

Universidad Autónoma de Madrid
Departamento de Bioquímica - Facultad de Medicina
Programa de Doctorado en Biociencias Moleculares



Efectos de las hormonas tiroideas en la tolerancia a la malaria cerebral

Diego Rodríguez Muñoz
Madrid, 2022

Universidad Autónoma de Madrid
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina

Efectos de las hormonas tiroideas en la tolerancia a la malaria cerebral

Memoria de Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor dentro
del Programa Oficial de Posgrado en Biociencias Moleculares,
presentada por el Graduado en Biología Sanitaria:

Diego Rodríguez Muñoz

Directoras de tesis:

Dra. Susana Alemany de la Peña

Dra. Ana Aranda Iriarte

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina
Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols"
CSIC/UAM

***“El viaje es lo que nos trae
la felicidad, no el destino”***

El guerrero pacífico

Agradecimientos

Todas las etapas se terminan y la mía no es una excepción, mi doctorado en el B-15 ha concluido. Siempre he dicho que lo mejor de la vida son las personas. Mi Tesis Doctoral, al igual que mi experiencia durante estos años, no podría haberse llevado a cabo sin todos aquellos que procederé a citar afectuosamente en este emotivo apartado y sin todos aquellos que, aunque no mencione, me han ayudado directa o indirectamente a terminar este proyecto.

Todos los comienzos vienen dados por oportunidades y la que me diste Susana fue el primer granito de arena de esto. Gracias de corazón por lo vivido estos años. Hemos tenido nuestras discrepancias, nuestras afinidades, pero lo que es un hecho es que hemos conseguido juntos algo bonito y especial. Si hoy soy quien soy es gracias a ti y el hecho de que me sienta orgulloso de mi mismo denota que has hecho muy bien tu trabajo. Gracias a ti también Ana, tus directrices e ideas han sido un faro durante todo este proyecto.

Mi mentora y sobre todo mi amiga, Ángela. Esta Tesis es en gran parte responsabilidad tuya también. Aún me acuerdo del primer día y de cómo poco a poco me fuiste abriendo tu corazón y tu mente para enseñarme y ayudarme a ser el profesional que soy hoy. Gracias por cada pregunta resuelta, gracias por escucharme cuando lo he necesitado, por intentar dar lucidez a mis momentos dudas, y gracias y otra vez gracias por ser la persona que eres. No me olvido de tu maravillosa familia, sois estupendos.

Tampoco puedo dejar de hablar del B-15 sin mencionar al grupo de Castrillo. Antonio, gracias por ayudarme siempre con la mejor de tus sonrisas en los momentos que lo he necesitado. Y por supuesto gracias a ti también Marta, por tus consejos, por los momentos de risas, los piques en el pádel y las infinitas charlas sobre el mundo y la sociedad. Hiciste que todo fuese mucho más llevadero y eso siempre te lo agradeceré.

No me despido del B-15 en estos agradecimientos sin todas aquellas personas que, aunque han pasado de forma breve en mayor o menor medida durante mi estancia, habéis hecho más amena y mucho más feliz mi etapa allí, destacando en especial a María, viniste la última amiga, pero hiciste que este último empujón fuese mucho más sencillo.

El B-11, mi segunda casa. Creo que no sería capaz de enumerar todas las veces que he cruzado la puerta de ese laboratorio buscando dudas, material, reactivos, un momento de risas, o simplemente para despedir el día. Gracias a todos y cada uno de los miembros que han pasado por ese laboratorio que me habéis ayudado a terminar mi etapa y que habéis sido además de buenos compañeros, buenos amigos. Omar, gracias por ayudarme a encontrar “mi hueco” entre partidos de fútbol y buenos momentos en el departamento. Marta, Natalia y Rafa, un buen trío de compañeros, pero sobre todo de amigos, fuisteis la esencia del B-11 y me impregnasteis de ella durante vuestra etapa. Sois unas personas maravillosas. Rocío, tardamos en conocernos a fondo, pero siempre tendrás en mí a un fan incondicional de tus novelas compañera. Mi “superpibe”, Dani, guerrero en la cancha y la poyata, coincidir con tus etapas en el B-11 han sido una delicia. Y en último lugar quiero destacar a Sergio, la última gran amistad que me llevo de ese laboratorio, cerrar este ciclo contigo capitaneando ese barco ha sido un auténtico placer. Eres un ser de luz amigo y me siento muy afortunado de haber podido conocerte.

El departamento además de ser mi lugar de oficio ha sido un buen lugar donde, por suerte en la gran mayoría de sus rincones y laboratorios, he podido conocer grandes personas. Manu del B-16, eres todo alegría y buen corazón. Pablo, amigo, confidente, mi buen drive del pádel

y mi gran experto en hacerme reír. Tu sucesor Miguel, una mente privilegiada inundada de honradez y saber estar. Gracias al Dr. Miguel Fernández Moreno, la viva imagen de la templanza y buen hacer, ha sido un goce absoluto compartir buenos momentos contigo. Nuestras charlas y reflexiones siempre perdurarán en mi interior.

Gracias a la persona más espléndida del servicio de limpieza, Cari, eres una bellísima persona. Gracias a todo el servicio del animalario, con especial mención a los técnicos: Coral, Raquel, María, Leti y a la jefa del servicio, Marta Miró. Con mención honorífica a Cris, el corazón todo el servicio. Creo que no sería capaz de enumerar todas las cosas que he aprendido de ti amiga mía, eres una profesional estupenda, una madre genial y sobre todo una de las mejores personas que he podido conocer durante mi estancia allí, ¡infinitas gracias!

No me puedo olvidar, aunque fueseis de otro departamento de ‘los Guerra’. Manu, Martina, y Michella. Hicisteis todo más divertido y fácil, sois fantásticos.

Quiero cerrar este ciclo de agradecimiento a la gente del Departamento con la persona más especial que he conocido durante mi etapa, Raúl. Las grandes amistades se construyen progresivamente, cada día y forjando unos cimientos y vínculos que con mimo y cuidado dan soporte a la relación. Creo que es la mejor forma de describir mi amistad contigo amigo mío. Jamás pensé que de mi primera experiencia laboral pudiese llevarme una amistad tan profunda y plena como la que siento hacia ti. Mi admiración, mi respeto y sobre todo el cariño que te tengo son infinitos.

Gema, Javi, Alex y Helena vuestra amistad ha sido siempre un empuje infinito desde que os conozco, esta etapa no ha sido una excepción, gracias por estar ahí y por cuidar de mí en mis momentos de mayor debilidad. Los amigos son la familia que se elige, y con vosotros me siento ‘en casa’.

Por último y no menos importante, dejo lugar a la expresión de gratitud a mi familia. En primer lugar, padre, madre, gracias por apoyarme incondicionalmente con mis decisiones, por sacrificaros tanto, por darme la mejor educación posible y sobre todo vuestro más sincero amor. Santi, Víctor, mis hermanos, mi sostén emocional durante la infancia y mis amigos en la adultez, nuestro gran vínculo ha sido una llave maestra de energía durante toda mi vida y también durante este periodo.

Y en último lugar, a mi pareja, mi compañera de viaje, mi hogar, Natalia. Tu impulso ilimitado durante estos años y tu fe en mí en cada momento del doctorado han sido inagotables. Gracias por ofrecerme tu amor de una forma plena y completa, y por aceptar el reto de compartir tu viaje vital a mi lado.

Gracias a todos, OS QUIERO.

A mi tío Loreto

Resumen/Abstract

Resumen

La malaria es una enfermedad devastadora que se transmite a humanos mediante la picadura de un mosquito que inocula el parásito *Plasmodium*. Según la OMS, cada año se diagnostican 200 millones de nuevos casos, siendo el año pasado la causa del fallecimiento de más de 400000 personas, lo que supone un grave problema de salud pública. La malaria cerebral es la forma más severa de la enfermedad y afecta principalmente a niños menores de 5 años. Está caracterizada por una rotura de la barrera hematoencefálica, infiltración de células del sistema inmune en el cerebro, y edema cerebral, lo cual conlleva un aumento de la presión intracraneal, compresión de los vasos cerebrales, formación de hemorragias y muerte. Las áreas donde la malaria es endémica coinciden parcialmente, principalmente en África, con regiones de deficiencia de yodo. Este elemento, es un componente esencial de la molécula de las hormonas tiroideas y un bajo consumo de yodo en la dieta puede generar un déficit de hormonas tiroideas causando hipotiroidismo. A pesar de que el hipotiroidismo y la malaria cerebral son importantes problemas de salud mundial, el impacto del hipotiroidismo del hospedador sobre el desarrollo y pronóstico de la malaria cerebral aún no ha sido estudiado.

En esta Tesis Doctoral se demuestra que el hipotiroidismo, mediante un mecanismo de tolerancia, confiere protección contra la malaria cerebral en el modelo experimental murino de infección por *Plasmodium berghei Anka (PbA)*. El hipotiroidismo aumenta la supervivencia de los ratones tras la infección con *PbA*, sin alterar la parasitemia, disminuyendo la presión intracraneal y el daño cerebral sin prevenir la rotura de la barrera hematoencefálica o la infiltración de células inmunes. Estos cambios están acompañados por una importante alteración en el perfil metabólico de los cerebros de los animales hipotiroideos, y con una mejor adaptación metabólica y respiratoria a la infección. La protección del hipotiroidismo contra la malaria cerebral es revertida parcialmente por el tratamiento con un inhibidor de la Sirtuina 1, mientras que un tratamiento activador de Sirtuina 1 en animales eutiroideos induce tolerancia a la enfermedad, reduciendo el daño cerebral, la presión intracraneal y consecuentemente la letalidad. Estos datos indican que la Sirtuina 1 podría ser una nueva diana terapéutica interesante para el tratamiento de la malaria cerebral, por aumentar la tolerancia a la enfermedad.

Abstract

Malaria is a devastating disease that is transmitted to humans through the bite of a mosquito that inoculates the *Plasmodium* parasite. According to the WHO, each year are diagnosed more than 200 million new cases, being last year the cause of death of more than 400000 people, which constitutes a serious public health problem. Cerebral malaria is the most severe form of the disease and mainly affects children under 5 years of age. This disease is characterized by the disruption of the blood brain barrier, immune cells infiltration and brain edema, which leads to an increase of the intracranial pressure, compression of the brain blood vessels, generation of hemorrhages and death. Areas of endemic malaria, mainly in Africa, partially overlap with endemic regions of iodine deficiency. This element is an essential component of the thyroid hormones molecule, and a low iodine intake consequently generates a deficit of thyroid hormones that causes hypothyroidism. Although hypothyroidism and cerebral malaria are important global health problems, the impact of host hypothyroidism on the development and outcome of cerebral malaria has not been yet studied.

This Doctoral Thesis shows that hypothyroidism, through a tolerance mechanism, confers protection against cerebral malaria in an experimental murine model of cerebral malaria caused by infection with *Plasmodium berghei Anka (PbA)*. Hypothyroidism improves the survival of mice after infection with *PbA*, without altering the pathogenic load, reducing intracranial pressure and brain damage, although it does not prevent, breakdown of the blood-brain barrier or infiltration of immune cells into the brain. These changes are associated with important alterations in the metabolomic profile of the hypothyroid brains and with an improved metabolic and respiratory adaptation of the animal to the infection. The protection of hypothyroidism is partially reversed after treatment with a Sirtuin1 inhibitor, while treatment with a Sirtuin 1 activator in euthyroid animals induces tolerance to the disease, reducing brain damage, intracranial pressure and consequently lethality. These results suggest that Sirtuin 1 could be an interesting novel therapeutic target for the treatment of cerebral malaria.

Índice

Índice

Abreviaturas	19
Introducción	26
1. Malaria	26
1.1. Situación actual	26
1.2. Tipos de parásito	27
1.3. Ciclo del parásito	29
1.4. Modelos animales de la malaria	30
1.5. Patogénesis y respuesta inmune	31
1.5.1. Bazo	31
1.5.2. Cerebro	32
2. Tolerancia a la enfermedad	34
2.1. Tolerancia a la enfermedad en malaria	34
2.2. Metabolismo y tolerancia a la enfermedad	36
3. Hormonas tiroideas	39
3.1. Producción de las hormonas tiroideas	39
3.2. Mecanismo de acción de las hormonas tiroideas	40
3.3. Hormonas tiroideas en situaciones de enfermedad grave	44
3.4. Déficit de iodo	45
Objetivos	48
Materiales y métodos	51
Resultados	67
- Capítulo I: Relevancia del estado tiroideo en el modelo animal de infección con <i>PbA</i>	67
- Capítulo II: Caracterización fisiopatológica del modelo de hipotiroidismo murino y su respuesta a la infección por <i>PbA</i>	73
- Capítulo III: Alteraciones metabólicas tras la infección con <i>PbA</i>	92
Discusión	103
Conclusiones	115
Bibliografía	118
Anexos	135

Abreviaturas

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ALT: Alanina aminotransferasa.

AMPK: Proteína quinasa activada por adenosina monofosfato (del inglés *adenosin monophosphate-activated protein kinase*).

ARN: Ácido ribonucleico.

ATG: Genes relacionados con la autofagia (del inglés *autophagy related gene*).

ATP: Trifosfato de adenosina (del inglés *adenosin triphosphate*).

Av: Promedio (del inglés *average*).

BCA: Ácido bicinconínico (del inglés *bicinchoninic acid*).

CAD: Carbamil fosfato sintetasa (del inglés *carbamoyl-phosphate synthetase*).

CCL: del inglés *C-C motif chemokine ligand*.

CCR: del inglés *C-C chemokine receptor*.

CD: del inglés *cluster of differentiation*.

CoA: Coenzima A.

CXCL: del inglés *C-X-C motif chemokine ligand*.

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol.

DBD: Dominio de unión al ADN (del inglés *DNA binding domain*).

DIO: Desiodasa.

DIT: Diyodo-tirosina.

DMEM: Medio de Eagle modificado por Dulbecco (del inglés *Dulbecco's Modified Eagle Medium*).

