



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

“Actividad inmunomoduladora del tamoxifeno en un modelo de malaria”

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Luis Antonio Cervantes Candelas

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA
FES Zaragoza UNAM
(Unidad de Investigación de Química Computacional, Síntesis y Farmacología de
Moléculas de Interés Biológico)

COMITÉ TUTOR:

DRA. MIRIAM RODRIGUEZ SOSA
FES Iztacala UNAM
(Unidad de Biomedicina)

DR. JORGE MORALES MONTOR
Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM
(Departamento de Inmunología)

Ciudad Universitaria, CDMX., Agosto, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

“Actividad inmunomoduladora del tamoxifeno en un modelo de malaria”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Luis Antonio Cervantes Candelas

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA
FES Zaragoza UNAM
(Unidad de Investigación de Química Computacional, Síntesis y Farmacología de
Moléculas de Interés Biológico)

COMITÉ TUTOR:

DRA. MIRIAM RODRIGUEZ SOSA
FES Iztacala UNAM
(Unidad de Biomedicina)

DR. JORGE MORALES MONTOR
Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM
(Departamento de Inmunología)

Ciudad Universitaria, México, CDMX., 2022

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

OFICIO CPCB/658/2022

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 28 de marzo de 2022 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTOR EN CIENCIAS del estudiante CERVANTES CANDELAS LUIS ANTONIO con número de cuenta 306050174 con la tesis titulada "ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA DEL TAMOXIFENO EN UN MODELO DE MALARIA", 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: DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ
Vocal: DR. RICARDO LASCURAIN LEDESMA
Secretaria: DRA. MIRIAM RODRÍGUEZ SOSA

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 28 de julio de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme realizar el proyecto de investigación en el Laboratorio de Inmunología Molecular, de la UMIEZ, FES Zaragoza UNAM

Agradezco al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT); proyectos IN220417 e IN228620 por financiar el proyecto de investigación. Además, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT por la beca que me otorgó como parte del programa de becas nacionales con número de CVU 743407

A la Dra. Martha Legorreta Herrera, asesor principal de mi proyecto de investigación, por la enseñanza, guía, apoyo y consejos que recibí en el transcurso del Doctorado.

A los miembros del mi comité tutorial, la Dra. Miriam Rodríguez Sosa y el Dr. Jorge Morales Montor por las recomendaciones y sugerencias en cada etapa del Doctorado, que me permitieron crecer y entender otros enfoques de mi investigación.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM por brindarme el espacio para realizar mi proyecto de investigación.

A mi familia María de la luz Candelas Ramírez, Luis Cervantes Argueta, Karina Yetzú Serrano Chávez, Paola de la Luz Cervantes Candelas, y Angélica Cervantes Candelas, en los que siempre encontré amor, apoyo y sobre todo comprensión, para crecer en lo personal y no solo en lo intelectual y que, además, los considero mis maestros de vida.

A mi segunda familia los integrantes del Laboratorio de Inmunología Molecular:

A la Dra. Martha Legorreta Herrera, por creer en mí desde la licenciatura hasta ahora, por toda la experiencia que aportó a mi formación y sobre todo por ser una motivación y enseñanza dentro y fuera de la investigación.

A Fidel Buendía, Omar Fernández, Jesús Aguilar, Teresita de Jesús Nolasco y Sofía López por brindarme su amistad, además, por todo el apoyo en cada experimento, seminario y pláticas que me hicieron mejorar.

	ÍNDICE	página
1 RESUMEN		1
2 ABSTRACT		3
3 INTRODUCCIÓN		5
4 ANTECEDENTES		7
4.1 Malaria		7
4.2 Respuesta inmune en la fase sanguínea de la infección por <i>Plasmodium</i>		8
4.3 Dimorfismo sexual en malaria		9
4.4 Estrógenos		11
4.4.1 Estrógenos en la respuesta inmune		14
4.5 Tamoxifeno		16
5 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA		18
6 HIPÓTESIS		19
7 OBJETIVOS		20
7.1 Objetivo general		20
7.2 Objetivos específicos		20

8 DISEÑO EXPERIMENTAL	21
8.1 Población de estudio	21
8.2 Diseño estadístico y experimental	21
9 MATERIALES Y MÉTODOS	23
9.1 Administración de tamoxifeno	23
9.2 Determinación de la parasitemia	23
9.3 Cuantificación del índice esplénico	23
9.4 Medición de la temperatura corporal	23
9.5 Determinación de la masa corporal	24
9.6 Cuantificación de la concentración de hemoglobina	24
9.7 Cuantificación de las poblaciones celulares de bazo	24
9.8 Cuantificación de las citocinas Th1/Th2/Th17	25
10 RESULTADOS EN LAS HEMBRAS	26
10.1 El tamoxifeno incrementó la parasitemia y el índice esplénico en las hembras infectadas	26
10.2 El tamoxifeno disminuyó la temperatura, la masa corporal y la concentración de hemoglobina en las hembras	28
10.3 El tamoxifeno disminuyó las poblaciones celulares CD8 ⁺ y B220 ⁺ , pero incrementó el número de células NK en las hembras independientes de la infección	30
10.4 El tamoxifeno disminuyó la concentración sérica de IL-2, IL-6 e IL-17 en hembras infectadas	32
11 RESULTADOS EN LOS MACHOS	34
11.1 El tamoxifeno incrementó la parasitemia en los machos Infectados	34
11.2 El tamoxifeno disminuyó la masa corporal e incrementó la concentración de hemoglobina en los ratones machos infectados	36

11.3 El tamoxifeno incrementó el número de linfocitos CD8 ⁺ , pero disminuyó el porcentaje de linfocitos B220 ⁺ en los machos infectados	38
11.4 El tamoxifeno incrementó la concentración plasmática de IL-10, TNF- α e IFN- γ de los ratones macho infectados	40
12 DISCUSIÓN	42
13 CONCLUSIÓN	47
14 PROSPECTIVAS	50
15 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
16 ANEXO (Artículo de Requisito)	58

ÍNDICE DE FIGURAS	página
Figura 1 Ciclo biológico de <i>Plasmodium sp.</i>	7
Figura 2 Representación esquemática de la síntesis de los estrógenos a partir del colesterol en las células granulosas de ovario	11
Figura 3A y 3B Esquema de la estructura de los receptores de estrógenos y su activación	13
Figura 4 Comparación de las estructuras químicas del tamoxifeno, 17β-estradiol, estriol y estrona	16
Figura 5 El tamoxifeno incrementó la parasitemia y el índice esplénico en las hembras infectadas con <i>P. berghei</i> ANKA	27
Figura 6 El tamoxifeno disminuyó la temperatura, la masa corporal y la concentración de hemoglobina de las hembras infectadas con <i>P. berghei</i> ANKA	29
Figura 7 El tamoxifeno disminuyó el porcentaje de linfocitos CD8 ⁺ y B220 ⁺ en hembras infectadas con <i>P. berghei</i> ANKA, pero incrementó el número de células NK independiente de la infección	31
Figura 8 El tamoxifeno disminuyó la concentración plasmática de IL-2, IL-6 e IL-17 en hembras infectadas con <i>P. berghei</i> ANKA	33
Figura 9 El tamoxifeno incrementó la parasitemia en los machos infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.	35
Figura 10 El tamoxifeno disminuyó la masa corporal e incrementó la concentración de hemoglobina en los machos infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.	37
Figura 11 El tamoxifeno incrementó el número de linfocitos CD8 ⁺ , pero disminuyó el porcentaje de linfocitos B220 ⁺ , en los machos infectados con <i>P. berghei</i> ANKA	39
Figura 12 El tamoxifeno incrementó la concentración de IL-10, TNF-α e IFN-γ de los ratones macho infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.	41
Figura 13 Efecto del tamoxifeno sobre la respuesta inmune de ratones CBA/Ca hembra y macho infectados con <i>P. berghei</i> ANKA.	49

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
CD	Cluster of Differentiation
dL	decilitro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ER- α	Receptor de estrógenos alfa
ER- β	Receptor de estrógenos beta
g	gramos
Hb	Hemoglobina
IL-	Interleucina
IFN- γ	Interferón gamma
NO	Óxido nítrico
nm	nanómetros
μ L	Microlitros
PBS	Amortiguador de fosfatos
rpm	Revoluciones por minuto
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
TGF- β	Factor de Crecimiento Tisular beta

1 RESUMEN

La malaria, ocasionada por el protozooario *Plasmodium*, es la enfermedad parasitaria que causa el mayor número de muertes en el mundo. Los principales síntomas son pérdida de peso, anemia, inflamación de hígado y bazo, en los casos más graves, malaria cerebral. Todos los síntomas se asocian con la respuesta inmune y la concentración de las citocinas pro- y anti- inflamatorias. La sintomatología y la mortalidad son mayores en los hombres que en las mujeres, es decir es una enfermedad dimórfica, lo que sugiere la participación de las hormonas sexuales. En nuestro grupo de investigación se demostró previamente que disminuir la concentración de estradiol mediante gonadectomía incrementa la parasitemia de ratones hembra, pero al reconstituir a las hembras gonadectomizadas con 17 β -estradiol, la parasitemia disminuye. Sin embargo, se desconocen los mecanismos mediante los cuales los estrógenos regulan el proceso inflamatorio en malaria. Por lo anterior, en este trabajo bloqueamos *in vivo* a los receptores de estrógenos en ratones hembra y macho con tamoxifeno para evaluar su efecto sobre la parasitemia, la hipotermia, la variación de la masa corporal y la concentración de hemoglobina, causado por *Plasmodium berghei* ANKA. Además, evaluamos los efectos del tamoxifeno sobre el índice esplénico y el número de linfocitos CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, B220⁺, MAC-3⁺ y CD16⁺/32⁺ en el bazo (el órgano donde se elimina al parásito). Finalmente, cuantificamos la concentración plasmática de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ y TNF- α en ratones hembra y macho infectados con este parásito.

Administrar tamoxifeno a las hembras incrementó significativamente ($p \leq 0.05$) la parasitemia y disminuyó el porcentaje de linfocitos B220⁺ en ambos sexos en relación con su grupo control ($p \leq 0.05$). Además, disminuyó significativamente ($p \leq 0.05$) el número de linfocitos CD8⁺ y la concentración plasmática de IL-2, IL-6 e IL-17 en las hembras infectadas, pero en contraste, el tamoxifeno incrementó el número de linfocitos CD8⁺, y la concentración de IFN- γ , TNF- α e IL-10 en los machos infectados. Estos hallazgos sugieren que, aunque el tamoxifeno incrementó la parasitemia en ambos sexos, el mecanismo es diferente en machos y hembras,

en las hembras pudo deberse a la disminución en 5% de los linfocitos citotóxicos y a la disminución en la concentración plasmática de IL-2 (de 16pg/ml a 8 pg/ml) e IL-6 (de 15pg/ml a 3 pg/ml), mientras que en machos incrementó el número de linfocitos T CD8⁺ (aproximadamente un 5 %) junto con el incremento en la concentración plasmática de IFN- γ (de 90 pg/ml a casi 400 pg/ml), TNF- α (de 75 pg/ml a aproximadamente 600 pg/ml) e IL-10 (de 25 pg/ml a casi 500 pg/ml), por lo que el tamoxifeno generó un efecto dimórfico en la respuesta inmune en malaria, lo que sugiere que la participación de los estrógenos es fundamental en la eliminación del parásito en ambos sexos aunque los mecanismos involucrados sean distintos. Este trabajo permitió profundizar sobre la función de los estrógenos en la respuesta inmune en malaria, lo que contribuye a comprender su papel de los estrógenos en la respuesta inmune dimórfica en malaria. Finalmente, provee información para el futuro desarrollo de estrategias terapéuticas más eficientes y distintas para cada sexo.

2 ABSTRACT

Malaria, caused by *Plasmodium* protozoan, is the parasitic disease that causes the highest number of deaths in the world. The main symptoms are weight loss, anemia, inflammation of the liver and spleen, and in the most severe cases, cerebral malaria. All symptoms have been associated with the immune response and the concentration of pro- and anti-inflammatory cytokines. The symptomatology and mortality are higher in men than in women, that is, it is a dimorphic disease, which suggests the participation of sexual hormones.

In our research group, it was previously shown that lowering estradiol concentration by gonadectomy increases parasitaemia in female mice, but reconstitution of gonadectomized females with 17β -oestradiol decreases parasitaemia. However, the mechanisms by which oestrogens regulate the inflammatory process in malaria are unknown. Therefore, in this work we block oestrogen receptors in vivo with tamoxifen in female and male mice to evaluate its effect on parasitaemia, hypothermia, body mass variation and hemoglobin concentration, caused by infection with *Plasmodium berghei* ANKA. In addition, we evaluated the effects of tamoxifen on the splenic index and the number of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, B220⁺, MAC-3⁺, and CD16⁺/32⁺ lymphocytes in the spleen (the organ where the parasite is eliminated). Finally, we quantified the plasma concentration of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ , and TNF- α in male and female mice infected with this parasite.

Tamoxifen administration to females significantly increased ($p \leq 0.05$) parasitaemia and decreased the percentage of B220⁺ lymphocytes in both sexes in relation to their control group ($p \leq 0.05$). In addition, the number of CD8⁺ lymphocytes and the plasma concentration of IL-2, IL-6 and IL-17 decreased significantly ($p \leq 0.05$) in infected females. In contrast, tamoxifen increased the number of CD8⁺ lymphocytes, and the concentration of IFN- γ , TNF- α and IL-10 in infected males. These findings suggest that, although tamoxifen increased parasitaemia in both sexes, the mechanism is different in males and females, in females it could be due to a 5% decrease in cytotoxic lymphocytes and a decrease in the plasma concentration of IL-2 (from 16pg/ml to 8 pg/ml) and IL-6 (from 15pg/ml to 3 pg/ml), while in males it

increased the number of CD8⁺ T lymphocytes (approximately 5%) together with the increase in the Plasma concentration of IFN- γ (from 90 pg/ml to about 400 pg/ml), TNF- α (from 75 pg/ml to about 600 pg/ml), and IL-10 (from 25 pg/ml to about 500 pg/ml). /ml), so the immune response in malaria responds dimorphically to tamoxifen, which suggests that the participation of estrogens is fundamental in the elimination of the parasite in both sexes. This work allowed us to delve into the role of estrogens in the immune response in malaria. In addition, it provides information that helps to understand the role of estrogens in the dimorphic immune response in malaria. Finally, it provides information for the future development of more efficient and different therapeutic strategies for each sex.

3 INTRODUCCIÓN

El paludismo o malaria es la parasitosis que provoca la mayor mortalidad en el mundo; la Organización Mundial de la Salud reportó 421,000,000 de casos nuevos y 627,000 muertes únicamente en el año 2021 (1). África, Sudamérica y el Sureste de Asia, son las zonas más afectadas. La enfermedad se manifiesta con fiebre, anemia, disminución en el peso, esplenomegalia y hepatomegalia y en los casos más graves malaria cerebral (2, 3), realizar el seguimiento de los síntomas es importante ya que se relacionan directamente con la respuesta inmune. La hipotermia se asocia con el aumento en la concentración de TNF- α e IL-1 β (4); además, el TNF- α también produce pérdida de peso (5-7). Mientras que la anemia, es consecuencia de la destrucción de los eritrocitos por el *Plasmodium* y de la activación del sistema inmunológico que genera anticuerpos que reconocen antígenos del parásito sobre eritrocitos sanos y los elimina cuando se fija el complemento (8). Al incrementar la carga parasitaria las células de la respuesta inmune de bazo proliferan lo que promueve la inflamación y como consecuencia el aumento del tamaño del bazo (esplenomegalia); el cual se cuantifica mediante el índice esplénico, que relaciona el peso del bazo con el peso del ratón (9) En la malaria, las mujeres desarrollan síntomas menos graves y presentan menor mortalidad que los hombres, lo que sugiere diferencias en la respuesta inmune reguladas por los esteroides sexuales.

En nuestro grupo de investigación documentamos que disminuir la concentración de hormonas sexuales mediante gonadectomía en ratones hembra incrementa significativamente la parasitemia, el número de linfocitos T CD3⁺ y de linfocitos CD19⁺ en el bazo; además, aumenta la concentración de anticuerpos específicos contra *Plasmodium* de tipo IgG1 e IgG2b, lo que incrementa la concentración de anticuerpos IgG totales exclusivamente en las hembras. La gonadectomía también incrementa la concentración de TNF- α , IL-6 e IL-10 en el plasma. En contraste, en los machos la gonadectomía incrementó la parasitemia, aumentó el número de macrófagos y disminuyó el porcentaje de las células NK en el bazo sin afectar la síntesis de anticuerpos (10). En general, los efectos de la gonadectomía son más evidentes en las hembras, lo que sugiere que las hormonas sexuales que se

sintetizan en las gónadas en hembras, entre ellas los estrógenos favorecen la eliminación de *Plasmodium*. Para demostrar la participación de los estrógenos en la respuesta inmune frente al *Plasmodium* y para comprender su contribución en el dimorfismo sexual en malaria es necesario emplear una estrategia dirigida exclusivamente a los estrógenos, por lo anterior, en este trabajo se administró tamoxifeno, un reconocido bloqueador de los receptores de estrógenos (ER- α y ER- β), utilizado ampliamente en el tratamiento del cáncer de mama estrógeno dependiente (11). Al bloquear la interacción de los estrógenos con sus receptores se interfiere con su función. El tamoxifeno se administró a ratones CBA/Ca hembra y macho que se infectaron con *P. berghei* ANKA y se analizó el efecto sobre: la parasitemia, el cuadro clínico y la respuesta inmune. Para evaluar el cuadro clínico analizamos: la pérdida de peso, la disminución en la temperatura corporal y la concentración de hemoglobina (medida indirecta de la anemia); para evaluar la respuesta inmune cuantificamos: el índice esplénico que es una medida de la estimulación antigénica e inflamación en el bazo, determinamos las poblaciones celulares también en bazo: linfocitos T CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, linfocitos B 220⁺, macrófagos (Mac-3⁺) y células NK (CD16⁺/32⁺); finalmente, cuantificamos la concentración en plasma de las citocinas: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ y TNF- α .

4 ANTECEDENTES

4.1 Malaria

La malaria o paludismo es la parasitosis que ocasiona la mayor mortalidad en el mundo; de acuerdo con la OMS en 2020 se presentaron 421,000,000 casos y 627,000 decesos (1). El protozooario *Plasmodium* es el parásito que origina la enfermedad (1). A continuación, se representa el ciclo biológico simplificado de *Plasmodium* (Figura 1).

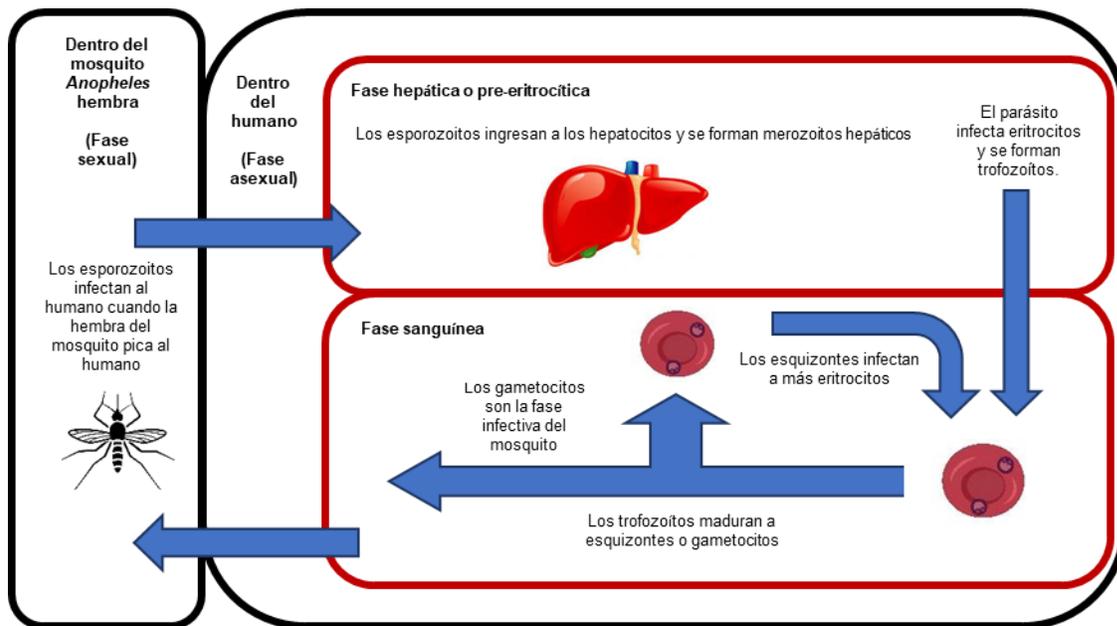


Figura 1. Ciclo biológico de *Plasmodium* sp. El ciclo comienza cuando el mosquito *Anopheles* hembra pica al humano, e incula esporozoitos de *Plasmodium*, que migran por el torrente sanguíneo hasta el hígado (fase hepática), infectan a los hepatocitos en donde se multiplican y se transforman en merozoitos que se liberan al torrente sanguíneo. Los merozoitos invaden a los eritrocitos (fase sanguínea o eritrocítica). Dentro de los eritrocitos el parásito madura y se multiplica asexualmente, rompe al eritrocito infectado y se libera a circulación, lo que facilita que se infecten otros eritrocitos. Algunos de esos merozoitos se transforman en trofozoitos y otros en gametocitos que es la forma infectiva para el mosquito, quien al alimentarse de sangre se infecta. En el estómago del mosquito se lleva a cabo la reproducción sexual, que resulta de la fusión de los gametocitos femenino y masculino lo que conduce a la formación del ooquineto y después a un ooquiste entre el epitelio y la lámina basal de mosquito, en donde se forman esporozoitos que migran a las glándulas salivales e inician el ciclo nuevamente. Modificado de Mokgethi Morule 2016 (12).

En este trabajo estudiamos la respuesta inmune durante la fase sanguínea del ciclo biológico, ya que es en esta fase donde se produce la esplenomegalia, la hipotermia, la pérdida de peso y la anemia debido a la activación del sistema inmune (13, 14), dado que los eritrocitos parasitados arriban al bazo, el principal sitio de eliminación de parásito (15). Por lo anterior, se realizó el seguimiento de la temperatura, el cambio en la masa corporal, la anemia y el índice esplénico, para conocer la gravedad de la enfermedad en los diferentes grupos experimentales. A continuación, se describe la respuesta inmune durante la fase sanguínea de *Plasmodium* para justificar los parámetros de nuestro interés durante la investigación.

4.2 Respuesta inmune en la fase sanguínea de la infección por *Plasmodium*

La fase sanguínea de *Plasmodium* induce los principales cambios en la respuesta inmune, principalmente en el bazo (16). Los macrófagos y las células dendríticas fagocitan a los eritrocitos parasitados, procesan sus antígenos y los presentan a los linfocitos T vírgenes en un contexto de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II y moléculas coestimuladoras (16). El reconocimiento de los antígenos del parásito presentado de esta forma activa a los linfocitos T. Este proceso induce la proliferación, diferenciación y activación de los linfocitos Th1, los cuales sintetizan IL-2, IFN- γ y TNF- α , citocinas que promueven la inflamación (17) y amplifican la respuesta inmune (18) y promueven la eliminación del parásito (19-21). En particular, la IL-2 es un factor de crecimiento y proliferación que induce la activación de los linfocitos Th2, los cuales una vez activados secretan IL-4 e IL-6, ambas citocinas son factores de diferenciación y proliferación de los linfocitos B que promueven su transformación a células plasmáticas productoras de anticuerpos. Los anticuerpos son importantes para controlar la parasitemia ya que promueven la fagocitosis (22), además de que al unirse al parásito evitan la invasión de nuevos eritrocitos (23, 24). En malaria la proliferación de los linfocitos T citotóxicos se asocia con el incremento de la respuesta inmune, estas células secretan IFN- γ que promueve la fagocitosis (25). Además, los linfocitos T citotóxicos también sintetizan

IL-12, que a su vez activa a las células NK, quienes como producto de ese reconocimiento sintetizan IFN- γ (26). Adicionalmente, los macrófagos liberan óxido nítrico (NO) (27) que promueve la liberación de IFN- γ por las células NK y T citotóxicas. Las concentraciones elevadas de IFN- γ y TNF- α inducen la secreción de IL-10 y del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) en los linfocitos T reguladores y en los linfocitos Th2, moléculas que regulan negativamente la inflamación (18). El IFN- γ y el TNF- α promueven la fagocitosis y favorecen la eliminación de eritrocitos parasitados, paradójicamente, estas mismas citocinas se asocian a anemia, pérdida de peso y fiebre (6, 17, 20, 28), por lo que realizar seguimiento de la concentración de estas citocinas aporta información para comprender la regulación de la respuesta inmune. Sin embargo, en esa regulación intervienen las hormonas sexuales ya que la enfermedad presenta un marcado dimorfismo sexual, el cual se describe a continuación.

