoras en el DNA lo que modula la expresión de los genes de diferentes citocinas (8). Además, el receptor de andrógenos también señala a través de diversos mecanismos independientes de unión al DNA o de la activación clásica (44).

La respuesta inmunitaria difiere entre los sexos (35, 41); las citocinas proinflamatorias, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-6, están en mayor concentración en los machos que en las hembras en infecciones con *Taenia sp*, *Leishmania sp*, entre otras (41). La respuesta inmunitaria innata representa la primera línea de defensa contra el parásito, inicia inmediatamente después de la primera exposición al *Plasmodium*. Mientras que la respuesta inmunitaria adquirida involucra la activación celular y humoral (Figura 2). Los macrófagos y los neutrófilos representan la primera defensa, como principales células fagocíticas, su función consiste en eliminar al parásito, generalmente, producen especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno como el óxido nítrico (35). Además de los macrófagos y los neutrófilos, también intervienen las células NK (natural killer) y las células dendríticas. Las células dendríticas y los macrófagos son células presentadoras de antígeno; además, producen citocinas que promueven la activación los linfocitos T vírgenes (41).

Los macrófagos y las células dendríticas inician la respuesta adaptativa al promover la maduración y la diferenciación de los linfocitos B y T (41) vía la presentación de antígeno y la síntesis de citocinas. Las subclases de los linfocitos T (T cooperadoras Th1, Th2 y Th17 y las células T reguladoras (Treg)) producen citocinas como IFN- $\gamma$ , IL-2, producida por la subclase de linfocitos Th1 o la citocina

TNF- $\alpha$ , secretada principalmente por los linfocitos Th2, además de IL-10 que se produce por los linfocitos Treg. En conjunto, estas citocinas se requieren para eliminar al parásito (23).



**Figura 2. Respuesta inmunitaria durante la infección por *Plasmodium sp.*** Las células presentadoras de antígeno (APC) ya sea células dendríticas o macrófagos reconocen a los eritrocitos infectados con *Plasmodium sp* a través de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), algunos de tipo *toll* (TLR) o de tipo *scavenger*. Ese reconocimiento promueve la fagocitosis en el que los macrófagos liberan especies reactivas del oxígeno (ROS) o de nitrógeno (NO), que contribuyen a la eliminación del parásito. Los macrófagos también liberan factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), el cual incrementa la capacidad fagocítica y promueve la liberación de interleucina 12, citocina que activa a las células natural killer (NK). El IFN- $\gamma$  producido por las células NK o por los linfocitos T cooperadores tipo 1 (Th1) incrementa la función fagocítica de los macrófagos, pero también promueve la inflamación por lo que los linfocitos T reguladores (Treg) regulan este proceso al sintetizar IL-10 y TGF- $\beta$ . Adicionalmente, los linfocitos B, presentan el antígeno en un contexto de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad tipo II (MHC-II) a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> cooperadores Th2, estas células promueven la liberación de IL-6 e IL-4 que inducen la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas, que sintetizan anticuerpos que contribuyen a la eliminación del parásito (23, 45, 46). Figura original creada en BioRender.com

En malaria, se observó que la concentración sérica de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 se elevan significativamente en las hembras por la disminución de los estrógenos por efecto de la gonadectomía en comparación a los machos donde no se observó efecto. Además, la disminución de los andrógenos incrementó el porcentaje de macrófagos y disminuyó el número de células NK en los ratones macho infectados con *P. berghei* ANKA (36).

#### **4.2.2. Andrógenos y respuesta inmunitaria en malaria**

Las diferencias en la respuesta inmunitaria entre machos y hembras que genera la infección con *Plasmodium* son mediadas en parte, por los andrógenos, esto incluye a la testosterona, dehidroepiandrosterona y androstenediona. Aunque los mecanismos de protección contra las infecciones por *Plasmodium* no están totalmente claros, varias investigaciones sugieren que los andrógenos, específicamente la testosterona, suprimen la respuesta inmunitaria (47). Por ejemplo, los ratones macho infectados con *Plasmodium chabaudi* AS presentan mayor mortalidad en comparación con las hembras. Además, reconstituir con testosterona a ratones macho gonadectomizados disminuye significativamente el porcentaje de linfocitos, monocitos y neutrófilos después de infectar a los ratones con *Plasmodium berghei*, estos hallazgos sugieren que la administración de testosterona suprime la proliferación de los leucocitos y que este tratamiento aumenta la susceptibilidad de los ratones a la infección (11). Además, el pretratamiento con testosterona induce un incremento en las células CD8<sup>+</sup> y una disminución en los linfocitos B en ratones C57BL/10 macho infectados con *P. chabaudi* (48). Además, disminuyó la concentración de anticuerpos IgG totales, especialmente los isotipos IgG1 e IgG2b, sin modificar la concentración de las citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 (49).

Interesantemente, la disminución de la concentración de testosterona mediante gonadectomía en ratones macho infectados con *P. chabaudi* aumenta su sobrevivencia; sin embargo si a los ratones gonadectomizados se les reconstituye con testosterona se suprime el desarrollo de la inmunidad protectora (9).

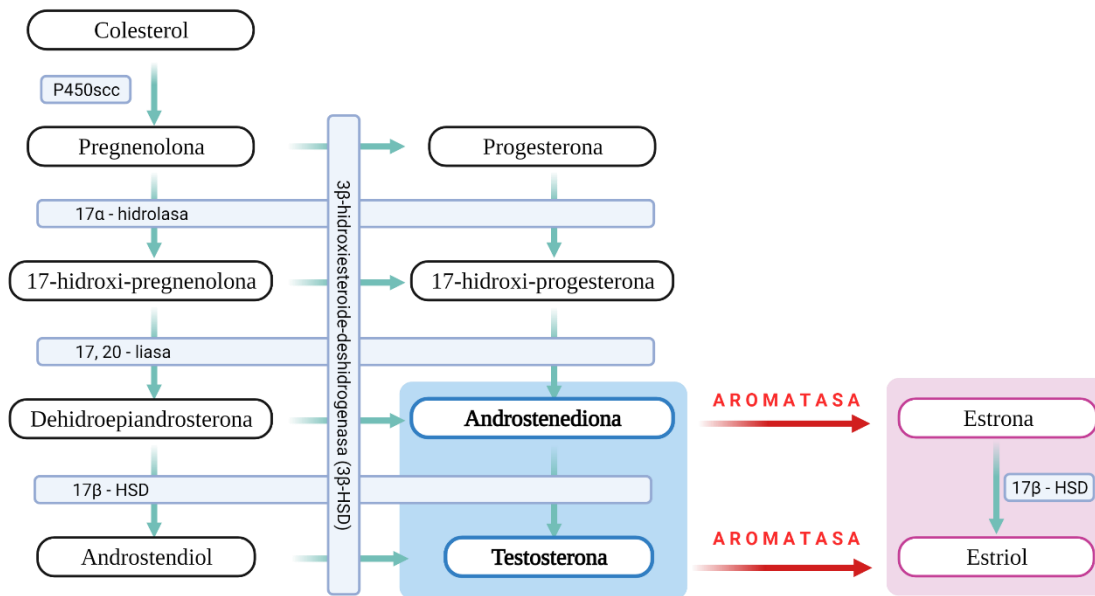
En general, para analizar el papel de la testosterona en la respuesta inmunitaria frente al *Plasmodium* se utilizan las estrategias de reconstituir a los ratones gonadectomizados exclusivamente con testosterona; o bien administrar la hormona. Sin embargo, no se considera que los andrógenos se transforman en estrógenos por acción de la enzima aromatasa y que, al administrar testosterona, particularmente a las hembras aumentaría la concentración de estrógenos y eso podría enmascarar los efectos de la testosterona con los efectos que provoca el estradiol.

A pesar de décadas de investigación sobre la respuesta inmunitaria en malaria, todavía no está clara la participación de los andrógenos en esta enfermedad; además, se desconoce su participación en el dimorfismo sexual. Por lo tanto, es necesario considerar la ruta de síntesis de los andrógenos y estrógenos.

#### **4.3. Síntesis de las hormonas sexuales**

Los andrógenos como la testosterona o androstenediona se sintetizan principalmente en las gónadas, a partir del colesterol; la principal fuente requerida es el colesterol LDL (lipoproteína de baja densidad) (50). Las gónadas (testículos u ovarios) producen esteroides sexuales, mientras que las glándulas suprarrenales también producen glucocorticoides y mineralocorticoides, y después de su síntesis se liberan a la circulación para ejercer su acción en diferentes órganos (51).

El colesterol ingresa a la mitocondria de la célula por acción del gen *Star* y las enzimas del citocromo p450 catalizan una serie de reacciones, que lo transforman en pregnenolona que da paso a una serie de hormonas precursoras tanto de andrógenos como de estrógenos, como la dehidroepiandrosterona (DHEA) (52). Los andrógenos, como la androstenediona y la testosterona, se transforman irreversiblemente en estrógenos por la enzima aromatasa. En este proceso de síntesis de estrógenos a partir de la androstenediona y la testosterona, el complejo enzimático de la aromatasa cataliza tres reacciones de hidroxilación (53) (Figura 3).



**Figura 3. Ruta de síntesis principal de los andrógenos a partir del colesterol.** Al ingresar el colesterol a la célula, la enzima P450scc cataliza la escisión del colesterol en la cadena lateral para dar lugar a la pregnenolona que por acción de la enzima 3β-HSD se transforma en progesterona. El siguiente grupo de enzimas que participan poseen actividad de hidrolasa y liasa que escinden el carbono 17 de la pregnenolona para convertirse en 17-hidroxi-pregnenolona o 17-hidroxi-progesterona que después por acción de la enzima 17,20-liasa se transforman en la dehidroepiandrosterona (DHEA) o la androstenediona. La androstenediona se convierte a testosterona mediante la enzima 17β-HSD, la misma enzima convierte a la DHEA en androstendiol. El androstendiol a su vez se transforma en testosterona gracias a la enzima 3β-hidroxiesteroide-deshidrogenasa. Tanto la androstenediona como la testosterona (resaltados en azul) dan lugar a la estrona y estriol, respectivamente gracias a la acción de la aromatasa y la estrona se transforma a estradiol por acción de la enzima 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β-HSD). La estrona y el estriol (señalados en color rosa) son estrógenos mientras que la androstenediona y la testosterona son andrógenos. Tomado y modificado de Miller, 2008 (52). Figura original creada en BioRender.com

#### 4.4. Aromatasa

Las enzimas del grupo citocromo p450 son enzimas con actividad oxidativa, contienen cerca de 500 aminoácidos y poseen un grupo hemo. El término p450 hace referencia al “pigmento 450” que absorbe luz a 450 nm en su estado reducido. Las enzimas del citocromo P450 unen los sustratos esteroideos y su sitio activo se asocia con el grupo hemo (52).

La aromatasa, enzima que pertenece a la familia 19 de la superfamilia del citocromo P450, producto del gen *CYP19*, también se conoce como CYP19A1 (54). La p450 aromatasa cataliza la conversión irreversible de andrógenos a estrógenos, en particular la androstenediona a estrona y la testosterona a estriol.



La dihidrotestosterona (DHT), andrógeno derivado de la testosterona, no se puede aromatizar por la enzima p450 aromatasa (55). La proteína hemo en el sitio activo de la p450 aromatasa es la responsable de unir el sustrato esteroideo en el carbono 19 de los andrógenos y catalizar las reacciones (hidroxilación, oxidación y desmetilación) que permiten la formación del anillo fenólico característico de los estrógenos (54).

En general, la aromatización de los andrógenos a estrógenos ocurre en el retículo endoplásmico. En el humano y en los ratones, la aromatasa se expresa en diferentes tejidos que por lo tanto, pueden sintetizar estrógenos (55). La mayor expresión se presenta en los tejidos gonadales, es decir, en las células de Leydig y Sertoli en los testículos y en el cuerpo lúteo o células de la granulosa en los ovarios. Además, se expresa en menor proporción en tejidos como el útero, mama, glándulas adrenales, hígado, tejido adiposo, hueso y cerebro (51).

#### **4.5. Inhibidores de la enzima p450 aromatasa**

Los inhibidores de aromatasa (AI), surgieron como posibles tratamientos para reducir el tamaño de los tumores dependientes de estrógenos, terapia de elección que consiste en reducir la concentración de estas hormonas (56). Los AI se dividen en dos grupos por su mecanismo de acción: esteroideos y no esteroideos. Los esteroideos, también conocidos como inactivadores compiten con el sustrato al unirse al sitio catalítico e inactivan irreversiblemente a la enzima. Sin embargo, el producto es capaz de reaccionar con la misma enzima p450 aromatasa. El segundo grupo, son inhibidores competitivos de la aromatasa y se unen reversiblemente al sitio activo de la enzima, acción que se mantiene con una concentración constante suficiente para que el inhibidor ocupe el sitio de unión enzimático (57).

El desarrollo de los AI como primera, segunda y tercera generación; permitió evaluar la selectividad a la enzima p450 aromatasa, la toxicidad y potencia del fármaco en el organismo. La testolactona y la aminoglutamida, inactivador

esteroideo e inhibidor no esteroideo respectivamente, son compuestos de primera generación, ya desplazados como tratamientos de elección en enfermedades cancerígenas, debido a la falta de especificidad selectiva para la enzima aromatasa (<90% en promedio) y los efectos secundarios en glándulas adrenales por su origen como derivados de androstenediona o testosterona (57, 58). Los pertenecientes a la segunda generación, tal es el caso del formestano y del fadrozol, redujeron el porcentaje de inhibición de la aromatasa (70% al 90%) con disminución de efecto colateral (57).

En contraste, se logró mejoría con el desarrollo de inhibidores de aromatasa de tercera generación, aprobados por la FDA en Estados Unidos de América desde 1996, para el tratamiento de cáncer estrógenos dependiente (cáncer de mamá, endometrio, entre otros) (59). Entre los fármacos que se desarrollaron en este grupo, se encuentran; el exemestano, como inactivador esteroide y como inhibidores no esteroides: el anastrozol, vorozol y el letrozol. En particular el letrozol, posee ventajas sobre los de primera y segunda generación debido a su mayor especificidad, eficacia y menor toxicidad (55, 56).

#### **4.5.1. Letrozol**

El letrozol es un importante inhibidor no esteroideo de la enzima p450 aromatasa, derivado del triazol, el inhibidor de tercera generación más potente, posee la mayor afinidad por la enzima (a unidad nanomolar (nM)) (60). En comparación con el anastrozol o fadrozol, supera la inhibición a la enzima aromatasa, con mayor tolerabilidad por el paciente y administración convencional (59).

La administración oral del letrozol a dosis de 2.5 mg en humanos (mujeres y hombres), inhibe a la aromatasa corporal total de 98.1 a 99.1%, que es más eficaz en comparación al anastrozol de 96.7 a 98.1% (61, 62). La cuantificación de la concentración plasmática del estrona, estradiol y sulfato de estrona, se redujo en 84, 87.8 y 98% respectivamente, con la administración de letrozol (57).