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DON: 6-diazo-5-oxo-L-norleucina.

DTPA: Ácido dietilentriamino pentaacético (del inglés *diethylenetriamine pentaacetic acid*).

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

Abreviaturas

EIF4E: Factor de inicio de traducción eucariótica 4 (del inglés *eukaryotic translation initiation factor 4E*).

FA: Ángulo de inclinación (del inglés *flip angle*).

FACS: Clasificador de células activadas por fluorescencia (del inglés *fluorescent activated cell sorter*).

FBS: Suero fetal bovino (del inglés *fetal bovine serum*).

FOV: Campo de visión (del inglés *field of view*).

FOXO1: del inglés *Forkhead box protein O1*.

GLUT: Transportador de glucosa (del inglés *glucose transporter*).

GTPasa: Guanosina trifosfatasa (del inglés *guanosine triphosphatase*).

HBBS: Solución salina balanceada de Hank (del inglés *Hanks' balanced salt solution*).

HEPES: Ácido 4-(2- hidroxietil) piperazin-1-iletanosulfónico (del inglés *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*).

HIF1- α : Factor 1-alfa inducible por hipoxia (del inglés *hypoxia-inducible factor 1-alpha*).

HMGCoa: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA.

HPRT: Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (del inglés *hypoxanthine phosphoribosyltransferase*).

HT: Hormonas tiroideas.

I.p.: Intraperitoneal.

IACUC: Comité institucional del cuidado y uso de animales (del inglés *Institutional Animal Care and Use Committees*).

ICAM: Molécula de adhesión intercelular (del inglés *intercellular adhesion molecule*)

ICV: Intracerebroventricular.

IFN- γ : Interferón gamma.

IL: Interleucina.

LKB1: Quinasa hepática B1 (del inglés *liver kinase B1*).

Ly6C: Complejo de antígeno linfocitario 6 (del inglés *lymphocyte antigen 6 complex*).

Abreviaturas

MACS: Clasificador de células activadas magnéticamente (del inglés *magnetic activated cell sorting*).

MC: Malaria cerebral.

MCT: Transportador de monocarboxilato (del inglés *monocarboxylate transporter*).

MIT: Monoyodotirosina.

Mo-DCs: Células dendríticas derivadas de monocitos (del inglés *monocytes derived dendritic cells*).

MRI: Resonancia magnética de imagen (del inglés *magnetic resonance imaging*).

MS: Malaria Severa.

MTHFD2: Metilentetrahidrofolato deshidrogenasa 2 (del inglés *methylenetetrahydrofolate dehydrogenase*).

mTORC1: Diana en mamíferos del complejo de rapamicina 1 (del inglés *mammalian target of rapamycin complex 1*).

mUIC: Mediana de la concentración de yodo en la orina (del inglés *median urinary iodine concentration*).

NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido.

NF-Kb: Factor nuclear kappa b (del inglés *nuclear factor kappa b*).

NK: del inglés *Natural Killers*.

NMR: Resonancia magnética nuclear (del inglés *nuclear magnetic resonance*).

Nrf2: Factor nuclear 2 relacionado con el eritroide 2 (del inglés *nuclear released factor 2*).

NTIS: Síndrome de la enfermedad no tiroidea (del inglés *nonthyroidal illness syndrome*).

OATPs: Polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (del inglés *organic anion transporting polypeptides*).

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PbA: Plasmodium Berghei Anka.

PbNK65-E: Plasmodium berghei NK65 – Edimburgo.

PbNK65-NY: Plasmodium berghei NK65 – Nueva York.

Abreviaturas

PBS: Tampón fosfato salino (del inglés *phosphate buffered saline*).

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *polymerase chain reaction*).

Pepck: Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (del inglés *phosphoenolpyruvate carboxykinase*).

PfEMP1: Proteína-1 de membrana eritrocitaria de *Plasmodium falciparum*.

PGC1- α : Coactivador del receptor gamma 1-alfa de los activadores de la proliferación de los peroxisomas (del inglés *peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator*).

PTU: Propiltiouracilo.

PVDF: Fluoruro de polivinilideno.

p70 S6K: Proteína ribosómica S6 quinasa (del inglés *ribosomal protein S6 kinase*).

RAPTOR: Proteína reguladora asociada a mTOR (del inglés *regulatory-associated protein of mTOR*).

RER: Cociente de intercambio respiratorio (del inglés *respiratory exchange ratio*).

RHEB7: Homólogo de Ras enriquecido en el cerebro (del inglés *Ras homolog enriched in brain*).

RIA: Radioinmunoensayo (del inglés *radioimmunoassay*).

Rpm: Revoluciones por minuto.

rT3: T3 reversa.

RXR: Receptor X de retinoides.

S.E.M: Error estándar de la media (del inglés *standard error of the mean*).

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*).

Sham: Simulado.

Sirt1: Sirtuína 1.

SNC: Sistema Nervioso Central.

SREBP: Proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides (del inglés *sterol regulatory element-binding proteins*).

Abreviaturas

TE: Tiempo de eco.

TGB: Globulina de unión a tiroxina (del inglés *thyroxine-binding globulin*).

Th1: Linfocitos T colaboradores 1 (del inglés *T helper 1*).

TLRs: del inglés *Toll-like receptor*.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa (del inglés *tumor necrosis factor-alpha*).

TREs: Elementos de respuesta a hormonas tiroideas (del inglés *thyroid hormones response elements*).

TRH: Hormona liberadora de tirotropina (del inglés *thyrotropin-releasing hormone*).

TRs: Receptores de hormonas tiroideas (del inglés *thyroid hormones receptors*).

TSC2: Complejo de esclerosis tuberosa 2.

TSH: Hormona estimulante del tiroides o tirotropina (del inglés *thyroid stimulating hormone*).

TSP: Ácido trimetilisilpropanoico.

VCAM: Molécula de adhesión a la célula vasculares (del inglés *vascular cell adhesion molecule*).

Introducción

Introducción

1. Malaria

1.1. Situación actual

La enfermedad de la malaria o paludismo es una de las enfermedades parasitarias de mayor relevancia a nivel mundial debido a la alta mortalidad, morbilidad e impacto socioeconómico que ocasiona en la población humana. El agente etiológico de la enfermedad en mamíferos es un protozoo perteneciente al género *Plasmodium*. En humanos, se transmite mediante vectores artrópodos pertenecientes a distintos géneros de dípteros, como *Anopheles*, *Aedes* o *Culex* (1).

Cada año se diagnostican más de 200 millones de nuevos casos causando, según datos del último informe publicado por la OMS, más de 400.000 decesos (2). La distribución de la enfermedad, pese a los avances científicos y desarrollo de nuevas terapias frente al patógeno, abarca más de 87 países endémicos, en especial regiones con altas tasas de pobreza (3): el Sur de Asia, algunas regiones de Europa del Este, América Latina (Centro-América y Sudamérica) y África, donde se producen el 90% de los decesos y casos de la enfermedad (Figura 1) (2,4).

Los mecanismos de profilaxis (mosquiteras, sprays insecticidas), los fármacos antimaláricos como la cloroquina o artemisina, y la vacuna RTS/S (40% de eficacia) han permitido que la incidencia y la mortalidad de la enfermedad decayese en la última década de manera notable (2).

En la actualidad se están llevando a cabo grandes avances científicos en la lucha contra la enfermedad, como el desarrollo de instrumentos o herramientas genéticas y biotecnológicas que sirvan para el control de las poblaciones de vectores o bien el avance en el desarrollo de vacunas antimaláricas más efectivas contra el patógeno como, por ejemplo, la vacuna R21/MM aprobada recientemente con una eficacia entre el 70-80% (2, 5).

Pese a ello, el lento progreso en la lucha contra la enfermedad, la capacidad de resistencia del parásito a muchas de las terapias farmacológicas, los niveles de pobreza y la difícil accesibilidad de la población de los países endémicos a unos servicios de salud de calidad, hacen que la malaria continúe siendo un problema de salud global de alto impacto (3).

Introducción

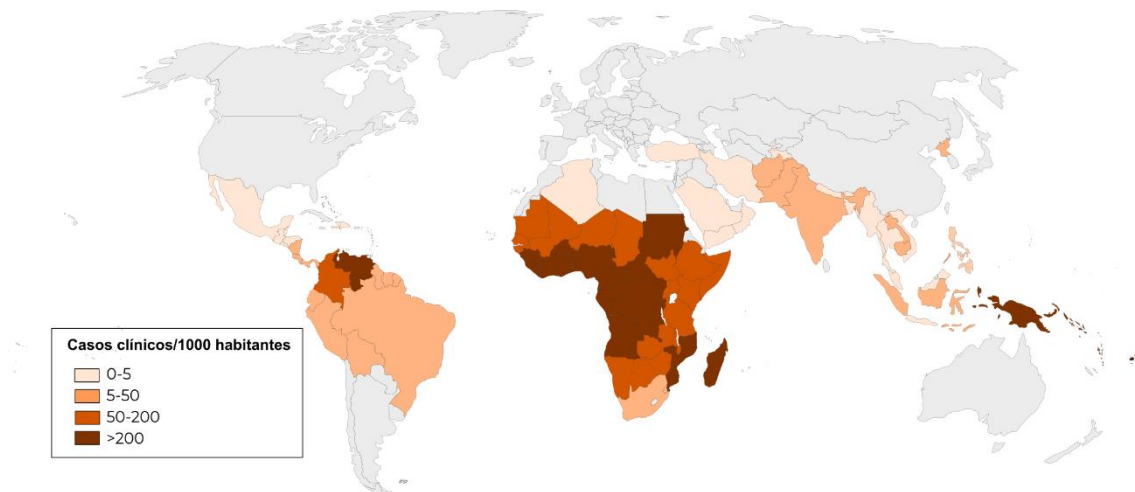


Figura 1 - Mapa de incidencia de malaria a nivel global. Incidencia de casos clínicos de malaria mundial (por cada 1000 personas) en 2019 (2).

1.2. Tipos de parásito

En humanos existen 5 especies distintas de *Plasmodium* que causan malaria: *vivax*, *ovale*, *malariae*, *knowlesi* y *falciparum* (6).

Plasmodium vivax es un parásito común en áreas templadas del Sudeste asiático, Etiopía, y Latinoamérica, siendo responsable del mayor número de casos de malaria en América central y del Sur, ya que es capaz de sobrevivir a condiciones desfavorables por poder estar latente como hipnozoito durante años (1, 8). La diferencia de prevalencia del patógeno en los distintos continentes en los que sigue latente, América y África, es debida entre otros motivos a que la población residente en los países de África es negativa para el antígeno Duffy, una proteína que se encuentra en la superficie de los glóbulos rojos y que es determinante para la invasión por este parásito (1, 6, 7).

Plasmodium ovale, es responsable del 0,5-10.5% de los casos de malaria a nivel global. Tiene una distribución geográfica que abarca África subsahariana, el océano Pacífico, Timor e Indonesia. Existen dos subespecies, *Plasmodium ovale curtisi* y *Plasmodium ovale wallikeri*. Normalmente este parásito está asociado a una baja mortalidad y morbilidad, pero puede llegar a causar complicaciones, como síndrome respiratorio agudo, insuficiencia renal, ictericia o incluso la muerte (1, 8).

Plasmodium malariae, geográficamente localizado en todo el mundo, pero con especial presencia en el oeste africano. Este protozoo causa el proceso infeccioso más suave de

Introducción

malaria, pero se ha reportado que en casos de infección crónica el paciente puede sufrir esplenomegalia y daño renal en casos de infección crónica (1, 4).

Plasmodium Knowlesi se reportó inicialmente como causante de una enfermedad parasitaria propia de primates no humanos, pero se han observado casos de zoonosis a humanos. De manera circunstancial, puede causar complicaciones clínicas severas (hiperparasitemia, fiebre, disfunción hepatorenal) típicas de *Plasmodium falciparum* y en determinadas circunstancias puede ser letal (1, 4, 9, 10).

Plasmodium falciparum, es el parásito que causa la mayor tasa de mayor morbilidad y mortalidad en la parte del África sub-Sahariana, donde ocurren en torno al 90% de las muertes y casos (1, 4, 6), causando en esta región durante la última década cerca de 1200 muertes de niños menores de cinco años al día (2). Además, es capaz de sobrevivir en otras áreas tropicales alrededor de todo el mundo (2).

Este parásito causa el mayor número de casos de Malaria Severa (MS) (11), un término que engloba un abanico amplio de síntomas con un cuadro clínico de gravedad y cuyo desarrollo viene determinado por la influencia de factores como la edad, exposición al parásito o el estado del sistema inmune (6, 12). Estas afecciones se caracterizan por un desarrollo de síndromes o complicaciones graves que pueden combinarse o actuar de manera individual: anemia severa; hipoglucemia; disfunción hepatorenal o síndrome respiratorio agudo entre otros (12, 13). Una de las formas de la MS, la malaria durante el embarazo, es un factor de riesgo, ya que *P.falciparum* es capaz de expresar receptores que reconocen la vasculatura de la placenta, incrementando notablemente el riesgo de aborto (1, 12).

La malaria con afectación al cerebro, la malaria cerebral (MC), es la manifestación más letal de la enfermedad (12, 14). Pese a la disminución de contagios en la última década, la tasa de mortalidad de la malaria cerebral se sitúa cerca del 10% en niños menores de 5 años a nivel global (6, 12). Está caracterizada por una disrupción de la barrera hematoencefálica, entrada de células inmunes al cerebro y edema cerebral, lo cual produce un aumento de la presión intracraneal, compresión de los vasos cerebrales y hemorragias. Este cuadro clínico provoca fuertes alteraciones de la conciencia y un alto impacto neurológico en los pacientes, que pueden sufrir desde convulsiones, parálisis parcial o completa y coma, y en última instancia, la muerte. (1, 6, 11, 12).