4.3 Dimorfismo sexual en malaria

El dimorfismo sexual se define como la influencia que las hormonas sexuales ejercen sobre una característica en particular, lo que genera diferencias según el sexo (29). En este patrón dimórfico las hormonas sexuales, es probable que los estrógenos sean responsables de las principales diferencias fisiológicas entre los sexos; especialmente en la respuesta inmune, debido a que linfocitos T, linfocitos B, macrófagos y células NK poseen receptores de estrógenos alfa y beta (ER- α y ER- β). Como resultado de la interacción de los estrógenos con sus receptores se modula la expresión de diferentes genes involucrados en la inmunidad (30-33), esto podría explicar que en malaria las mujeres desarrollan menor mortalidad y gravedad en los síntomas que los hombres, es decir se presenta dimorfismo sexual (29).

En nuestro grupo de investigación se describió que las hormonas sexuales participan en la eliminación del parásito al regular tanto el número de células de la respuesta inmune, como la expresión de las citocinas; demostramos que disminuir la concentración de hormonas sexuales mediante gonadectomía (proceso que

elimina el principal sitio de síntesis de las hormonas sexuales) afecta principalmente a las hembras. Si bien, la parasitemia incrementa en ambos sexos; en las hembras, incrementa el porcentaje de linfocitos CD3⁺ y CD19⁺ al mismo tiempo que disminuye el número de células NK, la expresión relativa de IFN- γ y TNF- α (34). Además, la reconstitución de los ratones gonadectomizados con 17 β -estradiol disminuye la parasitemia de las hembras (35). Los hallazgos anteriores, en conjunto sugieren que el 17 β -estradiol participa de forma importante en el dimorfismo sexual en malaria. Sin embargo, la gonadectomía al disminuir la concentración de todas las hormonas sexuales, no permite conocer la contribución de cada esteroide al dimorfismo sexual, por lo que es importante evaluar los mecanismos precisos que expliquen la participación de los estrógenos en el dimorfismo sexual de la respuesta inmune en malaria.

4.4 Estrógenos

Los estrógenos son: el estriol, la estrona y el 17β -estradiol, el último es el de mayor actividad y mayor concentración (36). Los ovarios son la principal fuente de estrógenos y en menor cantidad el cerebro, tejido graso y las glándulas suprarrenales (37). A continuación, se esquematiza la síntesis de los estrógenos a partir del colesterol en los ovarios y en las células de Leydig (Figura 2).

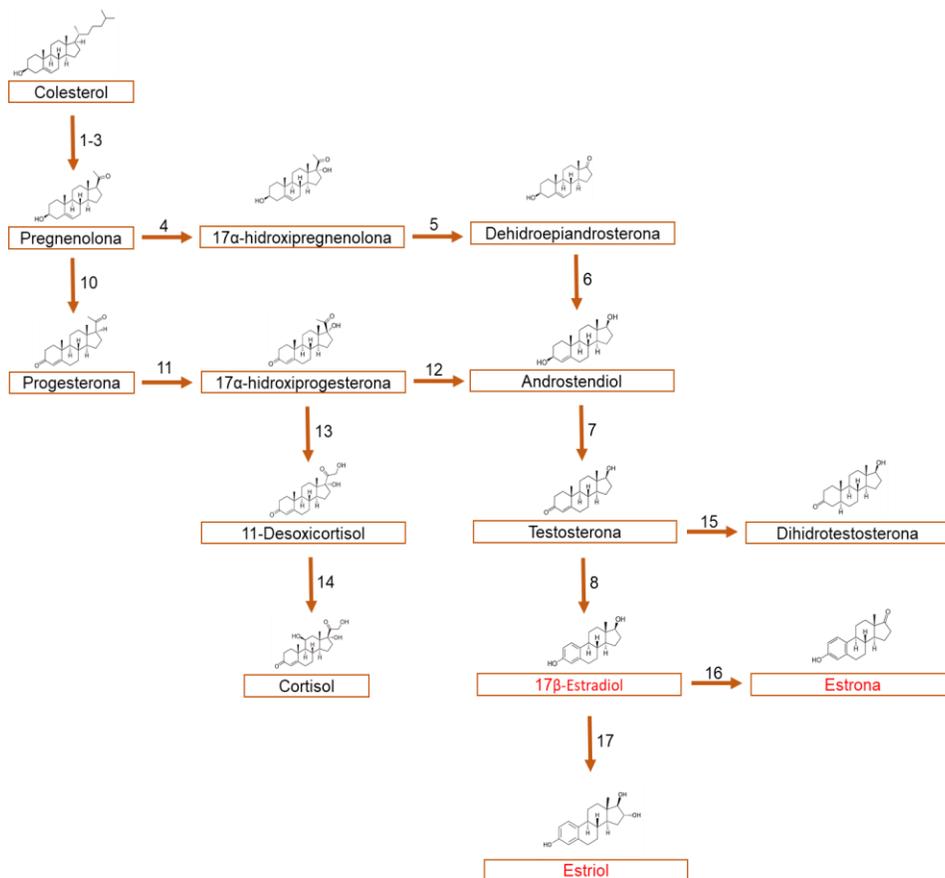


Figura 2. Representación esquemática de la síntesis de los estrógenos a partir del colesterol en las células granulosas de ovario. Los números representan las enzimas que participan en las síntesis de los esteroides: (1) 20-Hidroxilasa, (2) 22-Hidroxilasa, (3) 22-Desmolasa, (4) 17 α -Hidroxilasa, (5) Desmolasa, (6) 17 β -hidroxi esteroide hidrogenasa, (7) 3 β -hidroxi esteroide hidrogenasa, (8) Aromatasa, (9) 17 β -ol-deshidrogenasa, (10) 3 β -ol-deshidrogenasa, (11) 17 β -hidroxilasa, (12) Desmolasa, (13) 21-hidroxilasa, (14) 11 β -hidroxilasa, (15) 5 α -reductasa, (16) 17 β -dehidrogenasa y (17) 16 α -hidroxilasa. La síntesis esteroidea inicia con el colesterol, que se transforma en pregnenolona y posteriormente en progesterona o 17- α hidroxipregnenolona. En las mitocondrias, la 17- α hidroxipregnenolona se utiliza en la síntesis de dehidroepiandrosterona (DHEA) precursor de androstenediol, ambas moléculas se convertirán en testosterona y estradiol en las células granulosas y en las células de Leydig mediante la enzima aromatasa (38). Tomado y modificado de Cook 2015 (39).

Se ha demostrado que el sistema inmune y el sistema endócrino se relacionan a través de citocinas y hormonas ya que las células de la respuesta inmune poseen receptores para andrógenos (AR) y para estrógenos (ER- α , ER- β y ER acoplado a proteínas G de membrana), cuando interactúan con sus respectivos ligandos promueven la activación o diferenciación de los linfocitos T, B y de las células NK (30, 40-42); de tal forma que las hormonas sexuales regulan la supervivencia, la apoptosis y la proliferación de poblaciones celulares de la respuesta inmune ante un reto antigénico, así como promueven la síntesis de las citocinas antiinflamatorias y la síntesis de anticuerpos (43, 44). Es importante señalar que el efecto de las hormonas sexuales depende de la dosis y el resultado varía de acuerdo con la estirpe celular. Generalmente, los estrógenos regulan las vías de señalización NF- κ B, AKT, IP3, RAS y ERK (45, 46), vías que promueven la activación y proliferación de los linfocitos B y T (30, 42), también disminuyen la actividad de las células NK (47). La activación de NF- κ B se asocia con la síntesis de citocinas proinflamatorias (48). Además, existen receptores de estrógenos que se ubican en la membrana celular, acoplados a proteínas G (GPR30) que induce respuestas rápidas como la liberación de Ca^{2+} (49).

Parte fundamental de los efectos de los estrógenos son sus receptores, los cuales al activarse inducen la activación de los diferentes dominios (45). Es importante conocer la función de los dominios de los ER, ya que en este trabajo se emplea la estrategia de bloquear la interacción estrógenos-receptor con tamoxifeno, por lo que a continuación se describe brevemente la función de los dominios, la cual corresponde con su nombre: a) es el dominio de activación de la transcripción (A/B), es el primer dominio en responder a la unión con el ligando. b) es el dominio de unión al DNA (C), el cual favorece la interacción entre el DNA y los elementos de respuesta a estrógenos que estimulan la transcripción de los genes. c) es el dominio de unión al ligando (E), lugar en donde el ligando se une al receptor. d) Posible sitio de inhibición de la dimerización (F) (50). Aunque la función entre los ER alfa y beta es igual, el número de aminoácidos es diferente entre cada isoforma como se muestra a continuación (Figura 3A), además se muestra la activación de los ER

citoplasmáticos y su activación, así como los ER de membrana y las vías de señalización asociadas con la activación de los receptores (Figura 3B).

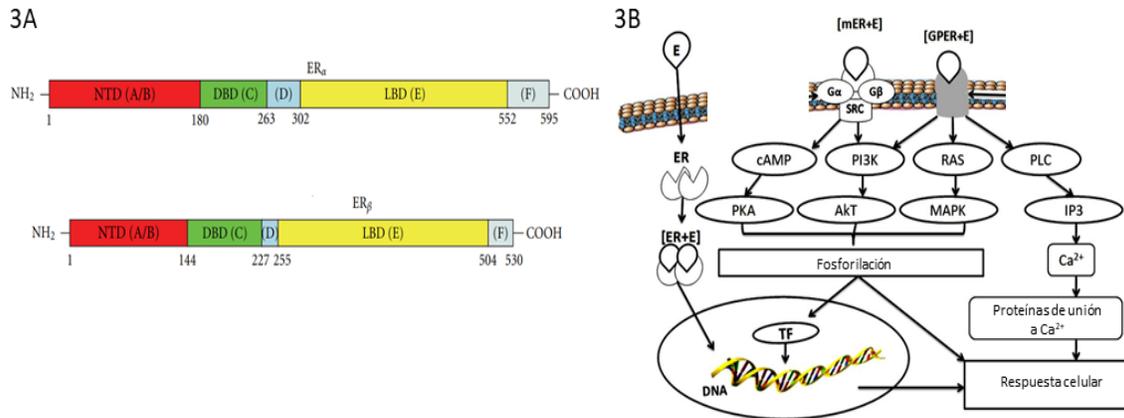


Figura 3A y 3B. Esquema de la estructura de los receptores de estrógenos y su activación. A: Representación de los dominios de los ER y la diferencia en el número de aminoácidos en la isoforma alfa y beta. Dominio A/B: activación de transcripción. C: dominio de unión al DNA. D: región bisagra. E: dominio de unión al ligando. F: posible lugar de inhibición de la dimerización. La diferencia entre el número de aminoácidos posiblemente afecta la actividad de las células diana. **B:** Esquema de activación de los ER, los estrógenos interactúan con los ER citoplasmáticos o de membrana. En ambos casos los estrógenos se unen al dominio E, lo que induce la dimerización y la activación de los dominios D y C, que muestran el dominio A/B para que pueda unirse al DNA y a los dominios de respuesta a hormonas en el caso de los receptores citoplasmáticos, o inducir la activación de segundos mensajeros como PI3K cAMP, RAS o PLC en el caso de los receptores de membrana, en ambos casos la señal transloca al núcleo y los factores de transcripción (TF) se activan o inhiben dependiendo de la célula blanco. Tomado y modificado de Barron 2001 (51) Kondakova 2020 (52) Kumar 2011 (53).

4.4.1 Estrógenos en la respuesta inmune

Los estrógenos modulan las funciones reproductivas (54) y las inmunes, incluidas la maduración de las células NK o linfocitos B y la expresión de diversos genes asociados con la respuesta inmune (55). Este último caso se da gracias a que los linfocitos T y B, los macrófagos y las células NK poseen receptores de estrógenos (30, 41, 56, 57). En malaria los estrógenos se asocian principalmente a una respuesta humoral (58), lo que promueve la eliminación de eritrocitos parasitados (24), no obstante, dado la gran diversidad de vías a las que los estrógenos se encuentran asociadas es probable que participen en más funciones de la respuesta inmune contra *Plasmodium*, por lo que requieren diferentes estrategias para evaluar su efecto, una de ellas es la gonadectomía que disminuye su concentración al eliminar el principal sitio de síntesis. La gonadectomía disminuye la concentración de INF- γ , IL-2, IL-4 e IL-6 en el bazo de ratones BALB/c (29), lo que sugiere que los estrógenos regulan la expresión de esas citocinas.

Otra estrategia es incrementar la concentración de los estrógenos, el 17 β -estradiol es el principal representante de los estrógenos, por lo que se emplea para incrementar la concentración de los estrógenos. El 17 β -estradiol a altas concentraciones (mayores de 5000 pg/mL) promueve la expresión de las citocinas IL-2 e INF- γ y disminuye la concentración de TNF- α , mientras que a dosis bajas tiene el efecto inverso (59).

Además, se evalúan los efectos del 17 β -estradiol *in vitro* en donde se demostró que el 17 β -estradiol disminuye la muerte por apoptosis inducida por TNF- α , a través de la activación de la proteína p-AKT (proteína cinasa B) en la ruta de señalización PI3K (60); asimismo, disminuye la muerte celular mediada por la señalización de la IL-1 β en células de rata (44). El 17 β -estradiol también estimula la proliferación y la diferenciación de las células dendríticas, a través de la activación de los factores de transcripción IRF 8 e IRF 1 (32). En contraste, se ha descrito que el tratamiento continuo con 17 β -estradiol disminuye la actividad de las células NK (61, 62).

En malaria, Benten y colaboradores demostraron que emplear tamoxifeno como bloqueador de los receptores de estrógenos disminuye la sobrevivencia de ratones

hembra (63, 64), pero en ese experimento no evaluaron otras variables de la respuesta inmune, por lo que no se analizaron las causas del porque el tamoxifeno incrementó la parasitemia.

En nuestro grupo de investigación, inicialmente empleamos la estrategia de gonadectomía en ratones infectados con *Plasmodium berghei* ANKA, con la cual se demostró que la disminución de hormonas sexuales sintetizadas en las gónadas incrementa la parasitemia y el índice esplénico; además, la gonadectomía moduló la respuesta inmune al incrementar el número de linfocitos T CD3⁺, CD8⁺, CD19⁺, y disminuir el número de células NK, mientras que disminuyó la expresión relativa de IFN- γ y TNF- α (10). Posteriormente, evaluamos el efecto de reconstituir a ratones hembra gonadectomizadas con 17 β -estradiol, detectamos que la parasitemia disminuyó significativamente el día 8 post-infección (65). En conjunto, estos trabajos sugieren que las hormonas sexuales que se sintetizan en las gónadas modulan la respuesta inmune en malaria; además, las hembras son más susceptibles a la gonadectomía que los machos, lo que nos llevó a direccionar la investigación al efecto de los estrógenos en malaria. Para ello, administramos tamoxifeno como lo realizó Benten, pero evaluamos diferentes parámetros de la respuesta inmune, así como su sintomatología para entender los mecanismos que expliquen la participación de los estrógenos en el dimorfismo sexual en malaria. A continuación, se describirán algunas características importantes del tamoxifeno.

4.5 El tamoxifeno

El tamoxifeno es un fármaco constituido por tres anillos aromáticos y dos cadenas laterales (Figura 4), estructura química similar a la de los estrógenos. El tamoxifeno se une a los ER en la región de unión al ligando e interfiere con la dimerización del receptor, por lo que es un modulador selectivo de los receptores de estrógenos (SERM's), a continuación se muestra la estructura del tamoxifeno y de los estrógenos (Figura 4) (66).

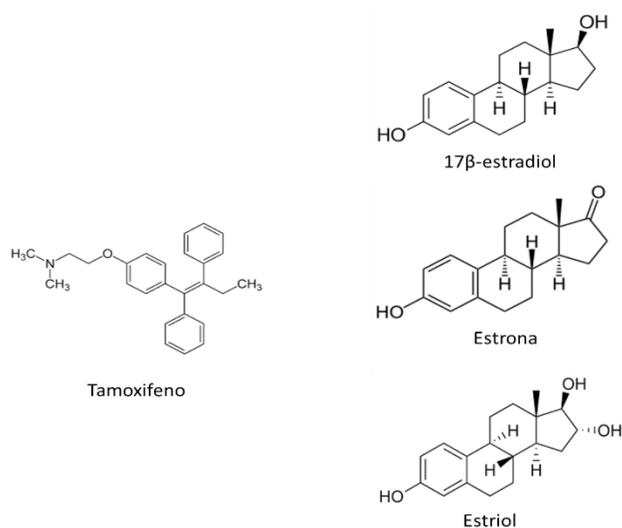


Figura 4 Comparación de las estructuras químicas del tamoxifeno, 17β-estradiol, estriol y estrona. El tamoxifeno es un modulador selectivo de estrógenos de naturaleza no esteroidea que imita la estructura de los estrógenos para unirse a lo ER y bloquear la unión de los estrógenos en los ER. Sin embargo, gracias a esta similitud en algunos casos actúa como agonista en células del útero (67). Tomado y modificado de Wiseman 1994 (68).

El tamoxifeno además de bloquear la interacción estrógenos-receptor, también reduce la síntesis del 17-β estradiol ya que disminuye la concentración sérica de la hormona luteinizante (LH) y de la prolactina, lo que señala para una menor producción de esta hormona en las células granulosas del ovario o en las células de Leydig en los testículos (69). Interesantemente, el tamoxifeno reduce la expresión de los receptores nucleares para estrógenos (70). Se metaboliza en el hígado por el sistema enzimático citocromo P450 (71). El tamoxifeno así como sus metabolitos se excretan principalmente por la orina (71). Además, sus principales

metabolitos: el 4-hidroxi tamoxifeno y el N-dimetil tamoxifeno también bloquean la interacción de los estrógenos con su receptor (71, 72), por lo que el tamoxifeno se utiliza como adyuvante en la terapia de cáncer de mama estrógeno dependiente (73, 74).

Desafortunadamente, el uso del tamoxifeno puede generar efectos adversos. El endoxifeno induce hemólisis de los eritrocitos humanos, la unión del 4-hidroxi tamoxifeno a las proteínas de membrana de los glóbulos rojos favorece la permeabilidad de la membrana y su lisis (75).

Debido a que los estrógenos modulan la actividad de las células del sistema inmune, el tamoxifeno se usó para estudiar su efecto en las parasitosis provocadas por *Leishmania*, *Tripanosoma* y *Taenia crassiceps* (70, 76-79). Adicionar tamoxifeno a cultivos *in vitro* disminuye el número de tripanosomas viables, vía la inducción de apoptosis (80). En las infecciones provocadas por *Leishmania amazonensis*, administrar tamoxifeno inhibe la síntesis de lípidos importantes para el parásito por lo que muere (81). Además, induce la apoptosis de *Leishmania major in vitro* (82). También se demostró que tiene efecto sobre la leishmaniasis cutánea (83-85). Adicionalmente, el tamoxifeno posee actividad cisticida contra *Taenia*, disminuye su motilidad y reproducción (86, 87). En malaria administrar tamoxifeno a ratones hembra C57Bl/10 infectados con *P. chabaudi* les incrementa la mortalidad (88). Por el contrario, la adición de tamoxifeno a la concentración de 10 μ M inhibe el crecimiento intracelular de *P. berghei* ANKA en la línea celular hepática Huh-17 (89).

En conjunto, estas características y el estudio previo realizado por Benten (63) justifican que el tamoxifeno sea el fármaco a emplear en este trabajo de investigación. Así profundizaremos sobre el efecto de los estrógenos en malaria y sobre su impacto en el dimorfismo sexual.

5 PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

La malaria es la parasitosis que ocasiona la mayor mortalidad en el mundo. La enfermedad presenta dimorfismo sexual ya que las mujeres desarrollan menor gravedad en los síntomas y mortalidad que los hombres, lo que sugiere la participación protectora de los estrógenos en este fenómeno. En estudios previos se demostró que la gonadectomía, incrementa la parasitemia, mientras que, reconstituir a las hembras gonadectomizadas con 17β -estradiol disminuye la parasitemia, lo que sugiere que los estrógenos promueven la eliminación del parásito. Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos involucrados en la activación de la respuesta inmune para eliminar al *Plasmodium* mediados por los estrógenos; además, aún no se conoce si los mecanismos mediante los cuales los estrógenos contribuyen a la eliminación del parásito difieren entre los machos y las hembras. Con el fin de profundizar sobre la regulación de los estrógenos en la respuesta inmune y su participación en el dimorfismo sexual en malaria, en este trabajo se interfirió la interacción de los estrógenos con sus receptores *in vivo* mediante el uso del tamoxifeno y se analizaron los efectos sobre la parasitemia, el cuadro clínico y la respuesta inmune de ratones hembra y macho CBA/Ca infectados con *Plasmodium berghei* ANKA.

6 HIPÓTESIS

Administrar tamoxifeno evitará la interacción entre los estrógenos y los ER en las células de la respuesta inmune por lo que disminuirá el número de linfocitos T (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺), linfocitos B (B220⁺), macrófagos (Mac-3⁺) y células NK (CD16⁺/32⁺) en el bazo y como consecuencia disminuirá la concentración plasmática de las citocinas: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ y TNF- α , lo que disminuirá la eliminación de los eritrocitos parasitados y como resultado incrementará la parasitemia y la sintomatología será más grave en los ratones infectados con *P. berghei* ANKA. Todos estos efectos se presentarán en ambos sexos.

7 OBJETIVOS

7.1 Objetivo principal.

Evaluar los efectos del tamoxifeno al evitar la interacción entre los estrógenos y los receptores sobre la parasitemia, el cuadro clínico, y la respuesta inmune en ratones hembra y macho infectados con *Plasmodium berghei* ANKA.

7.2 Objetivos específicos:

- a) Estudiar el efecto del tamoxifeno sobre la parasitemia, la temperatura, la masa corporal y la anemia (concentración de hemoglobina) de ratones CBA/Ca macho y hembra infectados con *P. berghei* ANKA.
- b) Determinar el efecto del tamoxifeno sobre las poblaciones celulares CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, B220⁺, CD16⁺/32⁺ y MAC-3⁺ y sobre las citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ y TNF- α de ratones CBA/Ca hembra y macho infectados con *P. berghei* ANKA.

8 DISEÑO EXPERIMENTAL

8.1 Población de estudio

Ratones CBA/Ca hembra y macho de 12 semanas de edad infectados con *Plasmodium berghei* ANKA (este modelo reproduce la infección causada por *P. falciparum* en humanos) (90). Las unidades reproductoras fueron una donación del Dr. William Jarra (National Institute for Medical Research, Londres Inglaterra). Los ratones se reprodujeron y mantuvieron en condiciones libres de patógenos específicos en el Bioterio de la FES Zaragoza-UNAM, con apego a la norma mexicana NOM-062-ZOO-1999 para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, certificado número 28/04/SO/3.4.1 para el uso y cuidado de animales aprobado por el Comité de Investigación.

La infección de los ratones se realizó vía sanguínea a una concentración de 1×10^3 eritrocitos parasitados 28 días después de iniciar el tratamiento con tamoxifeno o con vehículo o el tiempo equivalente en los ratones sin infección.

8.2 Diseño estadístico y experimental

Un lote de 30 ratones CBA/Ca hembra y 30 ratones macho de la cepa CBA/Ca, se dividieron en 3 grupos, de 10 ratones cada uno; el primer grupo se dejó sin tratamiento, el segundo recibió vehículo (etanol en solución salina estéril 1:20) y el tercer grupo se trató con tamoxifeno (1 mg/Kg de peso). Los grupos se infectaron con *P. berghei* ANKA y se sacrificaron en los días 0, 4 y 8 postinfección. Adicionalmente, se utilizó un grupo sin tratamiento y sin infección, un grupo tratado con vehículo sin infección y un grupo tratado con tamoxifeno sin infección como grupos control.