Por su estructura química (4,4'-[(1*H*-1,2,4-triazol-1-*il*) metileno]bis-benzonitrilo), el triazol se une a la fracción hemo del CYP450, mientras que la fracción cianobencil imita parcialmente la estructura base de la androstenediona o testosterona, el sustrato de la enzima. Después de su administración, su absorción es rápida (biodisponibilidad absoluta media del 99.9%) con distribución amplia por los tejidos, esto permite inhibición corporal completa de la aromatasa (63). Mediante estudios clínicos, se demostró que el letrozol no tiene efecto sobre la concentración plasmática de progesterona, de la hormona estimulante de la tiroides (TSH), la hormona luteinizante (LH), la hormona foliculoestimulante (FSH) o la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) (64).

El que el letrozol sea un inhibidor específico de la enzima aromatasa, que no presente efectos colaterales o tóxicos en los ratones y que además no afecte la concentración de progesterona, TSH, LH, FSH y ACTH; son las características que se consideraron para utilizarlo en este trabajo.

Por lo tanto, consideramos al letrozol el fármaco ideal para inhibir a la enzima p450 aromatasa en nuestro modelo de malaria experimental para evaluar el efecto de andrógenos sobre el dimorfismo sexual que se presenta en la respuesta inmunitaria en ratones infectados con *Plasmodium berghei* ANKA.

## 5. Objetivos

### 5.1. Objetivo General

Evaluar la actividad inmunomoduladora de los andrógenos sobre la respuesta inmunitaria mediante la inhibición *in vivo* de la enzima p450 aromatasa con letrozol y la administración de testosterona en ratones infectados con *P. berghei* ANKA.

### 5.2. Objetivos Específicos

- 5.2.1. Calibrar la dosis y la vía de administración del letrozol que inhibe a la enzima p450 aromatasa en el modelo de ratones infectados con *Plasmodium berghei* ANKA.
  - 5.2.1.1. Determinar la dosis y la vía de administración del letrozol que inhiba a la enzima p450 aromatasa y permita detectar los efectos de los andrógenos sobre la parasitemia, peso y temperatura corporales, así como sobre la concentración de hemoglobina de ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA.
  - 5.2.1.2. Determinar la concentración de testosterona libre, estradiol y DHEA que se obtiene al administrar letrozol solo o en combinación con testosterona, en ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA
- 5.2.2. Analizar el efecto de los andrógenos por inhibición de la enzima p450 aromatasa y la administración de testosterona, sobre la parasitemia, la masa y temperatura corporal, así como de la concentración de hemoglobina de ratones macho CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA.

- 5.2.3. Evaluar el efecto de los andrógenos por inhibición de la enzima p450 aromatasa y la administración de testosterona sobre el índice esplénico y el porcentaje de las poblaciones celulares CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, Mac-3, CD16<sup>+</sup>/32<sup>+</sup> en el bazo de ratones infectados con *P. berghei* ANKA.
- 5.2.4. Analizar el efecto de los andrógenos por inhibición de la enzima p450 aromatasa y la administración de testosterona sobre la concentración plasmática de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA.
- 5.2.5. Analizar el efecto de los andrógenos por inhibición de la enzima p450 aromatasa y la administración de testosterona sobre la concentración de anticuerpos IgM e IgG específicos contra *P. berghei* ANKA.

## **6. Materiales**

### **6.1. Animales de experimentación**

Ratones CBA/Ca macho de tres meses de edad

### **6.2. Parásito**

*Plasmodium berghei* ANKA, fue una donación del Dr. William Jarra del National Institute for Medical Research, Londres, Inglaterra y se ha criopreservado en nitrógeno líquido.

### **6.3. Fármacos**

- Letrozol (Pharmaceutical Secondary Standard, Certified Reference Material). Merck-Sigma Aldrich®
- Sostenon 250. Solución Inyectable 250 mg/mL. Aspen®

## 7. Métodos

### 7.1. Diseño experimental

Para el primer objetivo: calibrar la dosis y la vía de administración del letrozol adecuados para inhibir a la enzima p450 aromatasas. Se diseñaron tres experimentos preliminares para determinar la dosis y la vía de administración del letrozol en nuestro modelo de malaria experimental. Esto fue relevante para detectar efectos sobre: la parasitemia, la concentración de hemoglobina, la masa y temperatura corporales; variables que hemos demostrado se modifican por efecto de los andrógenos.

Para comprobar que la dosis y la vía de administración del letrozol anteriormente determinadas inhibieran a la enzima p450 aromatasas, se cuantificó la concentración plasmática de testosterona libre y estradiol en ratones CBA/Ca sin infección e infectados con *P. berghei* ANKA.

#### 7.1.1. Experimentos preliminares

En el primero, se utilizó la dosis reportada para los modelos murinos de cáncer (1 mg/Kg) vía oral (59, 65); con este experimento se evaluó si el letrozol modifica la sobrevivencia de los ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA.

En el segundo experimento, se realizó una curva dosis respuesta y se compararon tres dosis diferentes (1, 2 y 4 mg/Kg de peso corporal por vía oral), se utilizó un grupo control adicional que no recibió tratamiento. De esta forma establecimos la concentración de letrozol que tuvo efecto sobre la parasitemia, peso y temperatura corporal, así como en la concentración de hemoglobina.

En el tercer experimento, se comparó la administración oral del letrozol con la vía subcutánea. Esto se realizó para comparar los resultados (previos de nuestro grupo de investigación) con la administración de la testosterona vía subcutánea, así como para evitar al máximo el estrés inducido en los ratones por doble administración. Se administró letrozol a la dosis de 4 mg/Kg de peso por vía oral y

se comparó con su equivalente (66-69) administrado por vía subcutánea (7 mg/Kg de peso corporal). Es importante indicar que el letrozol se absorbe menos por vía subcutánea que por vía oral; por lo que la dosis subcutánea del letrozol equivalente a la oral resulta más alta. En estos tres experimentos, los ratones se revisaron diariamente para evaluar también la sobrevida.

### **7.1.2. Experimentos para determinar el efecto de los andrógenos en ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA**

Una vez establecida la dosis y la vía de administración de letrozol anteriores, se prepararon 5 grupos de 10 ratones CBA/Ca macho cada uno, de tres meses de edad: el primer grupo no recibió tratamiento; el segundo grupo recibió aceite de almendras como vehículo; el tercer grupo se trató con letrozol (7 mg/Kg de peso corporal); el cuarto grupo se administró con testosterona (30 mg/Kg de peso corporal) de acuerdo a la dosis descrita por Benten y Krücken (12, 70); el quinto grupo se trató con la combinación de 7 mg/Kg de letrozol y 30 mg/Kg de testosterona.

## **7.2. Administración con letrozol o testosterona**

**Administración de letrozol.** El letrozol se maceró en un mortero para obtener un polvo fino que se mezcló con aceite de almendras y se agitó vigorosamente hasta formar una suspensión. Se calculó el volumen necesario para administrar el equivalente a 7 mg/Kg de peso corporal a cada ratón e inmediatamente se administró vía subcutánea diariamente en un volumen total de 30  $\mu$ L, durante 14 días previos a la infección, el día de la infección y durante 6 días post-infección, en total los ratones recibieron 21 dosis.

**Administración de testosterona.** Se calculó el volumen necesario para administrar el equivalente a 30 mg/Kg de peso corporal a cada ratón y la testosterona se administró cada tercer día. Este grupo recibió un total de 5 dosis de testosterona resuspendidos en 30  $\mu$ L de aceite de almendras previas a la infección (70).

### **7.3. Infección con *Plasmodium berghei* ANKA**

Se descongeló un crioval con el parásito preservado en nitrógeno líquido y el contenido se inoculó vía intraperitoneal en dos ratones. Cuando la parasitemia alcanzó el 20% se tomó una muestra de sangre y se calculó el volumen de sangre requerido para preparar el inóculo con  $1 \times 10^3$  eritrocitos parasitados con *Plasmodium berghei* ANKA por ratón. El inóculo se inyectó vía intravenosa.

### **7.4. Determinación de la parasitemia**

A partir del día 3 después de la infección se tomó una gota de sangre de la cola de cada ratón, se extendió en un portaobjetos y se fijó con metanol absoluto. El frotis sanguíneo se tiñó con Giemsa. La parasitemia se evaluó mediante microscopía óptica a un aumento de 100x. Se contaron 200 eritrocitos totales si la parasitemia excedía a 2 eritrocitos parasitados por campo; cuando la parasitemia fue menor de 2 eritrocitos por campo se contaron los eritrocitos parasitados presentes en 50 campos.

### **7.5. Determinación de la concentración de hemoglobina**

Diariamente se tomaron 2  $\mu\text{L}$  de sangre de la cola de cada ratón y se mezclaron con 498  $\mu\text{L}$  de reactivo de Drabkin, se incubaron por 5 min en la obscuridad y se cuantificó la absorbancia a 540 nm. Para calcular la concentración de hemoglobina se utilizó una curva estándar comercial de hemoglobina (71).

### **7.6. Determinación de masa y temperatura corporal**

Diariamente, a la misma hora, se registró el peso de todos los ratones con una balanza semianalítica. Además, se evaluó la temperatura corporal mediante un termómetro infrarrojo (Thermofocus. 01500A/H1N1, Vedano Olana-Varese, Italy); el termómetro se dirigió a 5 cm del abdomen de cada ratón y se registró la lectura digital cuando el indicador de luz infrarroja mostró estabilidad.



### **7.7. Determinación del tiempo de sobrevida**

Diariamente se revisó la sobrevida de todos los ratones y se registró el día de deceso. Diariamente, se calculó el porcentaje de ratones vivos por grupo.

### **7.8. Cuantificación de la concentración de testosterona libre, estradiol y DHEA**

En el día 8 post-infección, los ratones se sacrificaron y se extrajo sangre del corazón en tubos estériles que contenían heparina sódica al 5% diluido en PBS 1x estéril. El plasma se separó por centrifugación y se almacenó a -70°C hasta su análisis. Los esteroides sexuales se extrajeron de las muestras de plasma con 300 µL de éter etílico, se colocaron en un baño de hielo seco; una vez congelada la fase acuosa, la fase orgánica se separó por decantación. Se eliminó el solvente mediante incubación en un baño María a 37°C y las muestras se hidrataron con una solución de PBS/gelatina 0.1%. Para la cuantificación de testosterona se utilizó el método comercial de DRG Diagnostics Free Testosterone ELISA (EIA 2924), para cuantificar 17β-estradiol DRG Diagnostics Estradiol ELISA (EIA 2693) y para cuantificar DHEA DRG Diagnostics DHEA ELISA (EIA 3415). Las muestras se analizaron en un espectrofotómetro Multiskan Ascent V1.25.

### **7.9. Sacrificio de ratones y obtención de muestras**

Todos los ratones se sacrificaron por dislocación cervical en el día 8 post-infección y se les extrajo el bazo y la sangre, la cual se recogió en tubos estériles con heparina sódica al 5% en PBS estéril. El plasma se separó por centrifugación a partir de las muestras de sangre y se almacenó a -70°C hasta su análisis.

### **7.10. Determinación del índice esplénico**

En el día 8 post-infección los ratones se pesaron, se sacrificaron y se les extrajo el bazo que se pesó en una balanza analítica (Sartorius, Göttingen, Germany), se calculó el índice esplénico al dividir el peso del bazo entre el peso de cada ratón.

### **7.11. Cuantificación de las poblaciones celulares de bazo**

El bazo de cada ratón se maceró en una malla de nylon para disgregar las células. Las células se lavaron con PBS, se fijaron con una solución comercial (Becton & Dickinson) y aproximadamente  $1 \times 10^6$  células se resuspendieron en 100  $\mu$ L de solución de tinción de FACS (PBS, albúmina sérica bovina 2% y azida de sodio 0.02%) y se incubaron con las siguientes diluciones de anticuerpos anti-ratón acoplados a fluorocromos: FITC-antiCD3<sup>+</sup> (1:250), APC-antiCD4<sup>+</sup> (1:1000), PE-antiCD8<sup>+</sup> (1:600), APC-antiCD19<sup>+</sup> (1:1600), PE-antiMac-3<sup>+</sup> (1:125), PRCP-antiCD45<sup>+</sup> (1:800) y PE-antiCD16<sup>+</sup>/32<sup>+</sup> (1:160). Todos los anticuerpos son de marca BioLegend. Para calibrar el equipo se utilizaron células sin tinción y las células teñidas con un solo anticuerpo. Se analizaron un total de 10,000 células para cada muestra en el citómetro de flujo FACSAria II (Beckton & Dickinson, San Jose, CA, USA) y se calculó el porcentaje de cada población celular con relación al número total de células analizadas.

### **7.12. Determinación de la concentración plasmática de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$ y TNF- $\alpha$**

Las muestras de plasma de todos los grupos de ratones se utilizaron para cuantificar la concentración de las citocinas por el método comercial Cytometric Bead Array (CBA). Previamente, tanto las muestras como los estándares se mezclaron con las perlas de captura y el reactivo de detección PE (ficoeritina) Th1/Th2/Th17 para cada tubo. Se preparó una curva estándar con las siguientes diluciones seriadas 1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024 y 1:2048. Se incubaron por 3 horas protegidos de la luz a temperatura ambiente y se adicionaron 330  $\mu$ L de solución de lavado a cada tubo. Todas las muestras, y estándares se centrifugaron a 1300 rpm (Centrifuga Eppendorf 58034R) por 5 min y se eliminó el sobrenadante. El botón se resuspendió con suavidad en 100  $\mu$ L de solución de lavado. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACSAria II (Beckton & Dickinson, San Jose, CA, USA).

### **7.13. Determinación de la concentración de anticuerpos IgM e IgG específicos para *P. berghei* ANKA**

Se preparó plasma hiperinmune específico para *P. berghei* ANKA al inocular  $1 \times 10^6$  eritrocitos parasitados en un grupo de ratones CBA/Ca y tratar al ratón con pirimetamina en el día 6 post-infección por al menos 4 ocasiones, con un mes de diferencia. También se obtuvo antígeno a partir de sangre parasitada, misma que se hizo pasar por una columna de celulosa para eliminar a los leucocitos, el parásito se lisó y se adicionó con un cóctel comercial de inhibidores de proteasas y se congeló en pequeñas alícuotas. Las placas de ELISA se sensibilizaron con 100  $\mu$ L de antígeno de *P. berghei* ANKA (10  $\mu$ g/mL) en solución amortiguadora de carbonatos durante toda la noche; las placas se lavaron 5 veces con 200  $\mu$ L de PBS-Tween 0.05% y se bloquearon con leche descremada (3%). Se adicionaron los plasmas problema diluidos 1:20 y se incubaron por 2 horas a 37°C, la placa se lavó y se incubó con anticuerpos anti-IgM y anti-IgG de ratón comerciales acoplados a peroxidasa de rábano. Se adicionó el sustrato ortofenilendiamina y se cuantificó la absorbancia a 492 nm en un lector de placas de ELISA Stat Fax-2100.