La alta tasa de mortalidad de la MC causada por *P.falciparum* en niños (1, 6, 11, 12), así como la falta de tratamientos neuro-protectores suponen la necesidad de seguir buscando estrategias de investigación que se centren en aportar conocimiento para el desarrollo de

Introducción

nuevas terapias contra esta enfermedad, siendo esto el epicentro de trabajo de este proyecto de investigación de Tesis Doctoral.

1.3. Ciclo del parásito

El ciclo comienza con la picadura del mosquito, el cual, introduce los esporozoitos en la dermis, dónde pueden ser destruidos y drenados por el sistema linfático (1, 6) (Figura 2). Gracias a su capacidad de motilidad deslizante, los esporozoitos abandonan aleatoriamente la dermis y penetran en el torrente sanguíneo. Una vez alcanzada la circulación sanguínea, viajan a los sinusoides hepáticos e infectan los hepatocitos donde se completará el ciclo exoeritrocítico (1, 4, 13).

Durante el transcurso de éste, el parásito se “envuelve” en una estructura que lo separa del citoplasma celular, denominada vacuola parasitófora, donde es capaz de dividir su núcleo numerosas veces y de desarrollar una nueva forma parasitaria, el esquizonte, que puede llegar a contener hasta 30.000 células hijas o merozoitos en su interior (14).

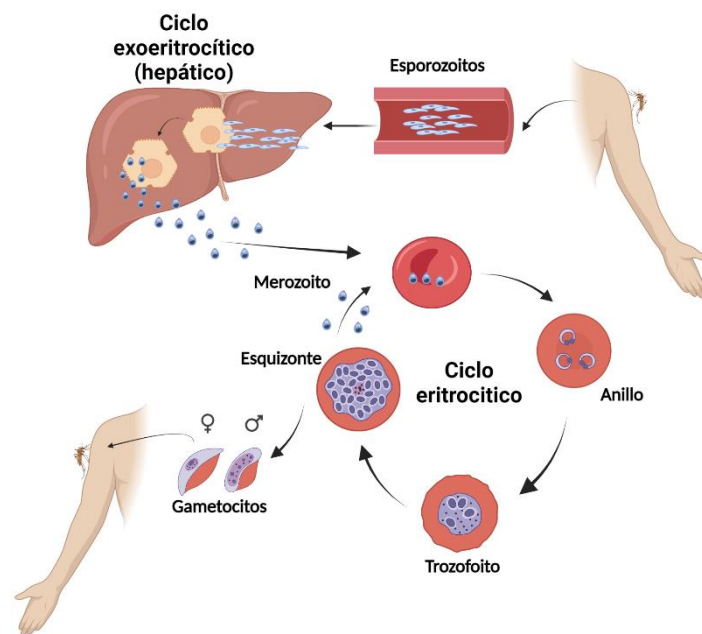


Figura 2 - Ciclo del *Plasmodium falciparum*.

El hepatocito infectado se lisa y libera los merozoitos (vacuolas contenedoras de merozoitos) al torrente sanguíneo, donde en un tiempo de 48-72 horas se liberarán los merozoitos que invadirán los glóbulos rojos comenzando el ciclo intraeritrocítico (13, 15). Una vez dentro del glóbulo rojo, el merozoito pasa por un proceso de multiplicación con distintos estadios en función del estado nutricional en el que se encuentra el parásito. Este mecanismo se inicia con una forma parasitaria joven en forma de anillo, que se va desarrollando hasta abarcar casi la totalidad del eritrocito, momento en el cual pasa a llamarse trofozoito, una forma parasitaria muy activa metabólicamente, que va ingiriendo el contenido citoplasmático del hematíe. Tras esto, el trofozoito comienza el proceso de esquizogonia eritrocítica, dividiendo su núcleo e induciendo la síntesis de las proteínas necesarias para el transcurso de este, finalizando con

Introducción

la producción de los esquizontes que contendrán varias decenas de merozoitos (1, 4, 16, 17, 18).

La degradación de la hemoglobina del eritrocito por parte del parásito supone un paso determinante en el transcurso del ciclo de este. Este proceso catabólico genera el grupo hemo, un metabolito que, por su toxicidad, puede suponer un riesgo para el desarrollo del parásito. Para contrarrestar el daño oxidante de este metabolito el parásito polimeriza la hematina (residuo derivado de la degradación parcial de la hemoglobina) generando la hemozoína, también conocida como pigmento malárico, que permanece en la vacuola digestiva del parásito (1, 4, 19).

La lisis del eritrocito supone la liberación de los merozoitos al torrente sanguíneo que volverán a infectar distintos eritrocitos, repitiendo el ciclo eritrocítico de nuevo. Una pequeña parte de estos merozoitos pueden transformarse en gametocitos, las formas sexuales e infectivas del parásito que, en caso de una nueva picadura del vector, invaden al mosquito e inician el ciclo de reproducción sexual en el aparato digestivo del mismo y la nueva formación de un ooquiste que desarrollará los esporozoitos que iniciarán el siguiente ciclo de infección del parásito (Figura 2) (1, 4, 20).

1.4. Modelos animales para el estudio de la malaria

Actualmente no existe ningún modelo experimental animal que sea capaz de recapitular en su totalidad la MS causada por *P.falciparum*. La infección por *Plasmodium yoelii*, *Plasmodium vinckei*, *Plasmodium chabaudi* o algunas cepas de *Plasmodium berghei* como *P.berghei* NK65 Edimburgo (*PbNK65-E*) o *P.berghei* NK65 Nueva York (*PbNK65-NY*) son modelos parasitarios muy utilizados en el ratón para recrear algunos de los síntomas más graves de la enfermedad, incluyendo la anemia severa, pero sin causar daño cerebral (21, 22). Para el estudio de la malaria cerebral, el mejor modelo es la infección por el *Plasmodium berghei Anka* (*PbA*) en ratones C57BL/6J, ya que la enfermedad producida en el ratón por este parásito, pese a obviar el ciclo exoeritrocítico de la infección convencional en humanos ya que a los animales se les inyectan eritrocitos ya infectados, guarda numerosas similitudes con el proceso patológico causado por *P.falciparum* en el hombre (21, 23).

Se ha demostrado que el desarrollo de la enfermedad depende en gran manera de la relación parásito-hospedador, ya que, pese a que la infección por *PbA* en ratones C57BL/6J es un modelo de MC ampliamente utilizado por la comunidad científica, este parásito no es capaz

Introducción

de causar MC en todas las cepas de ratones. En ratones DBA/2, el *PbA* sólo causa un síndrome cerebral no fatal, y en ratones de la cepa BALB/c el parásito no produce ninguna afección en el cerebro (22, 23).

El modelo de infección de ratones C57BL/6J con *PbA* reproduce entre 5 y 7 días muchos de los síntomas de la MC como ataxia, debilidad, encorvamiento, convulsiones, parálisis, coma y la muerte. A nivel celular, el incremento en los niveles de citocinas y la activación del endotelial cerebral con incremento de ICAM-1, VCAM-1 y P-Selectina, son muy similares a los que ocurren en humanos (22, 24).

La rotura de la barrera hematoencefálica, confirmada gracias a ensayos con Azul de Evans, es otra característica común de la infección causada por *PbA* y *P.falciparum*. También se ha observado el secuestro de eritrocitos infectados y de leucocitos en el tejido cerebral (linfocitos T CD8⁺, macrófagos y monocitos) de manera similar a lo que ocurre en humanos, un hecho crucial para el desarrollo de la patología (21, 24, 25).

Asimismo, se ha observado que el modelo de infección por *PbA* causa en el ratón un aumento de la presión intracraneal inducido por el edema vasogénico. Este suceso, que conduce a una herniación del tallo cerebral con muerte celular en esta zona que contiene el centro respiratorio, se asemeja también a lo descrito en humanos tras la infección por *P.falciparum* (24, 25).

1.5 Patogénesis y respuesta inmune

1.5.1. Bazo

El bazo tiene un papel crucial en la respuesta inmunológica frente a la malaria, debido a su importancia en la inducción de la respuesta inmune innata y adaptativa, el reciclaje del hierro y la eliminación de eritrocitos senescentes o dañados cuando sufren el proceso de infección por *Plasmodium* (26).

Uno de los procesos más característicos que se observan tras la infección por *P.falciparum* en humanos es la esplenomegalia (26). Esta misma reacción ha sido observada en el bazo de ratones infectados con *PbA*, que sirve como modelo experimental del proceso infeccioso producido por *P.falciparum* en humanos (27).

En la malaria, tanto en modelos de roedores como en humanos, se ha descrito que la función de eliminación en el bazo de los eritrocitos infectados o deformados por el *Plasmodium* es un proceso determinante en el desarrollo de la infección (28, 29). Asimismo, es importante

Introducción

reseñar la relevancia de las distintas poblaciones celulares esplénicas en la resistencia del huésped a la enfermedad. Los monocitos proinflamatorios y las células dendríticas son una fuente importante de citoquinas proinflamatorias y de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno que ayudan a generar un microambiente propicio para la destrucción de *Plasmodium* por parte de las células fagocíticas tanto en la malaria murina como humana (30, 31). Los macrófagos, en especial los de la pulpa roja del bazo, son los principales encargados de la eliminación de los eritrocitos infectados (26). Los monocitos, a su vez, también tienen un papel determinante en el transcurso de la enfermedad, al ser una fuente principal de generación de macrófagos y células dendríticas específicas (30).

Las células dendríticas tienen un papel crítico en la activación de los linfocitos T, a través de los TLRs, como el TLR9, y de la activación de las células natural killers (NK) gracias a su capacidad de producción de IL-12 (32). Los linfocitos T CD8⁺, una vez activados son capaces de contribuir a la eliminación de los eritrocitos infectados por parte de los macrófagos induciendo mediante un sistema de Fas-ligando, la expresión de la fosfatidilserina en la superficie de las células eritrocíticas infectadas y facilitando su fagocitosis por parte del macrófago (33). La activación de las NK por parte de las células dendríticas permite a éstas últimas comenzar a secretar IFN- γ , promoviendo la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ a Th1, un paso determinante para la adquisición de la inmunidad frente a las infecciones por *Plasmodium* (34). Asimismo, está descrita la capacidad de los linfocitos T CD4⁺ de condicionar a las células fagocíticas para la eliminación del *Plasmodium* y de colaborar con los linfocitos B para la génesis de anticuerpos antimaláricos (35).

1.5.2. Cerebro

Estudios en pacientes en África y Asia han descrito algunos de los signos neurológicos principales de la MC: rotura de la barrera hematoencefálica, hemorragias intracerebrales, edema, incremento del tamaño del cerebro y aumento de la presión intracraneal (12). En el modelo murino de malaria experimental con *PbA* también se ha descrito la aparición de estos síntomas durante la infección (36).

Una de las proteínas más relevantes para la patogenicidad del parásito es la proteína PfEMP1, una proteína expresada por el parásito una vez ha invadido el eritrocito. PfEMP1, además de ser la responsable de la variación antigénica para evadir la respuesta inmune, controla la capacidad de citoadherencia de los eritrocitos infectados a receptores de las células endoteliales de los capilares sanguíneos en diferentes órganos, incluido el cerebro, lo que se

Introducción

correlaciona directamente con la gravedad de la enfermedad (37, 38). La citoadherencia no es exclusiva del tejido endotelial activado. El parásito también es capaz de mediar la unión de los hematíes infectados con otros eritrocitos no infectados (fenómeno conocido como *rossetting*), e incluso con plaquetas activadas, creando así acúmulos de células infectadas y no infectadas que obstruyen el flujo sanguíneo en las zonas de adhesión en el cerebro (37, 38).

La falta de nutrientes y la hipoxia debidas a la obstrucción microvascular por los eritrocitos infectados y las rosetas formadas incapacitan a las células del tejido cerebral para mantener el potencial de membrana por las bombas de Na^+/K^+ dependientes de ATP. Esto podría facilitar la desregulación de la homeostasis acuosa celular, permitiendo la génesis de un edema vasogénico que se ha observado mediante resonancia magnética como una característica frecuente tanto en pacientes con signos avanzados de MC como en modelos experimentales murinos de MC (39, 40).

El proceso sistémico inflamatorio en el endotelio cerebral, más la pérdida de la capacidad citoprotectora de los receptores de proteína C en dicho endotelio, que sirven de unión de los eritrocitos infectados con el endotelio cerebral, también han sido descritos como causas determinantes para la formación del edema (12). Consecuentemente, el incremento de la compresión cerebral puede causar la herniación del tallo cerebral dentro del foramen magnum con consecuencias letales para la supervivencia del individuo (40).

En modelos experimentales de malaria cerebral se ha descrito que los macrófagos y monocitos, durante el transcurso de la infección, generan numerosas citocinas como $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\alpha$ o $\text{IL-1}\beta$, que a través de la circulación sanguínea activan el endotelio cerebral. A su vez, las células endoteliales liberan nuevas citocinas como CCL2, CCL4, CXCL4 y CXCL8 que producen el reclutamiento de linfocitos T CD4^+ y CD8^+ al cerebro (36, 41, 42). La activación de los linfocitos T tiene un papel muy relevante en el desarrollo de la patogenicidad de la MC experimental. En modelos murinos se ha descrito, que los linfocitos T CD8^+ , una vez alcanzan el lecho vascular cerebral, liberan proteasas como la granzima B y la perforina, que de manera indirecta inducen la apoptosis de las células endoteliales facilitando la ruptura de la barrera hematoencefálica y contribuyendo de manera determinante a la patogenicidad del parásito (43, 44). Se ha descrito una población de monocitos Ly6C^+ crítica para el reclutamiento de los linfocitos T CD8^+ en el sistema nervioso central (SNC) y para el desarrollo de la malaria murina experimental (45). Asimismo, en este modelo se ha descrito que la exposición de los monocitos del bazo al $\text{IFN-}\gamma$ genera una subpoblación de células dendríticas que son capaces de migrar al cerebro, las células dendríticas derivadas de monocitos o Mo-DCs, siendo esta subpoblación celular la mayoritariamente localizada en el

Introducción

SNC de los ratones con malaria cerebral. Las Mo-DCs tienen un rol importante en la inducción de la neuro inflamación característica de la malaria cerebral mediante la expresión de la citoquina CCR5 (30).