El diseño estadístico se realizó de acuerdo con la independencia de los datos; se consideró si los datos obtenidos provienen del mismo ratón en diferentes tiempos (datos dependientes) o si los datos provienen de diferentes ratones en un solo punto en el tiempo (datos independientes). Por lo anterior, la parasitemia, la temperatura, la variación de masa corporal y la concentración de hemoglobina se analizaron

mediante análisis de medias repetidas con una prueba *post-hoc* de Bonferroni y significancia de $p \leq 0.05$. Se consideró la diferencia entre el grupo tratado con tamoxifeno y los grupos control en cada día. Las variables: índice esplénico, poblaciones celulares de bazo (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, B220⁺, MAC-3⁺ y CD16⁺/32⁺) y la concentración plasmática de las citocinas: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α e IFN- γ , se analizaron mediante el efecto anidado con una prueba *post-hoc* de Bonferroni y significancia de $p \leq 0.05$. La prueba estadística de medias repetidas se realizó con el software Graph Pad Prism 7 (Graph Pad Software incorporated, Silicon Valley, CA, USA). El análisis de efecto anidado se realizó en el software Statgraphics Centurion XVI.

9 MATERIALES Y MÉTODOS

9.1 Administración de tamoxifeno.

Dado el rápido metabolismo del fármaco en ratones hembra (91) se administró el tamoxifeno (Sigma-Aldrich Darmstadt, Germany) diariamente vía subcutánea durante 28 previos a la infección y durante 8 días postinfección días para mantener la mayor concentración de tamoxifeno circulante en sangre (91). El tamoxifeno se administró a una concentración de 1 mg/Kg de peso disuelto en etanol al 1% en solución salina estéril (vehículo).(79).

9.2 Determinación de la parasitemia.

Una gota de sangre de la cola se extendió sobre un portaobjetos, se dejó secar al aire y se fijó con metanol absoluto, se tiñó con colorante Giemsa (Sigma Aldrich, US) diluido 1:10 en amortiguador de fosfatos. La parasitemia se evaluó mediante microscopía óptica a un aumento de 100X. Cuando el número de eritrocitos parasitados fue menor a 2 por campo se analizaron 50 campos; si la parasitemia excedía a 2 eritrocitos por campo, se contaron los eritrocitos parasitados en un total de 200 eritrocitos y la parasitemia se representó como el porcentaje de eritrocitos parasitados.

9.3 Cuantificación del índice esplénico. En los días 0, 4 y 8 post infección, los ratones se pesaron, se sacrificaron, se extrajo el bazo y se pesó en una balanza analítica, el índice esplénico se calculó como el cociente del peso del bazo entre el peso del ratón.

9.4 Medición de la temperatura corporal. Diariamente y a la misma hora, se midió la temperatura de todos los ratones. Se utilizó un termómetro infrarrojo (Thermofocus, 01500A/H1N1, Vedano Olana-Varese, Italy). El termómetro se calibró y se apuntó el rayo infrarrojo a 5 cm del abdomen del ratón.

9.5 Determinación de la masa corporal.

Los ratones se pesaron diariamente a la misma hora en una balanza semianalítica (OHAUS, New Jersey EUA), se consideró el peso registrado el día de la infección como el 100%. Diariamente, se calculó el porcentaje de variación del peso con base en el 100% para cada ratón y se restó del 100% inicial, lo que representa la variación de peso corporal en porcentaje.

9.6 Cuantificación de la concentración de hemoglobina.

Diariamente, a todos los ratones se les extrajeron 2 μ L de sangre y se mezclaron con 498 μ L de reactivo de Drabkin, se mezcló e incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se determinó la absorbancia a 540 nm. Para calcular la concentración de Hb se utilizó una curva estándar de hemoglobina (Sigma Aldrich).

9.7 Cuantificación de las poblaciones celulares de bazo.

Se utilizó el método previamente descrito (92). Brevemente, los ratones se sacrificaron en el día 8 postinfección, se les extrajo el bazo, el tejido se hizo pasar a través de una malla de Nylon estéril, las células se lavaron con 5 mL de PBS frío, se centrifugaron a 2500 rpm/5 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 2 mL de PBS frío. Se tomó una alícuota de 100 μ L y se transfirió a un tubo nuevo, se agregaron 100 μ L de solución de lisis (FACS BD) y se incubó durante 15 minutos en baño de hielo protegido de la luz. Se centrifugaron las muestras a 2500 rpm durante 5 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 165 μ L de PBS/albúmina 1%/azida de sodio 0.1%. Se tomaron 3 alícuotas de 50 μ L y se tiñeron con 50 μ L de una mezcla precalibrada de anticuerpos comerciales acoplados a fluorocromos, los cuales se prepararon en 3 mezclas: mezcla 1: CD3⁺FITC (1:250), CD4⁺APC (1:1000), CD8⁺PE (1:600), mezcla 2: CD19⁺APC (1:1600), MAC-3⁺PE (1:250) y mezcla 3: CD16⁺/32⁺PE (1:800) (Biolegend). Se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz. Se centrifugaron a 2500 rpm/5 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el

botón se resuspendió con 200 μL de solución de FACS. Las muestras se transfirieron a tubos de citometría y se analizaron en el citómetro FACS ARIA II (Beckton & Dickinson).

9.8 Cuantificación de las citocinas Th1/Th2/Th17

Los ratones se sacrificaron en el día 8 postinfección, se les extrajo la sangre, se separó el plasma y se almacenó a -20°C , para la cuantificación de las citocinas mediante el método comercial de CBA Bead Array Kit Th1/Th2/Th17 (Beckton & Dickinson, San Diego US). Brevemente, se utilizaron 25 μL de plasma, se adicionaron 25 μL de la mezcla de perlas y 25 μL del reactivo de detección, se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente en obscuridad. Se centrifugó a 1300 rpm/5 minutos y se eliminó el sobrenadante, las perlas se resuspendieron en 100 μL de líquido de FACS (marca BD para citometría de flujo). La concentración de cada citocina se determinó mediante una curva estándar comercial.

10 RESULTADOS EN LAS HEMBRAS

10.1 El tamoxifeno incrementó la parasitemia y el índice esplénico en las hembras infectadas.

La parasitemia mide el porcentaje de eritrocitos parasitados en sangre; en general, a mayor parasitemia mayor gravedad de los síntomas, por lo que evaluar la parasitemia permite conocer indirectamente si los estrógenos modifican la sintomatología de los ratones infectados con *P. berghei* ANKA. En la primera parte del proyecto se trabajó únicamente con ratones hembra.

El grupo que recibió tamoxifeno incrementó significativamente la parasitemia en el día 8 post-infección en comparación con los grupos control tratados con vehículo o no tratados (Figura 5A).

Se ha descrito que el bazo es el principal sitio de eliminación del parásito, en ese órgano se activan y proliferan las células de la respuesta inmune, lo que genera inflamación; ese proceso se evaluó con el índice esplénico (10). El índice esplénico se determinó en los días 0, 4 y 8 post infección. La infección incrementó significativamente el índice esplénico de las hembras en el día 8 post-infección en comparación con el día 4 post-infección (Figura 5B); por otro lado, el tamoxifeno aumentó significativamente el índice esplénico en comparación con los no tratados o administrados con vehículo en el mismo día o con relación al día 4 post-infección (Figura 5B).

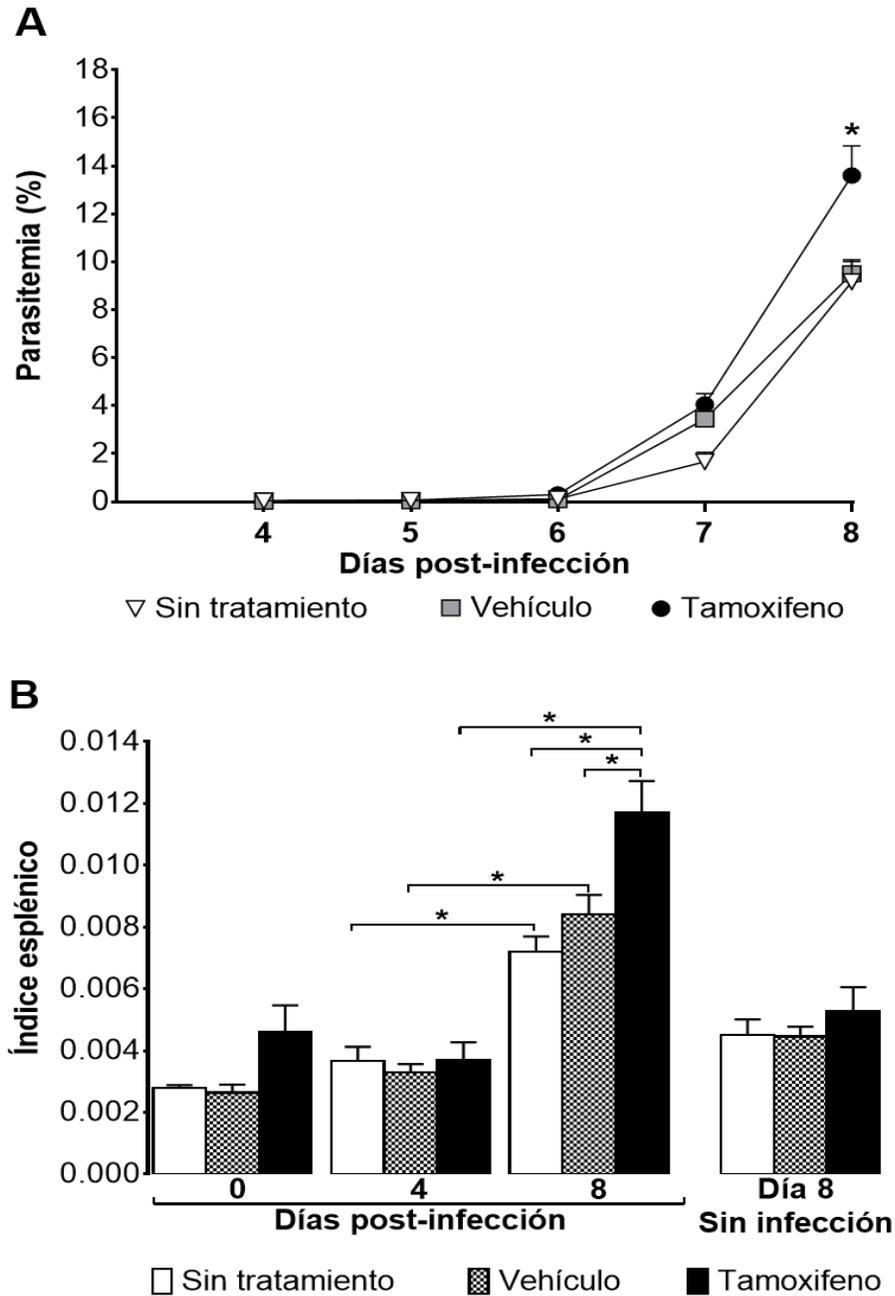


Figura 5. El tamoxifeno incrementó la parasitemia y el índice esplénico en las hembras infectadas con *P. berghei* ANKA. Tres grupos de ratones hembra CBA/Ca se trataron con tamoxifeno, vehículo o se dejaron sin tratamiento (como controles). Los ratones se infectaron con *P. berghei* ANKA y se sacrificaron en los días 0, 4 y 8 post-infección. En **(A)** se representa el porcentaje de parasitemia. Cada punto representa la media geométrica \pm el error estándar medio de cada grupo ($n=10$). **(B) Grupos de 10 ratones** se sacrificaron en los días 0, 4 y 8 post-infección se les extrajo el bazo y se calculó el índice esplénico, la gráfica representa la media \pm el error estándar medio de cada grupo ($n=10$). Adicionalmente, se presentan los resultados de 3 grupos control de ratones tratados de la misma forma sin infección ($n=10$). Los asteriscos representan la diferencia significativa entre los grupos ($p<0.05$). Se realizó el análisis de mediciones repetidas para la parasitemia y análisis en nido para el índice esplénico, ambos con un análisis post-hoc de Bonferroni.

10.2 El tamoxifeno disminuyó la temperatura, la masa corporal y la concentración de hemoglobina en las hembras

Dado que la temperatura corporal, la masa corporal y la concentración de hemoglobina se modifican con la enfermedad, cuantificar esas variables permite conocer los efectos del tamoxifeno sobre la hipotermia, caquexia y anemia asociadas con la gravedad de la malaria (2, 8, 90), analizamos estas variables en las hembras infectadas con *P. berghei* ANKA.

El tamoxifeno no modificó la temperatura de los ratones sin infección (Figura 6A), pero disminuyó significativamente la temperatura de los ratones infectados los días 1, 5 y 8 en comparación con los ratones infectados sin tratamiento (Figura 6B). Adicionalmente, el tamoxifeno disminuyó significativamente la masa corporal en los ratones sin infección los días 1 al 5 en comparación con los ratones sin tratamiento (Figura 6C) y disminuyó la masa corporal los días 2 al 7 en los ratones infectados, en comparación con los grupos control (Figura 6D),

Finalmente, el tamoxifeno disminuyó la concentración de hemoglobina los días 2 al 6 en ratones sin infección en comparación con los ratones tratados con vehículo y con los ratones sin tratamiento (Figura 6E). Además, el tamoxifeno disminuyó la concentración de hemoglobina los días 4, 5, 7 y 8 post-infección en comparación con ambos grupos control (Figura 6F).

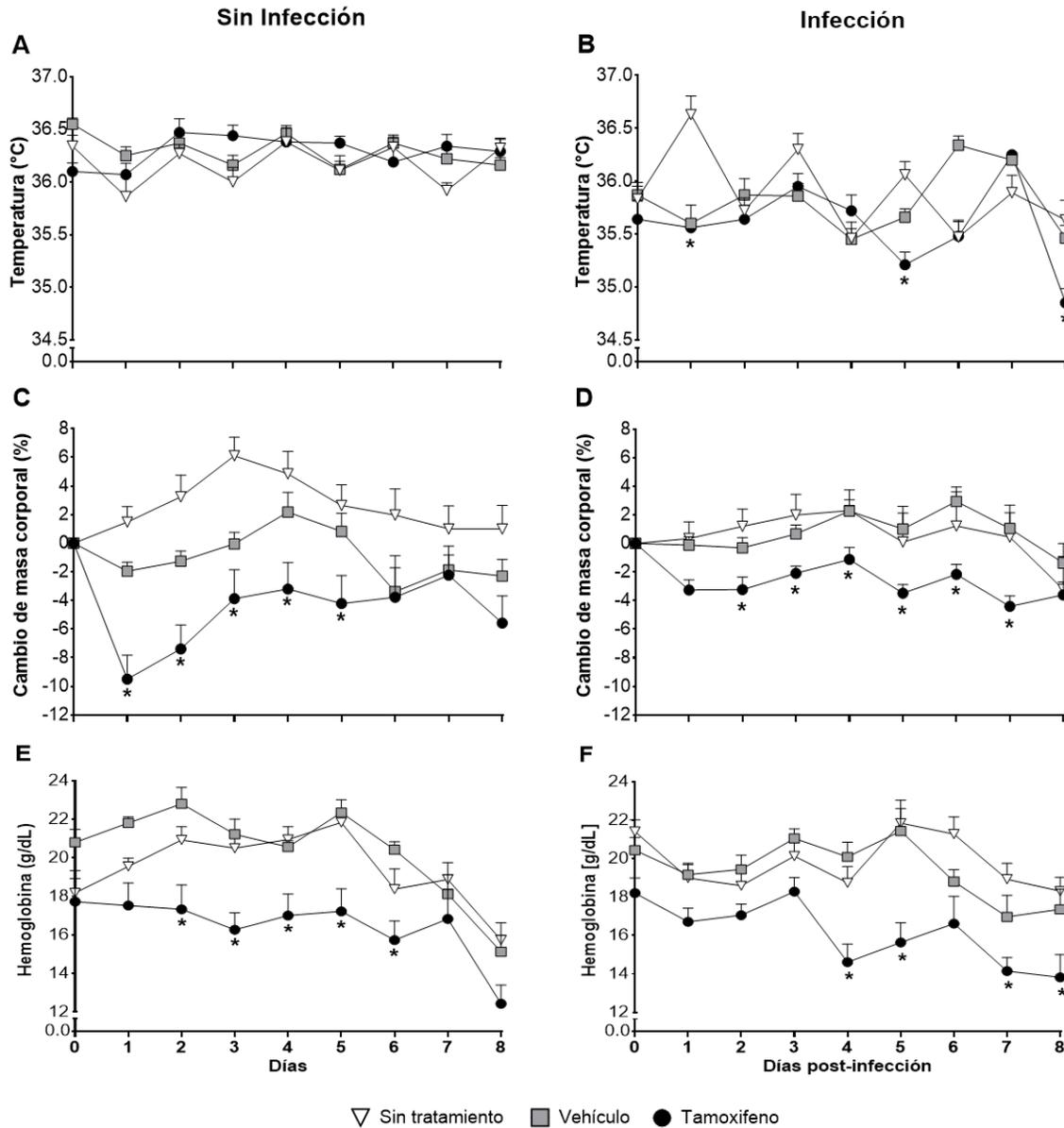


Figura 6. El tamoxifeno disminuyó la temperatura, la masa corporal y la concentración de hemoglobina de las hembras infectadas con *P. berghei* ANKA. Tres grupos de ratones hembra CBA/Ca se trataron con: tamoxifeno, o vehículo (28 días previos a la infección y durante la infección); o sin tratamiento. Los ratones se infectaron con *P. berghei* ANKA y se sacrificaron en los días 0, 4 y 8 post-infección. Adicionalmente, se estudiaron 3 grupos control de ratones tratados de la misma forma sin infección. En todos los grupos diariamente se evaluó la temperatura (A y B), el peso corporal (C y D) y la concentración de hemoglobina (E y F), cada punto representa la media \pm el error estándar medio de cada grupo en los días indicados respectivamente (n=10). Los asteriscos representan la diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$). Se realizó el análisis de mediciones repetidas con un análisis post-hoc de Bonferroni, para cada variable.

10.3 El tamoxifeno disminuyó las poblaciones celulares CD8⁺ y B220⁺, pero incrementó el número de células NK en las hembras, independiente de la infección

En el bazo las células de la respuesta inmune que incluyen a los: linfocitos T cooperadores Th1 y Th2 (CD3⁺, CD4⁺), linfocitos T citotóxicos (CD3⁺, CD8⁺), linfocitos B (CD19⁺), macrófagos (MAC-3⁺) y a las células NK (CD16⁺/CD32⁺) (54, 93) colaboran para la eliminación del *Plasmodium*. Para analizar los efectos del tamoxifeno sobre estas poblaciones celulares en diferentes tiempos durante la infección con *P. berghei* ANKA, se cuantificaron en los días 0, 4 y 8 post-infección ya que representan el inicio, la mitad y el día del sacrificio.

El tamoxifeno disminuyó el porcentaje de las poblaciones CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ y B220⁺ en el día 0 post infección en comparación con los grupos control tratados con vehículo o no tratados (Figura 7A-7D). En contraste, el tamoxifeno incrementó el número de células NK en el día 0 de la infección, en comparación con los grupos control (Figura 7F). El tamoxifeno no modificó el número de macrófagos en bazo (Figura 7E).

En el día 8 post-infección el tamoxifeno disminuyó el porcentaje de linfocitos CD8⁺ y de linfocitos B220⁺ en comparación con los ratones sin tratamiento (Figura 7C y 7D). Además, el tamoxifeno incrementó el número de células CD16⁺/32⁺ independiente a la infección (Figura 7F).

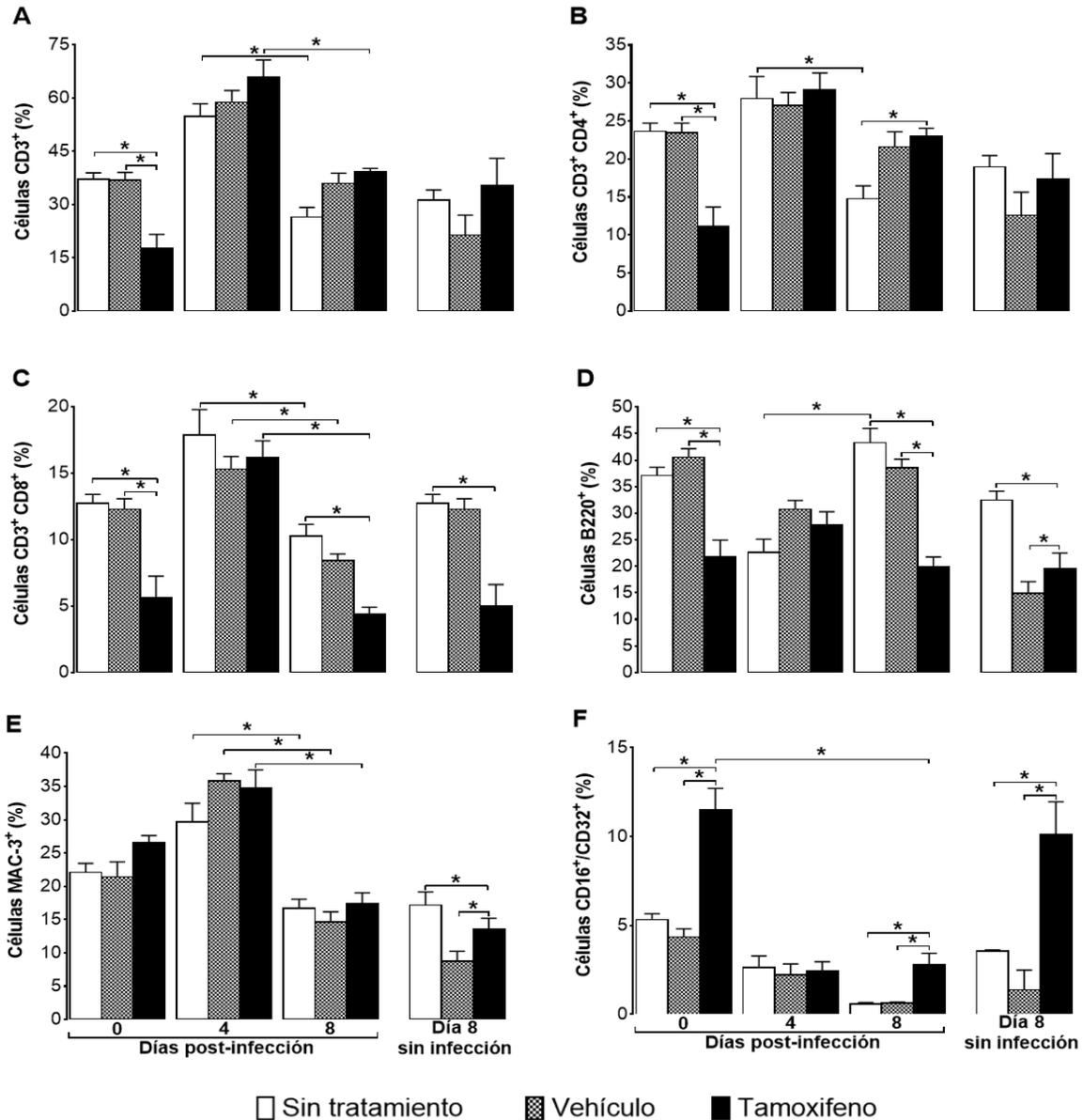


Figura 7. El tamoxifeno disminuyó el porcentaje de linfocitos CD8⁺ y B220⁺ en hembras infectadas con *P. berghei* ANKA e incrementó el número de células NK independiente de la infección. Grupos de ratones hembra CBA/Ca se trataron con tamoxifeno, se utilizaron dos grupos control uno tratado con vehículo y uno sin tratamiento. Los ratones se infectaron con *P. berghei* ANKA y se sacrificaron en los días 0, 4 y 8 post-infección. Además, se utilizaron 3 grupos control de ratones tratados de la misma forma sin infección y se sacrificaron en el día 8 post infección. A cada ratón se les extrajo el bazo y se cuantificó el porcentaje de las células de la respuesta inmune mediante citometría de flujo. En (A) se representa el porcentaje de linfocitos CD3⁺, en (B) el de los linfocitos CD3⁺CD4⁺, En (C) los linfocitos CD3⁺CD8⁺, en (D) los linfocitos B220⁺, en (E) los macrófagos MAC-3⁺ y en (F) las células NK CD16⁺/CD32⁺. Las barras representan la media \pm el error estándar medio de cada grupo (n=10). Los asteriscos representan la diferencia estadísticamente significativa entre los grupos (p<0.05). Se realizó el análisis en nido con un análisis post-hoc de Bonferroni.