## 8. Resultados

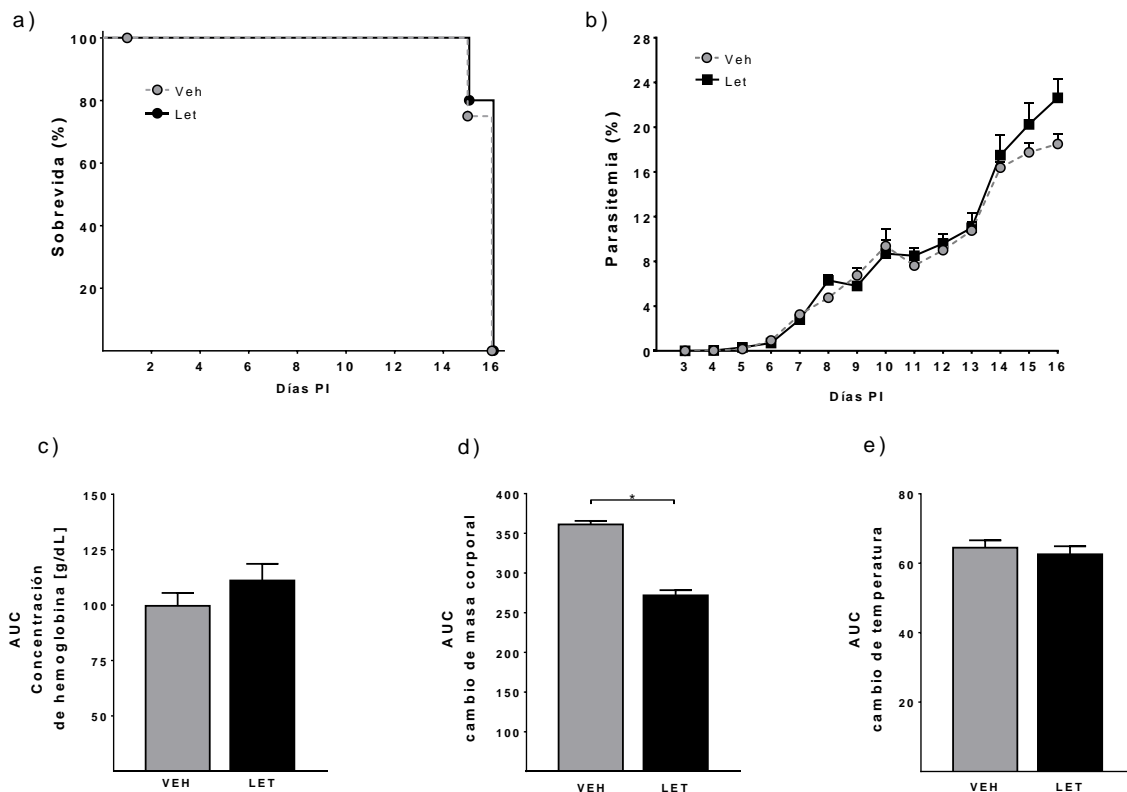
### 8.1. Efecto de las dosis y vías de administración del letrozol sobre la parasitemia, masa y temperatura corporal y concentración de hemoglobina en ratones CBA/Ca macho infectados con *P. berghei* ANKA

La concentración de letrozol descrita para inhibir a la aromatasa *in vivo* en los modelos de cáncer estrógeno dependiente es de 1 mg/Kg (64, 72, 73). Para determinar la concentración de letrozol, el vehículo y la vía de administración que en nuestro modelo murino de malaria cerebral tuvieran efecto sobre la parasitemia y que además de acuerdo con la literatura inhibieran la actividad de la enzima aromatasa *in vivo* realizamos tres experimentos preliminares. En el experimento 1, se analizó si la dosis de letrozol (1 mg/Kg) utilizada en los modelos de cáncer que afectara significativamente la parasitemia, la concentración de hemoglobina, la masa corporal y la temperatura de ratones CBA/Ca macho infectados con *Plasmodium berghei* ANKA (Figura 4). En primer lugar, se evaluó el tiempo de supervivencia, se detectó que el letrozol a la dosis de 1 mg/Kg de peso corporal no modificó el tiempo de supervivencia de los ratones infectados con *P. berghei* ANKA en comparación con el grupo tratado con el vehículo (carboximetilcelulosa) (Figura 4a).

Además, se analizó si administrar letrozol a la concentración de 1 mg/Kg de peso corporal vía oral modificaba significativamente la parasitemia de los ratones CBA/CA macho infectados con *P. berghei* ANKA. Se observó que esta dosis no modificó significativamente el porcentaje de parasitemia (Figura 4b).

En la infección por *Plasmodium* se desarrolla anemia severa, asociada con la disminución en la concentración de hemoglobina y con la disminución en la masa corporal (74). Además, se ha descrito que en el humano induce fiebre. En contraste, en los ratones provoca hipotermia (75). Se observó que el letrozol no modificó la concentración de hemoglobina, ni la temperatura corporal. En contraste, el letrozol disminuyó significativamente la masa corporal de los ratones infectados (Figura 4 c, d y e). Dado que la dosis reportada para inhibir a la

aromatasa en los modelos de cáncer, no modificó la parasitemia y se ha descrito que los andrógenos, particularmente la testosterona la incrementan (76), decidimos evaluar la dosis y vía de administración adecuados que demuestren efecto significativo en nuestro modelo de ratones CBA/Ca macho infectados con *P. berghei* ANKA.



**Figura 4. Efecto de administrar letrozol vía oral a la dosis de 1 mg/Kg de peso corporal sobre la sobrevida, parasitemia, masa corporal, temperatura y concentración de hemoglobina de ratones CBA/Ca infectados con *Plasmodium berghei* ANKA.** Se utilizaron 2 grupos de 5 ratones CBA/Ca macho: al primero se les administró Letrozol por vía oral (1 mg/Kg de peso corporal) cada 48 horas por 14 días previo a la infección y por 7 días después de la infección; el segundo grupo se trató con vehículo (carboximetilcelulosa al 0.3%). Todos los ratones se infectaron con  $1 \times 10^3$  eritrocitos parasitados con *P. berghei* ANKA. Diariamente se registró la sobrevida de todos los ratones (a). También se evaluó la parasitemia mediante frotis sanguíneos teñidos con Giemsa; cada punto representa la media geométrica  $\pm$  SEM (b). Diariamente, se cuantificó la concentración de hemoglobina; cada barra representa el área bajo la curva (AUC)  $\pm$  SEM (c). Además, diariamente se registró la masa corporal (d) y la temperatura (e) de todos los ratones y se calculó el cambio de la masa corporal o la temperatura con base en el día 0 de la infección. Cada barra representa el AUC de cada grupo  $\pm$  SEM. A los resultados de sobrevida y parasitemia se les realizó un análisis de medidas repetidas con prueba posthoc de Bonferroni. Para la concentración de hemoglobina, masa corporal y temperatura (c), d) y e)) se utilizó prueba t-student. Veh = Vehículo, Let = letrozol

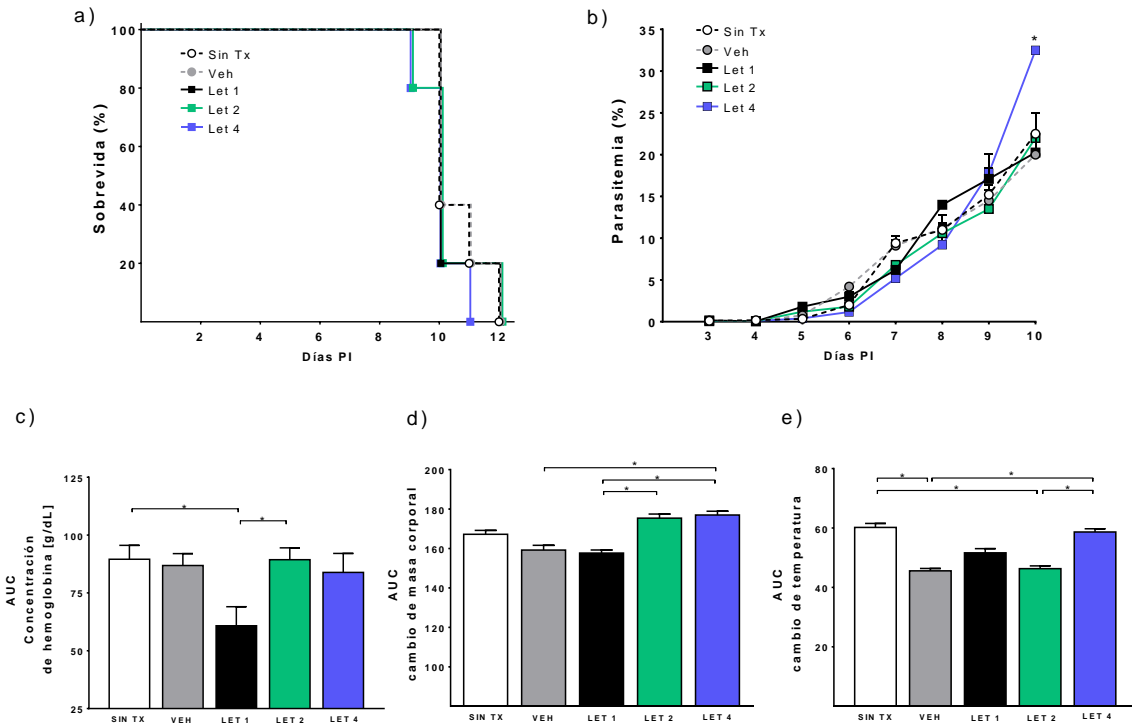
En el experimento 2, se realizó una curva dosis-respuesta, se administraron: 1, 2 y 4 mg/kg de peso corporal para determinar la dosis que modificaba el cuadro clínico en nuestro modelo experimental; medimos la parasitemia, la masa y la temperatura corporal de los ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA. Se obtuvo que la dosis de 4 mg/Kg de peso corporal disminuyó el tiempo de sobrevida en el día 11 después de la infección (Figura 5a).

Las dosis de 1 y 2 mg/Kg de peso corporal no modificaron significativamente la parasitemia. En contraste, la concentración de 4 mg/Kg aumentó significativamente la parasitemia en el día 10 después de la infección (PI) (Figura 5b). Lo anterior demostró que la dosis óptima de letrozol para detectar un efecto en la parasitemia es de 4 mg/Kg.

La dosis de 1 mg/Kg disminuyó significativamente la concentración de hemoglobina en comparación con las dosis de 2 y 4 mg/Kg en comparación con el vehículo o con el grupo sin tratamiento (Figura 5c); este efecto no se observó en el experimento 1, probablemente por la diferencia en la parasitemia.

Además, administrar el letrozol a las dosis de 2 y 4 mg/Kg de peso corporal incrementó la masa corporal de los ratones infectados (Figura 5d).

Con relación al efecto de las diferentes concentraciones de letrozol sobre la temperatura corporal, detectamos que la concentración de 4 mg/Kg incrementó significativamente la temperatura con respecto al grupo tratado con vehículo. Sin embargo, se detectó que el vehículo (carboximetilcelulosa) también disminuyó significativamente la temperatura en comparación con el grupo sin tratamiento (Figura 5e). Por lo anterior, en el siguiente experimento se utilizó aceite de almendras dulces como vehículo.



**Figura 5. Efecto del letrozol administrado por vía oral a las dosis de 1, 2 y 4 mg/Kg de peso corporal sobre la sobrevida, la parasitemia, la masa corporal, la temperatura y la concentración de hemoglobina en ratones CBA/Ca infectados con *Plasmodium berghei* ANKA.** Se realizó una curva dosis respuesta; se utilizaron 3 grupos de 5 ratones CBA/Ca macho a los que se les administró letrozol por vía oral a las dosis de 1, 2 y 4 mg/Kg de peso corporal, cada 48 horas durante 14 días previo a la infección y por 7 días después de la infección. Como controles se utilizaron dos grupos de ratones uno se trató con vehículo (carboximetilcelulosa 0.3%) y el segundo grupo no recibió tratamiento. Todos los ratones se infectaron con  $1 \times 10^3$  eritrocitos parasitados con *P. berghei* ANKA, el día de la infección se consideró como día 0. En a) se representa el tiempo de sobrevida de todos los ratones; en b) se representa la parasitemia. Cada punto representa la media geométrica  $\pm$  SEM. En c) se representa la concentración de hemoglobina en todos los grupos de ratones. Cada barra representa el área bajo la curva (AUC) de cada grupo desde el día 0 hasta el día que perecieron  $\pm$  SEM. En d) y e) se representa la masa corporal y la temperatura de todos los ratones respectivamente; se calculó el cambio de la masa corporal o la temperatura con base al día 0 de la infección. Cada barra representa el AUC de cada grupo desde el día 0 hasta su deceso  $\pm$  SEM. A los datos de a) y b) se les realizó un análisis de medidas repetidas con prueba post-hoc de Bonferroni, en c), d) y e) se utilizó análisis de ANOVA de una vía y prueba post-hoc de Bonferroni. El asterisco representa la diferencia estadísticamente significativa con  $p \leq 0.05$ . Sin Tx = Sin Tratamiento, Veh = Vehículo, Let 1 = letrozol a 1 mg/Kg, Let 2 = letrozol a 2 mg/Kg, Let 4 = letrozol a 4 mg/Kg de peso corporal.

Dado que en nuestra experiencia la liberación prolongada de testosterona se logra al administrarla en suspensión con aceite de almendras vía subcutánea; en el experimento 3 se utilizó aceite de almendras dulces como vehículo y se evaluó la vía de administración subcutánea. Para ello, se consideró que la absorción y biodisponibilidad del letrozol es mayor (90-98%) por la vía oral que por la vía subcutánea (60-70%) (63, 66, 67, 77) por lo que se calculó la dosis equivalente efectiva a la descrita en el experimento dos, que corresponde a 4 mg/Kg de peso corporal mediante un cálculo de relación con base al porcentaje y se estableció

como equivalente la dosis de 7 mg/Kg de peso corporal para una administración por vía subcutánea.

En el experimento 3, se detectó que administrar el letrozol por vía subcutánea disminuyó el tiempo de sobrevida de los ratones CBA/Ca macho infectados con *P. berghei* ANKA. En el día 9 post infección (PI) la sobrevida disminuyó al 20% en comparación con el grupo administrado por vía oral (Let 4) o el grupo sin tratamiento (Figura 6a). Este menor tiempo de sobrevida corresponde con el incremento en la parasitemia en los días 9 y 10 PI lo que demuestra mayor efecto que cuando la administración se realizó por vía oral (Figura 6b). Además, se detectó un efecto dependiente de la dosis o de la vía de administración.