2. Tolerancia a la enfermedad

La tolerancia a la enfermedad es una estrategia de defensa de los organismos vivos basada en mecanismos del control y limitación del daño en los tejidos, que previene de los efectos más severos de los patógenos (virulencia) sin alterar la carga patogénica de éstos (46). La respuesta es específica según el tipo de patógeno y no excluyente del resto de los mecanismos del sistema inmune para proteger al individuo (46, 47). Este mecanismo ocurre en distintas especies animales evolutivamente muy alejadas, como las moscas, roedores o humanos, en respuesta a infecciones de patógenos virales, bacterianas, fúngicas y protozoarias (48, 49, 50).

2.1. Tolerancia a la enfermedad en malaria

En relación con la malaria, se han descrito en la literatura científica distintos mecanismos de tolerancia a la enfermedad que parecen tener una influencia notoria en su desarrollo.

En el proceso de la invasión eritrocítica por *Plasmodium*, el factor de transcripción nuclear eritroide (Nrf2) se induce en respuesta al estrés oxidativo y es importante en el proceso de tolerancia a la enfermedad (51). El *Plasmodium* durante el proceso de digestión de la hemoglobina del eritrocito genera una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno que causan un estrés oxidativo elevado. Este proceso incrementa el daño causado por el parásito, pudiendo desencadenar graves consecuencias (52). Esto ha supuesto que la evolución humana haya permitido en zonas endémicas de malaria la mejor adaptación a la enfermedad de poblaciones que tienen una mutación en la cadena β de la hemoglobina, que sin influir en los niveles de parasitemia, les permite contrarrestar uno de los mecanismos de patogénesis del parásito al impedir la digestión de la hemoglobina mutada, un proceso dependiente del factor de transcripción Nrf2 (49, 52, 53).

La alimentación durante 8 semanas con una dieta rica en grasa también previene el desarrollo de la MC inducida por *PbA* en el ratón. Los ácidos grasos tienen un impacto relevante en el transcurso de la enfermedad, ya que la administración de ácidos grasos tras la infección protege de la MC y reduce el impacto fisiopatológico a nivel del hígado, disminuyendo los acúmulos de hemozoína y los niveles de alanina aminotransferasa (ALT), un marcador de daño hepático (54).

Introducción

El sistema adrenal tiene un efecto determinante en la tolerancia a la infección por *PbNK65-E* o *PbNK65-NY*. La adrenalectomía de ratones, 14 días antes de la infección, eleva los niveles de citocinas circulantes en cerebro, pero no en hígado ni pulmón, y aumenta significativamente la letalidad. Asimismo, está descrito en distintos modelos experimentales de malaria que los niveles de glucosa circulantes decrecen durante la infección por *Plasmodium*. La hipoglucemia en ratones previamente adrenalectomizados es mucho más marcada, siendo la causa de la mayor letalidad de la enfermedad. La administración de glucocorticoides a los animales adrenalectomizados es suficiente para mejorar los niveles de glucemia y disminuir la expresión de citoquinas en el cerebro, mejorando consecuentemente la supervivencia del animal a la infección sin influir en los niveles de parasitemia (55).

Se ha descrito que los linfocitos T activados, muy relevantes en la evolución de la patogenicidad de la malaria, importan grandes cantidades de glutamina al cerebro e incrementan la expresión de glutaminasa (56). La glutamina tiene un papel determinante en la actividad de los linfocitos T CD8⁺ en el cerebro durante el proceso de infección por *PbA* en modelos murinos (85). El DON es un análogo de la glutamina, capaz de inhibir la importación de glutamina a nivel celular y la expresión de las tres isoformas de la glutaminasa. Además, el tratamiento con DON fue suficiente para rescatar a los animales de la MC, incluso cuando ya presentaban signos de daño neurológico, disminuyendo levemente los niveles de parasitemia en el cerebro, recuperando la integridad de la barrera hematoencefálica y limitando la actividad de los linfocitos T CD8⁺ (57).

De igual modo, el metabolismo glucídico tiene un rol determinante en el desarrollo de la MC durante el proceso infeccioso en modelos murinos similares a *P.falciparum*. El uso de un análogo no metabolizable de la glucosa, la desoxiglucosa, metabolito que inhibe la glucólisis, previene el desarrollo de la MC sin alterar los niveles de parasitemia. La desoxiglucosa, no reduce la infiltración de células inmunes en el cerebro ni tampoco mejora la integridad de la barrera hematoencefálica, pero reduce el riesgo de micro trombosis cerebral causado durante el proceso de infección, otro suceso determinante de la letalidad del parásito (58).

Introducción

2.2. Metabolismo y tolerancia a la enfermedad

Cada vez hay más evidencias de que el estado metabólico modula la respuesta a distintos procesos infecciosos como estrategia para alcanzar un proceso de tolerancia. El estado metabólico en los procesos de sepsis ha ganado relevancia al tener un rol crítico en la capacidad del huésped para garantizar la supervivencia a infecciones de distinta etiología (59). Existen tres enzimas que tienen un papel esencial en la regulación del metabolismo.

Sirtuina 1. La Sirtuina 1 (Sirt1) es una enzima dependiente de NAD^+ que modula el metabolismo mediante el proceso de desacetilación de determinados reguladores transcripcionales o proteínas que controlan el gasto energético y el estado metabólico (60). En condiciones de bajo estado energético, como el ayuno, la restricción calórica o el ejercicio, el incremento de los niveles de NAD^+ estimula la actividad de Sirt1 (61, 62, 63). Del mismo modo, en condiciones de alto estado energético, que disminuyen los niveles celulares de NAD^+ , como la respuesta inflamatoria aguda, se reduce la actividad de Sirt1 (64). Además, se ha demostrado la capacidad de Sirt1 de intervenir en la autofagia, desacetilando algunos de los genes implicados en el mecanismo, como los *ATG* (65). A su vez, se ha determinado su implicación en el metabolismo de la glucosa. Se ha observado la capacidad de Sirt1 de tener un efecto positivo frente a la intolerancia a la glucosa inducida por dieta grasa en ratones (66, 67). También se determinó que, en respuesta a un estímulo de glucosa, Sirt1 controla la inducción de la secreción de insulina en las células β pancreáticas mejorando la tolerancia a la glucosa (68, 69). Uno de los efectos más importantes de Sirt1 es la regulación de la respuesta a la inflamación mediante la desacetilación de p65, una subunidad de $\text{NF-}\kappa\text{B}$, el factor transcripcional más determinante en la respuesta inflamatoria (70).

AMPK: Esta enzima es un sensor crucial de la energía celular. Se activa gracias a la quinasa LKB1, que cuando decaen los niveles intracelulares de energía, fosforila AMPK promoviendo la producción de ATP (71, 72). Su implicación en el metabolismo y estado energético es muy amplia (72), ya que activa rutas catabólicas en respuesta a la ingesta de glucosa a través del aumento del transportador GLUT 4 en membrana de las fibras musculares durante el ejercicio o a través del transportador GLUT 1 en otros tipos celulares (73, 74). Una vez se ha producido la entrada de glucosa al interior de la célula, induce la glucólisis (75); aumenta la entrada de ácidos grasos vía CD36 a través de vesículas en los miocitos cardíacos (71); causa la β -oxidación de ácidos grasos e induce la biogénesis mitocondrial y la autofagia (76).

Introducción

La AMPK también está implicada en la regulación de rutas de carácter anabólico, gracias a su capacidad de fosforilación de proteínas determinantes en dichas rutas. La AMPK induce la fosforilación de las siguientes enzimas provocando su inhibición: la acetil CoA carboxilasa que regula la síntesis de ácidos grasos (77), la glicero fosfato acil-transferasa que regula la síntesis de fosfolípidos y triglicéridos de tipo I (78), la HMG CoA reductasa implicada en la síntesis del colesterol (79) y la glucógeno sintetasa que regula la producción de glucógeno (80). Asimismo, la AMPK inhibe procesos de síntesis proteica a través de la fosforilación de la proteína RAPTOR y regula la actividad factores de transcripción implicados en la producción de la ARN polimerasa 1, necesaria para la síntesis de ARN ribosomal (81, 82).

mTORC1. Este complejo enzimático es un regulador determinante del crecimiento y proliferación celular, por lo que su implicación en los procesos metabólicos es muy amplia (83). mTORC1 regula la síntesis de proteínas mediante la activación esencial de dos de sus sustratos, la quinasa S6 p70 (p70 S6K) y el factor de transcripción EIF4E (84, 85). Ambas proteínas se fosforilan por mTORC1 y activan diversos sustratos necesarios para el proceso de síntesis de proteínas (84, 85). A su vez, mTORC1 es sensible a las variaciones en la concentración de aminoácidos citosólicos y extracelulares, como se ha podido observar con las concentraciones de leucina y arginina citosólicas, las cuales son moduladas por los complejos proteicos GATOR1 y GATOR2 gracias a la inducción de mTORC1 (83, 86).

mTORC1 también juega un papel importante en el control del metabolismo glucídico, lipídico y de nucleótidos. mTORC1 interviene en el metabolismo lipídico para garantizar la disponibilidad de suficientes ácidos grasos y esteroides que van a formar parte de las membranas celulares necesarias para el crecimiento celular. Esto lo lleva a cabo fundamentalmente mediante la interacción con el factor de transcripción SREBP, el cual a través de una ruta dependiente de p70 S6K, se transloca al núcleo y activa la expresión de genes implicados en la biosíntesis lipídica (87, 88). Asimismo, mTORC1 induce la expresión de proteínas necesarias para la síntesis de nucleótidos mediante la activación de la metilentetrahidrofolato deshidrogenasa (MTHFD2), esencial para la síntesis de purinas. Adicionalmente, mediante la fosforilación por p70 S6K activa la carbamil fosfato sintetasa o CAD, proteína esencial en las rutas de síntesis de pirimidinas (89, 90). La modulación del metabolismo glucídico por mTORC1 es mediada fundamentalmente por el aumento de los niveles de HIF1- α , que, en condiciones de alta demanda energética, se activa por mTORC1 y estimula la transcripción de distintas enzimas glucolíticas (91).

Introducción

mTORC1 es también sensible a las variaciones energéticas. En situaciones de hipoglucemia o de baja disponibilidad de nutrientes su actividad se inhibe notablemente, modulando la actividad de procesos muy relevantes para la supervivencia celular, como la autofagia (92).

La alta implicación de estos tres reguladores metabólicos en múltiples rutas y mecanismos biológicos hace evidente que sus funciones deben estar interconectadas (Figura 3). En efecto, AMPK, que se activa en condiciones de bajos niveles de ATP, inhibe mTORC1 porque los procesos que activa este requieren un alto gasto energético. Esta inhibición se produce a distintos niveles (93). En situaciones de estrés energético (baja disponibilidad de glucosa), AMPK fosforila Raptor, una proteína que facilita el reclutamiento a mTORC1 de algunas proteínas de su vía de señalización. AMPK también fosforila a TSC2, un corregulador negativo de mTORC1 que modula la activación de la GTPasa Rheb que actúa directamente sobre mTORC1, bloqueando de este modo su actividad funcional (93). Sirt1 y AMPK interactúan recíprocamente (94). Así, Sirt1 activa LKB1, una proteína con actividad de supresor tumoral, desacetilándola y activando consecuentemente AMPK (95, 96). Por otro lado, AMPK es capaz de activar Sirt1, incrementando los niveles de NAD⁺, un cofactor determinante de su actividad (97). Sirt1 es capaz de cooperar con mTORC1 en células madre intestinales a través de la desacetilación de p70 S6K, permitiendo su disponibilidad como sustrato para la consecuente fosforilación y activación por mTORC1 (98). A su vez, AMPK sufre una fosforilación inhibitoria por parte de varias quinasas, entre las que se incluye p70 S6K, en una región diferente a la treonina 172, la región común responsable de su activación (99). Esta inhibición puede constituir un mecanismo regulador negativo para apagar la señalización por la AMPK y favorecer de este modo la proliferación celular.

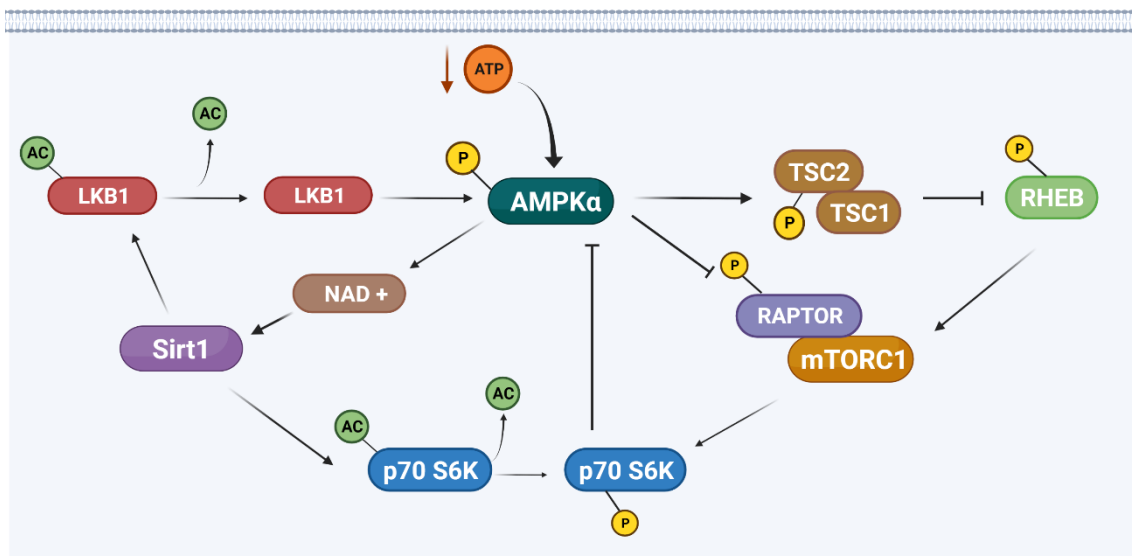


Figura 3 - Mapa de las interacciones principales entre Sirt1-mTORC1-AMPK α .