10.4 El tamoxifeno disminuyó la concentración sérica de IL-2, IL-6 e IL-17 en las hembras infectadas.

Dado que las citocinas participan en la activación de las células de la respuesta inmune, la inflamación y la sintomatología, se consideró importante evaluar la concentración de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, INF- γ y TNF- α en los días 0, 4 y 8 post infección.

La infección incrementó la concentración de IL-2, IL-4, IL-6, IL-17, TNF- α e IL-10 en el día 4 post-infección en comparación con el día 0 (Figura 8A, 8B, 8C, 8D, 8E y 8F).

El tratamiento con tamoxifeno no modificó la concentración de IL-2, IL-4, IL-17, IL-10 y TNF- α en los ratones al día 0 y 8 sin infección (Figura 8A, 8B, 8D, 8E y 8F). Sin embargo, el tamoxifeno incrementó la concentración de IL-6 e IFN- γ en los ratones sin infección en comparación con el grupo control sin tratamiento (Figura 8C y 8G).

En los ratones infectados, el tamoxifeno disminuyó la concentración IL-2, IL-6 e IL-17 en comparación con el grupo control sin tratamiento en el día 8 post-infección (Figura 8A, 8C y 8E).

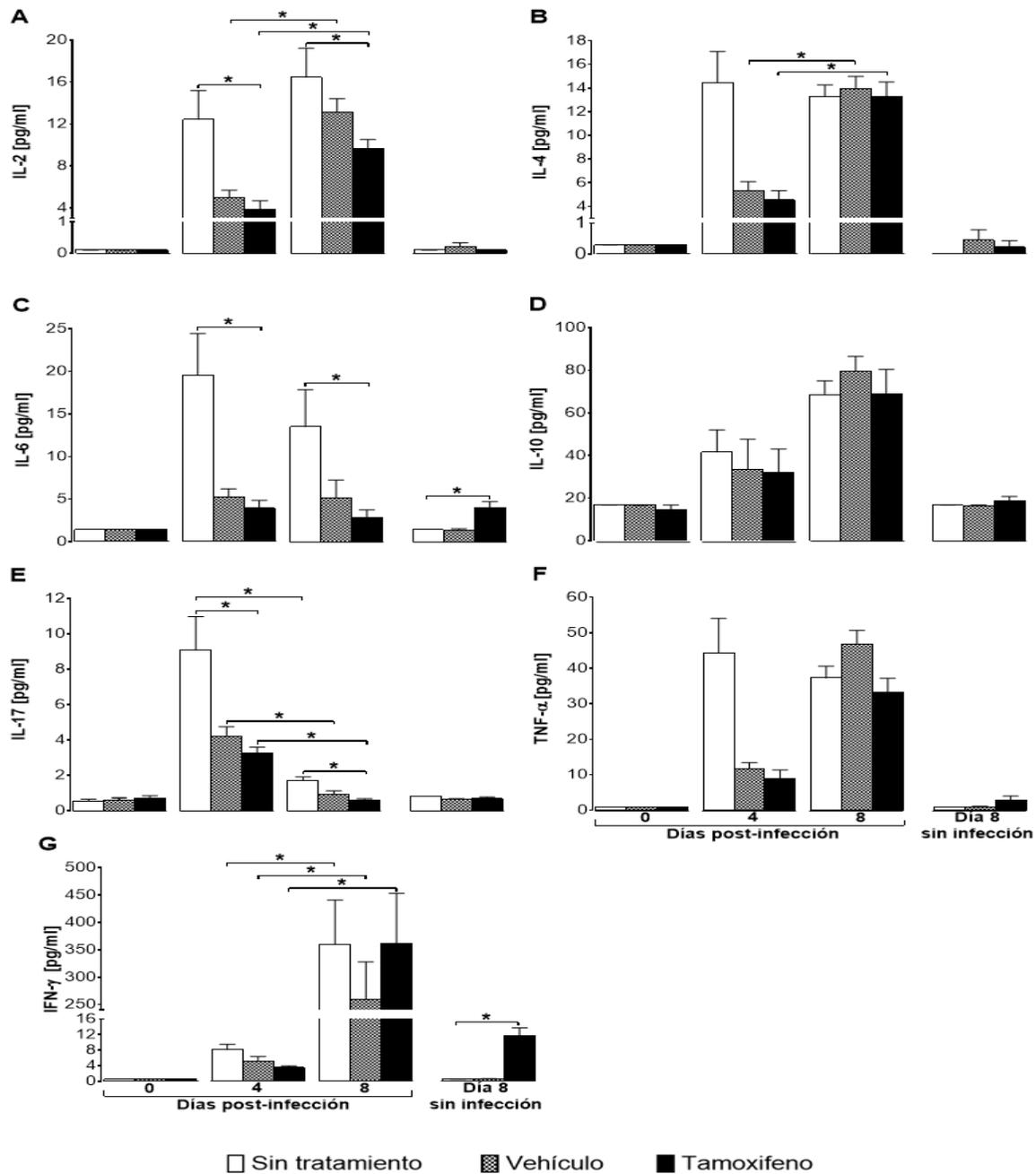


Figura 8. El tamoxifeno disminuyó la concentración plasmática de IL-2, IL-6 e IL-17 en hembras infectadas con *P. berghei* ANKA. Grupos de ratones hembra CBA/Ca se trataron con tamoxifeno, vehículo, además, de un grupo control sin tratamiento. Los ratones se infectaron con *P. berghei* ANKA y se sacrificaron a en los días 0, 4 y 8 post-infección, adicionalmente, se trabajaron 3 grupos control de ratones tratados de la misma forma sin infección y se sacrificaron en el día 8 post infección. A cada ratón se les extrajo sangre y se separó el suero para cuantificar (A) IL-2, (B) IL-4, (C) IL-6, (D) IL-10, (E) IL-17, (F), TNF- α y (G) IFN- γ por citometría de flujo. Las columnas representan la media \pm el error estándar medio de cada grupo (n=10). Los asteriscos representan la diferencia significativa entre los grupos ($p \leq 0.05$). Se realizó el análisis en nido con una prueba post-hoc de Bonferroni.

11. RESULTADOS EN LOS MACHOS

11.1 El tamoxifeno incrementó la parasitemia en los machos infectados.

Dado que los ratones macho también poseen receptores para estrógenos, en la segunda parte del presente proyecto se estudió el efecto del tamoxifeno en la parasitemia, temperatura y peso corporales, así como en la respuesta inmune en los ratones macho. El comparar los resultados de las hembras con los de los machos, permite conocer la contribución de los estrógenos al dimorfismo sexual que se presenta en la respuesta inmune en malaria. Es importante indicar que como en los ratones hembra no se detectó efecto del tamoxifeno en el día 4 post-infección, se decidió realizar el experimento únicamente en los días 0 y 8 post infección.

El tamoxifeno incrementó la parasitemia el día 8 post-infección en comparación con los grupos control sin tratamiento y el tratado con vehículo (Figura 9A). Sin embargo, el tamoxifeno no modificó el índice esplénico (Figura 9B).

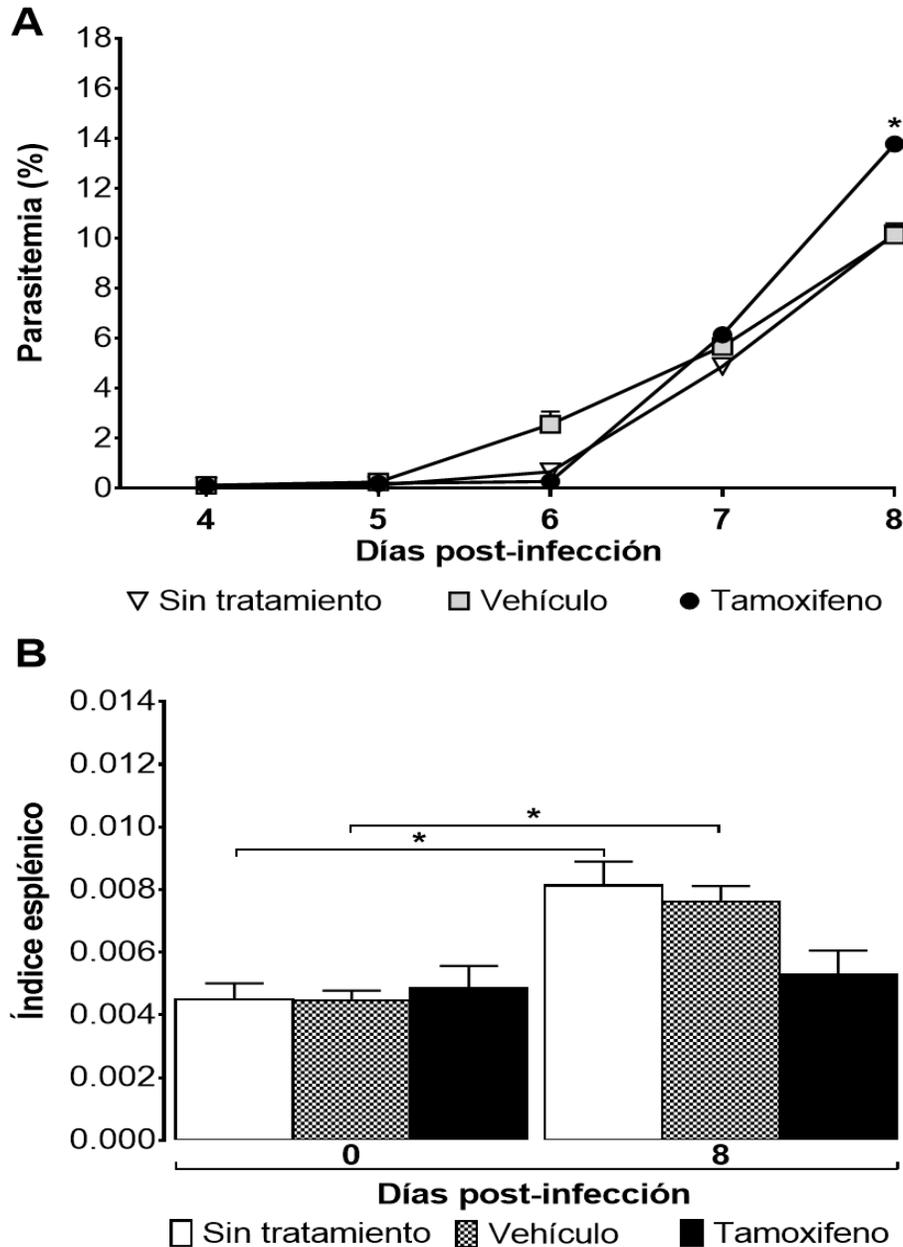
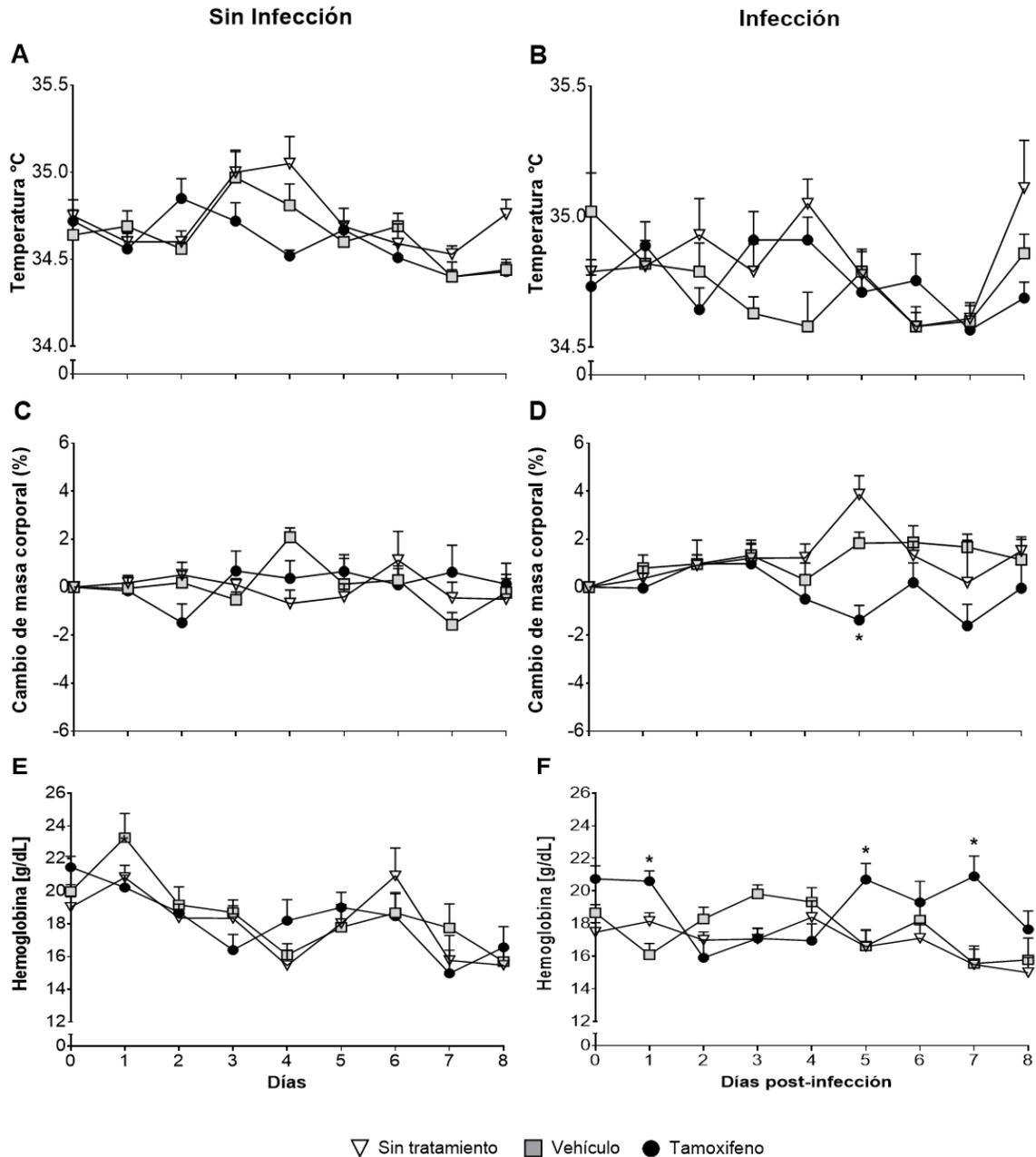


Figura 9. El tamoxifeno incrementó la parasitemia en los machos infectados con *P. berghei* ANKA. Tres grupos de ratones macho CBA/Ca se trataron con tamoxifeno. Se utilizaron dos grupos control (uno sin tratar y el otro administrado con el vehículo). La mitad de los ratones en cada grupo se infectaron con *P. berghei* ANKA y se sacrificaron en el día 8 post-infección. La parasitemia se evaluó diariamente, cada punto representa la media geométrica \pm el error estándar medio de cada grupo (n=10) (A). Los ratones se sacrificaron en el día 8 post-infección, se les extrajo el bazo y se calculó el índice esplénico, la gráfica representa la media \pm el error estándar medio de cada grupo (n=10) (B). Los asteriscos representan la diferencia significativa entre los grupos ($p \leq 0.05$). Para evaluar las diferencias estadísticas en la parasitemia se realizó el análisis de mediciones repetidas y análisis en nido para el índice esplénico, ambos con una prueba post-hoc de Bonferroni.

11.2 El tamoxifeno disminuyó la masa corporal e incrementó la concentración de hemoglobina en los ratones macho infectados.

El tamoxifeno no modificó la temperatura, la masa corporal o la concentración de hemoglobina en los ratones sin infección (Figura 10A, 10C y 10E). Sin embargo, en los ratones infectados, el tamoxifeno disminuyó la masa corporal el día 5 post-infección en comparación con los ratones sin tratamiento o los tratados con vehículo, pero se recuperó al día siguiente (Figura 10D). Además, el tamoxifeno incrementó la concentración de hemoglobina en los días 1, 5 y 7 post-infección en comparación con los ratones sin tratamiento (Figura 10F).



11.3 El tamoxifeno incrementó el número de linfocitos CD8⁺, pero disminuyó el porcentaje de linfocitos B220⁺, en los machos infectados.

El tamoxifeno no modificó el número de linfocitos CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, B220⁺, MAC-3⁺ y CD16⁺/32⁺ en los ratones macho no infectados (Figura 11A, 11B, 11C, 11D, 11E y 11F). Sin embargo, el tamoxifeno incrementó el porcentaje de los linfocitos CD3⁺CD8⁺ en el día 8 post-infección en comparación con el grupo sin tratamiento o con el grupo tratado con vehículo (Figura 11C). Además, el tamoxifeno disminuyó la población B220⁺ en el día 8 post-infección en comparación con los ratones sin tratamiento o con el grupo tratado con vehículo, he incluso con el grupo de tamoxifeno al día 0 (Figura 11D).

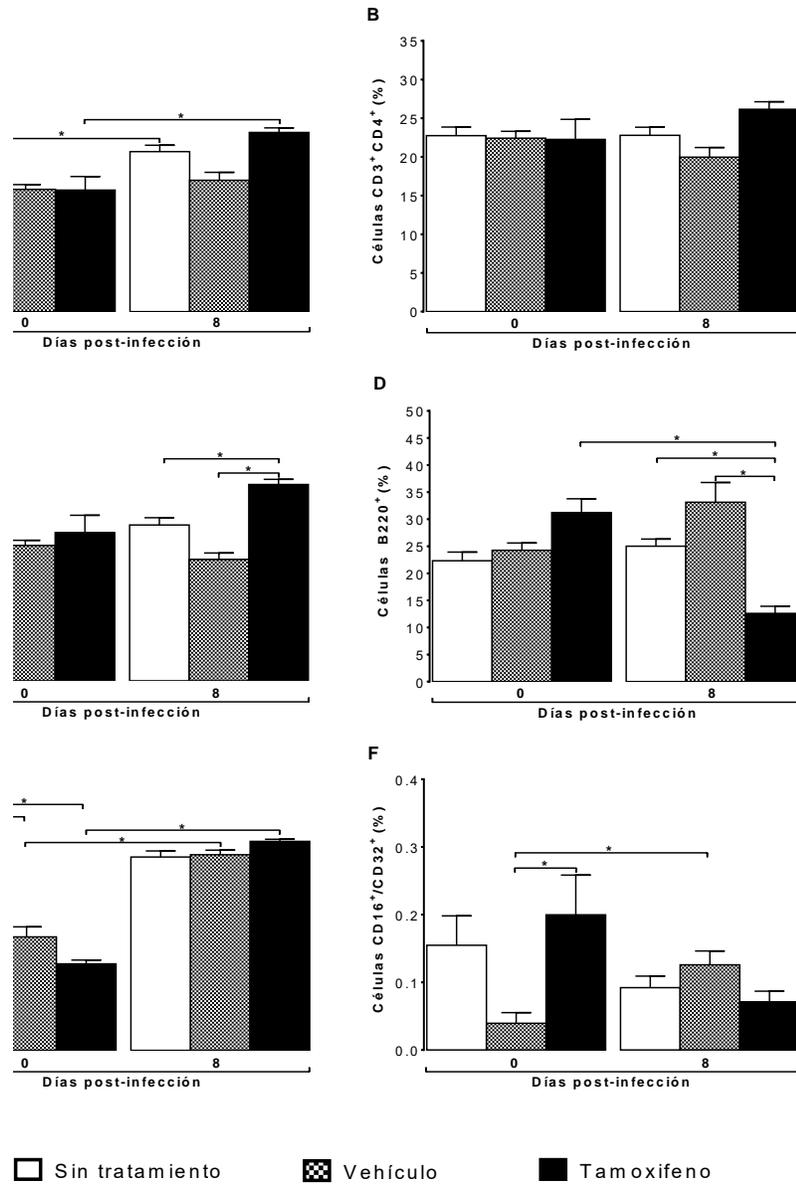


Figura 11 El tamoxifeno incrementó el número de linfocitos CD8⁺, pero disminuyó el porcentaje de linfocitos B220⁺, en los machos infectados con *P. berghei* ANKA. Grupos de ratones macho CBA/Ca se trataron con tamoxifeno. Se utilizaron dos grupos control (uno sin tratar y el otro administrado con el vehículo). La mitad de los ratones de cada grupo se infectaron con *P. berghei* ANKA y se sacrificaron el día 8 post-infección. A cada ratón se les extrajo el bazo para realizar la tinción con anticuerpos monoclonales y cuantificación de los linfocitos CD3⁺ (A), linfocitos CD3⁺CD4⁺ (B), linfocitos CD3⁺CD8⁺ (C), linfocitos B220⁺ (D), macrófagos MAC-3⁺ (E) y células NK CD16⁺/32⁺ (F). Las barras representan la media ± el error estándar medio de cada grupo (n=10). Los asteriscos representan la diferencia significativa entre los grupos (p<0.05). Para evaluar las diferencias estadísticas se realizó el análisis en nido con una prueba post-hoc de Bonferroni.

11.4 El tamoxifeno incrementó la concentración plasmática de IL-10, TNF- α e IFN- γ de los ratones macho infectados.

La administración de tamoxifeno no modificó la concentración plasmática de las citocinas en los machos sin infección (Figura 12A-12G). Sin embargo, el tamoxifeno incrementó la concentración sérica de IL-10, TNF- α e IFN- γ en el grupo de ratones macho infectados en comparación con los ratones sin tratamiento e infectados (Figura 12A-12G) en el día 8 post-infección.

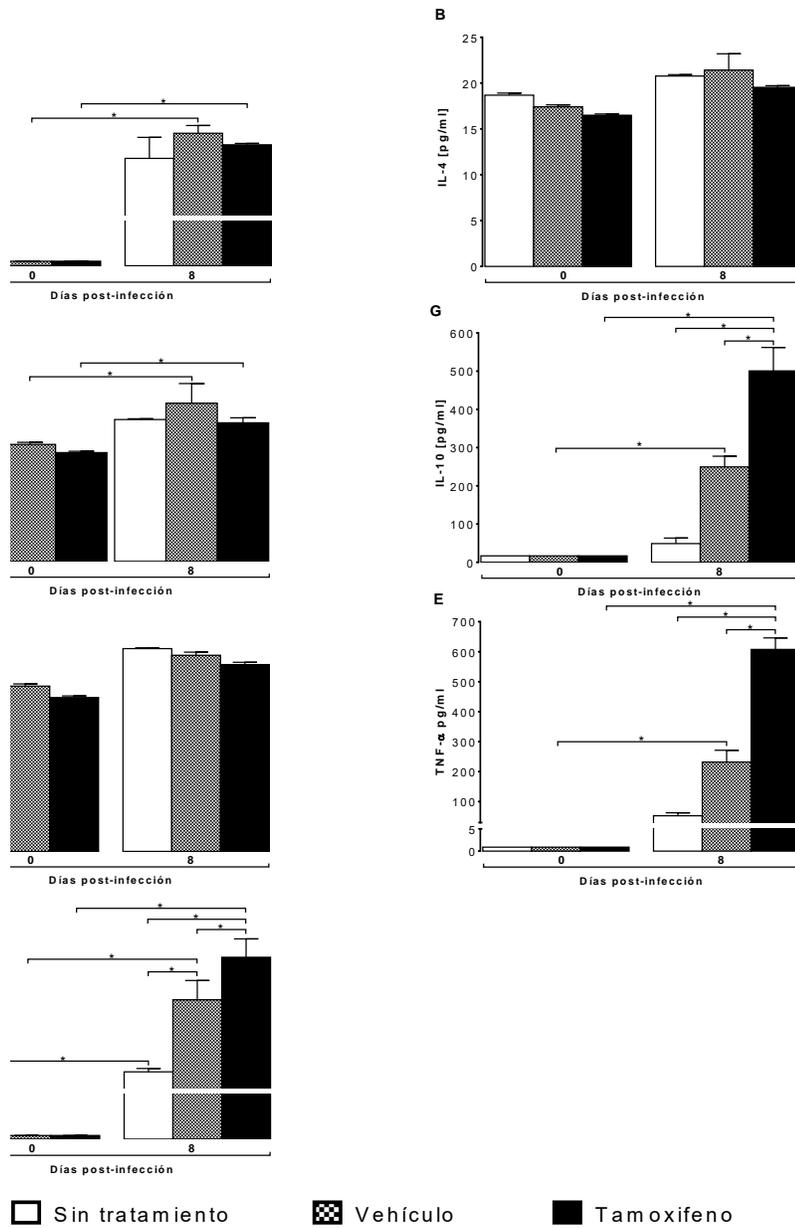


Figura 12. El tamoxifeno incrementó la concentración de IL-10, TNF- α e IFN- γ de los ratones macho infectados con *P. berghei* ANKA. Dos grupos de ratones macho CBA/Ca se trataron con tamoxifeno. Se utilizaron dos grupos control (uno sin tratar y el otro administrado con el vehículo). La mitad del número de ratones en cada grupo se infectaron con *P. berghei* ANKA y la otra mitad no se infectó. Todos los ratones se sacrificaron en el día que correspondió al 8 post-infección. A todos los ratones se les extrajo sangre y se separó el plasma para cuantificar IL-2 (A), IL-4 (B), IL-6 (C), IL-10 (D), IL-17 (E), TNF- α (F), e IFN- γ (G) por citometría de flujo. Las columnas representan la media \pm el error estándar medio de cada grupo (n=10). Los asteriscos representan la diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$). Se realizó el análisis en nido para evaluar las diferencias estadísticas con un análisis post-hoc de Bonferroni.