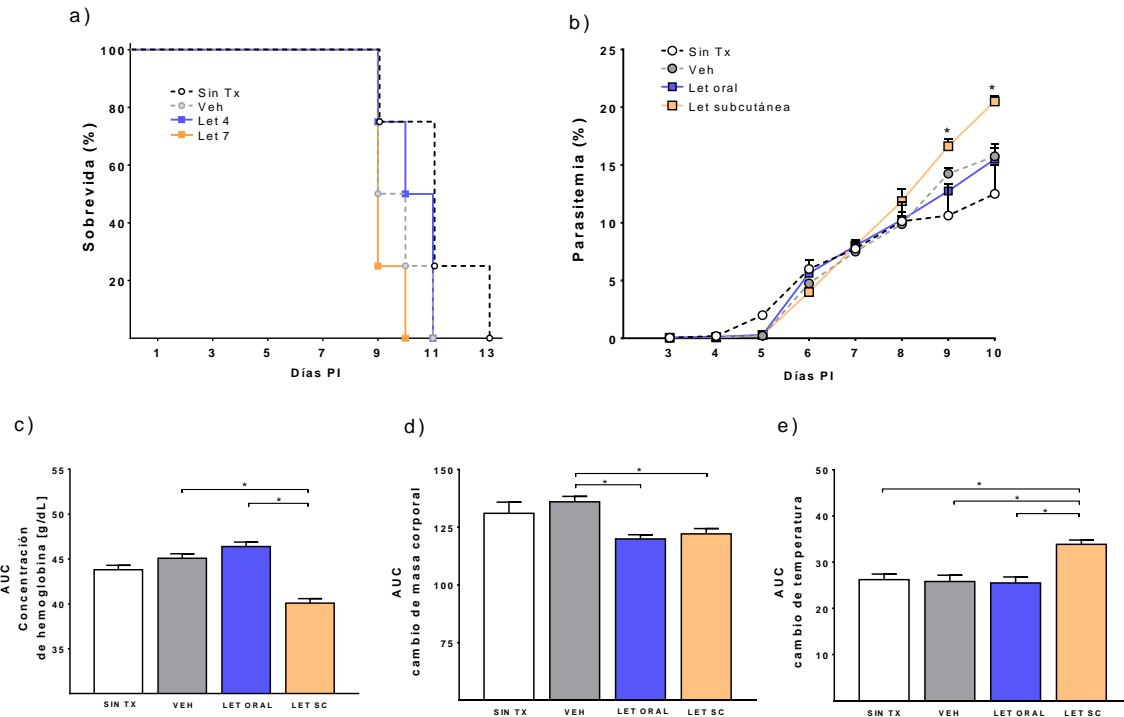
Se consideró importante evaluar el efecto del vehículo sobre la concentración de la hemoglobina, la masa y la temperatura corporal; por lo tanto, se incluyeron dos grupos, uno recibió exclusivamente vehículo y otro no recibió tratamiento y se detectó que el vehículo (aceite de almendras) no modificó la concentración de hemoglobina, la masa corporal o la temperatura en comparación con el grupo que no recibió tratamiento (Figura 6c, 6d y 6e).

La administración de letrozol por vía subcutánea disminuyó significativamente la concentración de hemoglobina en comparación al grupo tratado con vehículo y al letrozol administrado por vía oral (Figura 6c).

El letrozol administrado por vía oral o subcutánea disminuyó la masa corporal de forma similar con respecto al grupo tratado con vehículo (Figura 6d). La administración del letrozol por vía subcutánea aumentó significativamente la temperatura corporal, a diferencia de la administración por vía oral, en la que no se detectó efecto sobre la temperatura (Figura 6e).

En conjunto, estos resultados demostraron que la vía de administración subcutánea del letrozol de 7 mg/Kg (Let 7) resultó ideal para evaluar el efecto del letrozol sobre la sobrevida, la parasitemia, la concentración de hemoglobina, la masa y la temperatura corporal. Además, utilizar el aceite de almendras como vehículo no modificó esas variables.





**Figura 6. Efecto del letrozol por vía oral o subcutánea sobre la sobrevivida, la parasitemia, la masa corporal, la temperatura y la concentración de hemoglobina en ratones CBA/Ca infectados con *Plasmodium berghei* ANKA.** Se comparó el efecto del letrozol administrado por vía oral con el administrado vía subcutánea; se utilizaron 2 grupos de 5 ratones CBA/Ca macho. Al primer grupo se le administró letrozol a la dosis de 4 mg/Kg de peso corporal en suspensión de carboximetilcelulosa, al segundo grupo se le administró letrozol diariamente por vía subcutánea a la dosis de 7 mg/Kg de peso corporal en suspensión de aceite de almendras. El letrozol se administró durante 14 días previo a la infección y durante 7 días después de la infección. Como controles se utilizaron dos grupos de ratones uno tratado con vehículo (aceite de almendras) y el segundo grupo no recibió tratamiento. Todos los ratones se infectaron con *P. berghei* ANKA, el día de la infección se consideró como día 0. En a) se representa el tiempo de sobrevivida de todos los grupos. En b) se representa la parasitemia; cada punto representa la media geométrica  $\pm$  SEM. En c) se representa la concentración de hemoglobina en todos los grupos. Cada barra representa el área bajo la curva (AUC) de cada grupo desde el día 0 hasta el día 10 post-infección  $\pm$  SEM. En d) y e) se representa la masa corporal o la temperatura de cada grupo, se calculó el cambio de la masa corporal o de la temperatura con base en el día 0 de la infección. Cada barra representa el AUC de cada grupo desde el día 0 hasta el día 10 post-infección  $\pm$  SEM. Para detectar las diferencias estadísticas entre los grupos a los datos de sobrevivida y parasitemia se les realizó un análisis de medidas repetidas con prueba post hoc de Bonferroni, para evaluar las diferencias estadísticas en la concentración de hemoglobina, peso corporal y temperatura se utilizó ANOVA de una vía y prueba posthoc de Bonferroni. El asterisco representa la diferencia estadísticamente significativa con  $p \leq 0.05$  entre los grupos indicados. Sin Tx = sin tratamiento, Veh = vehículo, Let oral = letrozol administrado por vía oral a la dosis de 4 mg/Kg de peso corporal, Let SC = letrozol administrado por vía subcutánea a la dosis de 7 mg/Kg de peso corporal.

## **8.2. Efecto del tratamiento con letrozol o testosterona sobre la concentración plasmática de testosterona libre, 17 $\beta$ -estradiol y DHEA de ratones CBA/Ca macho tratados con Letrozol o Testosterona e infectados con *P. berghei* ANKA**

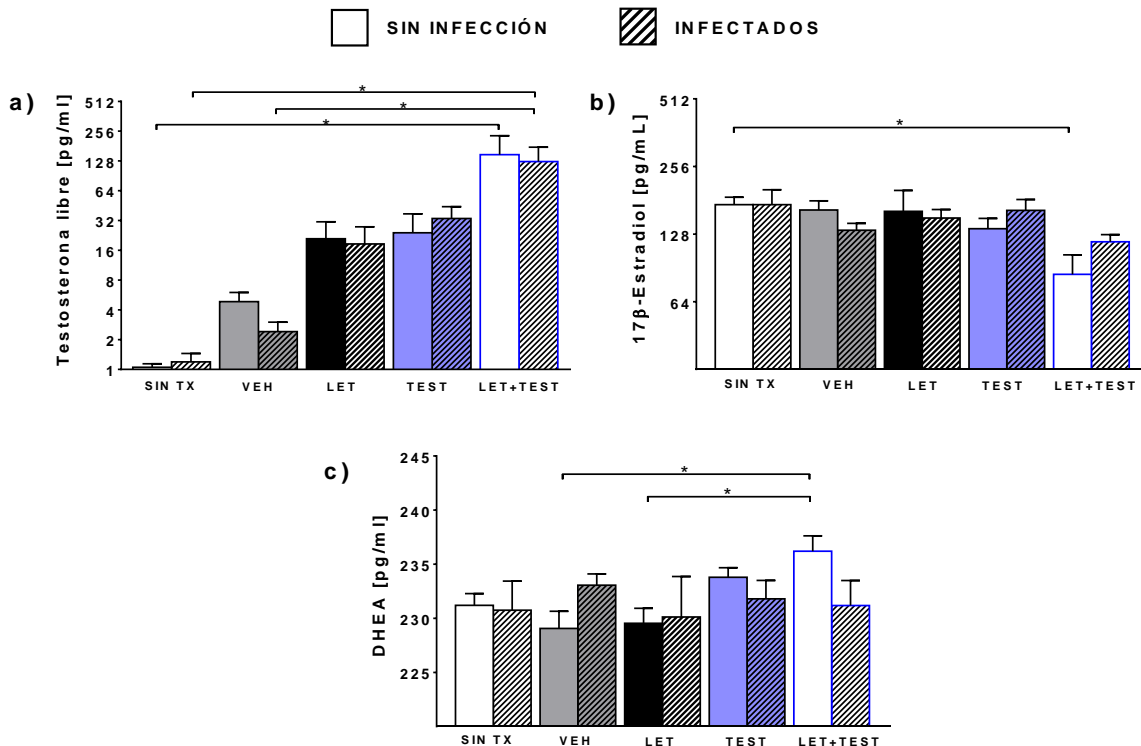
Para lograr el segundo objetivo: determinar el efecto del letrozol sobre la concentración de testosterona libre, estradiol y DHEA en el plasma de ratones infectados con *P. berghei* ANKA, primero establecimos la dosis adecuada de letrozol para modificar la concentración de andrógenos. Para ello, primero se comprobó que se inhibió a la aromatasa con las condiciones establecidas en el experimento 3. Por lo que se cuantificaron las concentraciones de testosterona, estradiol y DHEA mediante técnicas inmunoenzimáticas. Se analizaron 5 grupos de 10 ratones cada uno: el primero no recibió tratamiento, el segundo recibió exclusivamente vehículo, el grupo 3 recibió letrozol, el grupo 4 se trató con testosterona (30 mg/Kg de peso corporal) y el grupo 5 recibió la combinación de letrozol y testosterona. La mitad de los ratones de cada grupo, se infectaron con *P. berghei* ANKA y la segunda mitad permaneció sin infección para utilizarse como grupo control para cada condición.

El letrozol es altamente selectivo para inhibir la actividad de la enzima aromatasa, esto impide la conversión de andrógenos a estrógenos, por lo que si la inhibición es exitosa aumenta la concentración de andrógenos y disminuye la de los estrógenos (63, 78). En este trabajo, la administración de letrozol (7 mg/Kg vía subcutánea) aumentó la concentración de testosterona libre aproximadamente a una concentración semejante a la alcanzada con la administración de testosterona, aproximadamente 25 mg/mL. Además, al administrar la combinación de letrozol y testosterona aumentó significativamente la concentración de testosterona libre en comparación con los ratones tratados con vehículo (Figura 7a).

Interesantemente, el grupo de ratones no infectados que recibió la combinación de letrozol y testosterona desarrolló una concentración significativamente menor de 17 $\beta$ -estradiol que el grupo que recibió únicamente letrozol (Figura 7b). Asimismo,

se observó que la concentración de DHEA aumentó significativamente en el mismo grupo al que se le administró la combinación de letrozol y testosterona en comparación al grupo tratado con letrozol o al grupo tratado con vehículo (Figura 7c).

Además, se observó que la infección con *P. berghei* ANKA no modificó la concentración de testosterona libre o 17 $\beta$ -estradiol en todos los grupos de ratones (Figura 7a, 7b y 7c).



**Figura 7. Efecto del letrozol, y la testosterona sobre la concentración de testosterona libre, 17 $\beta$ -estradiol y DHEA en ratones infectados con *P. berghei* ANKA.** Se utilizaron 5 grupos con 10 ratones CBA/Ca cada uno, se administró letrozol diariamente (7 mg/Kg), a un segundo grupo se le administró testosterona (30 mg/kg), también se utilizó un grupo que recibió la combinación de letrozol y testosterona a las mismas dosis. Como controles se utilizaron dos grupos de ratones uno se trató con vehículo (aceite de almendras) y el segundo grupo no recibió tratamiento. La mitad de los ratones de cada grupo se infectó con *P. berghei* ANKA y la otra mitad no se infectó para usarse como grupo control. En el día 8 después de la infección todos los ratones se sacrificaron y se les extrajo la sangre total, se separó el plasma y se cuantificó la concentración de testosterona libre (a), 17 $\beta$ -estradiol (b) y DHEA (c) por métodos inmunoenzimáticos. Cada barra representa la media de la concentración en escala logarítmica base 2  $\pm$ SEM. Las diferencias estadísticas se calcularon mediante análisis de Kruskal-Wallis con prueba post hoc de Dunn's. El asterisco representa la diferencia estadísticamente significativa con  $p \leq 0.05$ . SIN TX = sin tratamiento, VEH = vehículo, LET = letrozol, TEST = testosterona y LET+TEST = Combinación de letrozol y testosterona.

Dado que con la dosis de letrozol de 7 mg/Kg administrada vía subcutánea se obtuvo la mayor concentración de andrógenos; además, que la combinación de letrozol y testosterona aumentó significativamente la concentración de testosterona y que esto modificó tanto la parasitemia, la concentración de hemoglobina, la masa y la temperatura corporales se decidió utilizar esta dosis para inhibir a la enzima aromatasa en nuestro modelo de ratones infectados con *P. berghei* ANKA.

### **8.3. Efecto del letrozol y la testosterona sobre la parasitemia, la pérdida de peso, la temperatura y la concentración de hemoglobina de ratones macho CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA**

Para cumplir el tercer objetivo: analizar el efecto de los andrógenos sobre la parasitemia, la concentración de hemoglobina, la masa y la temperatura corporales, se infectaron ratones CBA/Ca macho y se evaluó el efecto de administrar el letrozol y la testosterona, solos o en combinación, durante 8 días. Asimismo, se utilizaron grupos de ratones sin infección a los que se les administró letrozol y testosterona de la forma antes descrita como grupos control.

La combinación de letrozol y testosterona aumentó la parasitemia en los días 6, 7 y 8 post-infección y en el día 7 PI cuando se administró únicamente testosterona en comparación con los grupos que no recibieron tratamiento o que recibieron vehículo (Figura 8a). La administración de la combinación de letrozol y testosterona además de aumentar la concentración de andrógenos (Figura 7a) aumentó el número de parásitos en la sangre.

Se ha descrito que la infección con *P. berghei* ANKA induce anemia a los ratones, lo que evaluamos como una disminución en la concentración de hemoglobina, por lo anterior, cuantificamos la concentración de hemoglobina en todos los ratones. Los ratones sin infección tratados con letrozol o testosterona incrementaron su concentración de hemoglobina, en comparación con los ratones que recibieron vehículo o que no recibieron tratamiento (Figura 8b).