Introducción

3. Hormonas tiroideas

3.1. Producción de las hormonas tiroideas

Las hormonas tiroideas (HT) mayoritarias T3 (3,3',5-triiodotironina) y T4 (tiroxina) son secretadas por la glándula tiroides mediante la regulación de un eje hipotálamo-hipofisario con un sistema de retroalimentación negativa. Su síntesis es estimulada por la hormona estimulante del tiroides (TSH) o tirotropina, que se produce en la hipófisis anterior y que es a su vez regulada por la hormona liberadora de tirotropina (TRH), que se secreta en el hipotálamo. En condiciones normales existe un mecanismo de retroalimentación negativa por el cual las HT circulantes inhiben la secreción de TSH y TRH. Cuando los niveles séricos de T3 y T4 disminuyen, la TRH es secretada por el hipotálamo y se une a sus receptores en las células tirotropas de la hipófisis anterior causando la liberación de TSH (Figura 4). A su vez, la TSH se une a receptores acoplados a proteínas G en las células de los folículos tiroideos, regulando los procesos de importación de iodo y la síntesis de las HT (100, 101).

El iodo entra de forma activa en el tiroides mediante el transportador de sodio/iodo, donde se convierte a iodo elemental mediante la enzima peroxidasa tiroidea. Ciertos residuos de tirosina de la proteína tiroglobulina, que se encuentra en el lumen de los folículos tiroideos, son iodados para formar monoyodotirosina (MIT) y diyodotirosina (DIT) en un proceso conocido como organificación del iodo. El acoplamiento posterior de una molécula de MIT y una molécula de DIT da lugar a la formación de T3 (con tres moléculas de iodo), mientras que el acoplamiento de dos moléculas de DIT dan lugar a la T4 (con cuatro moléculas de iodo). La proteólisis de la tiroglobulina libera la T4 y la T3 que pasan al torrente sanguíneo. El transportador sanguíneo de las hormonas en la sangre es la globulina de unión a tiroxina (TGB), producida en el hígado (Figura 4) (102).

Introducción

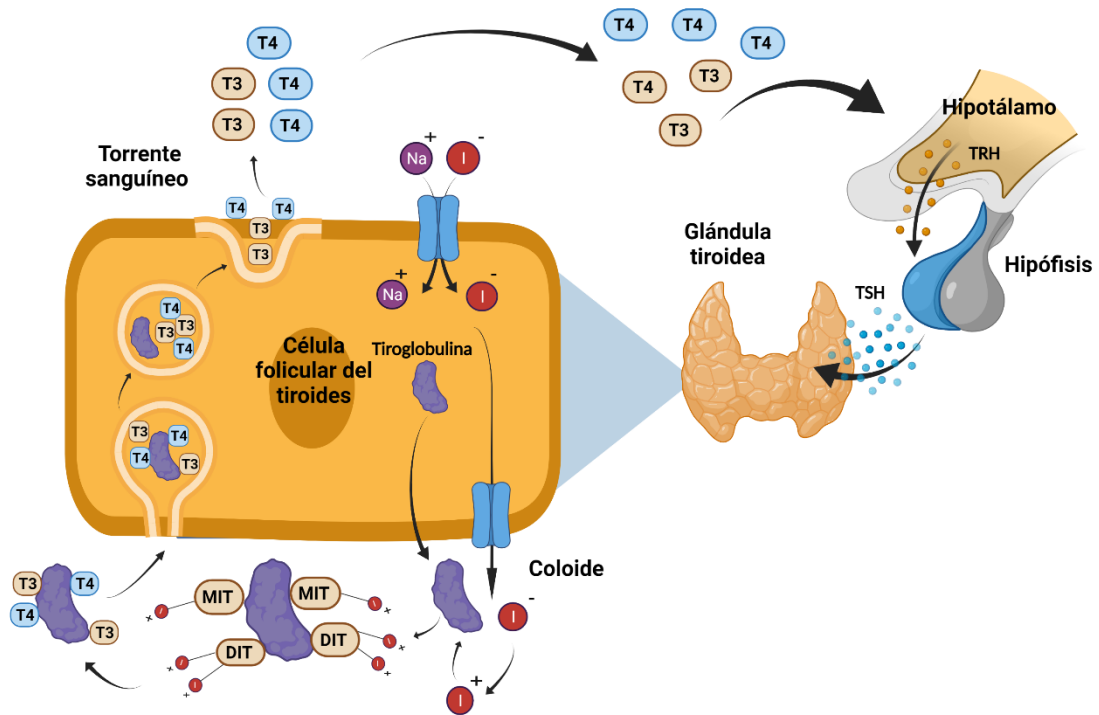


Figura 4 - Producción de hormonas tiroideas.

3.2. Mecanismo de acción de las hormonas tiroideas

Las HT entran en las células diana a través de transportadores entre los que destacan los monocarboxilados dependientes de ATP como el MCT8 o el MCT10 y los polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATPs). Ya que la T3 es la forma hormonal más activa pero el tiroides segrega mayoritariamente T4, esta última tiene como principal función servir como precursora de la

T3 mediante la desiodación en posición 5' del anillo externo. Esta acción, que ocurre en los tejidos periféricos, la llevan a cabo las enzimas desiodasas (DIO), que son selenoproteínas.

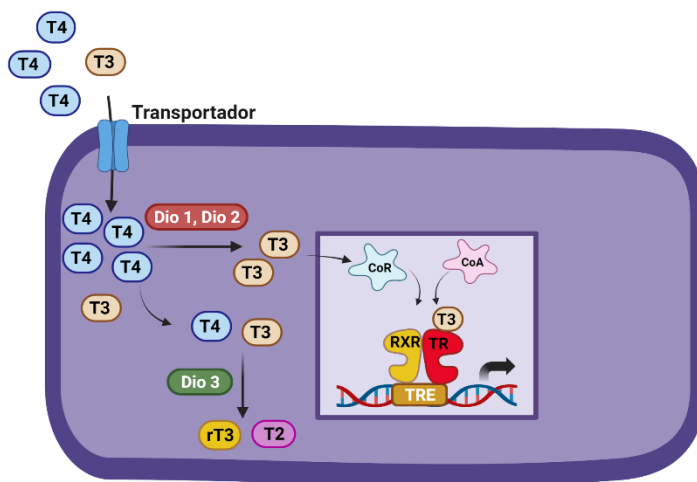


Figura 5 - Mecanismo de acción de hormonas tiroideas.

Introducción

Existen tres tipos de desiodasas. La DIO1 y la DIO2 catalizan la conversión de T4 a T3 en los tejidos diana, incrementando así los niveles intracelulares de la hormona activa. En cambio, la DIO3 ejerce el efecto contrario ya que disminuye los niveles de hormona activa catalizando la conversión de T4 y T3 a la forma inactiva rT3 (T3 reversa) y T2, respectivamente. Por ello, la expresión y la distribución de las desiodasas juega un papel muy importante en la acción de las HT regulando la cantidad de hormona activa que va a alcanzar el receptor en los diferentes tejidos (Figura 5). La transcripción de DIO1, expresada preferencialmente en el hígado, es estimulada por las HT y se utiliza ampliamente como un índice del estado tiroideo (102).

Aunque se ha postulado la existencia de un mecanismo de acción extra-genómico de las HT iniciado en la membrana celular, las funciones fisiológicas de las HT están mediadas principalmente por su unión a los receptores de hormonas tiroideas (TRs), localizados en el núcleo de la célula. Los TRs pertenecen a una superfamilia de receptores nucleares que actúan como factores de transcripción dependientes de la unión de un ligando (la T3, en el caso de los TRs). Los receptores están compuestos de distintos dominios funcionales: el dominio A/B que contiene una función de activación transcripcional independiente de ligando, el dominio C (que es el dominio de unión al ADN o DBD), una región bisagra D, y el dominio E, responsable de la unión del ligando, la dimerización y la transactivación dependiente de ligando. A través del DBD, los TRs se unen a los denominados elementos de respuesta a hormonas tiroideas (o TREs), mayoritariamente como heterodímeros con otro receptor nuclear, el receptor X de retinoides (RXR) (Figura 5). Estos elementos de respuesta son cortas secuencias de ADN formadas por palíndromes, palíndromes invertidos o repeticiones directas de la secuencia consenso AGGTCA, que se encuentran localizadas en las regiones reguladoras de los genes diana. Los efectos de los receptores sobre la transcripción están mediados por el reclutamiento de correguladores: coactivadores y correpresores. (100, 101).

En mamíferos los TRs están codificados por dos genes, el *TRα* y el *TRβ* (100, 101). A partir de los transcritos primarios de estos genes se generan las distintas isoformas de los receptores. El gen *TRα* codifica para las isoformas TRα1 y TRα2, que se producen por procesamiento alternativo, difiriendo entre ellas en el carboxilo terminal. El TRα2 no une hormona y se comporta como un dominante negativo del TRα1. El gen *TRβ*, a partir de diferentes puntos de inicio de la transcripción, da lugar a dos isoformas principales TRβ1 y TRβ2, con diferentes regiones amino terminales, pero ambas capaces de unirse a T3. Otras isoformas minoritarias son el TRβ3 y la forma truncada ΔTRβ. Esta última se comporta como un dominante negativo que se une a T3 con alta afinidad, pero no se une al ADN.

Introducción

Las HT juegan un papel fundamental en el crecimiento y desarrollo. Estas hormonas son esenciales para el crecimiento somático y el desarrollo del sistema nervioso; controlan funciones cardiovasculares, hepáticas y renales; están implicadas en la maduración de los huesos; determinan la forma de las fibras musculares de tipo 1 y de tipo 2 e influyen en el proceso de regeneración muscular; tienen un rol esencial en el desarrollo, maduración y función de las células pancreáticas y afectan a la función de la mayoría de los órganos y tejidos (100, 101). Así pues, las acciones de las HT son altamente pleiotrópicas y afectan a muchos tipos celulares en diferentes etapas del desarrollo. Como es de esperar por todos estos efectos, las HT tienen un papel fundamental en los procesos de proliferación y diferenciación celular, dependiente del tipo de célula, el contexto celular y el estado de desarrollo o transformación (100, 101).

Además de ser determinantes para el correcto crecimiento y desarrollo, las HT son esenciales en la regulación del metabolismo en los animales superiores (100, 101, 110). Está ampliamente descrita la implicación de las HT en los procesos de gasto de energía y su influencia notable en el peso corporal (111, 112). Las HT regulan de manera directa la lipogénesis, la β -oxidación de los ácidos grasos y la síntesis y transporte de colesterol. Dichas hormonas modulan estas funciones de forma transcripcional, post-transcripcional y mediante mecanismos de autofagia (101). En función de la concentración de HT en el suero de los organismos vivos se describen dos estados patológicos (101): hipertiroidismo o exceso de HT e hipotiroidismo o deficiencia de hormonas tiroideas. De acuerdo con los efectos metabólicos de estas hormonas, el **hipertiroidismo** está caracterizado por un hipermetabolismo con incremento del gasto energético basal, pérdida de peso, reducción de los niveles de colesterol e incremento de la lipólisis y glucólisis (113, 114), mientras que el **hipotiroidismo** se caracteriza por un hipometabolismo que conlleva una disminución del gasto energético basal, ganancia de peso, aumento de los niveles de colesterol y reducción de la lipólisis y de la gluconeogénesis (115).

Algunas de las funciones de las hormonas tiroideas involucran la regulación de algunas de las enzimas clave en el metabolismo, tanto en los tejidos periféricos como en el cerebro. Las HT causan la inhibición de mTORC1, mecanismo a través del cual modulan la expresión de distintas proteínas involucradas en la lipólisis y autofagia, como ocurre en el tejido adiposo marrón, donde la T3 suprime la actividad de mTORC1 para inducir el proceso de termogénesis (116). Asimismo, se ha descrito que la T3 controla el consumo energético vía regulación de la actividad de mTORC1 en el núcleo arcuado del hipotálamo (117).

Introducción

Del mismo modo, la T3 es capaz de ejercer distintos efectos sobre la enzima AMPK en función del tejido diana. Se ha descrito que en el músculo e hígado induce la fosforilación y consiguiente activación de AMPK, mientras que en las células del hipotálamo ventromedial inhibe su actividad, teniendo esta regulación un efecto directo en la modulación del metabolismo lipídico del hígado y de la grasa marrón (118, 119). A su vez, se ha descrito que las HT tienen un solapamiento funcional con Sirt1 en diversos procesos metabólicos, como la gluconeogénesis o la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos (120). Sirt1 es capaz mediante su capacidad deacetilasa de activar PGC1- α , previamente descrito como una diana directa de las HT, el cual está altamente implicado en los procesos de β -oxidación de los ácidos grasos (121). Las HT también son capaces, a través de Sirt1, de inducir la desacetilación de FOXO1, un factor transcripcional que modula algunos genes implicados en la gluconeogénesis, como *pepck* y la *glucosa-6-fosfatasa* (120, 121). Sirt1 puede además interactuar directamente con TR β , induciendo su actividad transcripcional (122).

Hay una evidencia creciente de la capacidad de las HT de modular la hematopoyesis y la respuesta inmune en humanos y animales (123, 124, 125, 126). Se ha estudiado la implicación de TR α en la maduración de los progenitores eritrocíticos (127). La desregulación del estado tiroideo tiene un impacto notable en el desarrollo de la serie roja. La anemia es un síntoma común de pacientes que padecen hipotiroidismo, mientras que en el hipertiroidismo se han observado también anomalías en los hematíes (123, 128).

Se ha descrito que en ratones hipotiroideos hay una marcada reducción de los precursores de células B de la médula ósea (129). Asimismo, los ratones *knock-out* para TR α presentan una disminución de los niveles de linfocitos B (130), mientras que el hipertiroidismo estimula la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas, y en ensayos *in vitro*, la T3 induce la maduración de las células dendríticas (131). Parece que los monocitos, los macrófagos, y el resto de las células inmunitarias guardan un estrecho vínculo con las HT, pero existe aún mucho conocimiento por esclarecer del vínculo entre las HT y el sistema inmune (132).