12 DISCUSIÓN

La malaria es la parasitosis que provoca la mayor mortalidad en el mundo. La enfermedad presenta dimorfismo sexual, de tal forma que la gravedad en los síntomas y la mortalidad es mayor en los hombres que en las mujeres. Dado que los esteroides sexuales son responsables de las principales diferencias fisiológicas entre los sexos; en particular, los estrógenos modulan la respuesta inmune y están en mayor concentración en las mujeres que en los hombres, analizamos su participación en el dimorfismo sexual. Diversos grupos de investigación han documentado las diferencias en las respuestas inmunes de hombres y mujeres, así como el dimorfismo sexual en malaria vía la disminución de la concentración de estrógenos (gonadectomía); o mediante el incremento de su concentración debida a la administración exógena de la hormona (10, 63, 65). La gonadectomía tiene la desventaja de eliminar el sitio de síntesis de otras hormonas; mientras que la administración endógena podría inducir mecanismos de regulación negativa por exceso de la hormona. Interesantemente, aun cuando se ha documentado el dimorfismo sexual en malaria, no se considera al sexo como una variable y no se ha profundizado en el estudio de los mecanismos involucrados en este dimorfismo sexual. Por lo anterior, en este proyecto estudiamos el efecto de los estrógenos en la parasitemia, cuadro clínico y respuesta inmune en un modelo de malaria experimental. Se utilizó la estrategia de bloquear a los receptores de estrógenos con tamoxifeno (un fármaco reconocido y ampliamente utilizado en el cáncer de mama estrógeno dependiente) para analizar sus efectos sobre: la parasitemia, el cuadro clínico y la respuesta inmune de ratones CBA/Ca hembras y machos infectados con *Plasmodium berghei* ANKA.

El tamoxifeno incrementó la parasitemia tanto en las hembras como en los machos en el día 8 post-infección (Figura 5A y 9A), lo que sugiere que los estrógenos promueven la eliminación del parásito. Este resultado corrobora lo descrito previamente por nuestro grupo de investigación; referimos que la disminución de la concentración de estrógenos mediante gonadectomía en ratones hembra CBA/Ca infectadas con *P. berghei* ANKA, disminuyó la sobrevivencia e incrementó significativamente la parasitemia (10). Además, reconstituir con estradiol a las

hembras gonadectomizadas disminuye la parasitemia (65), lo que sugiere que los estrógenos son importantes para eliminar al parásito. En contraste, Weinstock (et al). mostró que el tamoxifeno y su principal metabolito 4-HO-tamoxifeno disminuye la parasitemia en ratones infectados con *Plasmodium berghei* ANKA (94). Una posible explicación de esta diferencia es el tiempo y la dosis de tamoxifeno utilizado, Weinstock administró una dosis cuatro veces más alta, además, utilizó una cepa mutante para el sistema Cre/LoxP de ratones C57B/6, y nosotros usamos ratones CBA/Ca. Además, Weinstock y colaboradores no evaluaron parámetros de la respuesta inmune.

Que el tamoxifeno aumentara la carga parasitaria de *P. berghei* ANKA contrasta con la actividad antiparasitaria descrita para otras infecciones parasitarias incluida la teniasis (70), la esquistosomiasis (95), la leishmaniasis (81) y la tripanosomiasis (80). Las posibles razones de este resultado son diversas y complejas; una posible explicación es que algunos parásitos producen moléculas estrogénicas (80), y el tamoxifeno interfiere con el metabolismo tanto de los parásitos como del hospedador (96). Adicionalmente, en los estudios *in vivo*, el parásito puede alojarse en diferentes células u órganos, lo que hace que el tamoxifeno sea inaccesible, o que se requieran dosis más altas para detectar su efecto antiparasitario, dosis que podría ser similar a la que empleó Weinstock (40 mg/Kg). Esto explicaría por qué no detectamos un efecto antimalárico y resalta la importancia de validar los efectos terapéuticos de los antimaláricos *in vivo*.

El índice esplénico permite evaluar tanto la proliferación de las células del bazo como la inflamación debida a la infección con el parásito (97). El tratamiento con tamoxifeno incrementó significativamente el índice esplénico de las hembras en el día 8 postinfección (Figura 5A). Una probable explicación para este hallazgo es que dado que el estradiol promueve el proceso de diferenciación celular en el bazo, vía la inducción de apoptosis de las células autorreactivas, al bloquear a los receptores de estradiol con tamoxifeno, no se indujo apoptosis por lo que el tamaño del bazo aumentó y por lo tanto también aumentó el índice esplénico (98). Además, el incremento en el índice esplénico también podría explicarse por la proliferación de

células de la respuesta inmune como resultado del incremento en la parasitemia. En contraste, el tamoxifeno no modificó el índice esplénico en machos (Figura 9B). Lo que sugiere un efecto del tamoxifeno dependiente del sexo.

En los modelos murinos de malaria se desarrolla hipotermia que es menos severa en las hembras que en los machos (99). Por lo anterior, se midió el efecto del tamoxifeno sobre la temperatura corporal. Detectamos que el tamoxifeno agravó la hipotermia en las hembras infectadas (Figura 6B); una posible explicación es que en el hipotálamo existen receptores de estrógenos, que modulan la temperatura (100); probablemente el tamoxifeno interfirió con este proceso, por lo que la gravedad en la hipotermia se acentuó particularmente en las hembras (Figura 6B y 10B). Además, es probable que los andrógenos al estar en mayor concentración en los machos regulen la temperatura mediante un mecanismo diferente (101) (Figura 10A y 10B).

La pérdida de peso corporal es otra de las características de la malaria, se ha documentado que es consecuencia de la alta concentración de TNF- α (caquexina) (102, 103). En este trabajo, el grupo que recibió tamoxifeno disminuyó significativamente la masa corporal durante los días 2 al 7 post infección en las hembras infectadas y solo en el día 5 postinfección en los machos en la misma condición (Figura 6D y 10D), este hallazgo sugiere la participación de los estrógenos en la regulación de peso en los individuos con malaria; además, corrobora los resultados de experimentos previos de nuestro grupo de investigación donde los ratones hembras gonadectomizados disminuyeron el peso corporal (10). Una posible explicación es que dado el hipotálamo regula la ingesta de alimento (104) y en este tejido existen receptores de estrógenos (46); probablemente al administrar tamoxifeno el peso de los ratones disminuyó al interferir con esta función de los estrógenos

Además, administrar tamoxifeno a las hembras disminuyó la concentración de hemoglobina en comparación con las hembras tratadas con vehículo infectadas o con el grupo de hembras sin tratamiento infectadas (Figura 6F); este hallazgo corrobora lo previamente descrito por Kim (et al.), quienes describieron que los

estrógenos regulan la eritropoyesis (105). Otra posible explicación es que al metabolizarse el tamoxifeno se generó 4-hidroxitamoxifeno que al unirse a los eritrocitos de los ratones aumentó la permeabilidad y lisis de los glóbulos rojos, como lo describió Cruz Silva en humanos (106). Además, es probable que el tamoxifeno al incrementar la parasitemia, disminuyó la concentración de hemoglobina debido a la destrucción de eritrocitos en las hembras (Figura 6E y 6F). En contraste, el tamoxifeno incrementó la concentración de hemoglobina en los machos infectados, en comparación con los ratones infectados tratados con vehículo o sin tratamiento (Figura 10F). Este resultado fue inesperado, una posible explicación es que, debido a que el tamoxifeno evitó la interacción de los estrógenos con sus receptores, es probable que se acumulara el precursor testosterona que estimularía la liberación de eritropoyetina y así incrementaría la concentración de hemoglobina (107).

El bazo es el principal sitio de eliminación del parásito (24), por lo que se evaluó el efecto del tamoxifeno sobre el número de células de la respuesta inmune en ese órgano. Se detectó que la infección disminuyó el porcentaje de linfocitos CD3⁺ y CD3⁺ CD8⁺ en las hembras (Figura 7A y 7C). Una probable explicación para este hallazgo es que la infección con el parásito induce apoptosis en linfocitos T (108). Además, el tamoxifeno disminuyó el número de linfocitos CD3⁺CD8⁺ en las hembras el día 8 post-infección (Figura 7C); mientras que incrementó el número de CD3⁺CD8⁺ en machos en el día 8 post-infección (Figura 11C), lo que sugiere que los linfocitos CD3⁺CD8⁺ responden diferente ante el tamoxifeno de forma dependiente del sexo. Además, el tamoxifeno disminuyó el porcentaje de linfocitos B en las hembras y los machos (Figura 7D y 11D), una posible explicación es que el tamoxifeno inhiba la maduración de los linfocitos B en malaria como en otros sistemas (42). Además, en este trabajo, el administrar tamoxifeno incrementó la población de las células NK en las hembras infectadas en comparación con el grupo sin tratamiento infectado (Figura 7F); sin embargo, no afectó a las células NK en los machos (Figura 12F). Se ha descrito que administrar estradiol *in vitro* disminuye la actividad y proliferación de las células NK (41, 109), por lo que es probable que, en este trabajo, al bloquear al receptor de estrógenos se favoreció que las células NK

aumentaran su número y posiblemente su actividad en el bazo; sin embargo, esta hipótesis deberá demostrarse experimentalmente.

Se ha documentado que para eliminar al *Plasmodium* se requiere de la comunicación entre las células de la respuesta inmune mediada por citocinas (110). En este trabajo se evaluó si la administración de tamoxifeno modificaba la concentración de las citocinas pro- y anti- inflamatorias en los ratones infectados con *P. berghei* ANKA. Detectamos que el tamoxifeno disminuyó la concentración sérica de IL-2, IL-6 e IL-17 en las hembras infectadas con *P. berghei* ANKA (Figura 8A, 8C y 8E), esto sugiere que los estrógenos regulan la concentración de estas citocinas en nuestro modelo experimental. Una posible explicación a la disminución de IL-2 podría ser que el tamoxifeno interfirió con la síntesis de IL-2 en los linfocitos T, sin embargo, sería importante comprobar experimentalmente este hallazgo. La IL-6 induce la maduración y diferenciación de linfocitos B (111), por lo que la disminución en la concentración de IL-6 (Figura 8C) en las hembras tratadas con tamoxifeno explicaría el menor número de linfocitos B en este mismo grupo (Figura 7D).

El tamoxifeno incrementó la concentración de las citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10 en los machos en el día 8 post-infección (Figura 12D, 12F y 12G), es probable que este resultado sea consecuencia de que el tamoxifeno aumentó el número de linfocitos T citotóxicos (Figura 11C), ya que se ha descrito que en malaria los linfocitos T citotóxicos sintetizan TNF- α e IFN- γ (25). Además, es posible que en consecuencia al incremento de TNF- α e IFN- γ se incrementó la concentración de IL-10 (Figura 12D) ya que la IL-10 regula la concentración de estas citocinas (28).

Este trabajo demostró el efecto dimórfico del tamoxifeno en la respuesta inmune de ratones infectados con *Plasmodium berghei* ANKA, efecto que no se había investigado con anterioridad; ya que generalmente los efectos del tamoxifeno se estudian únicamente en hembras, debido a que desarrollan concentraciones más altas de estrógenos como lo describió Benten (et al) (63). Sin embargo, aún falta profundizar sobre el mecanismo por el cual el tamoxifeno generó dimorfismo en la población de los linfocitos T citotóxicos.

13 CONCLUSIÓN

Los resultados en este trabajo demostraron que el tamoxifeno a una dosis de 1 mg/kg de peso incrementa la parasitemia en hembras y machos CBA/Ca infectados con *Plasmodium berghei* ANKA.

Adicionalmente, el efecto del tamoxifeno sobre la respuesta inmune fue que disminuyó la síntesis de IL-2, IL-6 e IL-17 (Figura 8A, 8C y 8E) y de linfocitos T citotóxicos y linfocitos B (Figura 7C y 7D) en las hembras, lo que condujo a un aumento de la parasitemia (Figura 5A) por una deficiente respuesta inmune, lo que generó una mayor inflamación del bazo (Figura 5B). En contraste, en los machos el tamoxifeno incrementó el número de linfocitos T citotóxicos (Figura 11C) lo que condujo a una mayor concentración de TNF- α e IFN- γ (Figura 12F y 12G), además, disminuyó el número de linfocitos B (Figura 11D). Es probable que esta disminución generara un menor número de células plasmáticas y como consecuencia disminuyera la síntesis de anticuerpos por que se ha documentado que se requieren para promover la eliminación del parásito al aumentar la fagocitosis o al activar la citotoxicidad de las células NK; es probable que eso explique el incremento en la parasitemia (Figura 9A) y como consecuencia, aumentó el estímulo antigénico que indujo un aumento en la concentración de TNF- α e IFN- γ , de las citocinas que se asocian con mayor gravedad en la enfermedad. En conjunto, estos resultados sugieren que los linfocitos T citotóxicos y linfocitos B son claves para la eliminación del parásito y especialmente que el tamoxifeno afecta de forma diferencial a los linfocitos T citotóxicos de machos y hembras. Sin embargo, falta investigar el mecanismo que explique este hallazgo.

Estos resultados muestran que los linfocitos T citotóxicos modifican su actividad de forma diferente en los machos que en las hembras y que en esa actividad intervienen los estrógenos. Lo anterior, explicaría al menos en parte, el efecto dimórfico de los estrógenos en la respuesta inmune frente a *Plasmodium*, además, sugiere la importancia de evaluar el efecto de los estrógenos sobre las vías de señalización de linfocitos T citotóxicas.

Finalmente, este trabajo demuestra que el tamoxifeno, al interferir con la interacción de los estrógenos con sus receptores, afecta de forma diferencial la respuesta inmune de ratones CBA/Ca machos y hembras infectados con *P. berghei* ANKA, lo que podría tener implicaciones para el desarrollo de futuras terapias antimaláricas eficientes que difieran entre los sexos. En la figura 13 se representan los efectos del tamoxifeno en las hembras y en los machos.

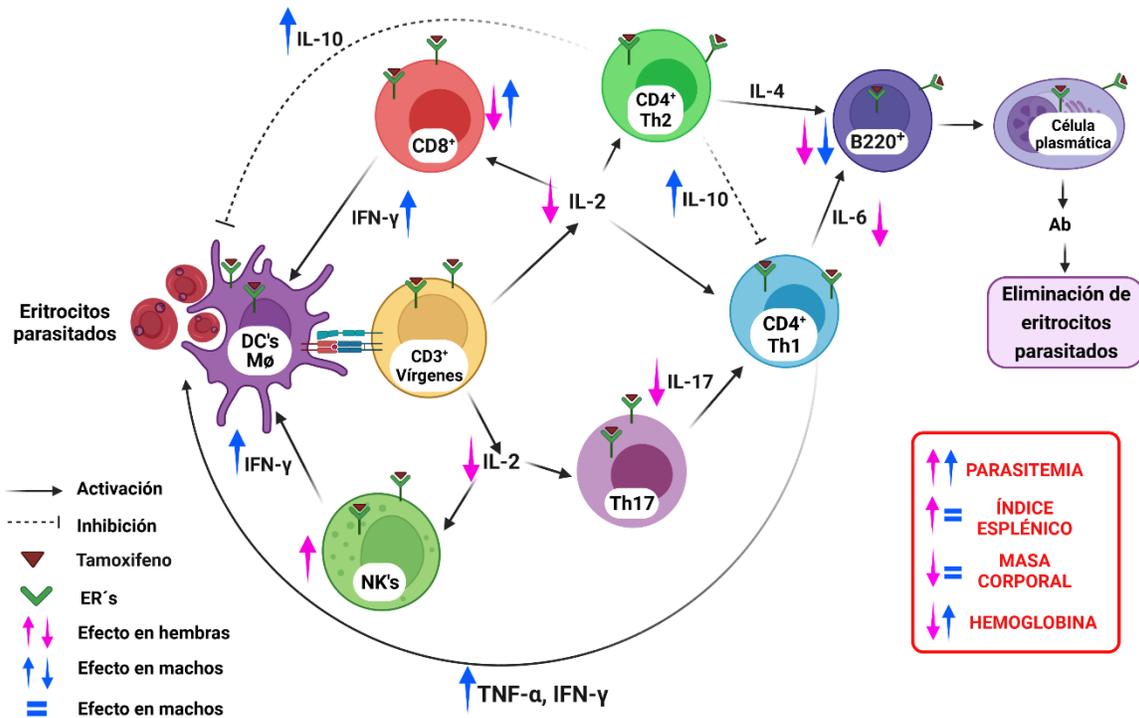


Figura 13 Efecto del tamoxifeno sobre la respuesta inmune de ratones CBA/Ca hembra y macho infectados con *Plasmodium berghei* ANKA. La respuesta inmune innata y adaptativa se requieren para controlar la infección con *Plasmodium*. Las células dendríticas (CD) y los macrófagos (Mφ) fagocitan eritrocitos parasitados, presentan antígenos del parásito a los linfocitos T CD3⁺ vírgenes; esto induce la secreción de IL-2 que promueve su proliferación y maduración a células CD4⁺ Th1. Estas últimas células producen IFN-γ, que activa a Mφ y a células NK, lo que promueve la eliminación del parásito. Además, las células Th2 producen IL-4 e IL-6, que son factores de crecimiento y diferenciación para que los linfocitos B220⁺ maduren a células productoras de anticuerpos involucradas en la eliminación de *Plasmodium*. Los efectos del tamoxifeno se muestran en rosa para las hembras y en azul para los machos. El tamoxifeno en hembras aumentó el número de células NK pero disminuyó la población linfocitos T CD8⁺ y B220⁺; también disminuyó la concentración de IL-2, IL-6 e IL-17, lo que podría dificultar la eliminación del parásito, porque al disminuir la concentración de IL-2 e IL-6 disminuyó el número de linfocitos B que maduren a células productoras de anticuerpos que favorecen la eliminación del parásito mediante la fagocitosis y por lo tanto no se eliminó de forma eficiente al parásito y como consecuencia incrementó la parasitemia y el índice esplénico, lo que genera un cuadro clínico más grave. El tamoxifeno en machos disminuyó el número de linfocitos B220⁺, pero aumentó la población linfocitos T CD8⁺ junto con la concentración de TNF-α, IFN-γ e IL-10 lo que podría afectar la eliminación del parásito ya que al igual que las hembras al existir un menor número de linfocitos B que puedan madurar a células productoras de anticuerpos que favorecen la eliminación del parásito mediante la fagocitosis, no existe una adecuada eliminación del parásito lo que incrementó la parasitemia y por tanto la estimulación antigénica que indujo mayor concentración de TNF-α e IFN-γ que se asocian con complicaciones en malaria. Figura original elaborada en bio RENDER (112).

4 PROSPECTIVAS

Para completar este proyecto se podría evaluar la expresión de los receptores de estrógenos (alfa y beta) junto con la expresión de genes asociados a la activación de la respuesta inmune. Además de: cuantificar la concentración de anticuerpos; cuantificar la concentración de esteroides sexuales; evaluar los mecanismos de señalización de los linfocitos T citotóxicos mediante los cuales el tamoxifeno modificó esa población, además de evaluar el efecto del tamoxifeno en los linfocitos T reguladores, evaluar los mecanismos mediante los cuales el tamoxifeno regula la actividad de las células presentadoras de antígeno en el bazo.

15 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. (WHO) WHO. World malaria report 2021 Geneva: World Health Organization; 2021 [Available from: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2020>].
2. Esamai F, Mining S, Forsberg P, Lewis DH. A comparison of brain, core and skin temperature in children with complicated and uncomplicated malaria. *J Trop Pediatr*. 2001;47(3):170-5.
3. Day NP, Hien TT, Schollaardt T, Loc PP, Chuong LV, Chau TT, et al. The prognostic and pathophysiologic role of pro- and anti-inflammatory cytokines in severe malaria. *J Infect Dis*. 1999;180(4):1288-97.
4. de Menezes MN, Salles EM, Vieira F, Amaral EP, Zuzarte-Luis V, Cassado A, et al. IL-1 α promotes liver inflammation and necrosis during blood-stage *Plasmodium chabaudi* malaria. *Sci Rep*. 2019;9(1):7575.
5. Anaya JM. Descripción molecular del TNF- α . *Reumatología*. 2003;19:8.
6. Sarangia A, Dalaic M. Serum cytokine TNF-alpha and hemoglobin levels in *Plasmodium falciparum*. A correlative study in coastal districts of Odisha. *Apollo Medicine*. 2012;9:4.
7. Schofield L., F. H. Signal transduction in host cells by glycosphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *J Exp Med*. 1993;177:8.
8. Nussenblatt V, Mukasa G, Metzger A, Ndeezi G, Garrett E, D. Semba R. Anemia and interleukin-10, tumor necrosis factor alpha and erythropoietin levels among children with acute, uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001;8:6.
9. Nobre Lopes L, Folha Santos FA, Marques Oliveira LC, Ferreira Araujo MT, Guilhon Sequeira C, Feio Libonati RM, et al. An analysis of the influence of sex hormones on Balb/c mice infected with *Plasmodium berghei*. *Microbial Pathogenesis*. 2015;90:9.
10. Legorreta-Herrera M, Mosqueda-Romo NA, Nava-Castro KE, Morales-Rodriguez AL, Buendia-Gonzalez FO, Morales-Montor J. Sex hormones modulate the immune response to *Plasmodium berghei* ANKA in CBA/Ca mice. *Parasitol Res*. 2015;114(7):2659-69.
11. Jordan VC. The role of tamoxifen in the treatment and prevention of breast cancer. *Curr Probl Cancer*. 1992;16(3):129-76.
12. Mokgethi MT, N'Da DD. Cell based assays for anti-Plasmodium activity evaluation. *Eur J Pharm Sci*. 2016;84:10.
13. Organization WH. WHO Malaria Report. Suiza: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data; 2013. p. 252.
14. Cervantes Rebolledo C, Carrero Sánchez JC. Hormonas y la susceptibilidad a las infecciones parasitarias. *Rev Med Portuguesa*. 2008;2:77-88.
15. Del Portillo HA, Ferrer M, Brugat T, Martin-Jaular L, Langhorne J, Lacerda MV. The role of the spleen in malaria. *Cell Microbiol*. 2012;14(3):343-55.
16. Stevenson MM, Riley EM. Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(3):169-80.
17. Kinra P, Dutta V. Serum TNF alpha levels: a prognostic marker for assessment of severity of malaria. *Tropical Biomedicine*. 2013;30:9.
18. Stevenson MM, Riley EM. Innate immunity to malaria. *Nature Rev Immunol*. 2004;4:11.
19. Berretta F, St-Pierre J, Piccirillo CA, Stevenson MM. IL-2 contributes to maintaining a balance between CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells and effector CD4⁺ T cells required for immune control of blood-stage malaria infection. *J Immunol*. 2011;186(8):4862-71.