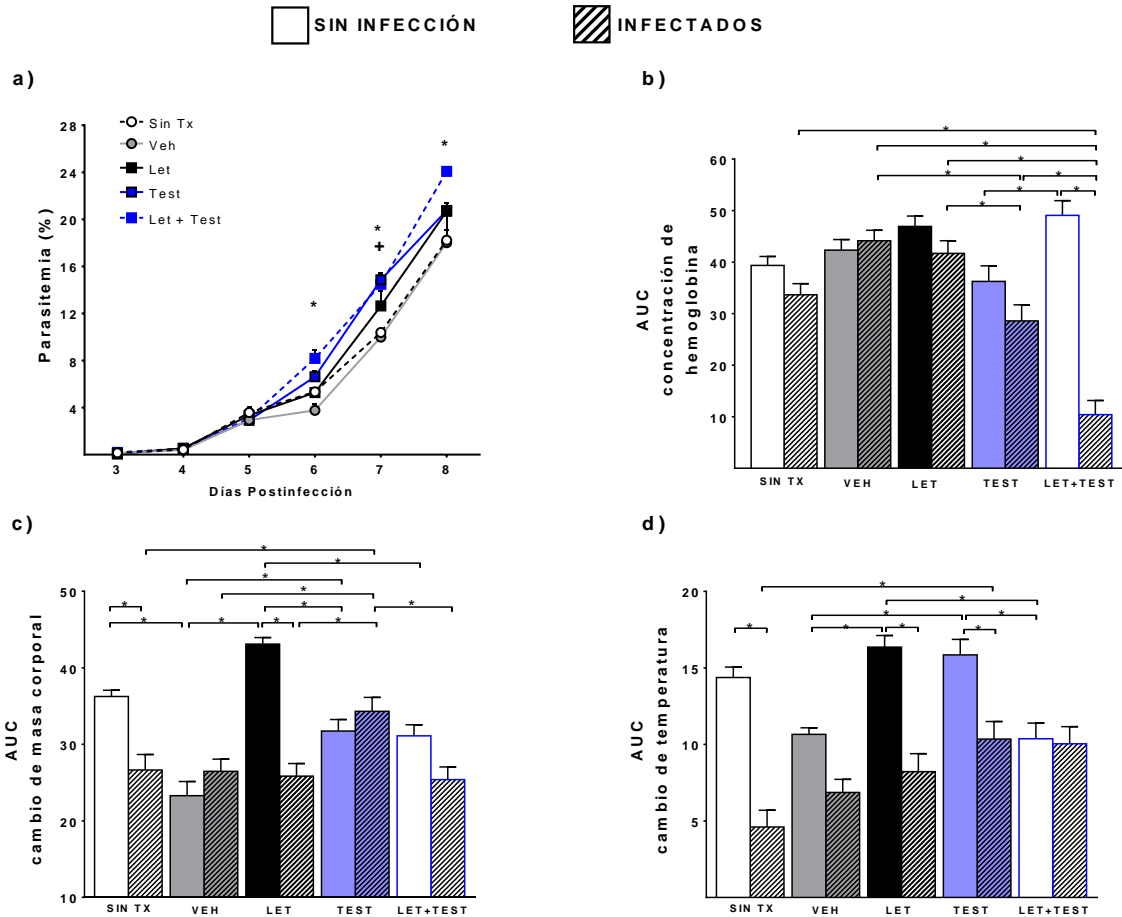
Además, los ratones tratados con letrozol o testosterona que se infectaron con *P. berghei* ANKA incrementaron la parasitemia, como consecuencia la concentración de hemoglobina disminuyó significativamente en comparación con el grupo control no tratado o con su control sin infección (Figura 8b).

Se ha descrito que los ratones infectados con *Plasmodium* pierden peso (22), esto se corroboró en este modelo experimental donde el grupo de ratones infectados sin tratamiento y el tratado con letrozol disminuyeron significativamente su masa corporal en comparación con su grupo control correspondiente no infectado (Figura 8c).

En relación con el efecto de los andrógenos sobre la masa corporal, se detectó que la administración de letrozol o testosterona a los ratones no infectados aumentó significativamente la masa corporal en comparación con los ratones que recibieron vehículo.

Dado que la hipotermia es una característica de la gravedad de la infección con *Plasmodium* en ratones (75), en este trabajo, analizamos el efecto de la testosterona sobre la temperatura de los ratones infectados con *P. berghei* ANKA. Con excepción del grupo tratado con la combinación de testosterona y letrozol, todos los grupos infectados con *P. berghei* ANKA disminuyeron su temperatura corporal (Figura 8d).

El grupo de ratones infectados con *P. berghei* ANKA tratados únicamente testosterona o con testosterona en combinación con letrozol, aumentaron significativamente su temperatura en comparación con el grupo de ratones que no recibieron tratamiento (Figura 8d). Mientras que, en los ratones sin infección tratados únicamente con letrozol o testosterona el incremento en la temperatura fue más marcado.



**Figura 8. Efecto de los andrógenos sobre la parasitemia, la concentración de hemoglobina, la masa y la temperatura corporales de ratones CBA/Ca macho infectados con *P. berghei ANKA*.** Se utilizaron 5 grupos de 10 ratones CBA/Ca cada uno. Al primer grupo se le administró letrozol diariamente (7 mg/Kg), a un segundo grupo se le administró testosterona (30 mg/Kg) también se utilizó un grupo que recibió la combinación de letrozol y testosterona a las mismas dosis. Como controles se utilizaron dos grupos de ratones uno se trató con vehículo (aceite de almendras) y el segundo grupo no recibió tratamiento. La mitad de los ratones de cada grupo se infectó con *P. berghei ANKA* y la otra mitad de los ratones no recibió infección. En el día 8 después de la infección todos los ratones se sacrificaron. En a) se representa la parasitemia. Cada punto representa la media geométrica  $\pm$  SEM. En b) se representa la concentración de hemoglobina; cada barra representa el área bajo la curva (AUC) de cada grupo desde el día 0 hasta el día 8 después de la infección  $\pm$  SEM. En c) y d) se representa la masa o la temperatura corporales respectivamente en cada grupo. Se calculó el cambio de la masa corporal o la temperatura corporales con base en los datos obtenidos el día 0 de la infección. Cada barra representa el AUC de cada grupo desde el día 0 hasta el día 8 después de la infección  $\pm$  SEM. A los datos de parasitemia se les realizó un análisis de medidas repetidas con prueba post hoc de Bonferroni y para evaluar las diferencias en la concentración de hemoglobina, masa y temperatura corporales se utilizó el análisis de ANOVA de una vía y prueba post hoc de Bonferroni. El asterisco representa la diferencia estadísticamente significativa con  $p \leq 0.05$ . SIN TX = sin tratamiento, VEH = vehículo, LET = letrozol, TEST = testosterona y LET+TEST = Combinación de letrozol y testosterona.

#### **8.4. Efecto del letrozol y la testosterona sobre el índice esplénico y el porcentaje de poblaciones celulares CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, Mac-3<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>/32<sup>+</sup> en el bazo de ratones macho CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA**

La respuesta inmunitaria adaptativa que se desencadena por la infección con *Plasmodium*, se lleva a cabo principalmente en el bazo. Una de las funciones principales de este órgano es eliminar a los eritrocitos infectados por el parásito (40). En la malaria grave la destrucción de los eritrocitos por las células del sistema inmune incrementa el tamaño del bazo (38). El índice esplénico permite evaluar el tamaño del bazo de cada ratón con relación a su peso corporal.

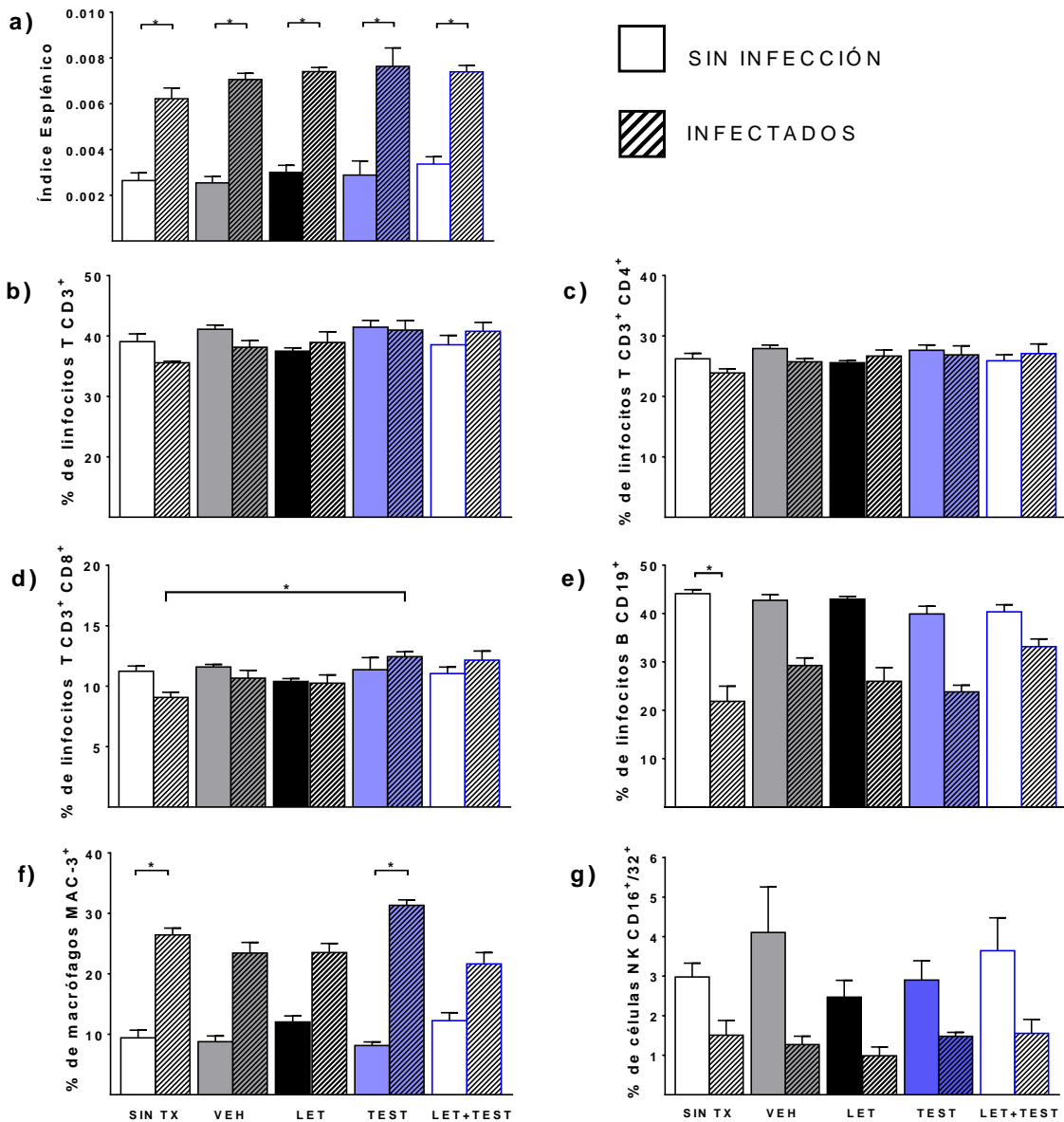
La infección con *P. berghei* ANKA aumentó significativamente el índice esplénico en todos los grupos de ratones en comparación al grupo control sin infección (Figura 9a).

Adicionalmente, se cuantificaron los porcentajes de linfocitos T (CD3<sup>+</sup>), T cooperadores (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), T citotóxicos (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), linfocitos B (CD19<sup>+</sup>), macrófagos (Mac-3<sup>+</sup>) y NK (CD16<sup>+</sup>/CD32<sup>+</sup>) en el bazo.

La administración de letrozol, testosterona o la combinación de ambos no modificó el porcentaje de linfocitos T CD3<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup> o NK de bazo de ratones infectados o sin infección (Figura 9b, 9c, 9g). En contraste, la administración de testosterona aumentó significativamente el porcentaje de linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> en comparación al grupo de ratones infectados que no recibió tratamiento (Figura 9d).

La infección con *P. berghei* ANKA disminuyó el porcentaje de linfocitos B CD19<sup>+</sup> únicamente en el grupo de ratones sin tratamiento (Figura 9e).

En contraste, el porcentaje de macrófagos aumentó significativamente en los ratones infectados que no recibieron tratamiento y en los ratones que se les administró testosterona (Figura 9f).



**Figura 9. Efecto de los andrógenos sobre el índice esplénico y el porcentaje de poblaciones celulares CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, Mac-3<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>/32<sup>+</sup> en el bazo de ratones CBA/Ca machos infectados con *P. berghei* ANKA.** Se utilizaron 5 grupos de 10 ratones CBA/Ca cada uno, al primer grupo se le administró letrozol diariamente (7 mg/Kg), a un segundo grupo se le administró testosterona (30 mg/Kg), el tercer grupo recibió la combinación de letrozol y testosterona a las mismas dosis. Como controles se utilizaron dos grupos de ratones uno se trató con vehículo (aceite de almendras) y el segundo grupo no recibió tratamiento. La mitad de los ratones de cada grupo se infectaron con *P. berghei* ANKA y se sacrificaron al día 8 después de la infección. En a) se representa el índice esplénico; cada barra indica la media en cada grupo  $\pm$ SEM. Además, se cuantificaron los porcentajes de las células del bazo mediante citometría de flujo. En b) se representa el porcentaje de linfocitos CD3<sup>+</sup>, en c) se representa el porcentaje de linfocitos T cooperadores (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), en d) se representa el porcentaje de linfocitos T citotóxicos (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), en e) se representan los linfocitos B (CD19<sup>+</sup>), en f) se representa el porcentaje de macrófagos (Mac-3<sup>+</sup>) y en g) se representa el porcentaje de células Natural Killer (CD16<sup>+</sup>/32<sup>+</sup>). Cada barra representa la media de cada población de células  $\pm$  SEM. Para determinar las diferencias estadísticas entre los grupos se realizó un análisis de Kruskal-Wallis con prueba post-hoc de Dunn's. El asterisco representa la diferencia estadísticamente significativa con  $p < 0.05$  con (n=5). SIN TX = sin tratamiento, VEH = vehículo, LET = letrozol, TEST = testosterona y LET+TEST = Combinación de letrozol y testosterona.



### **8.5. Efecto del letrozol y la testosterona sobre la concentración sérica de las citocinas: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$ y TNF- $\alpha$**

Además de las poblaciones celulares, en la respuesta inmunitaria se requiere de la interacción de citocinas que favorezcan la activación, la proliferación o la inhibición de las células de la respuesta inmunitaria. Las citocinas proinflamatorias, se asocian principalmente a la malaria grave y al desarrollo de la malaria cerebral (79). Por lo anterior, en este trabajo se determinó la influencia de la testosterona sobre la concentración sérica de las citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (Figura 10).

La infección con *P. berghei* ANKA disminuyó la concentración de IL-2 en todos los grupos de ratones. Sin embargo, únicamente resultó significativa en el grupo que no recibió tratamiento y en el grupo que recibió la combinación de letrozol y testosterona (Figura 10a).