Introducción

3.3. Hormonas tiroideas en situaciones de enfermedad grave.

En condiciones de enfermedad severa se observa frecuentemente una disminución en los niveles de hormonas tiroideas. Este descenso, que es el resultado de una fuerte reducción en la producción de las HT y de cambios en su metabolismo, es una condición conocida como “síndrome del enfermo eutiroideo” o “síndrome de la enfermedad no tiroidea” (NTIS en inglés) (133). Este síndrome ha sido observado en cuadros de enfermedad grave de diverso tipo: pacientes tras una cirugía abdominal, infarto de miocardio (donde existe una relación entre las dimensiones del infarto de miocardio y la disminución de T3), cáncer y enfermedades infecciosas causadas por diferentes patógenos (134). La disminución de los niveles de hormonas tiroideas se correlaciona con la gravedad de la enfermedad. Primero disminuyen los niveles de T3, y según aumenta la gravedad de los pacientes también se reducen drásticamente los niveles de T4. Aunque las consecuencias funcionales de este síndrome todavía están por esclarecer, la disminución de las HT podría representar una respuesta de emergencia del hospedador para disminuir la tasa metabólica y garantizar un proceso de tolerancia a la enfermedad. De acuerdo con esta idea, se ha reportado también la existencia de NTIS en casos de ayuno, lo que podría constituir una adaptación para el ahorro de energía al disminuir el catabolismo. La NTIS inhibiría los niveles de las hormonas en órganos importantes como el hígado o los músculos, disminuyendo así el gasto metabólico (133).

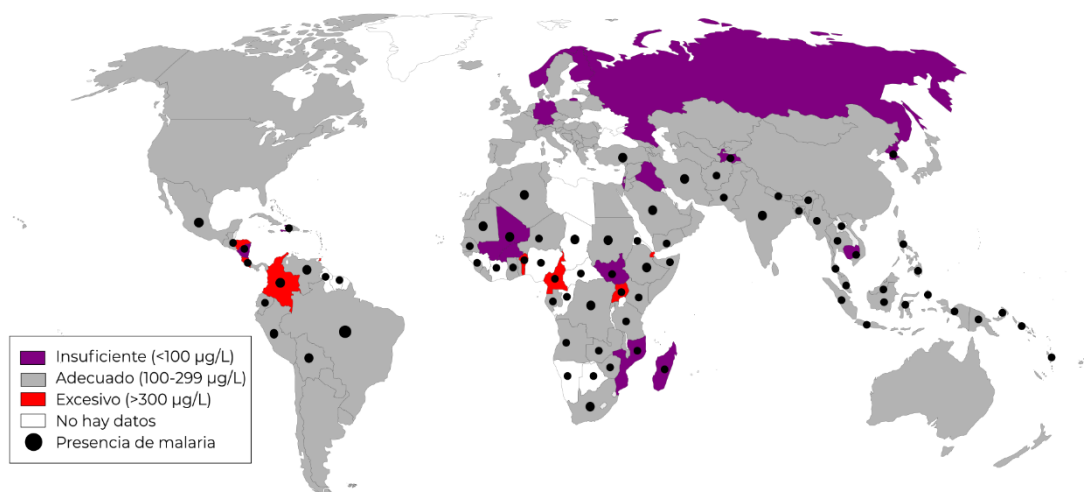
En el caso de la MS en humanos, se ha descrito la existencia de disfunción tiroidea (135) y la disminución de la actividad de las células tirotropas hipofisarias (134), lo que sugiere que la desregulación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides está involucrado en una respuesta de emergencia a la situación de estrés generada por la infección. Pese a ello, se desconoce todavía la implicación de los niveles de hormonas tiroideas en el desarrollo y desenlace de la enfermedad.

Introducción

3.4. Déficit de iodo

El déficit de iodo es hoy todavía un importante problema de salud en países subdesarrollados. Ya que el iodo es fundamental para la síntesis de las HT, el déficit de iodo conlleva a corto/medio plazo la aparición de bocio e hipotiroidismo. Los niveles adecuados de iodo son importantes para el desarrollo del ser humano desde las primeras etapas de desarrollo del feto en el embarazo. El déficit de iodo en la dieta durante el embarazo puede tener consecuencias en la prole que pueden fluctuar desde el retraso mental medio hasta el cretinismo, una condición patológica que implica discapacidad mental severa, sordomudez y estatura baja entre otros muchos defectos. Todas las personas residentes en zonas endémicas de déficit de iodo, desde niños hasta adultos, viven en riesgo de padecer algún tipo de disfunción mental (136), aunque los problemas más severos ocurren por una deficiencia de iodo prenatal o en la niñez temprana, ya que las HT son críticas para el desarrollo del SNC.

Aunque durante las últimas décadas la deficiencia de iodo se ha paliado en muchas áreas con una medida tan sencilla como la utilización de la sal iodada, en la actualidad existen todavía numerosas zonas endémicas de deficiencia de iodo, algunas de las cuales coinciden con ser regiones a su vez endémicas de malaria (Figura 5) (137, 138, 139). Este hecho podría ser un agravante de la enfermedad, pero quizás podría suponer un mecanismo de protección frente al parásito.



Objetivos

Objetivos

Los objetivos que se plantean en esta Tesis Doctoral son los siguientes:

1. Evaluar la relevancia e influencia del estado tiroideo en la malaria cerebral causada por *Plasmodium berghei* en el ratón.
 - 1.1. Estudiar la supervivencia, desarrollo de síntomas neurológicos y parasitemia.
 - 1.2. Examinar los parámetros sanguíneos y caracterizar las poblaciones inmunes celulares del bazo y su grado de activación.
 - 1.3. Determinar la rotura de la barrera hematoencefálica y analizar las distintas poblaciones inmunes celulares infiltradas en el cerebro y su grado de activación.
 - 1.4. Examinar el daño cerebral, la presión intracraneal y la circulación cerebral.
2. Evaluar la relevancia e influencia del estado tiroideo en un modelo experimental de malaria no cerebral producido por *Plasmodium yoelii*.
3. Estudiar el perfil metabólico de los ratones eutiroideos e hipotiroideos durante la infección con *Plasmodium berghei*.
 - 3.1. Estudio de los cambios metabólicos en el cerebro.
 - 3.2. Estudio de la actividad locomotora y respirométrica.
 - 3.3. Análisis de distintas vías de señalización celular con relevancia metabólica a nivel hepático.
4. Identificación de posibles dianas moleculares que modulen la tolerancia a la malaria cerebral.
 - 4.1. Examinar los efectos de activadores e inhibidores de la Sirtuína 1 sobre la supervivencia, desarrollo de síntomas neurológicos y parasitemia.
 - 4.2. Evaluar el impacto de los activadores e inhibidores de la Sirtuína 1 sobre el daño cerebral.

Materiales y métodos

Materiales y métodos

Animales de experimentación

Los ratones macho C57BL/6J utilizados en este proyecto son procedentes del laboratorio Charles River y fueron estabulados en el animalario del Instituto de Investigaciones Biomédicas ‘‘Alberto Sols’’. Todos los experimentos con animales fueron realizados siguiendo la normativa del IACUC en acuerdo con la Ley comunitaria europea (86/609/EEC) y la ley española (R.D. 1201/2005), con la aprobación del Comité de ética del CSIC y de la Comunidad de Madrid.

Generación de ratones hipo e hipertiroideos

Para inducir el hipotiroidismo, se alimentaron ratones de 4-5 semanas de edad con una dieta deficiente en yodo ($<0,015$ mg/kg) que contiene un 0,15% de la droga antitiroidea propiltiouracilo (PTU) (E15551-04, Sniff) y con 10 g/L de perclorato potásico ($KClO_4$) (460494, Merk) en el agua de bebida durante 4 semanas previas al experimento, hasta alcanzar las 8-9 semanas de edad. Los animales control fueron alimentados con una dieta eutiroidea (Sniff, E15552-24), concretamente, la misma dieta que el grupo hipotiroideo de comparación, pero sin PTU y suplementada con yoduro potásico a una concentración de 1,15 mg/kg. Para la generación de animales hipertiroideos, se utilizaron animales alimentados con la dieta control a los que se les añadió en el agua de bebida T4 (25 ng/g de ratón, IRMM468, Sigma-Aldrich) y T3 (95 ng/g de ratón, T-2877, Sigma-Aldrich) durante 14 días previos a la infección. El agua de bebida se cambió cada día. Salvo que se indique lo contrario, todos los grupos de animales mantuvieron el mismo tipo de dieta hasta el final de cada experimento.

Diseño del modelo experimental de malaria cerebral

Para la inducción de la malaria experimental se infectaron ratones de 8-9 semanas de edad con la cepa de *Plasmodium Berghei Anka (PbA)* (MRA-311, BeiResources) o con *Plasmodium Yoeli* (MRA755, BeiResources), mediante una inyección intraperitoneal (i.p.) de 1×10^6 eritrocitos infectados obtenidos previamente de un ratón donante. Los ratones recibieron comida *ad libitum* y la bebida fue suplementada con ácido paraminobenzoico al 0,05% para asegurar el crecimiento del parásito. Se monitorizó la parasitemia de la infección en los animales mediante frotis de sangre fijados con metanol y teñidos con la solución de Wright (1013830500, Merck) con una magnificación de 100X y usando para calcularla el programa FIJI-image Jimage J-FIJI (140). Los ratones fueron evaluados diariamente para controlar el desarrollo del estado clínico de la MC. Las etapas clínicas de la enfermedad se

Materiales y métodos

definieron en función de la presentación de: ningún síntoma (0), piloerección (1), piloerección media y ataxia leve (2), ataxia y parálisis (3) convulsión y coma (4) (141). Cuando los ratones mostraron un estado severo de la enfermedad (grado 4) fueron sacrificados mediante la inhalación de CO₂ según la normativa ética.

Tratamientos de los ratones.

El grupo de ratones eutiroideos fue inyectado i.p. diariamente, comenzando el día de la infección, con el activador de Sirt1, SRT1720 (HY-15145, Med Chem Express) (142) a una dosis de 20 mg/kg en 100 µl. SRT1720 fue disuelto en 10% DMSO (D2438, Sigma-Aldrich), 20% 2-Hidroxipropil-β-ciclodextrina (H5784, Merck) en PBS. Los ratones hipotiroideos fueron tratados diariamente desde el día inicial de la infección con el inhibidor de Sirt1, EX-527 (E7034, Sigma-Aldrich) (143), a una dosis de 10 mg/kg en 50 µl de volumen de inoculación. EX-527 fue disuelto en 4% de DMSO, 10% de 2-Hidroxipropil-β-ciclodextrina en PBS. A otros grupos de ratones se les administró 20 µg/ ratón de leptina recombinante murina (498-OB, R&D Systems) disuelta en PBS dos veces al día mediante inyección i.p, comenzando el día de la infección. Otro grupo de ratones fue inoculado con 500 µl de manitol (25% in 0.9% de suero salino; Sigma-Aldrich) o con el vehículo (control) diariamente, comenzando el día 0 de la infección. Para el tratamiento intracerebroventricular (ICV) con T3, se implantaron cánulas en los ratones hipotiroideos mediante estereotaxia como se ha descrito previamente en (117, 119), utilizando las siguientes coordenadas: 1,2 mm laterales al bregma, 0,6 mm posteriores y 2 mm de profundidad. Cuatro días después de la implantación, los animales fueron inoculados i.p. con *PbA* y la T3 (16 ng en 4 µl de suero salino) o con el vehículo, administrados de manera ICV a través de la cánula durante 6 días hasta que la cánula colapsó. La administración ICV fue llevada a cabo 1 hora previa al ciclo nocturno de estabulación de los ratones. Las adrenalectomías fueron realizadas quirúrgicamente tanto en ratones eutiroideos como hipotiroideos 14 días antes de la infección y sus correspondientes animales control fueron “falsamente operados” (Sham). El agua de bebida de los animales adrenalectomizados fue suplementada con 0,9% de cloruro sódico tras la operación (55).

Materiales y métodos

Hemogramas

Los ratones fueron sacrificados mediante sobreexposición inhalatoria a CO₂ según la normativa ética. Las muestras de sangre se recolectaron en tubos con EDTA (1591126, EVEREST) mediante punción cardíaca. Los hemogramas de las muestras de sangre con EDTA (400 µl) fueron analizados por el laboratorio ‘‘Serolab S.L’’. La hemoglobina de sangre periférica fue determinada mediante la lisis de 10 µl de sangre total en 1 ml de agua y la densidad óptica medida a 540 nm de longitud de onda en un lector de microplaca Biotek EL340 y posteriormente transformada a la concentración correspondiente, como ha sido previamente descrito (132).

Determinación de citoquinas circulantes.

El plasma de las diferentes muestras de sangre fue obtenido mediante la centrifugación de las muestras recogidas durante 5 minutos a 2000 revoluciones por minuto (rpm). Las citoquinas circulantes se midieron utilizando el kit Cytokine Response Panel (740622, Biolegend), de acuerdo con las instrucciones del fabricante y las muestras fueron posteriormente analizadas por citometría de flujo (FACS) en un citómetro Citoflex S (Beckman and Coulter). Las concentraciones de las distintas citoquinas se calcularon usando el software Legendplex V8.0 de Biolegend.

Cuantificación de glucosa y leptina

Las mediciones de glucosa fueron llevadas a cabo en gotas de sangre de la cola de los ratones utilizando el detector Accu-check Aviva (6453970037, Roche). Los niveles de leptina se midieron en muestras de suero, obtenidas por centrifugación de muestras de sangre durante 5 minutos a 2000 rpm, usando el kit de ELISA para ratones (90030, Cristal Chem) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cuantificación de la T3 y T4 total circulante.