20. Amani V, Vigarío AM, Belnoue E, Marussig M, Fonseca L, Mazier D, et al. Involvement of IFN-gamma receptor-mediated signaling in pathology and anti-malarial immunity induced by *Plasmodium berghei* infection. *Eur J Immunol*. 2000;30(6):1646-55.
21. Stevenson MM, Tam MF, Nowotarski M. Role of interferon-gamma and tumor necrosis factor in host resistance to *Plasmodium chabaudi* AS. *Immunol Lett*. 1990;25(1-3):115-21.
22. Billker O, Shaw MK, Margos G, Sinden RE. The roles of temperature, pH and mosquito factors as triggers of male and female gametogenesis of *Plasmodium berghei* in vitro. *Parasitol*. 1996;114:7.
23. Tadmori W, Lee HK, Clark SC, Choi YS. Human B cell proliferation in response to IL-4 is associated with enhanced production of B cell-derived growth factors. *J Immunol*. 1989;142(3):826-32.
24. Yone CL, Kremsner PG, Luty AJ. Immunoglobulin G isotype responses to erythrocyte surface-expressed variant antigens of *Plasmodium falciparum* predict protection from malaria in African children. *Infect Immun*. 2005;73(4):2281-7.
25. Legorreta-Herrera M, Rivas-Contreras S, Ventura-Gallegos J, Zentella-Dehesa A. Nitric oxide is involved in the upregulation of IFN-gamma and IL-10 mRNA expression by CD8(+) T cells during the blood stages of *P. chabaudi* AS infection in CBA/Ca mice. *Int J Biol Sci*. 2011;7(9):1401-11.
26. McCall MB, Roestenberg M, Ploemen I, Teirlinck A, Hopman J, de Mast Q, et al. Memory-like IFN-gamma response by NK cells following malaria infection reveals the crucial role of T cells in NK cell activation by *P. falciparum*. *Eur J Immunol*. 2010;40(12):3472-7.
27. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:323-50.
28. Kumar R, Ng S, Engwerda C. The Role of IL-10 in Malaria: A Double Edged Sword. *Front Immunol*. 2019;10:229.
29. Marco de León-Nava, Karen Nava, Gloria Soldevila, Lorena López Griego, Jesús R. Chávez Ríos, José A. Vargas Villavicencio, et al. Immune sexual dimorphism: Effect of gonadal steroids on the expression of cytokines, sex steroid receptors, and lymphocyte proliferation. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2009;113:8.
30. Mohammad I, Starskaia I, Nagy T, Guo J, Yatkin E, Vaananen K, et al. Estrogen receptor alpha contributes to T cell-mediated autoimmune inflammation by promoting T cell activation and proliferation. *Sci Signal*. 2018;11(526).
31. Andersson A, Tornqvist AE, Moverare-Skrtic S, Bernardi AI, Farman HH, Chambon P, et al. Roles of activating functions 1 and 2 of estrogen receptor alpha in lymphopoiesis. *J Endocrinol*. 2018;236(2):99-109.
32. Sophie Laffont¹, Cyril Seillet, Guéry JC. Estrogen Receptor-Dependent Regulation of Dendritic Cell Development and Function. *frontiers in Immunology*. 2017;8:14.
33. Seto K, Hoang M, Santos T, Bandyopadhyay M, Kindy MS, Dasgupta S. Non-genomic oestrogen receptor signal in B lymphocytes: An approach towards therapeutic interventions for infection, autoimmunity and cancer. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016;76:115-8.
34. Legorreta Herrera M, Mosqueda Romo NA, Rodríguez Morales AL, Buendía González FO, Aguilar Sánchez M, Morales Montor J. Gonadal steroids negatively modulate oxidative stress in CBA/Ca female mice infected with *P. berghei* ANKA. *BioMed Research International*. 2014:10.
35. Cervantes-Candelas LA, Aguilar-Castro J, Buendia-Gonzalez FO, Fernandez-Rivera O, Nolasco-Perez TJ, Lopez-Padilla MS, et al. 17beta-Estradiol Is Involved in the Sexual Dimorphism of the Immune Response to Malaria. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:643851.

36. Nelson LR, Bulun SE. Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol.* 2001;45(3 Suppl):S116-24.
37. Gardner DG, Dolores S. *Endocrinología básica y clínica de Greenspan: Lange;* 2012.
38. Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. *Harper Bioquímica Ilustrada.* 29ª ed 2013. 816 p.
39. Cook MB, Wood SN, Cash BD, Young P, Acosta RD, Falk RT, et al. Association between circulating levels of sex steroid hormones and Barrett's esophagus in men: A case-control analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2015;13(4):673-82.
40. Liao ZH, Huang T, Xiao JW, Gu RC, Ouyang J, Wu G, et al. Estrogen signaling effects on muscle-specific immune responses through controlling the recruitment and function of macrophages and T cells. *Skelet Muscle.* 2019;9(1):20.
41. Seaman WE, Gindhart TD. Effect of estrogen on natural killer cells. *Arthritis Rheum.* 1979;22(11):1234-40.
42. Nordqvist J, Bernardi A, Islander U, Carlsten H. Effects of a tissue-selective estrogen complex on B lymphopoiesis and B cell function. *Immunobiology.* 2017;222(8-9):918-23.
43. De León-Nava MA, Morales-Montor J. Dimorfismo sexual inmunitario: ¿Pueden los esteroides sexuales polarizar el perfil de citocinas Th1/Th2? *Rev Invest Clin.* 2006;58:161-9.
44. Haiying Wang, Wenyuan Ding, Dalong Yang, Tixin Gu, Sidong Yang, Bai Z. Different concentrations of 17 β -estradiol modulates apoptosis induced by interleukin-1 β in rat annulus fibrosus cells. *MOLECULAR MEDICINE REPORTS.* 2014;10:7.
45. Fuentes N, Silveyra P. Estrogen receptor signaling mechanisms. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2019;116:135-70.
46. Malyala A, Kelly MJ, Ronnekleiv OK. Estrogen modulation of hypothalamic neurons: activation of multiple signaling pathways and gene expression changes. *Steroids.* 2005;70(5-7):397-406.
47. Hao S, Zhao J, Zhou J, Zhao S, Hu Y, Hou Y. Modulation of 17beta-estradiol on the number and cytotoxicity of NK cells in vivo related to MCM and activating receptors. *Int Immunopharmacol.* 2007;7(13):1765-75.
48. Bettelli E, Dastrange M, Oukka M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(14):5138-43.
49. Reyhaan AC, Agreeen H, Kirill SL, Zvi S, Barbara DB. Estrogen receptor-alpha 36 mediates the anti-apoptotic effect of estradiol in triple negative breast cancer cells via a membrane-associated mechanism. *Biochim Biophys.* 2014;1843(11):2796-806.
50. Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin J-R, Chambon P. Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell.* 1987;51:10.
51. Barrón González A, Arias Martínez J, Castro Romero I. Antiestrógenos: mecanismo de acción y aplicaciones clínicas. *ScieELO.* 2001;43(6):577-84.
52. Kondakova IV, Shashova EE, Sidenko EA, Astakhova TM, Zakharova LA, Sharova NP. Estrogen Receptors and Ubiquitin Proteasome System: Mutual Regulation. *Biomolecules.* 2020;10(4).
53. Kumar R, Zakharov MN, Khan SH, Miki R, Jang H, Toraldo G, et al. The dynamic structure of the estrogen receptor. *J Amino Acids.* 2011;2011:812540.
54. Abbas AK, Lichtman AH, Peber J. *Inmunología Celular y Molecular.* Elsevier. ; 2004.
55. Hernández Cervantes R, Sánchez Acosta AG, Ramírez Nieto R, Morales Montor J. Regulación neuroendocrinológica de la función inmunitaria: El papel de la hipófisis y los esteroides sexuales. *Rev Esp en Ciencias Químico-Biológicas.* 2010;13:9.
56. Tasker C, Ding J, Schmolke M, Rivera-Medina A, Garcia-Sastre A, Chang TL. 17beta-estradiol protects primary macrophages against HIV infection through induction of interferon-alpha. *Viral Immunol.* 2014;27(4):140-50.

57. Lambert KC, Curran EM, Judy BM, Lubahn DB, Estes DM. Estrogen receptor-alpha deficiency promotes increased TNF-alpha secretion and bacterial killing by murine macrophages in response to microbial stimuli in vitro. *J Leukoc Biol.* 2004;75(6):1166-72.
58. Paavonen T, Andersson LC, Adlercreutz H. Sex hormone regulation of in vitro immune response. Estradiol enhances human B cell maturation via inhibition of suppressor T cells in pokeweed mitogen-stimulated cultures. *J Exp Med.* 1981;154(6):1935-45.
59. Gilmore W., Weiner L.P., J. C. Effect of estradiol on cytokine secretion by proteolip protrin-specific T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. *J Immunol.* 1997;158:8.
60. Tao Wang, Si-Dong Yang, Sen Liu, Hui Wang, Huan Liu, Ding W-Y. 17b-Estradiol Inhibites Tumor Necrosis Factor-alpha Induced Apoptosis of Human Nucleus Pulposus Cells via the PI3K/Akt Pathway. *LAB/IN VITRO RESEARCH.* 2016;22:11.
61. Seaman WE, Gindhart TD. Effect of estrogen on Natural Killer cells. *Arthritis and Rheumatism.* 1979;22(11):7.
62. Huber S. ER β and ER α differentially regulate NKT and V γ 4+ T-cell activation and T-regulatory cell response in *Coxsackievirus* B3 infected mice. *J Clin Cell Immunol.* 2015;6(6):9.
63. Benten WP, Wunderlich F, Mossmann H. Plasmodium chabaudi: estradiol suppresses acquiring, but not once-acquired immunity. *Exp Parasitol.* 1992;75(2):240-7.
64. Benten WPM, Stephan C, Lieberherr ML, Wunderlich F. Estradiol signaling via sequestrable surface receptors. *Endocrinology.* 2001;14:9.
65. Aguilar-Castro J, Cervantes-Candelas LA, Buendia-Gonzalez FO, Nolasco-Perez TJ, Lopez-Padilla MS, Fernandez-Rivera O, et al. Dimorphic effect of 17beta-oestradiol on pathology and oxidative stress in experimental malaria. *Immunobiology.* 2020;225(1):151873.
66. Espeland MA, Shumaker SA, Limacher M, Rapp SR, Bevers TB, Barad DH, et al. Relative Effects of Tamoxifen, Raloxifene, and Conjugated Equine Estrogens on Cognition. *Journal of women's health.* 2010;19:371-82.
67. Webb P, Lopez GN, Uht RM, Kushner PJ. Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. *Mol Endocrinol.* 1995;9(4):443-56.
68. Wiseman H. Tamoxifen and estrogens as membrane antioxidants: Comparison with cholesterol. *Methods in Enzymol.* 1994;234:13.
69. Aquinoa Nayara S. S., Lopesa Roberta A., Batistaa Izadora A. R., Henriquesa Patricia C., Poletinia Maristela O., Francib Celso R., et al. Hypothalamic effects of tamoxifen on oestrogen regulation of luteinizing hormone and prolactin secretion in female rats. *Journal of Neuroendocrinology.* 2015;28:31.
70. Vargas Villavicencio JA, Larralde C, Nava MADL, Escobedo G, Morales Montor J. Tamoxifen treatment induces protection in murine cysticercosis. *Journal of Parasitology.* 2007;93(6):7.
71. Desta Z., Ward B.A., Soukhova N.V., D.A. F. Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6. *J Pharmacol.* 2004;310:14.
72. Johanning J, Kroner P, Thomas M, Zanger UM, Norenberg A, Eichelbaum M, et al. The formation of estrogen-like tamoxifen metabolites and their influence on enzyme activity and gene expression of ADME genes. *Arch Toxicol.* 2018;92(3):1099-112.
73. Wibowo E, Pollock PA, Hollis N, Wassersug RJ. Tamoxifen in men: a review of adverse events. *Andrology.* 2016;4(5):776-88.
74. Yang G, Nowsheen S, Aziz K, Georgakilas AG. Toxicity and adverse effects of Tamoxifen and other anti-estrogen drugs. *Pharmacol Ther.* 2013;139(3):392-404.

75. Cruz Silva MM, Madeira VMC, Almeida LM, Custódio JBA. Hydroxytamoxifen interaction with human erythrocyte membrane and induction of permeabilization and subsequent hemolysis. *Toxicology in Vitro*. 2001;15:8.
76. Miguel DC, Ferraz ML, Alves Rde O, Yokoyama-Yasunaka JK, Torrecilhas AC, Romanha AJ, et al. The anticancer drug tamoxifen is active against *Trypanosoma cruzi* in vitro but ineffective in the treatment of the acute phase of Chagas disease in mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105(7):945-8.
77. Eissa MM, Amer El, El Sawy SM. Leishmania major: activity of tamoxifen against experimental cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol*. 2011;128(4):382-90.
78. Miguel DC, Zauli-Nascimento RC, Yokoyama-Yasunaka JK, Katz S, Barbieri CL, Uliana SR. Tamoxifen as a potential antileishmanial agent: efficacy in the treatment of *Leishmania braziliensis* and *Leishmania chagasi* infections. *J Antimicrob Chemother*. 2009;63(2):365-8.
79. Escobedo G, Palacios Arreola MI, Olivos A, López Griego L, Morales Montor J. Tamoxifen treatment in hamsters induces protection during taeniosis by *Taenia solium*. *Biomed Res Int*. 2013;2013:11.
80. Landoni M, Pinero T, Soprano LL, Garcia-Bournissen F, Fichera L, Esteva MI, et al. Tamoxifen acts on *Trypanosoma cruzi* sphingolipid pathway triggering an apoptotic death process. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;516(3):934-40.
81. Trinconi CT, Miguel DC, Silber AM, Brown C, Mina JGM, Denny PW, et al. Tamoxifen inhibits the biosynthesis of inositolphosphorylceramide in *Leishmania*. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2018;8(3):475-87.
82. Doroodgar M, Delavari M, Doroodgar M, Abbasi A, Taherian AA, Doroodgar A. Tamoxifen Induces Apoptosis of *Leishmania major* Promastigotes in Vitro. *Korean J Parasitol*. 2016;54(1):9-14.
83. Trinconi CT, Reimao JQ, Yokoyama-Yasunaka JK, Miguel DC, Uliana SR. Combination therapy with tamoxifen and amphotericin B in experimental cutaneous leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(5):2608-13.
84. Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JK, Uliana SR. Tamoxifen is effective in the treatment of *Leishmania amazonensis* infections in mice. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2(6):e249.
85. Trinconi CT, Reimao JQ, Bonano VI, Espada CR, Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JKU, et al. Topical tamoxifen in the therapy of cutaneous leishmaniasis. *Parasitology*. 2018;145(4):490-6.
86. Escobedo G, Palacios-Arreola MI, Olivos A, Lopez-Griego L, Morales-Montor J. Tamoxifen treatment in hamsters induces protection during taeniosis by *Taenia solium*. *Biomed Res Int*. 2013;2013:280496.
87. Vargas-Villavicencio JA, Larralde C, De Leon-Nava MA, Escobedo G, Morales-Montor J. Tamoxifen treatment induces protection in murine cysticercosis. *J Parasitol*. 2007;93(6):1512-7.
88. Benten WPM, Wunderlich F, Mossmann H. *Plasmodium chabaudi*: Estradiol suppresses acquiring, but not once-acquired immunity *Exp Parasitol*. 1992;75:8.
89. Prudêncio M, Derbyshire ET, Marques CA, Krishna S, Mota MM, Staines HM. *Plasmodium berghei*-infection induces volume-regulated anion channel-like activity in human hepatoma cells. *Cell Immunol*. 2009;10:9.
90. Basir R, Fazalul Rahiman SS, Hasballah K, Chong WC, Talib H, Yam MF, et al. *Plasmodium berghei* ANKA infection in icr mice as a model of cerebral malaria. *Iran J Parasitol*. 2012;7:12.
91. Reid JM, Goetz MP, Buhrow SA, Walden C, Safgren SL, Kuffel MJ, et al. Pharmacokinetics of endoxifen and tamoxifen in female mice: implications for comparative in vivo activity studies. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2014;74(6):1271-8.

92. 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. *Parasitol Res.* 2015;114(7):11.
93. Peakman M, Vergani D. *Inmunología Básica y Clínica*. 2^{da}, editor: El Sevier; 2011.
94. Weinstock A, Gallego-Delgado J, Gomes C, Sherman J, Nikain C, Gonzalez S, et al. Tamoxifen activity against *Plasmodium* in vitro and in mice. *Malar J.* 2019;18(1):378.
95. Oliveira RN, Correa SAP, Vieira KM, Mendes T, Allegretti SM, Miguel DC. In vitro schistosomicidal activity of tamoxifen and its effectiveness in a murine model of schistosomiasis at a single dose. *Parasitol Res.* 2019;118(5):1625-31.
96. Morales-Montor J, Larralde C. The role of sex steroids in the complex physiology of the host-parasite relationship: the case of the larval cestode of *Taenia crassiceps*. *Parasitology.* 2005;131(Pt 3):287-94.
97. Ferrer M, Martin-Jaular L, De Niz M, Khan SM, Janse CJ, Calvo M, et al. Imaging of the spleen in malaria. *Parasitol Int.* 2014;63(1):195-205.
98. Verthelyi D. Sex hormones as immunomodulators in health and disease. *Int Immunopharmacol.* 2001;1(6):983-93.
99. Li C, Corraliza I, Langhorne J. A defect in interleukin-10 leads to enhanced malarial disease in *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection in mice. *Infect Immun.* 1999;67(9):4435-42.
100. Mekjavic IB, Eiken O. Contribution of thermal and nonthermal factors to the regulation of body temperature in humans. *J Appl Physiol* (1985). 2006;100(6):2065-72.
101. Rodriguez AM, Monjo M, Roca P, Palou A. Opposite actions of testosterone and progesterone on UCP1 mRNA expression in cultured brown adipocytes. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59(10):1714-23.
102. Randall LM, Engwerda CR. TNF family members and malaria: old observations, new insights and future directions. *Exp Parasitol.* 2010;126(3):326-31.
103. Kinra P, Dutta V. Serum TNF alpha levels: a prognostic marker for assessment of severity of malaria. *Trop Biomed.* 2013;30(4):645-53.
104. Vogel H, Wolf S, Rabasa C, Rodriguez-Pacheco F, Babaei CS, Stober F, et al. GLP-1 and estrogen conjugate acts in the supramammillary nucleus to reduce food-reward and body weight. *Neuropharmacology.* 2016;110(Pt A):396-406.
105. Kim HR, Lee JH, Heo HR, Yang SR, Ha KS, Park WS, et al. Improved hematopoietic differentiation of human pluripotent stem cells via estrogen receptor signaling pathway. *Cell Biosci.* 2016;6(1):50.
106. Cruz Silva MM, Madeira VM, Almeida LM, Custodio JB. Hydroxytamoxifen interaction with human erythrocyte membrane and induction of permeabilization and subsequent hemolysis. *Toxicol In Vitro.* 2001;15(6):615-22.
107. McManus JF, Nguyen NN, Davey RA, MacLean HE, Pomilio G, McCormack MP, et al. Androgens stimulate erythropoiesis through the DNA-binding activity of the androgen receptor in non-hematopoietic cells. *Eur J Haematol.* 2020;105(3):247-54.
108. Hojo-Souza NS, Pereira DB, Mendes TA, Passos LS, Gazzinelli-Guimaraes AC, Gazzinelli-Guimaraes PH, et al. CD4+ T cells apoptosis in *Plasmodium vivax* infection is mediated by activation of both intrinsic and extrinsic pathways. *Malar J.* 2015;14:5.
109. Robinson E, Rubin D, Mekori T, Segal R, Pollack S. In vivo modulation of natural killer cell activity by tamoxifen in patients with bilateral primary breast cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 1993;37(3):209-12.
110. Angulo I, Fresno M. Cytokines in the pathogenesis of and protection against malaria. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9(6):1145-52.
111. Sebina I, Fogg LG, James KR, Soon MSF, Akter J, Thomas BS, et al. IL-6 promotes CD4(+) T-cell and B-cell activation during *Plasmodium* infection. *Parasite Immunol.* 2017;39(10).

112. bioRENDER. <https://app.biorender.com/biorender-templates>: bioRENDER; 2021 [

16 ANEXO

Artículo de requisito

Article

Tamoxifen Suppresses the Immune Response to *Plasmodium berghei* ANKA and Exacerbates Symptomatology

Luis Antonio Cervantes-Candelas ^{1,2}, Jesús Aguilar-Castro ¹, Fidel Orlando Buendía-González ¹, Omar Fernández-Rivera ¹, Armando Cervantes-Sandoval ³, Jorge Morales-Montor ⁴  and Martha Legorreta-Herrera ^{1,*}

- ¹ Unidad de Investigación Química Computacional, Síntesis y Farmacología de Moléculas de Interés Biológico, Laboratorio de Inmunología Molecular, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 09230, México; cervantescandelasluis@gmail.com (L.A.C.-C.); jesus_aguilar_castro@yahoo.com.mx (J.A.-C.); fidel_zzz@hotmail.com (F.O.B.-G.); qfbfdz@gmail.com (O.F.-R.)
- ² Posgrado en Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado, Edificio D, 1° Piso, Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México 04510, México
- ³ Laboratorio de Aplicaciones Computacionales, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 09230, México; arpacer@unam.mx
- ⁴ Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, AP 70228, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, México; jmontor66@biomedicas.unam.mx
- * Correspondence: marthal@unam.mx; Tel: +52-5556230700 (ext. 83207)



Citation: Cervantes-Candelas, L.A.; Aguilar-Castro, J.; Buendía-González, F.O.; Fernández-Rivera, O.; Cervantes-Sandoval, A.; Morales-Montor, J.; Legorreta-Herrera, M. Tamoxifen Suppresses the Immune Response to *Plasmodium berghei* ANKA and Exacerbates Symptomatology. *Pathogens* 2021, 10, 743. <https://doi.org/10.3390/pathogens10060743>

Academic Editors:
Jorge Morales-Montor, Derek M. McKay and Luis I. Terrazas

Received: 1 May 2021
Accepted: 9 June 2021
Published: 12 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Malaria is the most lethal parasitic disease in the world. Mortality and severity in symptoms are higher in men than women, suggesting that oestrogens, which are in higher concentration in females than in males, may regulate the immune response against malaria. Tamoxifen, a selective oestrogen receptor modulator used in breast cancer treatment due to its antagonistic effect on oestrogen receptors α and β , is also studied because of its potential therapeutic use for several parasitic diseases. However, most studies, including one in malaria, have not addressed the immunomodulatory role of tamoxifen. In this work, we evaluated the effect of tamoxifen on the immune response of CBA/Ca mice against *Plasmodium berghei* ANKA. This study showed for the first time that tamoxifen increased parasite load, aggravated symptoms by decreasing body temperature and body weight, and worsened anaemia. Additionally, tamoxifen significantly increased the splenic index and the percentages of CD4⁺ and NK⁺ cells on day eight post-infection. By contrast, tamoxifen decreased both CD8⁺ and B220⁺ populations in the spleen and decreased the serum levels of IL-2, IL-6, and IL-17. Our findings support the notion that tamoxifen is a potent immunomodulator in malaria-infected mice and suggest caution when administering it to malaria-infected women with breast cancer.

Keywords: malaria; *Plasmodium berghei* ANKA; tamoxifen; oestrogens; immune system

1. Introduction

As the most lethal parasitic disease globally, malaria was responsible for 409,000 deaths in 2020 alone and 229 million new cases [1]. In epidemiological studies and experimental malaria models, males exhibit higher mortality, parasitaemia, increased anaemia, and stronger weight loss than females [2,3]. These findings indicate that oestrogens contribute to this sexual dimorphism [4]. These molecules constitute the major sex steroids in females and work as immunomodulators [5,6]. The interaction of oestrogens with their receptors activates signalling pathways such as NF- κ B, ERK/MAPK, PI3K/AKT, etc., leading to activation or inhibition of transcription factors that modulate the expression of different genes [7–9], including those for the immune response. Oestrogens physiological levels induce the proliferation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells which promote the synthesis of IFN- γ , TNF- α and IL-6 [10,11]. In addition, oestrogens induce the proliferation of B lymphocytes and their maturation to plasma cells, which increases the synthesis of antibodies [5,12]. Oestrogens also enhance the proliferation of dendritic cells and macrophages,

which promote phagocytosis and secretion of IL-6, TNF- α and IFN- γ [13,14]. In addition, it has been shown that oestrogens modulate the immune response in several parasitic diseases [15–17].

We have previously shown that gonadectomy (which eliminates the primary source of oestrogens, the ovaries) detrimentally affects the immune response in females infected with *P. berghei* ANKA; it increases TNF- α and IL-6 serum levels but decreases the mRNA expression of IFN- γ in blood [18]. In addition, 17 β -oestradiol administration to intact female mice infected with *P. berghei* ANKA increases parasitaemia and decreases body weight. By contrast, reconstitution of gonadectomised female mice using 17 β -oestradiol reduces parasitaemia and affects the immune response [19,20].