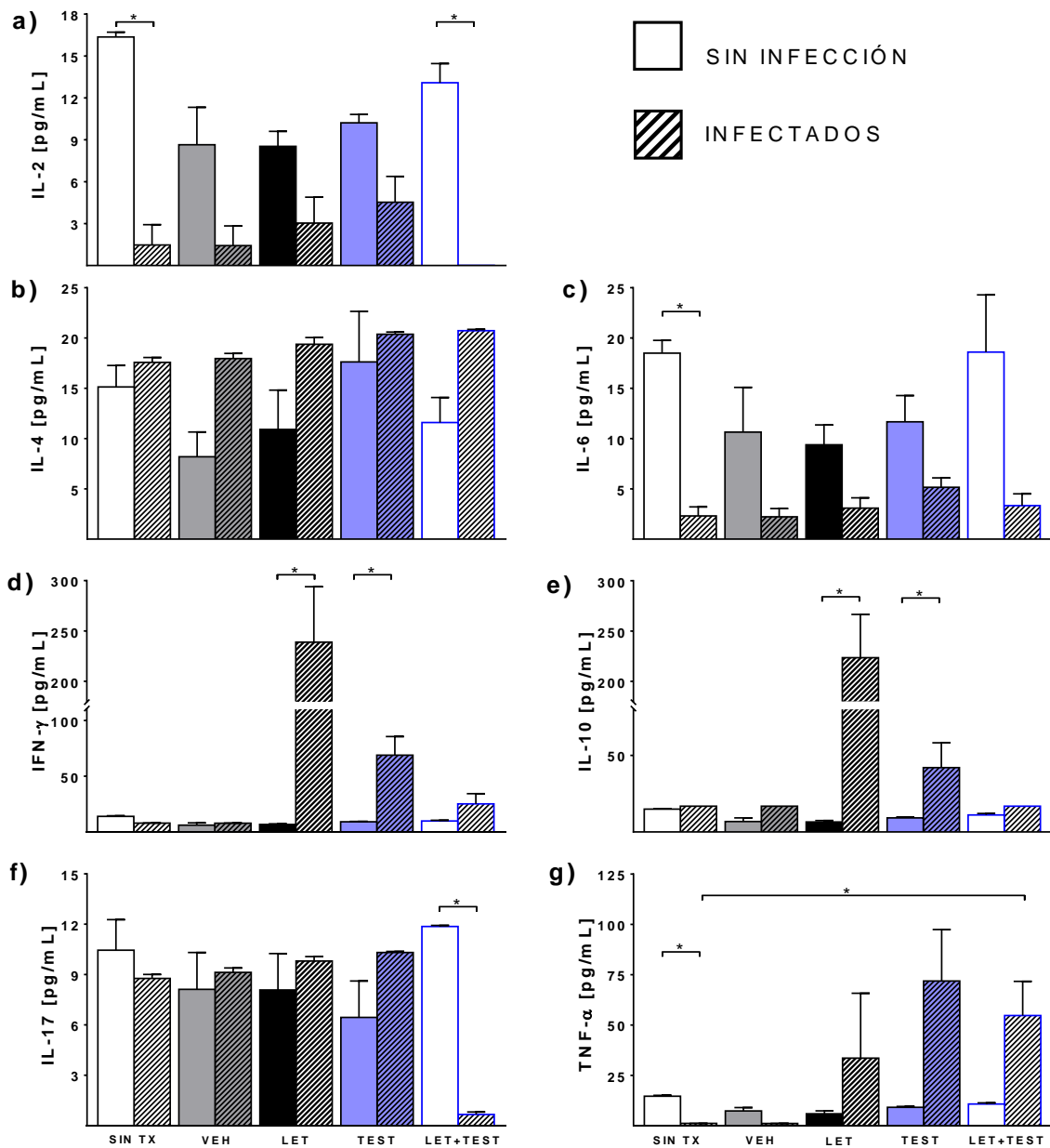
En contraste, la testosterona no modificó significativamente la concentración de IL-4 en ninguno de los grupos analizados (Figura 10b).

Con respecto a la IL-6, se observó que la concentración de esta citocina disminuyó en todos los grupos de ratones infectados. Sin embargo, la reducción solo resultó significativa en el grupo que no recibió tratamiento (Figura 10c).

Interesantemente, el letrozol y la testosterona incrementaron significativamente la concentración de IFN- $\gamma$  (Figura 10d). Mientras que, al cuantificar la concentración de la IL-10, se detectó un aumento significativo en los ratones infectados tratados con letrozol o testosterona por separado (Figura 10e).

Con relación a la concentración de IL-17, se observó que disminuyó significativamente en el grupo de ratones infectados a los que se les administró la combinación de letrozol y testosterona (Figura 10f).

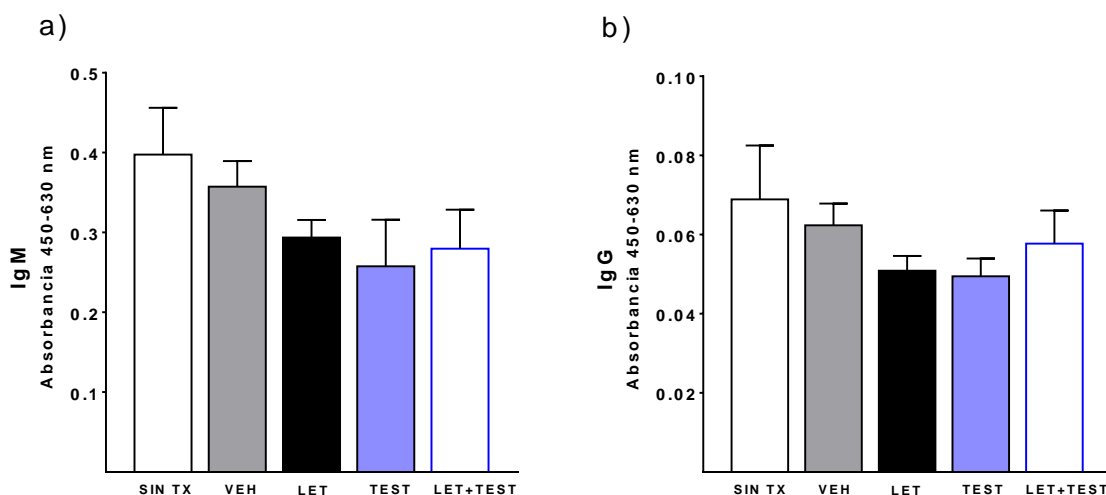
Finalmente, se cuantificó la concentración de TNF- $\alpha$ , detectamos que la infección con *P. berghei* ANKA disminuyó significativamente la concentración de TNF- $\alpha$  en el grupo de ratones que no recibieron tratamiento, resultado que probablemente se deba a que no se observó modificación en el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Figura 9c). En contraste, se observó que el TNF- $\alpha$  aumentó su concentración al administrar letrozol o testosterona, con diferencia significativa en el grupo de ratones infectados que se les trató con la combinación de letrozol y testosterona (Figura 10g).



## 8.6. Efecto del letrozol y la testosterona sobre la concentración de anticuerpos IgM e IgG específicos contra *P. berghei* ANKA.

La producción de anticuerpos por las células plasmáticas es importante para la eliminación del *Plasmodium*. Los anticuerpos al unirse a los eritrocitos parasitados promueven su fagocitosis por los macrófagos; permiten la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos; además, al unirse al parásito neutralizan la invasión a nuevos eritrocitos. Por lo anterior, se evaluó la concentración de anticuerpos específicos de los ratones infectados.

Se observó que la administración de letrozol, testosterona o la combinación de letrozol y testosterona, no modificó significativamente la producción de los anticuerpos de las clases IgM e IgG específicos para *P. berghei* ANKA (Figura 11).



**Figura 11. Efecto de los andrógenos sobre la concentración de anticuerpos IgM e IgG específicos contra *P. berghei* ANKA.** Se utilizaron 5 grupos de 5 ratones CBA/Ca cada uno. Al primer grupo se le administró letrozol diariamente (7 mg/Kg), a un segundo grupo se le administró testosterona (30 mg/Kg); otro grupo recibió la combinación de letrozol y testosterona a las mismas dosis. Como controles se utilizaron dos grupos de ratones uno se trató con vehículo (aceite de almendras) y el segundo grupo no recibió tratamiento. Todos los ratones de cada grupo se infectaron con *P. berghei* ANKA y se sacrificaron al día 8 después de la infección. Se cuantificó la concentración plasmática de los anticuerpos mediante la técnica de ELISA: En a) se representa a la concentración de IgM, en b) se representa a la concentración de IgG. Cada barra indica la media de la absorbancia en cada grupo  $\pm$ SEM. Los datos se analizaron con análisis de Kruskal-Wallis y la prueba post hoc de Dunn's. El asterisco representa la diferencia estadísticamente significativa con  $p \leq 0.05$ . SIN TX = sin tratamiento, VEH = vehículo, LET = letrozol, TEST = testosterona y LET+TEST = Combinación de letrozol y testosterona.

## 9. Discusión

En este trabajo se evaluó el efecto de los andrógenos, en particular de la testosterona sobre el cuadro clínico y la respuesta inmunitaria en ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA. Debido a que *in vivo* la testosterona se transforma en estradiol y otros estrógenos por la enzima p450 aromatasas, utilizamos el letrozol, un inhibidor específico de esta enzima para impedir que al administrar testosterona se convierta en estrógenos. Dado que no existen reportes en la literatura del uso del letrozol en los modelos experimentales de malaria murina, lo primero que se hizo fue determinar la dosis, vía de administración y vehículo a utilizar, para adaptar el uso del letrozol en este modelo experimental.

En los experimentos preliminares se encontró que el letrozol a dosis de 1 mg/Kg de peso corporal no tuvo efecto sobre la sobrevivencia, parasitemia, concentración de hemoglobina y temperatura corporal. En cambio, disminuyó la masa corporal de los ratones infectados que, aunque no se alcanzó un elevado porcentaje en la parasitemia, los ratones desarrollaron caquexia, es decir disminución en la masa corporal, efecto producido en la infección con *P. berghei* en ratones (22). Además, en el experimento preliminar 2, se observó que por efecto de la infección se disminuyó la concentración de hemoglobina en los ratones que se administró el letrozol a esta misma dosis. Esto demostró, que a esta dosis el letrozol posiblemente no modificó la concentración de los andrógenos y por lo tanto el efecto es propio de la infección con *P. berghei* ANKA.

Está establecido que los andrógenos aumentan el porcentaje de parasitemia y aumentan la gravedad de los síntomas desarrollados con la infección con *Plasmodium* (9, 36, 49, 71), por lo que para alcanzar la inhibición de la enzima p450 aromatasas con letrozol, fue necesario aumentar la dosis del letrozol como lo realizado en investigaciones independientes por Skarra o Luthra donde analizaron el efecto del letrozol a diferentes dosis desde 1 a 8 mg/Kg de peso corporal (67, 80, 81) y observaron sus efectos en una curva de dosis-respuesta. El aumento de la dosis del letrozol a 4 mg/Kg de peso corporal, aumentó también el porcentaje de la parasitemia y disminuyó la concentración de hemoglobina, efecto que en

nuestro grupo de investigación se conoce se debe al aumento en la concentración de andrógenos (36). Además, administrar el letrozol a esta dosis, los ratones aumentaron la masa y la temperatura corporal en comparación al grupo tratado con vehículo. Por lo tanto, la dosis de 4 mg/Kg de letrozol, a diferencia de la dosis de 1 mg/Kg, posiblemente aumenta la concentración de andrógenos y esto repercute en la parasitemia, concentración de hemoglobina, masa y temperatura corporal, ya que se modifican por efecto de los andrógenos, como lo describimos en nuestro grupo de investigación.

El cambio a la vía de administración subcutánea permitió utilizar una única vía de administración para reducir el nivel de estrés por manejo experimental de los ratones en los que se administró la combinación de letrozol y testosterona. Se consideró la evaluación farmacocinética del letrozol donde se informa que la administración del letrozol por vía subcutánea posee una biodisponibilidad del 75% aproximadamente, por lo que se necesitó una dosis superior para alcanzar efectos similares a la vía de administración oral (82). Determinamos que la dosis de 7 mg/Kg de peso corporal en suspensión con aceite de almendras y administrada por vía subcutánea resultó óptima para evaluar el efecto de los andrógenos en ratones CBA/Ca infectados con *P. berghei* ANKA, ya que disminuyó el tiempo de sobrevida, aumentó la parasitemia, disminuyó la concentración de hemoglobina y aumentó la temperatura corporal en los ratones infectados.

La cuantificación de la testosterona libre y el 17 $\beta$ -estradiol comprobaron que la administración del letrozol a la dosis de 7 mg/Kg es efectiva para la inhibición de la enzima p450 aromatasa, ya que aumentó la concentración plasmática de testosterona libre y de la DHEA (Figura 7a). Como era de esperarse, la combinación de letrozol con testosterona incrementó significativamente la concentración de testosterona libre, a su vez disminuyó la concentración de estradiol en el mismo grupo de ratones no infectados en comparación con el grupo que no recibieron ningún tratamiento (Figura 7b). Esto corresponde al efecto

esperado en la cuantificación de estas hormonas por la inhibición de la enzima p450 aromatasa.

Además, se observó que la concentración de DHEA aumenta significativamente en el mismo grupo de ratones en los que se administró letrozol y testosterona. La DHEA, un andrógeno precursor en la esteroidogénesis, probablemente se acumula por efecto de la inhibición de la enzima p450 aromatasa. Está reportado que después de administrar el letrozol e inhibir a la enzima aromatasa también se observó un aumento en la concentración de la DHEA, así como aumento en la concentración de testosterona (83, 84).

En un análisis realizado por Zhang N en 2016, se describió que al administrar DHEA a ratones hembras aumenta la concentración de  $17\beta$ -estradiol, mientras que si se administra conjuntamente DHEA y letrozol la concentración de  $17\beta$ -estradiol disminuye significativamente, concentración que se mantiene en comparación a los ratones control o a los ratones que recibieron únicamente letrozol (85). Este resultado también se observó en este trabajo; donde los ratones que recibieron letrozol no disminuyeron la concentración del  $17\beta$ -estradiol en comparación a la concentración basal de los ratones que no recibieron ningún tratamiento, probablemente porque los ratones estudiados fueron machos y su concentración de  $17\beta$ -estradiol es muy baja. Sin embargo, aunque no se observó disminución significativa del  $17\beta$ -estradiol si se logró la inhibición de la aromatasa con la administración del letrozol a la dosis de 7 mg/Kg de peso corporal por vía subcutánea debido a que aumentó la concentración de andrógenos (la testosterona libre y la DHEA).

La regulación en la conversión de andrógenos a estrógenos se regula por la estimulación en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. Donde, la testosterona es el regulador principal de la secreción de gonadotropinas, por lo tanto, un aumento en la concentración de esta hormona promueve la retroalimentación para la liberación de gonadotropinas, por lo que aumenta la concentración de andrógenos (86). Se ha descrito que cuando se administra letrozol principalmente en dosis superiores a 5 mg/Kg de peso corporal, se promueve el aumento significativo de las

gonadotropinas LH y FSH (66, 87), lo que probablemente complicó la disminución significativa del  $17\beta$ -estradiol en el grupo de ratones tratados únicamente con letrozol. Sin embargo, se requiere comprobar experimentalmente que el tratamiento con letrozol modificó la concentración de las hormonas LH o FSH.

Los resultados en los experimentos preliminares y la cuantificación de la testosterona libre,  $17\beta$ -estradiol y DHEA permitieron establecer el uso del letrozol a la dosis de 7 mg/Kg de peso corporal por vía subcutánea como un esquema óptimo que al combinar con la administración de testosterona a la dosis de 30 mg/Kg permitió evaluar el efecto de los andrógenos en nuestro modelo experimental de malaria murina.

Los andrógenos agudizaron la severidad de la sintomatología ya que al administrar letrozol en combinación con testosterona se incrementó la concentración de testosterona libre; lo que explica el incremento de la parasitemia; además, disminuyó la concentración de hemoglobina y la masa corporal en comparación con los ratones sin tratamiento infectados con *P. berghei* ANKA. Lo anterior explicaría al menos en parte, que la testosterona sea responsable de la mayor susceptibilidad de los machos a la enfermedad como lo describió Wassmer y colaboradores en 2015 (74).

Un hallazgo relevante de este trabajo es que la regulación de la temperatura corporal es dependiente de la concentración de andrógenos, ya que el aumento de la testosterona libre, resultado de la administración de letrozol y testosterona impidió la disminución de la temperatura únicamente en los ratones infectados con *P. berghei* ANKA. Se ha demostrado que la testosterona disminuye la temperatura corporal, de forma independiente de la concentración de andrógenos (88). Sin embargo, en este modelo experimental la regulación es aún más compleja porque la infección indujo hipotermia en los ratones infectados con *Plasmodium berghei* ANKA (Figura 8c), el mecanismo que explique como la testosterona regula la disminución de la temperatura en el grupo infectado requiere investigarse.