La determinación de las cantidades de HT se llevó a cabo utilizando ¹²⁵I-T3 y ¹²⁵I-T4 (3000 µCi/µg) que fueron obtenidos usando yodo radiactivo (NEZ033A, Perkin Elmer) y (3-5)-T2 (D0629, Sigma–Aldrich) o T3 (T2877, Sigma–Aldrich) como substratos, respectivamente, como ha sido previamente descrito (144). La separación de los productos marcados se realizó utilizando cromatografía ascendente en papel durante 16 horas en presencia de

Materiales y métodos

butanol:etanol:amonio 0,5 N (5:1:2) como solvente. ^{125}I -T3 y ^{125}I -T4 fueron eluidas y mantenidas en etanol a 4°C. La concentración de hormonas tiroideas se analizó por radioinmunoensayo (RIA), tras la extracción y purificación de las muestras de plasma. Brevemente, cantidades trazadoras de ^{125}I -T3 and ^{125}I -T4 fueron añadidas a alícuotas individuales de plasma de 80 μl y la T3 y T4 totales fueron extraídas con metanol (1:6), se evaporaron a sequedad y se disolvieron en tampón de RIA para su cuantificación. El rango dinámico fue de 0,4-100 pg T3/tubo y 2,5-320 pg T4/tubo. Las muestras se procesaron por duplicado y el resultado final fue calculado en base a la cantidad de hormona detectada en el ensayo, la recuperación de los trazadores añadidos y el volumen de muestra de plasma extraído (149). La ^{125}I -T3 y ^{125}I -T4 de alta actividad específica y los antiseros anti-T3 y anti-T4 (originalmente generados por la profesora MJ. Obregón), fueron amablemente cedidos por la Dr. A Guadaño-Ferraz del IIBM.

Identificación de las células esplénicas hematopoyéticas por citometría de flujo

Los esplenocitos fueron aislados y purificados usando el disociador Gentle MACS y el kit de disociación de bazo (130-095-926, Miltenyi), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células en suspensión se pasaron a través de un filtro de 70 μm y se centrifugaron durante 5 minutos a 300 g. Para lisar los eritrocitos, las células sedimentadas se resuspendieron en 1 mL de solución de lisis Versalyse (A09777, Beckman Coulter) y dos minutos después se añadieron 3 mL de tampón FACS (PBS, 2% FBS y 5 mM de EDTA) para frenar la reacción. La suspensión celular lisada se centrifugó 5 min a 300G, y una vez eliminado el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en tampón de FACS. Las distintas muestras (conteniendo 0,5-2x10⁶ células) fueron incubadas con los anticuerpos de los marcadores de superficie apropiados (Tabla 1) durante 20 minutos a temperatura ambiente y seguidamente se lavaron dos veces usando tampón FACS para frenar la reacción. Para el marcaje intracelular las células se fijaron y permeabilizaron con el uso de un kit de fijación/permeabilización (00-5523-00, Thermo Fisher) y se incubaron con el correspondiente anticuerpo (Tabla 1). Las células muertas fueron identificadas por adición de Sytox Green (S7020, Life technologies) o DAPI ((D9542, Sigma-Aldrich) 5 minutos antes del análisis por citometría de flujo. Las células sin marcar se usaron como control negativo para establecer los estándares de voltaje del citómetro, y se utilizaron controles de un único color para ajustar la compensación de cada anticuerpo. Las distintas poblaciones de células eritrocíticas fueron identificadas sin

Materiales y métodos

realizar el tratamiento de solución de lisis y por citometría de flujo como se ha descrito previamente (132, 145) mientras que las poblaciones de interés del sistema inmune fueron identificadas siguiendo la estrategia mostrada en la Figura 7A y 7B. El número absoluto de células fue calculado añadiendo “Perfect-Count Microspheres” (CYTPCM-100, Cytognos) a las muestras de citometría. Los datos de citometría se adquirieron utilizando los aparatos FACSCanto II (Becton and Dickinson) o Cytotflex S (Beckman and Coulter) y fueron analizados con los programas de análisis FlowJo o Cytoexpert.

Identificación de las células hematopoyéticas infiltradas en el cerebro por citometría de flujo

Para identificar por citometría de flujo los leucocitos infiltrados en cerebro, las muestras de cerebro fueron cuidadosamente extraídas tras el sacrificio animal, y procesadas en el disociador Gentle MACS usando el kit de disociación para cerebro (130-107-677, Miltenyi). Las muestras se pasaron a través de un filtro de 70 μm y se centrifugaron en un gradiente de Percoll al 36% (P1644, Sigma-Aldrich) /DMEM-HEPES (DF-041, Sigma-Aldrich), enriquecido con FBS al 10% (10270-106, Gibco) y 0.4% HBBS (14185-045, Gibco) durante 30 minutos a 800 g y a temperatura ambiente. Los eritrocitos fueron lisados con 400 μL de solución de lisis Versalyse, como se describió en el procesamiento de células del bazo, y posteriormente las células se marcaron con los anticuerpos para superficie indicados (Tabla 1). El cálculo del número de células y el análisis de FACS fue llevado a cabo como se describe en el apartado “identificación de las células esplénicas”. La determinación de las distintas poblaciones de interés del sistema inmune se llevó a cabo utilizando la estrategia mostrada en la Figura 7C y 7D. Para el marcaje intracelular, la suspensión celular fue tratada de manera similar a lo descrito en el tratamiento de las células del bazo y se incubaron con su anticuerpo correspondiente (Tabla 1).

Presión sistólica sanguínea

La presión sanguínea fue medida por pletismografía, utilizando un manguito en la cola del ratón. Para ello, los animales fueron entrenados durante la semana previa a la medición inicial de la presión de la infección por *PbA*. La presión sistólica se midió a día 6 tras la inoculación del parásito utilizando un sistema de análisis de presión sanguínea BP-2000 (Visitech Systems, USA). Las medidas se hicieron siempre a la misma hora (desde las 8 a.m a las 10

Materiales y métodos

a.m). Para cada animal se realizaron y promediaron al menos 10 observaciones individuales cada día de medición.

Permeabilidad de la barrera hematoencefálica

Para la evaluación de la rotura de la barrera hematoencefálica se inoculó en el seno venoso retro orbital de los ratones 100 μ l de Azul de Evans (E2129, Sigma-Aldrich) diluido a 10 mg/mL en PBS, el día 6 post infección. Después de 1 hora, los cerebros se extrajeron, se pesaron y se incubaron en formamida (295876, Sigma-Aldrich) a 37°C durante 2 días. La absorbancia fue medida espectrofotométricamente en el lector de microplaca Biotek 340 a 620 nm de longitud de onda, y los datos fueron corregidos por el peso del cerebro de cada animal.

Estudios histopatológicos

Los cerebros y los bazo se extrajeron sin ningún tipo de perfusión. Se fijó el bazo y un hemisferio del cerebro de cada animal en 4% de formalina en H₂O miliQ (141328, Panreac AppliChem) durante 72 h. Los cortes coronales fueron embebidos en parafina (253211, Panreac AppliChem) y cortes seriados de 5 μ m se marcaron con H&E (75290, Panreac AppliChem; 4530 Merk). El número de hemorragias se cuantificó usando el programa FIJI-Image J. Las hemorragias fueron estimadas usando el método *Max-Entropy Tresholding* para los valores de intensidad de eosina y determinados con la herramienta de “deconvolución de color”. Las hemorragias fueron posteriormente visualizadas y revisadas en la imagen original de cada corte. El área del tejido de cerebro en cada corte fue también cuantificada usando el programa de FIJI- ImageJ, usando un método de umbral de Otsu en una imagen de 8-bit. Los datos recopilados de cada ratón fueron cuantificados y expresados como número de microhemorragias por mm² de tejido cerebral.

Western Blot

Los hígados de los ratones se homogeneizaron en hielo con tampón de lisis compuesto de HEPES 50 mM (3375, Sigma-Aldrich), 1% Triton X-100 (T8787, Sigma-Aldrich), pirofosfato sódico tetrabásico a 50 mM, (P8010, Sigma-Aldrich) 0.1 mM fluoruro sódico (S7920, Sigma-Aldrich), 10 mM EDTA (E9884, Sigma-Aldrich) y 10 mM ortovanadato sódico (S6508, Sigma-Aldrich), más 1/100 de un mix de inhibidores de proteasas (GE80-6501-23, Ge-Healthcare), a pH 7,5. Las muestras fueron centrifugadas a 14000 rpm durante

Materiales y métodos

30 minutos a 4°C. Se recogió el sobrenadante y la concentración de proteína se midió usando el kit de ensayo de proteínas Pierce BCA (23227, Thermo-fisher). Las muestras de proteína (30-50 µg) fueron diluidas en tampón de lisis (20 µl por muestra). Después de la adición de tampón Laemmli 2X (S3401, Sigma-Aldrich), las muestras se hirvieron durante 5 minutos y se cargaron en un gel en gradiente de 4-15% SDS-PAGE (4561086, BIO-RAD), junto con el estándar de peso molecular de proteínas (B4MWP03, Cultek). Los geles se transfirieron a membranas de PVDF (IPVH00010, MERCK Millipore), se incubaron con el correspondiente anticuerpo primario (Tabla 2) y tras esto, se incubaron con anticuerpos anti-conejo o anti-ratón asociados a peroxidasa (Tabla 2). Las membranas fueron radiografiadas usando películas azules de rayos X (Agfa) en un procesador de películas médicas (modelo SRX-101A, Konica) y cuantificadas por densitometría usando el programa imageJ -FIJI. Los niveles de proteínas fueron normalizados frente a la proteína β-tubulina, usada como control de carga.

PCR cuantitativa a tiempo real

Los hígados, cerebros y bazos fueron congelados inmediatamente después de la disección y homogenizados con morteros libres de ARN (16339635, Fisher Scientific, 16339635). El ARN fue extraído con solución TRIzol (AM9738, Invitrogen AM9738) y cuantificado en un Nanodrop nd-100 (Thermo Scientific). Un microgramo de ARN fue tratado con DNasa libre de RNasa (79254, Qiagen 79254) y la síntesis del ADNc fue llevada a cabo con el kit de síntesis iScript ADNc (170-8891, BIO-RAD 170-8891) con oligos-dT y cebadores de hexámeros aleatorios en una reacción cuyo protocolo fue de 5 min. a 25°C, 30 min a 42°C y 5 min. a 85°C. La PCR cuantitativa fue llevada a cabo con el Mix rápido de SYBR Green master (4385612, Applied Biosystems) en una máquina Stratagene Mx3005P Real-Time PCR con los oligos mostrados en la Tabla 3. Las condiciones de ciclo térmico usadas fueron: activación de la polimerasa a 95°C durante 20 segundos, 40 ciclos de desnaturalización a 95°C de 3 segundos de duración y un paso de recalentamiento y extensión a 60°C durante 30 segundos. El análisis de datos fue realizado usando el método de umbral comparativo del ciclo (CT) y los transcritos fueron normalizados usando como control interno el gen HPRT.

Materiales y métodos

Análisis del comportamiento de los ratones y de los parámetros respirométricos

El análisis metabólico y respiratorio fue llevado a cabo en el servicio de animalario del IIBM (Madrid, España). Los parámetros metabólicos fueron medidos utilizando un sistema de Phenomaster de 16 cubetas (TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Germany). Los animales fueron trasladados a la habitación de la Phenomaster 72 h antes del comienzo del experimento para asegurar una correcta adaptación al espacio. Los ratones se colocaron individualmente en las cajas metabólicas 48 horas antes de comenzar el experimento con la inoculación de *PbA*. Los datos de consumo de agua, consumo de comida, gasto energético, movimientos centrales y periféricos, VO_2 y VCO_2 , fueron registrados cada hora durante 8 días y almacenados utilizando el programa TSE de Phenomaster. La tasa de intercambio respiratorio (RER) se corresponde con el coeficiente VCO_2/VO_2 y el gasto energético fue calculado como $(3.185 + 1.232 \times RER) \times VO_2$. Se consideró que era de día entre las 8 a.m y las 8 p.m, cuando las luces estaban encendidas.