On the other hand, tamoxifen, a selective oestrogen receptor modulator, used in the treatment of breast cancer due to its antagonistic effects on α - and β -oestrogen receptors [21]; it also has immunomodulatory effects [22]. Interestingly, several studies have focused on its possible therapeutic use in several parasitic infections. The tamoxifen administration to mice infected with *Taenia crassiceps* reduced parasite load, decreased its reproduction and loss of motility in female mice [23]. In vitro, tamoxifen inhibits the evagination of *Taenia solium* cysticerci, and in vivo, it decreased the intestinal establishment of this parasite in hamsters [24]. Additionally, tamoxifen also inhibits the survival of *Echinococcus granulosus* in vitro and protect mice against its infection [25]. Furthermore, tamoxifen induces morphological alterations in *Schistosoma mansoni* parasites and eggs in vitro [26].

Tamoxifen also exhibited anti-protozoan activity in vitro against *Trypanosoma cruzi*; induced lysis and triggered an apoptotic death process of trypomastigotes in vitro [27]. Moreover, tamoxifen killed *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania major*, *Leishmania donovani* and *Leishmania chagasi* in vitro [28]. Tamoxifen topical therapy was also efficient in decreasing lesion size and parasite load in an experimental model of cutaneous leishmaniasis [29]. Finally, tamoxifen has also been used in malaria, but its anti-parasitic activity has led to controversial results. Tamoxifen has been reported to have antimalarial activity in vitro and in vivo against *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei*, respectively [30]. However, no antimalarial activity was detected in Swiss mice infected with a *Plasmodium yoelii nigeriensis* isolate (Py-R2) [31].

Given that oestrogens modulate the immune response, particularly in malaria, that tamoxifen, an oestrogen receptor antagonist, also exhibits an immunomodulatory and parasiticidal activity for various nematodes and protozoa. In this work, we decided to study the effect of tamoxifen on *Plasmodium berghei* ANKA proliferation in vivo and its effects on the immune response in CBA/Ca mice. We assessed parasite load, splenic index, number of immune response cells in the spleen and circulating levels of pro- and anti-inflammatory cytokines.

2. Results

2.1. Tamoxifen Increased Parasitaemia and Splenic Index of CBA/Ca Mice Infected with *Plasmodium berghei* ANKA

To assess the effects of tamoxifen on parasitaemia and inflammation in the spleen, CBA/Ca mice were treated with tamoxifen and then infected with *Plasmodium berghei* ANKA. We used controls groups of infected mice treated only with the vehicle or infected without treatment. To demonstrate that the effects are due to tamoxifen and not to infection with the parasite, we used three additional groups of mice treated in the same way but without infection sacrificed on the day corresponding to day eight post-infection.

Tamoxifen significantly increased parasitaemia on day eight post-infection compared to that in both control groups, the untreated and the vehicle-treated groups (Figure 1A). The splenic index increased as the infection progressed, reaching its higher level on day eight post-infection in all groups. Of note, the groups infected treated with tamoxifen exhibited the highest splenic index compared to the groups treated with vehicle or untreated. As expected, the uninfected mice did not significantly increase the splenic index; however, the tamoxifen-treated groups tended towards a higher splenic index (Figure 1B).

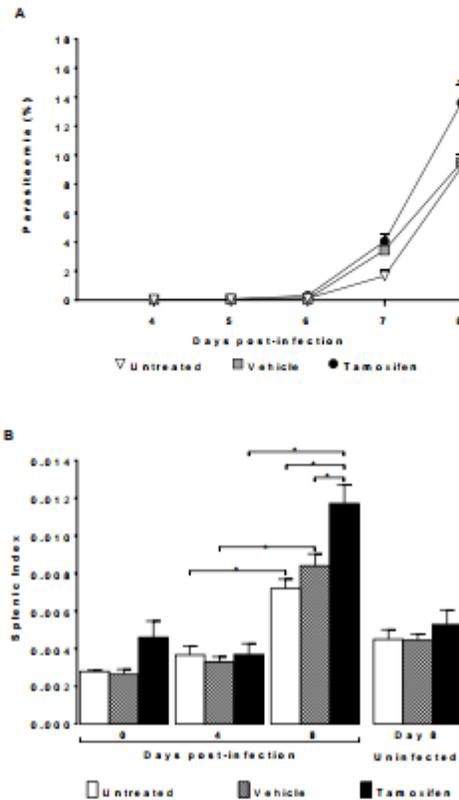


Figure 1. Tamoxifen increased parasitaemia and spleen index of CBA/Ca mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA. Groups of CBA/Ca female mice were treated with either tamoxifen or vehicle or left untreated as controls; all groups were infected with *Plasmodium berghei* ANKA. (A) The percentage of parasitised erythrocytes was evaluated daily; each point represents the geometric mean of parasitaemia in each group ($n = 10$). (B) Mice were sacrificed at 0, 4 and 8 days post-infection; the graph shows the spleen index; each bar represents the mean \pm SEM in each group ($n = 10$). Additionally, three control groups treated in the same way as the mice on day eight but without infection ($n = 10$) were analysed. Asterisks represent the statistically significant difference between the groups ($p \leq 0.05$) using repeated means test for parasitaemia and nested analysis test for spleen index, both with post hoc Bonferroni test.

2.2. Tamoxifen Aggravates Pathology by Decreasing Body Temperature, Body Mass, and Haemoglobin Levels in CBA/Ca Mice Infected with *Plasmodium berghei* ANKA

Administration of tamoxifen to uninfected mice significantly decreased body mass and haemoglobin concentration but did not change temperature (Figure 2A,C,E). While in the infected mice, the body temperature decreased significantly compared to the infected group treated with vehicle and the infected group without treatment ($p \leq 0.05$) (Figure 2B). In addition, infected mice treated with tamoxifen significantly decreased body mass during all the experiment (Figure 2D) and significantly decreased haemoglobin concentration compared with the untreated group ($p \leq 0.05$) (Figure 2F).

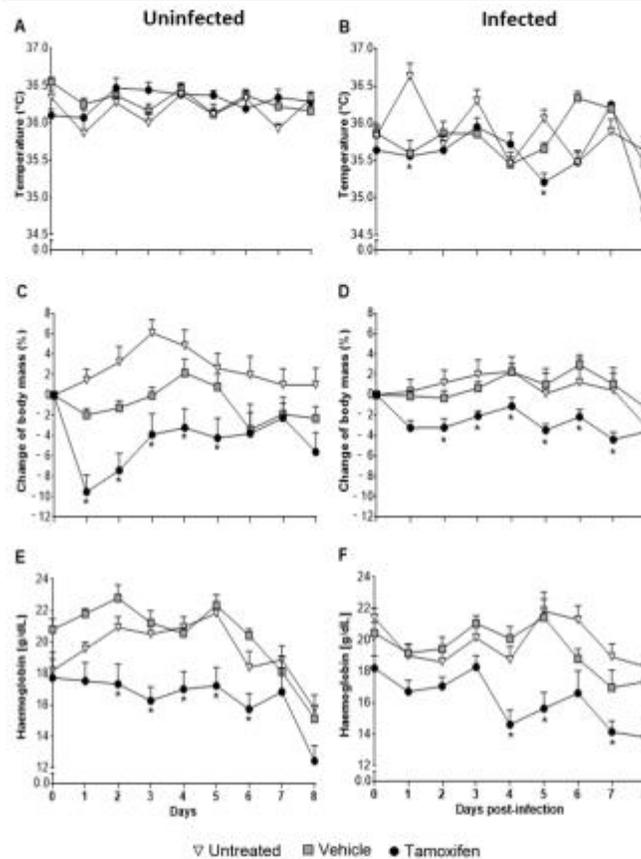


Figure 2. Tamoxifen decreased the temperature, body mass, and haemoglobin concentration of CBA/Ca mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA. Groups of mice treated with tamoxifen, vehicle or untreated, were used to evaluate its effect on body temperature, body weight and haemoglobin concentration. All variables were assessed daily. Panels A, C and E correspond to the uninfected control groups, while graphs (B, D and F) correspond to mice infected with *P. berghei* ANKA. (A) represents body temperature in uninfected mice, while (B) represents temperature in mice infected with *P. berghei* ANKA. (C,D) represent the change in body weight in uninfected and infected mice, respectively. Finally, (E,F) represent the haemoglobin concentration in uninfected and *P. berghei* ANKA infected mice, respectively. Each line represents the mean \pm SEM in each group for the indicated days. Asterisks represent statistically significant differences between the tamoxifen-treated and vehicle-treated groups, $p \leq 0.05$, ($n = 10$); data were analysed using repeated means tests with a Bonferroni post hoc test.

2.3. Tamoxifen Decreased the Percentage of Immune Response Cells in the Spleen of Mice Infected with *P. berghei* ANKA

Tamoxifen showed immunomodulatory activity even in uninfected mice; on the day of treatment that would correspond to day eight post-infection, tamoxifen significantly decreased the percentage of CD8⁺ cells and significantly increased the CD16⁺/CD32⁺ cells (Figure 3C,F), respectively.

On day zero post-infection, tamoxifen significantly decreased CD3⁺, CD3⁺/CD4⁺, CD3⁺/CD8⁺ and B220⁺ cells compared with both control groups (Figure 3A–D). However, tamoxifen did not affect the percentage of macrophages (MAC3⁺) (Figure 3E). In contrast, tamoxifen significantly increased NK⁺ (CD16⁺/CD32⁺) cells (Figure 3F). In general, infection increased all cell populations on day four post-infection except for the B220⁺ and CD16⁺/CD32⁺ cells; both populations decreased (Figure 3D,F). While on day eight post-infection, CD3⁺, CD3⁺/CD4⁺, CD3⁺/CD8⁺ and MAC-3⁺ cells decreased significantly ($p \leq 0.05$) compared with their respective counterpart group on day four post-infection (Figure 3A–C,E). However, on day eight post-infection, tamoxifen significantly decreased the percentage of B220⁺ (Figure 3D), it did not modify the percentage of macrophages (Figure 3E), but increased NK⁺ cells compared with both control groups ($p \leq 0.05$) (Figure 3F).

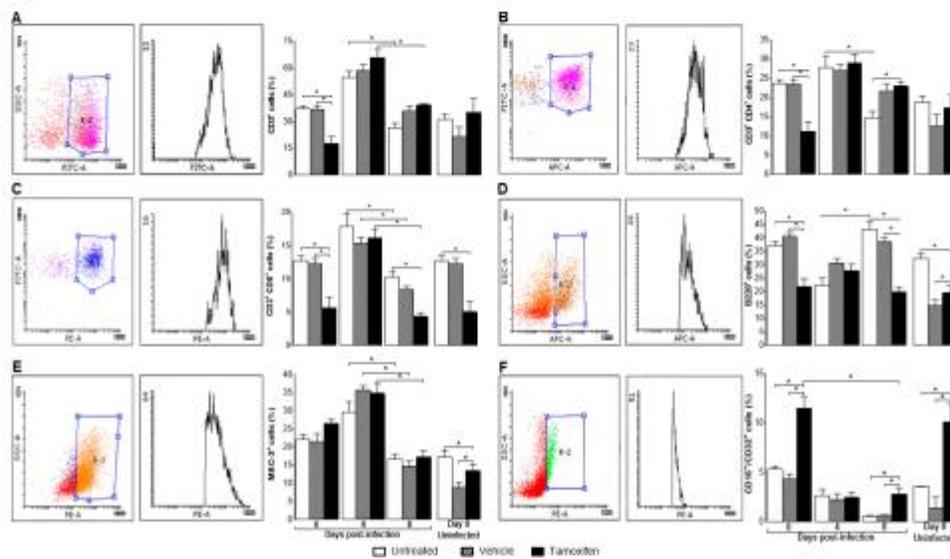


Figure 3. Tamoxifen decreased CD8⁺ and B220⁺ and increased NK cells in the spleen of *P. berghei* ANKA infected mice. Groups of female mice were treated with tamoxifen or vehicle or untreated as controls, were infected with *Plasmodium berghei* ANKA. At 0, 4, and 8 days post-infection, mice were sacrificed, and their spleens cells were stained with specific monoclonal antibodies and analysed by flow cytometry. Additionally, three control groups treated in the same way as the mice on day eight but uninfected ($n = 10$) were analysed as controls of tamoxifen effects in the absence of infection. The first box provides an example of how each cell population was selected according to the fluorescence emitted by the fluorochrome coupled to the specific antibody for that population and the cell complexity. The second box represents the histogram for each population, and the bars represent the mean \pm SEM of the percentage of cells in each group. (A) CD3⁺ lymphocytes; (B) CD3⁺/CD4⁺ lymphocytes; (C) CD3⁺/CD8⁺ lymphocytes; (D) B220⁺ (B lymphocytes); (E) Mac3⁺ (macrophages); (F) CD16⁺/CD32⁺ (NK cells). Asterisks represent statistically significant differences between groups, ($p \leq 0.05$), ($n = 10$) using a nested analysis test with a Bonferroni post hoc test.

2.4. Tamoxifen Modified Plasma Levels of Th1, Th2 and Th17 Cytokines from CBA/Ca Mice Infected with *Plasmodium berghei* ANKA

Tamoxifen significantly increased IFN- γ concentration in uninfected mice. On day zero post-infection, all cytokines exhibited a shallow concentration; no differences were detected between the groups. On day four post-infection, the concentration of all cytokines increased significantly ($p \leq 0.05$) compared to day zero post-infection, particularly in the infected untreated group (Figure 4A–G). On day eight post-infection, tamoxifen increased

IL-2, IL-4, TNF- α and IFN- γ compared to the same group on day four (Figure 4A,B,F,G). Interestingly, tamoxifen increased IL-6 and IFN- γ in uninfected mice (Figure 4C,G).

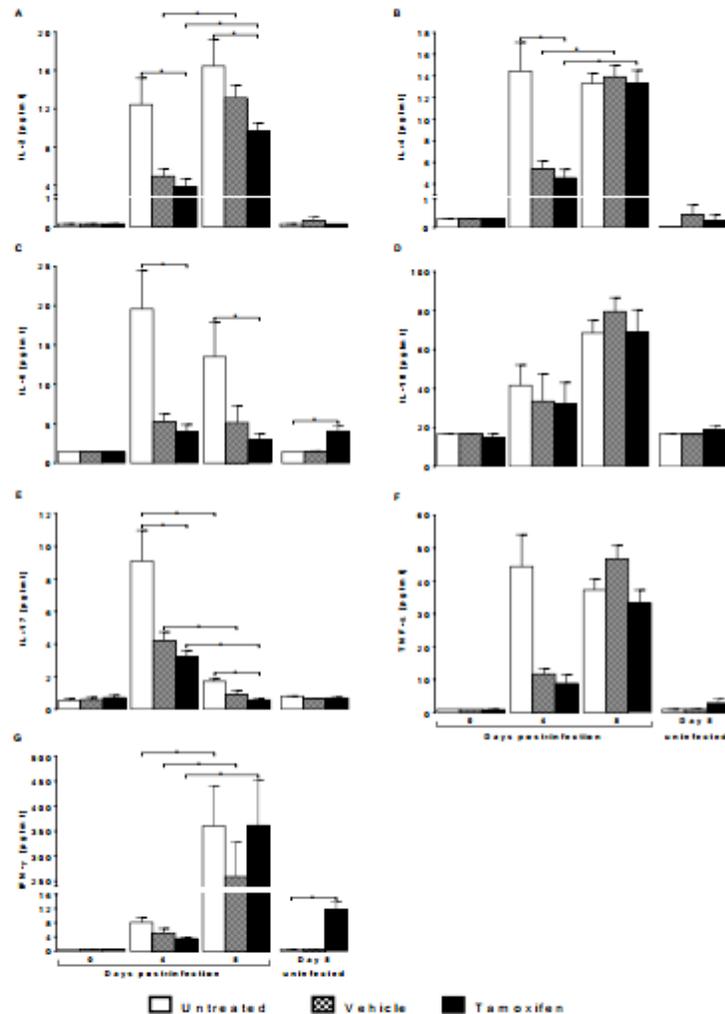


Figure 4. Tamoxifen decreased the levels of IL-2, IL-6, and IL-17 in CBA/Ca mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA. Groups of female CBA/Ca mice were treated with tamoxifen or vehicle or untreated as controls, then were infected with *Plasmodium berghei* ANKA. Additionally, three control groups treated in the same way as the mice on day eight but uninfected ($n = 10$) were analysed as controls of tamoxifen effects in the absence of infection. The histograms represent the plasma concentration of the following cytokines: (A) IL-2, (B) IL-4, (C) IL-6, (D) IL-10, (E) IL-17, (F) TNF- α and (G) IFN- γ 0, 4, and 8 days post-infection. The bars represent the means \pm SEM in each group. Asterisks represent the statistically significant difference among the groups, $p < 0.05$, using a nested analysis test ($n = 10$) and a post hoc Bonferroni test.

3. Discussion

For the first time, we show that tamoxifen, far from being parasitocidal, increases parasite load in *P. berghei* ANKA-infected mice. This drug also worsens the symptomatology by increasing the splenic index and decreasing haemoglobin concentration, body temperature and body weight. In addition, tamoxifen differentially affected immune response cells; it decreased CD3⁺CD8⁺ and B220⁺ cell populations and increased the number of NK⁺ cells. Finally, tamoxifen decreased circulating concentrations of IL-2, IL-6 and IL-17.

The interaction of oestrogens with their receptors activates different signalling pathways that modulate the expression of immune response genes [32]. We recently showed that parasitaemia of *Plasmodium berghei* ANKA-infected mice varies depending on 17 β -oestradiol concentration [20]. In this work, we found that tamoxifen, an estrogen receptor binding antagonist, increased parasitaemia. In contrast, Weinstock et al. showed that tamoxifen and its primary metabolite 4-HO-tamoxifen decreases parasitaemia in mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA [30]. A possible explanation for this difference is the time and dose of tamoxifen used, as Weinstock et al. administered a dose four times higher than ours. In addition, the strain of mice also generated differences in parasitaemia levels [33]. Weinstock group used a C57Bl/6 mutant strain of mice, and we used CBA/Ca mice.

That tamoxifen showed no antimalarial activity in CBA/Ca mice is in sharp contrast to other parasitic infections such as taeniasis [23], schistosomiasis [26], leishmaniasis [34] and trypanosomiasis [27]. The possible reasons for this result are diverse and complex; one possible explanation is that some parasites produce oestrogenic molecules [35], and tamoxifen interferes with the metabolism of both parasites and host [36]. Additionally, in *in vivo* studies, the parasite may be located inside different cells or organs, making tamoxifen inaccessible or requiring higher doses to be effective. It is also likely that both the parasite and the host metabolise the drug or dilute its effect by binding to other proteins or other possible receptors [37]. This could explain why we did not detect antimalarial activity and underlines the importance of validating the therapeutic effects of antimalarials *in vivo*.

In addition, it has been demonstrated that *P. berghei* infection causes splenomegaly by massive recruitment of mesenchymal stem cells to the spleen [38]. In this work, tamoxifen further increased the splenic index, particularly on day eight post-infection. This finding could be explained by the fact that by increasing parasitaemia, tamoxifen could increase antigenic stimulation in the spleen, promoting inflammation and cell recruitment in the spleen, as described by Del Portillo et al. and Zhao, et al. [39,40].

The increment in parasitaemia leads to hypothermia, weight loss, and anaemia in rodent malaria models [41–43]. All these disease complications were worsened in mice treated with tamoxifen. In fact, this drug caused weight loss and decreased haemoglobin concentration even in uninfected mice. One possible explanation is that tamoxifen decreases appetite and increases fat mobilisation in rats and mice [44–46]. In addition, it is likely that increased parasitaemia also contributed to higher erythrocyte destruction, which decreased haemoglobin concentration. Another possible explanation is that the metabolism of tamoxifen generated 4-OH-tamoxifen, which by binding to erythrocytes, increased its permeability and promoted lysis, as described by Cruz Silva in humans [47]. Our results show tamoxifen aggravates symptomatology in *P. berghei* ANKA-infected mice.

Since the spleen is the main organ where *Plasmodium* is eliminated [35], we analysed the effect of tamoxifen on the immune response cells in the spleen. Tamoxifen decreased the populations of CD3⁺/CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes and B220⁺ lymphocytes but increased the CD16⁺/CD32⁺ (NK) cells on day eight post-infection. The effects of tamoxifen on the immune response to malaria are indicated in red (Figure 5). In addition, tamoxifen decreased the concentration of IL-2, which is a cell differentiation and growth factor for T lymphocytes [48], which could explain the decrease in this cell population. Moreover, tamoxifen also reduced IL-6, which is a cytokine required to activate B cells as described

in C57BL/6J mice infected with *Plasmodium* [49]. Therefore, possibly the decreased IL-6 concentration induced by tamoxifen would reduce the number of B cells.

Additionally, tamoxifen also decreased IL-17 levels; interestingly, low IL-17 concentration is associated with severe malarial anaemia and multiple organ dysfunction [50–52]. Taken together, the alterations produced by tamoxifen in immune response cells as well as cytokines, at least, partly explain the worsening of malaria symptoms when tamoxifen is administered to *P. berghei* ANKA infected mice.

Although tamoxifen exhibits activity against different parasites, attention should be observed to its therapeutical use since it is not specific and may have effects other than those expected. In the case of malaria, it promoted the proliferation of *Plasmodium* and exacerbated symptomatology. Since tamoxifen is still used in breast cancer therapy, caution is suggested when administering tamoxifen to patients with breast cancer and malaria.

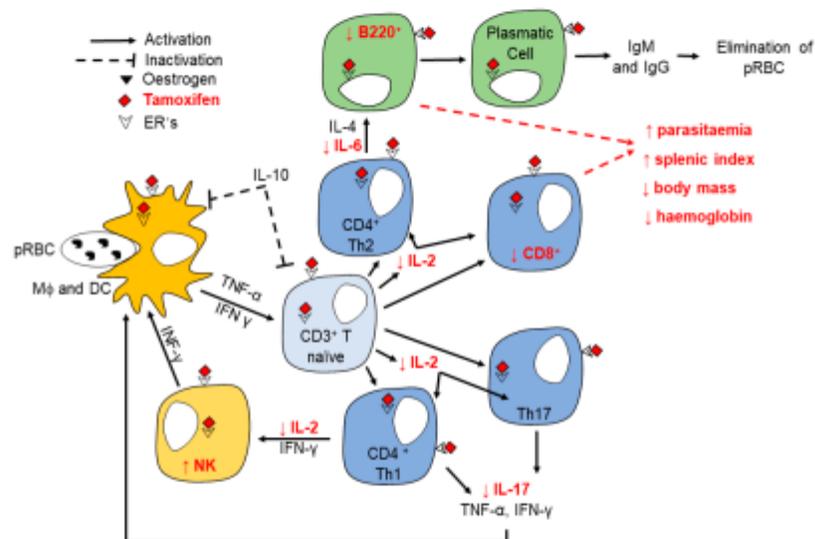


Figure 5. Effect of tamoxifen on the immune response of CBA/Ca mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA. Innate and adaptive immune responses are required to control erythrocyte infection with *Plasmodium*. Dendritic cells (DC) and macrophages (Mφ) phagocytose parasitised erythrocytes, then present parasite antigens to virgin CD3⁺; such interaction activates them to produce IL-2, promoting their proliferation and maturation to CD4⁺ Th1 cells. These last cells produce IFN-γ, which activates Mφ and NK cells, promoting parasite elimination. On the other hand, CD4⁺ cells produce IL-4 and IL-6, which are growth and differentiation factors for B220⁺ cells to mature into antibody-producing cells involved in parasite elimination. Tamoxifen effects are labelled in red. This drug increased the number of NK⁺ cells but decreased the CD3⁺CD8⁺ population; it also decreased the concentration of IL-2, IL-6, and IL-17, which could affect parasite clearance leading to increasing parasitaemia and the splenic index as well as decreasing body mass and haemoglobin concentration.

4. Materials and methods

4.1. Mice and Parasites

The mouse strain used (CBA/Ca) was initially donated by Dr William Jarra (National Institute for Medical Research, London, UK). The mice were reproduced, fed, and kept under a specific pathogen-free environment at the FES Zaragoza, UNAM animal house facilities. For the experiments, 12-week-old female mice were used. The animals were kept in the animal house at the FES Zaragoza-UNAM, in strict agreement with the institutional

and national official guideline NOM-062-ZOO-1999, certificate number 28/04/SO/3.4.1 for the use and care of laboratory animals.

Plasmodium berghei ANKA was also generously donated by Dr William Jarra. Parasites were cryopreserved under liquid nitrogen. For parasite activation, a vial was thawed and immediately injected into one mouse. When parasitaemia reached 20%, parasitised blood was extracted. Blood was diluted to infect the experimental groups of mice using an intravenous inoculation of 1×10^5 *Plasmodium berghei* ANKA-infected red blood cells in each mouse.