La combinación de testosterona con letrozol (grupo que exhibió la mayor concentración de testosterona libre) incrementó la concentración de hemoglobina



únicamente en los ratones no infectados; este hallazgo se explicaría porque se ha demostrado que los andrógenos promueven la diferenciación de las células hematopoyéticas y la liberación de eritropoyetina, lo que a su vez induce un aumento en el número de eritrocitos y en la concentración de hemoglobina (89, 90). En contraste, en los ratones infectados con *P. berghei* ANKA la combinación de testosterona y letrozol disminuyó la concentración de hemoglobina; por lo que es probable que la disminución se deba a que ese grupo incrementó más la parasitemia, lo que generó destrucción de eritrocitos parasitados y por lo tanto menor concentración de hemoglobina (Figura 8a y 8b).

Además, en el grupo no infectado la inhibición de la aromatasa aumentó la masa corporal y proporcionalmente aumentó la temperatura corporal, esto corrobora que ambas variables se regulan por los andrógenos. Este hallazgo, está acorde con lo descrito por Skarra y col., quienes documentaron que la administración de letrozol aumenta la masa corporal y la adiposidad de los ratones lo que se relaciona con el aumento de la masa corporal (80).

Referente al efecto de los andrógenos sobre la respuesta inmunitaria se evaluó el índice esplénico; se comprobó que la infección con *P. berghei* ANKA aumentó el tamaño del bazo ya que genera un proceso inflamatorio en el principal sitio de destrucción del parásito, es probable que al aumento en el tamaño del bazo contribuyan los macrófagos (Mac-3<sup>+</sup>) y otras poblaciones celulares que no se cuantificaron como las células dendríticas y las de la pulpa blanca del bazo. El incremento de las células Mac-3<sup>+</sup> corrobora lo reportado por Wunderlich y colaboradores quienes describieron que la testosterona activa a los macrófagos, debido a su interacción con los receptores de andrógenos en la infección con *P. chabaudi* (76).

Además, contrario a lo establecido por investigaciones anteriores en las que la administración de testosterona modifica el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> por vías de señalización no genómicas (76), en este trabajo se observó que la administración de letrozol, testosterona o la combinación de ambos no modificó el porcentaje de linfocitos T CD3<sup>+</sup>, T CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>, B CD19<sup>+</sup>, Mac-3<sup>+</sup> o NK CD16<sup>+</sup>/32<sup>+</sup>.

En contraste, la administración de testosterona aumentó el porcentaje de los linfocitos T CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, resultado que confirma lo publicado por Wunderlich y colaboradores quienes evaluaron el efecto de la testosterona en ratones C57BL/10 infectados con *P. chabaudi* (48).

Contrario a lo esperado, la infección con *P. berghei* ANKA no modificó el porcentaje de células de bazo CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Sin embargo, disminuyó las poblaciones de linfocitos B CD19<sup>+</sup> y de células NK CD16<sup>+</sup>/CD32<sup>+</sup> y aumentó la de los macrófagos, estos hallazgos corroboran lo reportado por nuestro grupo de investigación donde se informó que la infección con *P. berghei* ANKA aumenta el porcentaje de macrófagos después de la gonadectomía (36). Sin embargo, el que la testosterona incremente el número de macrófagos no necesariamente indica que su actividad parasiticida aumente, ya que este grupo de ratones presentó parasitemia más alta que el grupo control. Sin embargo, el incremento de andrógenos probablemente aumentó la activación de los macrófagos detectado por la liberación de IFN- $\gamma$  y de TNF- $\alpha$ .

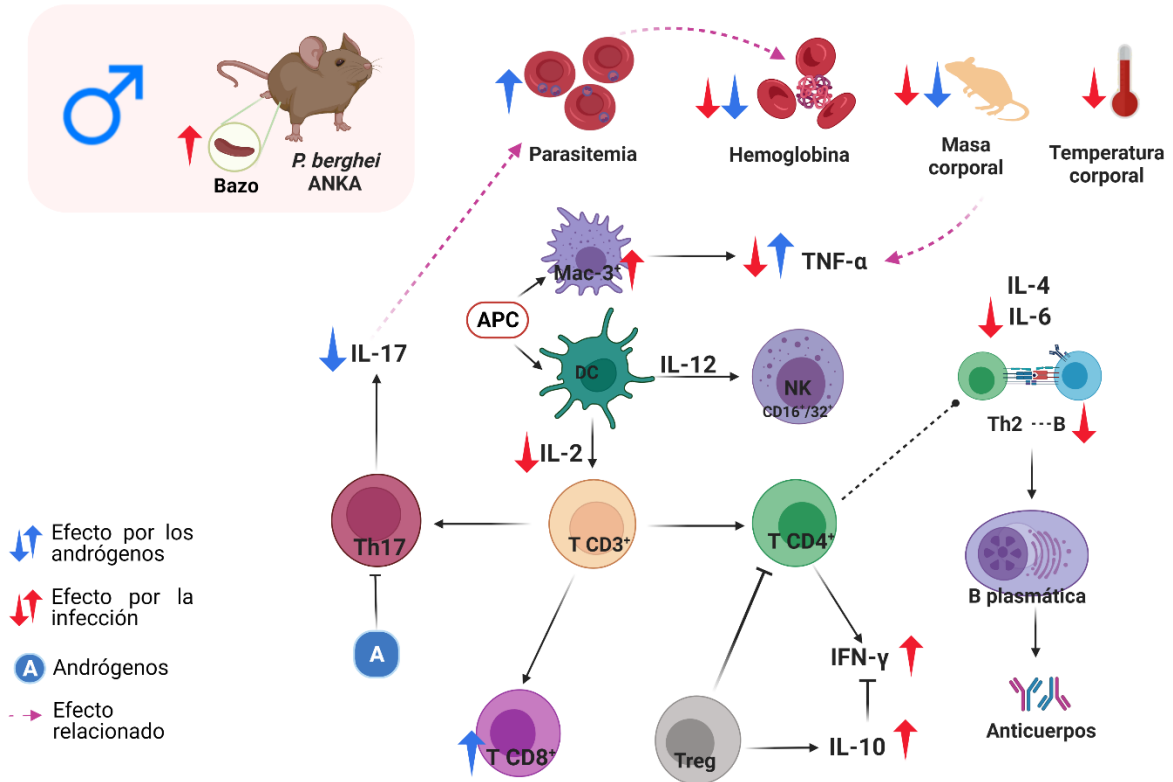
Las hormonas sexuales también modulan la síntesis de citocinas en las células de la respuesta inmunitaria (41). La IL-2 es una de las principales citocinas que intervienen en la activación de la respuesta de los linfocitos T; se observó que la infección con *P. berghei* ANKA disminuyó la concentración plasmática de la IL-2, efecto que se agudizó por el aumento en la concentración de testosterona libre al administrar la combinación de letrozol y testosterona. En contraste, la administración únicamente de letrozol o testosterona no modificó la concentración de la IL-4 en los grupos analizados. Esto explicaría, al menos parcialmente, que no se modificara el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, ya que una de las principales funciones de esta citocina, en conjunto con la IL-2, es promover la activación de los linfocitos T cooperadores tipo 2 (Th2) e inducir la proliferación y diferenciación de linfocitos B (91), que de la misma manera corresponde con la disminución de los linfocitos B CD19<sup>+</sup> en este trabajo (Figura 9e).

A su vez, la disminución en la IL-6 necesaria para la diferenciación y maduración de los linfocitos B a células plasmáticas, corresponde con la disminución en la

población de linfocitos B CD19<sup>+</sup> por efecto de la infección con *P. berghei* ANKA. Es probable que el tiempo de infección (8 días), no fue suficiente para la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas y por eso no se detectaron cambios importantes en la concentración de anticuerpos específicos para *P. berghei* ANKA. Este hallazgo corresponde con lo descrito por Smith y colaboradores quienes reportaron que estas clases de anticuerpos, IgM e IgG, se producen después de la segunda semana de infección con *P. berghei* ANKA (92).

Por otro lado, las citocinas proinflamatorias como el IFN- $\gamma$  promueven la destrucción del parásito al promover la actividad fagocítica de los macrófagos; sin embargo, también favorece el desarrollo de la malaria cerebral (79), por lo que su síntesis está bajo la estricta regulación de la IL-10 (93). En este trabajo, se demostró que los andrógenos favorecen el incremento en la concentración de IFN- $\gamma$  de los ratones infectados con *P. berghei* ANKA, efecto que es proporcional al aumento de la IL-10 en el mismo grupo de ratones.

Interesantemente, el grupo infectado tratado con la combinación de testosterona y letrozol disminuyó la concentración de IL-17. Esa disminución probablemente se debe a que la combinación de letrozol y testosterona al aumentar significativamente la concentración de testosterona libre, redujo la expresión de la IL-17 descrita en modelos de infección similar con diferentes cepas de *P. berghei* (94). Es probable que, al elevar la concentración de testosterona libre, se inhibió la respuesta de los linfocitos Th-17 en la infección con *P. berghei* ANKA y por lo tanto se inhibió la síntesis de la IL-17, esto explicaría el aumento de la parasitemia en este grupo. Además, recientemente se ha descrito que la IL-17 juega un papel protector contra la infección por *P. berghei* cepa NK65 (94, 95), por lo que este trabajo suma la relevancia de la IL-17 como una citocina que en concentraciones bajas favorece el desarrollo de malaria grave.



**Figura 12. Resumen de efecto de los andrógenos sobre la patología y respuesta inmunitaria desarrollada en la infección con *P. berghei* ANKA como resultado de inhibir a la enzima p450 aromatas en un modelo de ratones macho CBA/Ca.** Se representa el modelo de ratones CBA/Ca macho infectados con *P. berghei* ANKA en la esquina superior izquierda. En el recuadro superior se esquematiza el efecto de la testosterona sobre la parasitemia, concentración de hemoglobina, masa y temperatura corporal, como parámetros de la patología en la malaria. En el recuadro inferior se esquematiza el efecto de la testosterona sobre la respuesta inmunitaria; DC abreviatura de células dendríticas, NK: células natural killer, T CD3<sup>+</sup> linfocitos T, TCD4<sup>+</sup> linfocitos T cooperadores y TCD8<sup>+</sup> linfocitos T citotóxicos, Mac-3<sup>+</sup>: macrófagos, Th17: linfocitos Th17, Th2: T cooperadores tipo 2, B: linfocitos B, B plasmática: células plasmáticas. En azul se representa el efecto de los andrógenos en la infección con *P. berghei* ANKA y en rojo el efecto únicamente por la infección con *P. berghei* ANKA. CPA: Células presentadoras de antígeno. Las flechas hacia arriba indican modulación positiva y las flechas hacia abajo indican modulación negativa. Figura original creada en BioRender.com

## 10. Conclusiones

La estrategia de inhibir la transformación de los andrógenos a estrógenos, al administrar letrozol vía subcutánea en conjunto con la administración de testosterona, permitió demostrar que los andrógenos agravan la sintomatología, es decir, aumentan la parasitemia, disminuyen la concentración de hemoglobina y la masa corporal que son dependientes del aumento en la concentración de andrógenos. Este efecto también se observó en la respuesta inmunitaria, ya que el aumento de la testosterona activó la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> y la actividad de los macrófagos, esto provocó un incremento en la liberación de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  y a su vez, de la IL-10.

El aumento en la concentración de andrógenos también inhibió importantes mecanismos de defensa en el hospedero, ya que no se modificó la concentración de anticuerpos IgM o IgG y además se inhibió la concentración de la IL-17 en la respuesta a la infección contra *Plasmodium berghei* ANKA.

## 11. Perspectivas

Este trabajo permitió visualizar que los efectos de los andrógenos en un modelo de malaria experimental son dependientes de la concentración, por lo que resulta interesante evaluar cada una de las variables analizadas en los ratones hembra, ya que en condiciones fisiológicas poseen menor concentración de andrógenos y mayor concentración de estrógenos que los ratones macho, por lo que el efecto de inhibir la conversión a estrógenos podría resultar significativo.

Dado que se observó que los andrógenos tienen efecto sobre las poblaciones de linfocitos TCD8<sup>+</sup>, linfocitos B e incluso probablemente sobre las células NK o linfocitos Th17, podría considerarse evaluar estas poblaciones y la concentración de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-17 en experimentos in vitro de células provenientes de ratones macho y hembra con la adición de letrozol y testosterona a las dosis ya establecidas.

Asimismo, es interesante realizar la cuantificación de subclases de anticuerpos IgG1, IgG2, IgG2a e IgG2b en ratones hembra y macho, ya que no se observó efecto en las clases IgM e IgG, pero si se observó disminución en los linfocitos B.

Debido a que el letrozol no disminuyó la concentración del 17 $\beta$ -estradiol como se esperaba, es importante evaluar la actividad de la aromatasa por PCR en tiempo real en diferentes tejidos como testículos y cerebro; como órganos en los que la enzima aromatasa se encuentra en mayor porcentaje.

## 12. Referencias

1. Organization WH. World Malaria Report 2018. 2018:14,5.
2. 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.
3. Roved J, Westerdahl H, Hasselquist D. Sex differences in immune responses: hormonal effects, antagonistic selection, and evolutionary consequences. *Hormones and Behavior*. 2017;88:95-105.
4. Grossman CJ. Regulation of the immune system by sex steroids. *Endocrine Reviews*. 1984;5(3):435-55.
5. Ahmed SA, Talal N, Christadoss P. Genetic regulation of testosterone-induced immune suppression. *Cellular immunology*. 1987;104(1):91-8.
6. Gubbels Bupp MR, Jorgensen TN. Androgen-induced immunosuppression. *Frontiers in immunology*. 2018;9:794.
7. Buskiewicz I, Huber S, Fairweather D. Chapter 4—sex hormone receptor expression in the immune system A2. *Sex Differences in Physiology*. Boston: Academic Press; 2016.
8. Brinkmann A, Blok L, De Ruiter P, Doesburg P, Steketee K, Berrevoets C, et al. Mechanisms of androgen receptor activation and function. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 1999;69(1-6):307-13.
9. Benten W, Wunderlich F, Mossmann H. Testosterone-induced suppression of self-healing *Plasmodium chabaudi* malaria: an effect not mediated by androgen receptors? *Journal of endocrinology*. 1992;135(3):407-13.
10. Benten W, Wunderlich F, Herrmann R, Kühn-Velten W. Testosterone-induced compared with oestradiol-induced immunosuppression against *Plasmodium chabaudi* malaria. *Journal of endocrinology*. 1993;139(3):487-94.
11. Kamis A, Ibrahim J. Effects of testosterone on blood leukocytes in *Plasmodium berghei*-infected mice. *Parasitology research*. 1989;75(8):611-3.
12. Krücken 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. *Infection and immunity*. 2005;73(1):436-43.
13. Organization WH. World Malaria Report 2020: 20 years of global progress and challenges. 2020:16, 7.
14. Espinoza JL. Malaria resurgence in the Americas: An underestimated threat. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2019.
15. Lancet T. Malaria prevention: civilisation versus disease. Elsevier; 2013.
16. Hay SI, Guerra CA, Tatem AJ, Noor AM, Snow RW. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *The Lancet infectious diseases*. 2004;4(6):327-36.
17. 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.
18. Butcher G, Mitchell G. The role of *Plasmodium knowlesi* in the history of malaria research. *Parasitology*. 2018;145(1):6-17.
19. Lee K-S, Cox-Singh J, Singh B. Morphological features and differential counts of *Plasmodium knowlesi* parasites in naturally acquired human infections. *Malaria journal*. 2009;8(1):1-10.
20. Milner DA. Malaria pathogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2018;8(1):a025569.

21. Hviid L, Marinho CR, Staalsoe T, Penha-Gonçalves C. Of mice and women: rodent models of placental malaria. *Trends in parasitology*. 2010;26(8):412-9.
22. Zuzarte-Luis V, Mota MM, Vigário AM. Malaria infections: What and how can mice teach us. *Journal of immunological methods*. 2014;410:113-22.
23. Stevenson MM, Riley EM. Innate immunity to malaria. *Nature Reviews Immunology*. 2004;4(3):169-80.
24. Basir R, Rahiman SF, Hasballah K, Chong W, Talib H, Yam M, et al. *Plasmodium berghei* ANKA infection in ICR mice as a model of cerebral malaria. *Iranian journal of parasitology*. 2012;7(4):62.
25. Carvalho LJ, Ferreira-da-Cruz MF, Daniel-Ribeiro CT, Pelajo-Machado M, Lenzi HL. Germinal center architecture disturbance during *Plasmodium berghei* ANKA infection in CBA mice. *Malaria Journal*. 2007;6(1):1-8.
26. Howick VM, Russell AJ, Andrews T, Heaton H, Reid AJ, Natarajan K, et al. The Malaria Cell Atlas: Single parasite transcriptomes across the complete *Plasmodium* life cycle. *Science*. 2019;365(6455).
27. Fujioka H, Aikawa M. Structure and life cycle. *Chem Immunol*. 2002;80(1):1-26.
28. Tuteja R. Malaria– an overview. *The FEBS journal*. 2007;274(18):4670-9.
29. Ekpenyong EA, Eyo JE. *Plasmodium* infection in man: a review. *Animal Research International*. 2006;3(3):573-80.
30. Crutcher JM, Hoffman SL-. *Malaria*. Medical Microbiology. 4th edition ed. Galveston, Texas 1996.
31. 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. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2015;110:23-47.
32. Demissie Y, Ketema T. Complicated malaria symptoms associated with *Plasmodium vivax* among patients visiting health facilities in Mendi town, Northwest Ethiopia. *BMC infectious diseases*. 2016;16(1):1-8.
33. Antonelli LR, Junqueira C, Vinetz JM, Golenbock DT, Ferreira MU, Gazzinelli RT. The immunology of *Plasmodium vivax* malaria. *Immunological reviews*. 2020;293(1):163-89.
34. Landgraf B, Kollaritsch H, Wiedermann G, Wernsdorfer WH. Parasite density of *Plasmodium falciparum* malaria in Ghanaian schoolchildren: evidence for influence of sex hormones? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1994;88(1):73-4.
35. Klein SL. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. *Parasite immunology*. 2004;26(6-7):247-64.
36. 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):2659-69.
37. 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):3190-203.
38. Del Portillo HA, Ferrer M, Brugat T, Martin-Jaular L, Langhorne J, Lacerda MV. The role of the spleen in malaria. *Cellular microbiology*. 2012;14(3):343-55.
39. Chotivanich K, Udomsangpetch R, McGready R, Proux S, Newton P, Pukrittayakamee S, et al. Central role of the spleen in malaria parasite clearance. *Journal of Infectious Diseases*. 2002;185(10):1538-41.
40. Engwerda CR, Beattie L, Amante FH. The importance of the spleen in malaria. *Trends in parasitology*. 2005;21(2):75-80.



41. Aguilar-Díaz H, Nava-Castro K, Cerbón-Cervantes M, Meneses-Ruiz D, Ponce-Regalado M, Morales-Montor J. Endocrine immune interactions in the host-parasite relationship: steroid hormones as immune regulators in parasite infections. *Journal of Steroids and Hormonal Science*. 2015;6(3):165.
42. Bouman A, Heineman MJ, Faas MM. Sex hormones and the immune response in humans. *Human reproduction update*. 2005;11(4):411-23.
43. Rider V, Abdou NI. Sexual dimorphism and the immune system. *Principles of Gender-Specific Medicine*: Elsevier; 2004. p. 1071-81.
44. Simental J, Sar M, Lane M, French F, Wilson E. Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(1):510-8.
45. Langhorne J, Quin SJ, A. SL. Mouse models of blood-stage malaria infections: immune responses and cytokines involved in protection and pathology. *Chem Immunol*. 2002;80:204-28.
46. Malaguarnera L, Musumeci S. The immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. *The Lancet infectious diseases*. 2002;2(8):472-8.
47. Zhang Z-H, Chen L, Saito S, Kanagawa O, Sendo F. Possible modulation by male sex hormone of Th1/Th2 function in protection against *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS infection in mice. *Experimental parasitology*. 2000;96(3):121-9.
48. Wunderlich F, Benten WPM, Bettenhaueser U, Schmitt-Wrede HP, Mossman H. Testosterone-unresponsiveness of existing immunity against *Plasmodium chabaudi* malaria. *Parasite immunology*. 1992;14(3):307-20.
49. Benten W, Ulrich P, Kühn-Velten W, Vohr H, Wunderlich F. Testosterone-induced susceptibility to *Plasmodium chabaudi* malaria: persistence after withdrawal of testosterone. *Journal of Endocrinology*. 1997;153(2):275-81.
50. Luu-The V. Assessment of steroidogenesis and steroidogenic enzyme functions. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2013;137:176-82.
51. Payne AH, Hales DB. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocrine reviews*. 2004;25(6):947-70.
52. Miller WL. Androgen synthesis in adrenarche. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2009;10(1):3-17.
53. Hanukoglu I. Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 1992;43(8):779-804.
54. Simpson ER, Clyne C, Rubin G, Boon WC, Robertson K, Britt K, et al. Aromatase—a brief overview. *Annual review of physiology*. 2002;64(1):93-127.
55. Lephart ED. Modulation of aromatase by phytoestrogens. *Enzyme research*. 2015;2015.
56. Smith IE, Dowsett M. Aromatase inhibitors in breast cancer. *New England Journal of Medicine*. 2003;348(24):2431-42.
57. Geisler J, Lønning PE. Aromatase inhibition: translation into a successful therapeutic approach. *Clinical Cancer Research*. 2005;11(8):2809-21.
58. Geisler J, Lønning PE. Endocrine effects of aromatase inhibitors and inactivators in vivo: review of data and method limitations. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2005;95(1-5):75-81.
59. Buzdar A, Douma J, Davidson N, Elledge R, Morgan M, Smith R, et al. Phase III, multicenter, double-blind, randomized study of letrozole, an aromatase inhibitor, for advanced breast cancer versus megestrol acetate. *Journal of clinical oncology*. 2001;19(14):3357-66.

60. Bhatnagar A, Brodie A, Long B, Evans D, Miller W. Intracellular aromatase and its relevance to the pharmacological efficacy of aromatase inhibitors. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2001;76(1-5):199-202.
61. Geisler Jr, Haynes B, Anker G, Dowsett M, Lønning PE. Influence of letrozole and anastrozole on total body aromatization and plasma estrogen levels in postmenopausal breast cancer patients evaluated in a randomized, cross-over study. *Journal of Clinical Oncology*. 2002;20(3):751-7.
62. Geisler J, Helle H, Ekse D, Duong NK, Evans DB, Nordbø Y, et al. Letrozole is superior to anastrozole in suppressing breast cancer tissue and plasma estrogen levels. *Clinical Cancer Research*. 2008;14(19):6330-5.
63. Bhatnagar AS. The discovery and mechanism of action of letrozole. *Breast cancer research and treatment*. 2007;105(1):7-17.
64. Long BJ, Jelovac D, Handratta V, Thiantanawat A, MacPherson N, Ragaz J, et al. Therapeutic strategies using the aromatase inhibitor letrozole and tamoxifen in a breast cancer model. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004;96(6):456-65.
65. Carreau S, Delalande C, Silandre D, Bourguiba S, Lambard S. Aromatase and estrogen receptors in male reproduction. *Molecular and cellular endocrinology*. 2006;246(1-2):65-8.
66. He Q, Liang L, Zhang C, Li H, Ge Z, Wang L, et al. Effects of different doses of letrozole on the incidence of early-onset ovarian hyperstimulation syndrome after oocyte retrieval. *Systems biology in reproductive medicine*. 2014;60(6):355-60.
67. Li L, Fang L, Xu X, Liu Y, Sun Y, He Z. Formulation and biopharmaceutical evaluation of a transdermal patch containing letrozole. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*. 2010;31(2-3):138-49.
68. Lalonde R, Kowalski K, Hutmacher M, Ewy W, Nichols D, Milligan P, et al. Model-based drug development. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2007;82(1):21-32.
69. Wang F, Li S, Meng L, Kuang Y, Liu Z, Ma X. Delayed implantation induced by letrozole in mice. *bioRxiv*. 2021.
70. Benten W, Bettenhauser U, Wunderlich F, Van Vliet E, Mossmann H. Testosterone-induced abrogation of self-healing of *Plasmodium chabaudi* malaria in B10 mice: mediation by spleen cells. *Infection and immunity*. 1991;59(12):4486-90.
71. Mosqueda-Romo NA, Rodríguez-Morales AL, Buendía-González FO, Aguilar-Sánchez M, Morales-Montor J, Legorreta-Herrera M. Gonadal steroids negatively modulate oxidative stress in CBA/Ca female mice infected with *P. berghei* ANKA. *BioMed research international*. 2014;2014.
72. Rashid D, Panda B, Vohora D. Reduced estradiol synthesis by letrozole, an aromatase inhibitor, is protective against development of pentylenetetrazole-induced kindling in mice. *Neurochemistry international*. 2015;90:271-4.
73. Wang W, Belosay A, Yang X, Hartman JA, Song H, Iwaniec UT, et al. Effects of letrozole on breast cancer micro-metastatic tumor growth in bone and lung in mice inoculated with murine 4T1 cells. *Clinical & experimental metastasis*. 2016;33(5):475-85.
74. 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.
75. Jambou R, El-Assaad F, Combes V, Grau GE. In vitro culture of *Plasmodium berghei*-ANKA maintains infectivity of mouse erythrocytes inducing cerebral malaria. *Malaria journal*. 2011;10(1):346.
76. Wunderlich F, Benten WPM, Lieberherr M, Guo Z, Stamm O, Wrehlke C, et al. Testosterone signaling in T cells and macrophages. *Steroids*. 2002;67(6):535-8.

77. Haynes B, Dowsett M, Miller W, Dixon J, Bhatnagar A. The pharmacology of letrozole. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2003;87(1):35-45.
78. Pfister CU, Martoni A, Zamagni C, Lelli G, De Braud F, Souppart C, et al. Effect of age and single versus multiple dose pharmacokinetics of letrozole (Femara®) in breast cancer patients. *Biopharmaceutics & drug disposition*. 2001;22(5):191-7.
79. Angulo I, Fresno M. Cytokines in the pathogenesis of and protection against malaria. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2002;9(6):1145-52.
80. Skarra DV, Hernández-Carretero A, Rivera AJ, Anvar AR, Thackray VG. Hyperandrogenemia induced by letrozole treatment of pubertal female mice results in hyperinsulinemia prior to weight gain and insulin resistance. *Endocrinology*. 2017;158(9):2988-3003.
81. Luthra R, Kirma N, Jones J, Tekmal RR. Use of letrozole as a chemopreventive agent in aromatase overexpressing transgenic mice. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2003;86(3-5):461-7.
82. Kivrak MB, Corum O, Alkan H, Atik O, Aydin I, Uney K. The pharmacokinetics of letrozole and its effect on gonadotropins in anestrus ewes. *Theriogenology*. 2021;176:225-32.
83. Dallagiovanna C, Reschini M, Polledri E, Pinna M, Ciaffaglione M, Cuce V, et al. Effect of letrozole on follicular fluid steroids concentrations in cancer patients undergoing oocytes cryopreservation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2022:1-8.
84. Zhou Y, Kang J, Chen D, Han N, Ma H. Ample evidence: Dehydroepiandrosterone (DHEA) conversion into activated steroid hormones occurs in adrenal and ovary in female rat. *PLoS one*. 2015;10(5):e0124511.
85. Zhang N, Gui Y, Qiu X, Tang W, Li L, Gober H-J, et al. DHEA prevents bone loss by suppressing the expansion of CD4+ T cells and TNF $\alpha$  production in the OVX-mouse model for postmenopausal osteoporosis. *BioScience Trends*. 2016;10(4):277-87.
86. Mills SC, Hazard L, Lancaster L, Mappes T, Miles D, Oksanen TA, et al. Gonadotropin hormone modulation of testosterone, immune function, performance, and behavioral trade-offs among male morphs of the lizard *Uta stansburiana*. *The American Naturalist*. 2008;171(3):339-57.
87. Bhatnagar A, Müller P, Schenkel L, Trunet P, Beh I, Schieweck K. Inhibition of estrogen biosynthesis and its consequences on gonadotrophin secretion in the male. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 1992;41(3-8):437-43.
88. Rodriguez ML, Schilperoort M, Johansson I, Eriksson ES, Palsdottir V, Kroon J, et al. Testosterone reduces metabolic brown fat activity in male mice. *Journal of Endocrinology*. 2021;251(1):83-96.
89. Guo W, Bachman E, Li M, Roy CN, Blusztajn J, Wong S, et al. Testosterone administration inhibits hepcidin transcription and is associated with increased iron incorporation into red blood cells. *Aging cell*. 2013;12(2):280-91.
90. Bachman E, Trivison TG, Basaria S, Davda MN, Guo W, Li M, et al. Testosterone induces erythrocytosis via increased erythropoietin and suppressed hepcidin: evidence for a new erythropoietin/hemoglobin set point. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*. 2014;69(6):725-35.
91. Jason J, Archibald LK, Nwanyanwu OC, Bell M, Buchanan I, Larned J, et al. Cytokines and malaria parasitemia. *Clinical Immunology*. 2001;100(2):208-18.
92. Smith N, Favila-Castillo L, Monroy-Ostria A, Hirunpetcharat C, Good M. The spleen, IgG antibody subsets and immunity to *Plasmodium berghei* in rats. *Immunology and cell biology*. 1997;75(3):318-23.
93. Kossodo S, Monso C, Juillard P, Velu T, Goldman M, Grau GE. Interleukin-10 modulates susceptibility in experimental cerebral malaria. *Immunology*. 1997;91(4):536-40.

94. Helegbe GK, Huy NT, Yanagi T, Shuaibu MN, Kikuchi M, Cherif MS, et al. Elevated IL-17 levels in semi-immune anaemic mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA. *Malaria journal*. 2018;17(1):1-12.
95. Schwinge D, Carambia A, Quaas A, Krech T, Wegscheid C, Tiegs G, et al. Testosterone suppresses hepatic inflammation by the downregulation of IL-17, CXCL-9, and CXCL-10 in a mouse model of experimental acute cholangitis. *The Journal of Immunology*. 2015;194(6):2522-30.