4.2. Experimental Design

Ninety CBA/Ca mice were divided into three groups; the first group was untreated, the second group was administered vehicle (1% alcohol diluted in saline), and the third group was administered tamoxifen diluted in the vehicle. All groups were infected with *Plasmodium berghei* ANKA. In addition, three groups of uninfected mice treated in the same way as the mice on day 8 ($n = 10$) were used as controls of tamoxifen effects in the absence of infection.

Body temperature, body weight and haemoglobin concentration were assessed daily. Ten mice from each group were sacrificed at 0, 4, and 8 days post-infection. On the days of sacrifice, blood and spleen were removed. Plasma was separated from the blood by centrifugation and stored in aliquots to quantify the concentration of Th1, Th2 and Th17 cytokines by flow cytometry. The spleen of each mouse was weighed and disaggregated, and cells were stained with fluorochrome-labelled monoclonal antibodies and analysed by flow cytometry.

4.3. Tamoxifen Administration

Mice were treated daily with tamoxifen (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) at a dose of 1 mg/kg body weight. We had previously calibrated the dose to achieve in vivo parasitocidal activity against *Taenia* [24]. Tamoxifen was diluted in a mixture of 1% ethanol in isotonic saline (vehicle). It was administered daily subcutaneously for 28 days before infection and for 8 days post-infection to achieve constant concentrations throughout the experiment.

4.4. Parasitaemia

A drop of tail blood was used daily to prepare thin blood smears, fixed with absolute methanol, and stained with 1:10 dilution of Giemsa stain (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). Parasite load was assessed by light microscopy using a 100 \times magnification in oil immersion lens using a Carl Zeiss Standard 20 microscope (Carl Zeiss LTD, Welwyn Garden City, UK). Parasitaemia was assessed by counting the number of parasitised red blood cells compared to the total red blood cells tested (200).

4.5. Body Temperature

The body temperature was recorded daily at the same time using an infrared thermometer (Thermofocus, 01500A/H1N1, Vedano Olana-Varese, Italy). Each mouse was immobilised, and the infrared beam was directed 5 cm from its abdomen.

4.6. Body Mass Variation

Each mouse was weighed daily using an electronic balance (Ohaus, Parsippany, NJ, USA); the weight recorded on the day of infection (day zero) was considered 0%. The percentage of weight variation (PWV) was calculated daily by the following equation: $PWV = ((A/B) \times 100) - 100$, where A is the weight of each mouse on a particular day, and B is the weight on day zero post-infection.

4.7. Haemoglobin (Hb) Levels

Daily, 2 μ L of tail blood were mixed with 498 μ L of Drabkin reagent (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and incubated for 5 min at room temperature in the dark. The absorbance was measured at 540 nm in a microplate reader (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific, Inc, Waltham, MA, USA). The Hb concentration was calculated using a commercial Hb standard (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

4.8. Splenic Index

At 0, 4 and 8 days post-infection, mice were weighed on an electronic balance (Ohaus), sacrificed, and the spleen was removed and weighed on an analytical balance (Sartorius, Göttingen, Germany). The splenic index was calculated as the ratio of the spleen weight and body mass for each mouse.

4.9. Quantification of Spleen Cell Populations by Flow Cytometry

The quantification of cell populations was assessed by multicolour flow cytometry as previously described [18]. Briefly, groups of mice treated with tamoxifen, vehicle or untreated, were infected with *P. berghei* ANKA. Mice were sacrificed 0, 4, and 8 days post-infection, and their spleens were removed and disaggregated using a nylon net. Additionally, three control groups of uninfected mice treated in the same way were used to assess the effects of tamoxifen in the absence of infection. Spleen cells were washed with sterile staining buffer (PBS, 2% SFB, 0.02 NaN₂) and stained using previously calibrated dilutions of commercial anti-mouse fluorochrome-coupled antibodies: FITC-antiCD3⁺, APC-antiCD4⁺, PE-antiCD8⁺, APC-antiCD19⁺, PE-anti-Mac-3⁺ and PE-antiCD16⁺/32⁺ antibodies. For this purpose, three combinations of antibodies were prepared: The first identified total T cells, T-helper, and cytotoxic T cells (CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺); the second combination identified B cells and macrophages (B220⁺ and anti-Mac-3⁺). The third only contained anti-CD16⁺/32⁺ to identify NK cells. To select the populations, first, the negative and positive region was defined in each dot plot. Three tubes were used for each population: the control of unstained cells, the control of cells stained with a single antibody coupled to the fluorochrome and the tube containing the isotype control. FITC-antiCD3 is a rat IgG2b antibody, and its isotype control was FITC-rat (IgG2b κ); APC-antiCD4 is a rat IgG2a antibody, its isotype control was APC-rat (IgG2a, κ); PE-CD8 is a rat IgG2a antibody, its isotype control was PE-rat (IgG2a, κ); APC-B220 is a rat IgG2a antibody, its isotype control was APC-rat (IgG1, κ); PE-MAC-3 is a rat IgG1 antibody, the isotype control was PE-rat (IgG1, κ). Finally, PE-CD16/32 is an IgG2a antibody, and its isotype control was PE-rat (IgG1 κ). A total of 10,000 cells were evaluated for each sample, and the percentage (%) of positive cells was calculated. All antibodies were purchased from Biolegend (Biolegend, San Diego, CA, USA). Stained cells were analysed using a FACSAria II flow cytometer (Beckton and Dickinson, San Jose, CA, USA); the data were examined with the FlowJo™ software (Beckton and Dickinson, Ashland, OR, USA).

4.10. Th1/Th2/Th17 Cytokine Quantification

At 0, 4, and 8 days post-infection, mice were sacrificed, and blood was extracted in heparinised tubes and centrifuged at 2000 \times g for 15 min. The plasma was recovered, aliquoted into two tubes and kept frozen at -20 °C until used. The levels of the cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ and IL-17a were assessed using a cytometric bead array (BD Mouse Th1/Th2/Th17 CBA Kit Biosciences-Pharmingen, Heidelberg, Germany). Briefly, 25 μ L of plasma were incubated for 2 h at room temperature in the dark with 25 μ L of bead mixture and the detection reagent. The supernatant was separated by centrifugation, and the beads were resuspended in 100 μ L of FACS liquid. The concentration of each cytokine was calculated using a commercial standard curve.

4.11. Statistical Analysis

Parasitaemia, temperature, body mass variation, and haemoglobin concentration data were analysed by repeated means analysis with a Bonferroni post hoc test and a significance of $p \leq 0.05$ ($n = 10$). The tamoxifen group was compared against the vehicle-treated and untreated groups on each day. This analysis was performed with the Graph Pad Prism 7 software (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA).

The data for splenic index, spleen cell populations and serum cytokine concentration were analysed using the nested treatment effect test 0, 4, and 8 days post-infection with a Bonferroni post hoc test, and significance of $p \leq 0.05$ ($n = 10$) in each group per day. The nested effect analysis was performed with Statgraphics (Centurion XVI software, The Plains, VA, USA).

Author Contributions: Conceptualisation: M.L.-H. Data curation: L.A.C.-C. Formal analysis: A.C.-S., J.M.-M. and L.A.C.-C. Funding acquisition: M.L.-H. Investigation: L.A.C.-C. and M.L.-H. Methodology: L.A.C.-C., J.A.-C., O.F.-R. and F.O.B.-G. Project administration: M.L.-H. Supervision: M.L.-H. and L.A.C.-C. Validation: L.A.C.-C. Writing—original draft: L.A.C.-C. Writing—review and editing: M.L.-H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by PAPIIT IN220417 and IN228620, DGAPA UNAM, awarded to Martha Legorreta Herrera. Luis A. Cervantes-Candelas, awarded the fellowship 743407 from the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACyT), this work is part of requirements for his PhD degree from the Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. Jesús Aguilar-Castro, Omar Fernández-Rivera and Fidel O Buendía-González are CONACyT fellows from the Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the agreement of the Research Committee and the Ethics, Bioethics and Biosafety Committee of the Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. Agreement Number 28/04-SO/3.4.1 and register FESZ-CE/16-118-02, dated 26 May 2020, as it complies with the bioethical principles for carrying out the research and with the guidelines established by the Research Committee.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: We thank Miriam Rodríguez-Sosa and Antonio Valencia Hernández for helpful discussion of results. We are grateful to Teresita de Jesús Nolasco-Pérez and Sofía Monserrat López-Padilla for help with experimental procedures. Additionally, we thank the animal house workers: Adriana Altamirano-Bautista, Román Hernández-Meza and Dolores Elizabeth Guzmán-Andrade, for taking care of the animals in this study. Finally, we thank the cytometric technician Guadalupe Gómez García for their help with cytometry.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. WHO. *World Malaria Report 2020: 20 Years of Global Progress & Challenges*; Licence: CCBY-NC-SA 3.0 IGO; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2020.
2. Landgraf, B.; Kollaritsch, H.; Wiedermann, G.; Wernsdorfer, W.H. Parasite density of *Plasmodium falciparum* malaria in Ghanaian schoolchildren: Evidence for influence of sex hormones? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1994**, *88*, 73–74. [[CrossRef](#)]
3. Zhang, Z.; Chen, L.; Saito, S.; Kanagawa, O.; Sando, F. Possible modulation by male sex hormone of th1/th2 function in protection against *Plasmodium chabaudi chabaudi* as infection in mice. *Exp. Parasitol.* **2000**, *96*, 121–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Cernetic, A.; Garver, L.S.; Jedlicka, A.E.; Klein, P.W.; Kumar, N.; Scott, A.L.; Klein, S.L. Involvement of gonadal steroids and gamma interferon in sex differences in response to blood-stage malaria infection. *Infect. Immun.* **2006**, *74*, 3190–3203. [[CrossRef](#)]
5. Nordqvist, J.; Bernardi, A.; Islander, U.; Carlsten, H. Effects of a tissue-selective estrogen complex on b lymphopoiesis and b cell function. *Immunobiology* **2017**, *222*, 918–923. [[CrossRef](#)]
6. Mohammad, I.; Starskaia, I.; Nagy, T.; Guo, J.; Yatkin, E.; Vaananen, K.; Watford, W.T.; Chen, Z. Estrogen receptor alpha contributes to t cell-mediated autoimmune inflammation by promoting t cell activation and proliferation. *Sci. Signal.* **2018**, *11*, 9415. [[CrossRef](#)]

7. Ghisletti, S.; Meda, C.; Maggi, A.; Vegeto, E. 17beta-estradiol inhibits inflammatory gene expression by controlling nf-kappab intracellular localization. *Mol. Cell Biol.* 2005, 25, 2957–2968. [\[CrossRef\]](#)
8. Acconcia, F.; Totta, P.; Ogawa, S.; Cardillo, I.; Inoue, S.; Leone, S.; Trentalance, A.; Muramatsu, M.; Marino, M. Survival versus apoptotic 17beta-estradiol effect: Role of er alpha and er beta activated non-genomic signaling. *J. Cell Physiol.* 2005, 203, 193–201. [\[CrossRef\]](#)
9. Marino, M.; Acconcia, F.; Trentalance, A. Biphasic estradiol-induced akt phosphorylation is modulated by pten via map kinase in hepg2 cells. *Mol. Biol. Cell* 2003, 14, 2583–2591. [\[CrossRef\]](#)
10. Robinson, D.P.; Hall, O.J.; Nilles, T.L.; Bream, J.H.; Klein, S.L. 17beta-estradiol protects females against influenza by recruiting neutrophils and increasing virus-specific cd8 t cell responses in the lungs. *J. Virol.* 2014, 88, 4711–4720. [\[CrossRef\]](#)
11. Maret, A.; Coudert, J.D.; Garidou, L.; Foucras, G.; Gourdy, P.; Krust, A.; Dupont, S.; Chambon, P.; Druet, P.; Bayard, F.; et al.; et al. Estradiol enhances primary antigen-specific cd4 t cell responses and th1 development in vivo. Essential role of estrogen receptor alpha expression in hematopoietic cells. *Eur. J. Immunol.* 2003, 33, 512–521. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Erlandsson, M.C.; Jonsson, C.A.; Lindberg, M.K.; Ohlsson, C.; Carlsten, H. Raloxifene- and estradiol-mediated effects on uterus, bone and b lymphocytes in mice. *J. Endocrinol.* 2002, 175, 319–327. [\[CrossRef\]](#)
13. Liao, Z.H.; Huang, T.; Xiao, J.W.; Gu, R.C.; Ouyang, J.; Wu, G.; Liao, H. Estrogen signaling effects on muscle-specific immune responses through controlling the recruitment and function of macrophages and t cells. *Skelet. Muscle* 2019, 9, 20. [\[CrossRef\]](#)
14. Tzehoval, E.; De Baetselier, P.; Ron, Y.; Tartakovsky, B.; Feldman, M.; Segal, S. Splenic b cells function as immunogenic antigen-presenting cells for the induction of effector t cells. *Eur. J. Immunol.* 1983, 13, 89–94. [\[CrossRef\]](#)
15. Zhang, X.; Liu, J.; Li, M.; Fu, Y.; Zhang, T.; Han, Q.; Liu, Q. Role of an estradiol regulatory factor-hydroxysteroid dehydrogenase (hsd) in *Toxoplasma gondii* infection and pathogenicity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2017, 174, 176–182. [\[CrossRef\]](#)
16. Trinconi, C.T.; Reimao, J.Q.; Coelho, A.C.; Uliana, S.R.B. Efficacy of tamoxifen and miltefosine combined therapy for cutaneous leishmaniasis in the murine model of infection with *Leishmania amazonensis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2016, 71, 1314–1322. [\[CrossRef\]](#)
17. Ambrosio, J.R.; Ostoa-Saloma, P.; Palacios-Arreola, M.I.; Ruiz-Rosado, A.; Sanchez-Orellana, P.L.; Reynoso-Ducoing, O.; Nava-Castro, K.E.; Martinez-Velazquez, N.; Escobedo, G.; Ibarra-Coronado, E.G.; et al. Oestradiol and progesterone differentially alter cytoskeletal protein expression and flame cell morphology in taenia crassiceps. *Int. J. Parasitol.* 2014, 44, 687–696. [\[CrossRef\]](#)
18. Legorreta Herrera, M.; Mosqueda Romo, N.A.; Nava Castro, K.E.; Morales Rodriguez, A.L.; Buendia González, F.O.; Morales Montor, J. Sex hormones modulate the immune response to *Plasmodium berghei* ANKA in CBA/Ca mice. *Parasitol. Res.* 2015, 114, 11. [\[CrossRef\]](#)
19. Aguilar-Castro, J.; Cervantes-Candelas, L.A.; Buendia-Gonzalez, F.O.; Nolasco-Perez, T.J.; Lopez-Padilla, M.S.; Fernandez-Rivera, O.; Cervantes-Sandoval, A.; Legorreta-Herrera, M. Dimorphic effect of 17beta-oestradiol on pathology and oxidative stress in experimental malaria. *Immunobiology* 2020, 225, 151873. [\[CrossRef\]](#)
20. Cervantes-Candelas, L.A.; Aguilar-Castro, J.; Buendia-Gonzalez, F.O.; Fernandez-Rivera, O.; Nolasco-Perez, T.J.; Lopez-Padilla, M.S.; Chavira-Ramirez, D.R.; Legorreta-Herrera, M. 17beta-estradiol is involved in the sexual dimorphism of the immune response to malaria. *Front. Endocrinol.* 2021, 12, 643851. [\[CrossRef\]](#)
21. Ahmad, I. Tamoxifen a pioneering drug: An update on the therapeutic potential of tamoxifen derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 2018, 143, 515–531.
22. Behjati, S.; Frank, M.H. The effects of tamoxifen on immunity. *Curr. Med. Chem.* 2009, 16, 3076–3080. [\[CrossRef\]](#)
23. Vargas Villavicencio, J.A.; Larralde, C.; Nava, M.A.D.L.; Escobedo, G.; Morales Montor, J. Tamoxifen treatment induces protection in murine cysticercosis. *J. Parasitol.* 2007, 93, 7. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Escobedo, G.; Palacios-Arreola, M.I.; Olivios, A.; Lopez-Griego, L.; Morales-Montor, J. Tamoxifen treatment in hamsters induces protection during taeniosis by *Taenia solium*. *Biomed. Res. Int.* 2013, 2013, 280496. [\[CrossRef\]](#)
25. Nicolao, M.C.; Elisondo, M.C.; Denegri, G.M.; Goya, A.B.; Cumino, A.C. In vitro and in vivo effects of tamoxifen against larval stage *Echinococcus granulosus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014, 58, 5146–5154. [\[CrossRef\]](#)
26. Oliveira, R.N.; Correa, S.A.P.; Vieira, K.M.; Mendes, T.; Allegratti, S.M.; Miguel, D.C. In vitro schistosomicidal activity of tamoxifen and its effectiveness in a murine model of schistosomiasis at a single dose. *Parasitol. Res.* 2019, 118, 1625–1631. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Landoni, M.; Pinero, T.; Soprano, L.L.; Garcia-Bournissen, F.; Fichera, L.; Esteva, M.I.; Duschak, V.G.; Couto, A.S. Tamoxifen acts on *Trypanosoma cruzi* sphingolipid pathway triggering an apoptotic death process. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019, 516, 934–940. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Miguel, D.C.; Yokoyama-Yasunaka, J.K.; Andreoli, W.K.; Mortara, R.A.; Uliana, S.R. Tamoxifen is effective against *Leishmania* and induces a rapid alkalization of parasitophorous vacuoles harbouring *Leishmania (leishmania) amazonensis* amastigotes. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007, 60, 526–534. [\[CrossRef\]](#)
29. Trinconi, C.T.; Reimao, J.Q.; Bonano, V.I.; Espada, C.R.; Miguel, D.C.; Yokoyama-Yasunaka, J.K.U.; Uliana, S.R.B. Topical tamoxifen in the therapy of cutaneous leishmaniasis. *Parasitology* 2018, 145, 490–496. [\[CrossRef\]](#)
30. Weinstock, A.; Gallego-Delgado, J.; Gomes, C.; Sherman, J.; Nikain, C.; Gonzalez, S.; Fisher, E.; Rodriguez, A. Tamoxifen activity against *Plasmodium* in vitro and in mice. *Malar. J.* 2019, 18, 378. [\[CrossRef\]](#)
31. Singh, N.; Puri, S.K. Interaction between chloroquine and diverse pharmacological agents in chloroquine resistant plasmodium yoelii nigeriensis. *Acta Trop.* 2000, 77, 185–193. [\[CrossRef\]](#)

32. Kovats, S. Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. *Cell Immunol.* 2015, 294, 63–69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Stevenson, M.M.; Riley, E.M. Innate immunity to malaria. *Nat. Rev. Immunol.* 2004, 4, 11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Trinconi, C.T.; Miguel, D.C.; Silber, A.M.; Brown, C.; Mina, J.G.M.; Denny, P.W.; Heise, N.; Uliana, S.R.B. Tamoxifen inhibits the biosynthesis of inositolphosphorylceramide in *Leishmania*. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 2018, 8, 475–487. [[CrossRef](#)]
35. Botelho, M.C.; Soares, R.; Vale, N.; Ribeiro, R.; Camilo, V.; Almeida, R.; Medeiros, R.; Gomes, P.; Machado, J.C.; Correia da Costa, J.M. *Schistosoma haematobium*: Identification of new estrogenic molecules with estradiol antagonistic activity and ability to inactivate estrogen receptor in mammalian cells. *Exp. Parasitol.* 2010, 126, 526–535. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Morales-Montor, J.; Larralde, C. The role of sex steroids in the complex physiology of the host-parasite relationship: The case of the larval cestode of *Taenia crassiceps*. *Parasitology* 2005, 131, 287–294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Nola, M.; Jukic, S.; Ilic-Forko, J.; Babic, D.; Uzarevic, B.; Petroveckii, M.; Suchanek, E.; Skrablin, S.; Dotlic, S.; Marusic, M. Effects of tamoxifen on steroid hormone receptors and hormone concentration and the results of DNA analysis by flow cytometry in endometrial carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 1999, 72, 331–336. [[CrossRef](#)]
38. Thakur, R.S.; Toussif, S.; Awasthi, V.; Sanyal, A.; Atul, P.K.; Punia, P.; Das, J. Mesenchymal stem cells play an important role in host protective immune responses against malaria by modulating regulatory t cells. *Eur. J. Immunol.* 2013, 43, 2070–2077. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Del Portillo, H.A.; Ferrer, M.; Brugat, T.; Martin-Jaular, L.; Langhorne, J.; Lacerda, M.V. The role of the spleen in malaria. *Cell Microbiol.* 2012, 14, 343–355. [[CrossRef](#)]
40. Zhao, Y.; Hosking, C.; Cunningham, D.; Langhorne, J.; Lin, J.W. Transcriptome analysis of blood and spleen in virulent and avirulent mouse malaria infection. *Sci. Data* 2020, 7, 253. [[CrossRef](#)]
41. Ageely, H.M.; Dawoud, H.A.; Heiba, A.A. Anemia, interleukin-10, tumor necrosis factor alpha, and erythropoietin levels in children with acute, complicated and uncomplicated malignant malaria in Jazan, Saudi Arabia. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 2008, 38, 359–370.
42. Esamai, F.; Mining, S.; Forsberg, P.; Lewis, D.H. A comparison of brain, core and skin temperature in children with complicated and uncomplicated malaria. *J. Trop. Pediatr.* 2001, 47, 170–175. [[CrossRef](#)]
43. Cross, C.E.; Langhorne, J. *Plasmodium chabaudi chabaudi* (AS): Inflammatory cytokines and pathology in an erythrocytic-stage infection in mice. *Exp. Parasitol.* 1998, 90, 220–229. [[CrossRef](#)]
44. Ferrer-Lorente, R.; Garcia-Pelaez, B.; Fernandez-Lopez, J.A.; Remesar, X.; Alemany, M. Tamoxifen does not prevent the mobilization of body lipids elicited by oleoyl-estrone. *Steroids* 2004, 69, 661–665. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Wade, G.N.; Heller, H.W. Tamoxifen mimics the effects of estradiol on food intake, body weight, and body composition in rats. *Am. J. Physiol.* 1993, 264, R1219–R1223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Zhao, L.; Wang, B.; Gomez, N.A.; de Avila, J.M.; Zhu, M.J.; Du, M. Even a low dose of tamoxifen profoundly induces adipose tissue browning in female mice. *Int. J. Obes.* 2020, 44, 226–234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Cruz Silva, M.M.; Madeira, V.M.; Almeida, L.M.; Custodio, J.B. Hydroxytamoxifen interaction with human erythrocyte membrane and induction of permeabilization and subsequent hemolysis. *Toxicol. In Vitro* 2001, 15, 615–622. [[CrossRef](#)]
48. Turka, L.A.; Walsh, P.T. IL-2 signaling and CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells. *Front. Biosci.* 2008, 13, 1440–1446. [[CrossRef](#)]
49. Sebina, I.; Fogg, L.G.; James, K.R.; Soon, M.S.F.; Akter, J.; Thomas, B.S.; Hill, G.R.; Engwerda, C.R.; Haque, A. IL-6 promotes cd4(+) t-cell and b-cell activation during *Plasmodium* infection. *Parasite Immunol.* 2017, 39, e12455. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Oyegue-Liabagui, S.L.; Bouopda-Tuedom, A.G.; Kouna, L.C.; Maghendji-Nzondo, S.; Nzoughe, H.; Tchitoula-Makaya, N.; Pegha-Moukandja, I.; Lekana-Douki, J.B. Pro- and anti-inflammatory cytokines in children with malaria in Franceville, Gabon. *Am. J. Clin. Exp. Immunol.* 2017, 6, 9–20.
51. Raballah, E.; Kempaiah, P.; Karim, Z.; Orinda, G.O.; Otieno, M.F.; Perkins, D.J.; Ong'echa, J.M. CD4 T-cell expression of ifn-gamma and il-17 in pediatric malarial anemia. *PLoS ONE* 2017, 12, e0175864. [[CrossRef](#)]
52. Herbert, F.; Tchitchek, N.; Bansal, D.; Jacques, J.; Pathak, S.; Becavin, C.; Fescl, C.; Dalko, E.; Cazenave, P.A.; Preda, C.; et al. Evidence of il-17, ip-10, and il-10 involvement in multiple-organ dysfunction and il-17 pathway in acute renal failure associated to *Plasmodium falciparum* malaria. *J. Transl. Med.* 2015, 13, 369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]