Imagen por resonancia magnética

Los experimentos de imagen por resonancia magnética (MRI) fueron llevados a cabo en el servicio de resonancia magnética del IIBM, Madrid, España. Las imágenes fueron adquiridas con el sistema MRI Bruker Biospect 7T (Bruker Medical GmbH, Ettlingen, Alemania), equipado con un resonador de volumen selectivo de 1H de 23 mm y un sistema de gradientes de 90 mm de diámetro (intensidad máxima 36 G/cm). Los animales fueron colocados en primer lugar en una caja de inducción de anestesia con 3% de Isoflurano (Ecuphar) y oxígeno puro como gas portador, con un flujo de $0,8 \text{ l/min}^{-1}$ durante 4 minutos. Tras la anestesia, los animales fueron trasladados a la cama del sistema de MRI y posicionados en el centro del imán, donde se mantuvieron bajo inhalación continua de anestesia con una mascarilla conectada al aparato de anestesia (isoflurano al 1,5%-2% en oxígeno) manteniendo la frecuencia respiratoria entre 60-80 bpm/min. La temperatura del animal se mantuvo con una cama de recirculación de agua a 37°C y su estado fisiológico fue controlado usando un sistema de monitorización para pequeños animales (SA Instruments, Stony Brook, NY) que mide el ciclo respiratorio y la temperatura corporal. Todos los datos fueron adquiridos en un ordenador HP con un sistema operativo Linux y el software Paravision 6.1 (Bruker Medical GmbH). Se adquirieron imágenes eco de espín ponderadas en T1 (T1W) con una secuencia MSME y los siguientes parámetros: tiempo de repetición = 350 ms, tiempo de eco (TE) = 10 ms, promedios (Av) = 3, FOV = 2,3 cm, matriz de adquisición = 256×256 ,

Materiales y métodos

correspondiente a una resolución en el plano de $89 \times 89 \mu\text{m}^2$, grosor de corte = 1,00 mm y número de cortes = 14 axiales, 10 sagitales y 6 coronales. Las imágenes eco de espín ponderadas en T2 (T2W) se adquirieron con una secuencia RARE y los siguientes parámetros: Tiempo de repetición = 2500 ms, TE = 26 ms, factor RARE = 8, $A_v = 4$, FOV = 2,3 cm, matriz de adquisición = 256×256 correspondiente a una resolución en el plano de $89 \times 89 \mu\text{m}^2$, grosor de corte = 1,00 mm y número de cortes = 14 axiales, 10 sagitales y 6 coronales. Las angiografías por resonancia magnética se adquirieron con una secuencia TOF con los siguientes parámetros: Tiempo de repetición=15 ms, TE=2,6 ms, Ángulo de inclinación (FA) 80° , 160 cortes de 0,3 mm consecutivos, matriz 256×256 y FOV $38 \times 38 \text{mm}$. Las imágenes de angiografía se obtuvieron a partir de una construcción 3D realizada con imageJ -FIJI con el efecto "Thermal Lut". Los datos se cuantificaron utilizando los mismos parámetros de umbral de brillo para todos los animales. Los videos de las angiografías se realizaron con el programa imageJ -FIJI y todos fueron tratados con los mismos parámetros de brillo/contraste. La permeabilidad de la barrera hematoencefálica se evaluó mediante imágenes axiales en T1W realizadas con contraste, que se tomaron 15 minutos después de la inyección i.p. de gadolinio-DTPA (0,3 mmol/kg, Magnevist, Bayer Health Care Pharmaceuticals). Se utilizaron imágenes axiales en T1W antes y después del contraste para calcular los mapas de intensidad con gadolinio. El índice se calculó como la diferencia entre la señal de la imagen previa al contraste y posterior al contraste dividida por la señal de la imagen anterior al contraste, píxel por píxel, y se calculó el valor medio de las diferentes estructuras cerebrales. El volumen cerebral se calculó como la suma de los volúmenes de todos los cortes sagitales medios y axiales T1 con ImageJ-FIJI. La superficie del cerebro y las distancias se midieron a partir de imágenes sagitales medias con el software ImageJ-FIJI y RadiAnt DICOM Viewer. La superficie del cerebro se calculó a partir de la elipse determinada por la longitud entre el bulbo olfatorio y el extremo posterior del cerebelo y desde la altura del cerebro que proviene de la glándula hipofisaria.

Presión intracraneal

La presión intracraneal fue determinada midiendo el promedio del diámetro del grosor del nervio óptico de ambos ojos del ratón en imágenes coronales de MRI en T2 de un grosor de 1 mm (146).

Materiales y métodos

Análisis de metabolitos de cerebro por espectroscopia de resonancia magnética nuclear.

Las muestras de cerebro (50 mg de cerebro seco) fueron liofilizadas, pulverizadas y enviadas en hielo seco a Biosfer Teslab (<https://biosferteslab.com>, Reus, España) para el análisis por espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR). Las muestras se homogeneizaron por ultra sonicación durante 10 minutos. El extracto acuoso del tejido cerebral se obtuvo usando el método BUME (butanol-metanol 3:1) (147) con ligeras modificaciones. Este método fue optimizado utilizando el di-isopropil éter en las extracciones reemplazando al heptano como solvente orgánico. La fase acuosa fue sometida a tres ciclos consecutivos de extracción de lípidos. Los extractos acuosos se recuperaron, se secaron en un Speedvac hasta la evaporación de los solventes orgánicos y posteriormente fueron congelados a -80°C hasta la medición por espectroscopía $^1\text{H-NMR}$. Los extractos acuosos fueron reconstituidos en PBS deuterado conteniendo 2,32 mM de trimetilsilil propionato y transferidos a tubos de cristal de NMR de 5-mm. El espectro de $^1\text{H-NMR}$ fue medido a 600,20 MHz utilizando el espectrofotómetro Avance III 600 Bruker. Los experimentos de pulso monodimensional de H^1 fueron llevados a cabo usando la espectroscopía de secuencia de presaturación del efecto overhauser (NOESY) para suprimir el pico de agua residual alrededor de 4,7 ppm en los extractos acuosos. Para el análisis de metabolitos, el área de NMR asociado con la concentración de cada metabolito fue obtenido después del análisis espectral usando el ajuste de forma de línea interno basado en un algoritmo desarrollado para deconvolucionar el espectro de NMR preprocesado, utilizando las funciones lorentzianas y gaussianas para minimizar el error de ajuste (148). El área de NMR fue transformado a unidades de concentración usando el factor específico de conversión dependiente del número de protones de la estructura molecular que genera la señal y del estándar interno ácido trimetilsililpropanoico (TSP) como se ha descrito previamente (149). Cada metabolito se identificó comprobando todas sus resonancias a lo largo de todo el espectro, y posteriormente fue cuantificado, usando los métodos de ajuste de forma de líneas en una de sus señales.

Análisis estadístico

Para las comparaciones entre dos grupos se usó el t de Student de doble cola. Cuando había tres grupos o más se utilizó el análisis de varianza (one way ANOVA) con un test *Tukey* posterior para comparar los diferentes grupos entre sí. El resultado siempre se expresa como media \pm error estándar de la media (SEM). Las curvas de supervivencia fueron analizadas con el test de Kaplan Meier. Un valor de P menor de 0.05 fue considerado estadísticamente

Materiales y métodos

significativo. La significancia de los tests en los grupos experimentales indicados en las figuras está mostrada como * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, y *** $p < 0.001$. La estadística se llevó a cabo con el programa GraphPad Prism 7.0.

Tabla 1. Anticuerpos utilizados para la citometría de flujo

Anticuerpo	Casa comercial	Identificador
A4:D38 B220 BV 421	BioLegend	clone RA3-6B2
CCR5 (CD195) PerCP-Cy5.5	BioLegend	clone HM-CCR5
CD11a PE-Cy7	BioLegend	clone M17/4
CD11b APC-Cy7	BioLegend	clone MI-70
CD11c (LFA-1) PerCP-Cy5.5	BDPharmingen	clone HL3
CD3 APC	BioLegend	clone 145-2C11
CD4 APC-Cy7	eBioscience	clone GK1.5
CD44 FITC	BioLegend	clone IM7
CD45 BV 510, PE-Cy7	BioLegend	clone 30-F11
CD49d PE	BioLegend	clone R1-2
CD62L PE	eBioscience	clone MEL-14
CD69 PerCP-Cy5.5	BioLegend	clone H1.2F3
CD71 FITC	BioLegend	clone RI7217
CD80 (B7-1) PE	BioLegend	clone 16-10A1
CD86 (B7-2) FITC	eBioscience	clone GL1
CD8a BV 450	BioLegend	clone 53-6.7
CXCR3 (CD183) PE	BioLegend	clone CXCR3-173

Materiales y métodos

DC-SIGN (CD209) APC, e-fluor 660	eBioscience	clone MMD3
F4/80 APC, BV 421	BD Bioscience	clone T45-2342
GRANZYME B PerCP-Cy5.5	BioLegend	clone QA16A02
Ki67 PE-Cy7	BioLegend	clone 16A8
MHC II (I-A/I-E) Super Bright 600	eBioscience	clone M5/114.15.2
SIGLEC H (CD169) PE-Cy7	eBioscience	clone eBio440c
TER119 APC	BioLegend	clone TER

Tabla 2. Anticuerpos utilizados para Western Blot

Anticuerpo	Casa comercial	Identificador
Acetyl-NF- κ B p65	Abcam	Cat# ab19870
AMPK	Cell Signaling	Clone D63G4
α -Tubulina	Cell Signaling	Clone 2146
NF- κ B p65	Santa Cruz	Cat#sc372X
P-AMPK (T172)	Cell Signaling	Clone 40H9
P-p70 S6K	Santa Cruz	Cat# sc-11759
P-S6 (240/244)	Cell Signaling	Clone 2215S
S6	Cell Signaling	Clone 5G10
Sirtuina 1	Cell Signaling	Clone 2028S
Anticuerpo anti-conejo marcado con peroxidasa	Santa Cruz	Cat# sc-2357
Anticuerpo anti-ratón marcado con peroxidasa	Santa Cruz	Cat# sc-516502

Materiales y métodos

Tabla 3. Anticuerpos utilizados para Western Blot

Gen	Secuencia
Desiodasa 1	Directo: 5'-GTTGAACTTTGGCAGTTGCAC-3' Reverso: 5'-GGCTGTGGAGGCAAAGTCATC-3'
Desiodasa 2	Directo: 5'- GAAGATGGGACTCCTCAGCGTA-3' Reverso: 5'-AGGCATCTAGGAGGAAGCTGTTC-3'
Desiodasa 3	Directo: 5'-TCAACAGTGAAGGCGAGGAG-3' Reverso: 5'-CCTTGTGCGTAGTCGAGGATG-3
Granzima B	Directo: 5'-ACAGAAGGATCGGGAGTGTG-3' Reverso: 5'-GAAGCCAGTCTTTGCAGTCC-3'
IL-6	Directo: 5'-GCTACCAAACCTGGATATAATCAGGA-3' Reverso: 5'-CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA-3'
PbA	Directo: 5'-AAGCATTAAATAAAGCGAATACATCCTTAC-3' Reverso: 5'-GGAGATTGGTTTTGACGTTTATGTG-3
Perforina	Directo: 5'-GCATCGGTGCCCAAGCCAGTG-3' Reverso: 5'-GCCAGCGAGCCCCTGCTCATCA-3'
TNF-α	Directo: 5'-GCCAACATCCCTACCTCTCC-3' Reverso: 5'-GCTACCAAACCTGGATATAATCAGGA-3'

Materiales y métodos

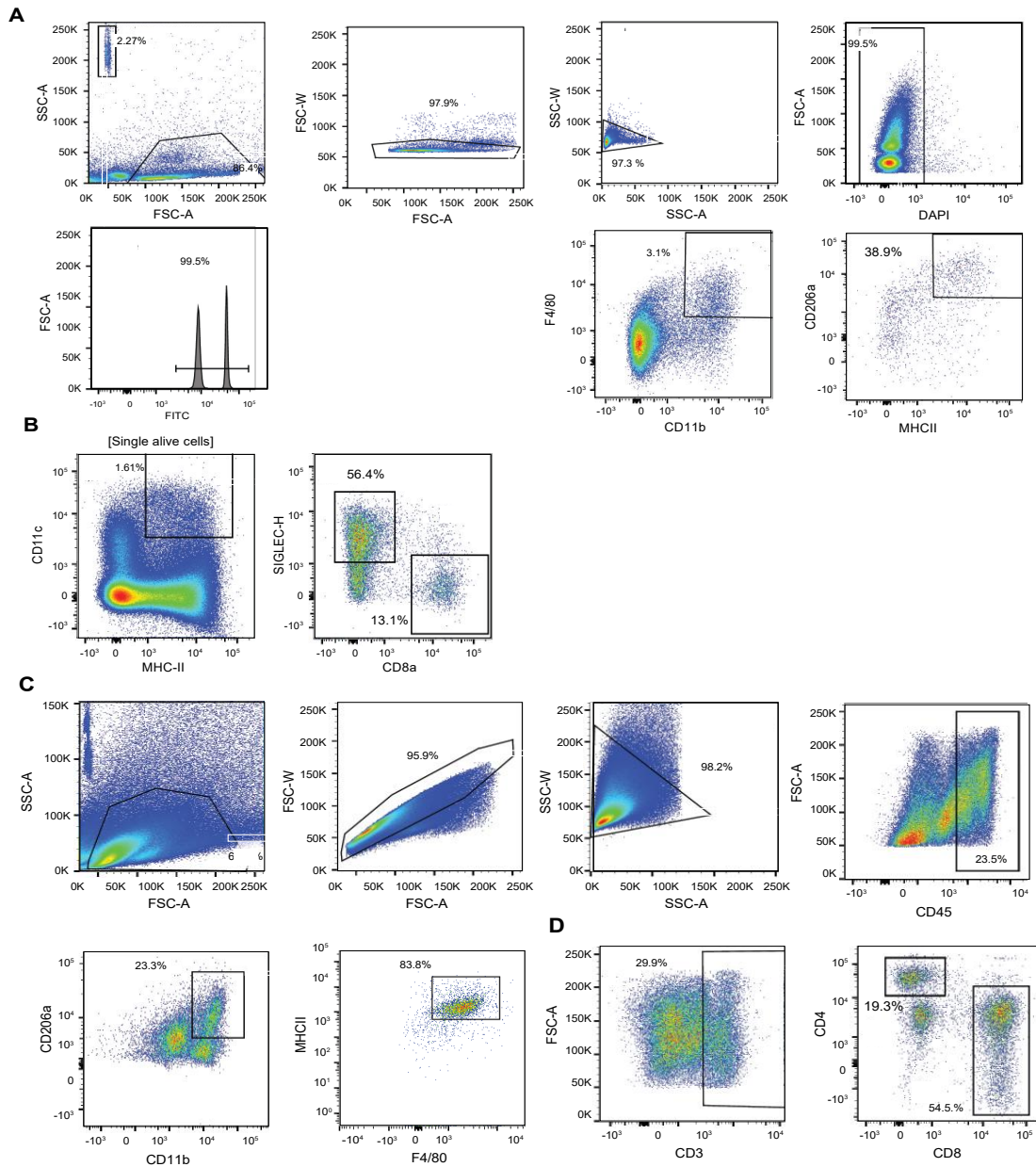


Figura 7 - Estrategia de caracterización de las poblaciones celulares de bazo y de cerebro por citometría de flujo. (A) Células esplénicas vivas individuales fueron clasificadas por la expresión de F4/80 y CD11b. Las Mono-DCs fueron identificadas por una estrategia adicional de F4/80⁺CD11b⁺ con CD206a contra MHCII. (B) Células esplénicas vivas individuales fueron clasificadas por la expresión de CD11c y MHCII. Las células CD11c⁺/MHCII⁺ fueron entonces dividida clasificadas en dos subgrupos en base a su expresión positiva de Siglec H (pDCs) o CD8a (cDC1s). (C) Se seleccionaron las células del cerebro CD45⁺CD3⁺ y entonces se dividieron en dos subgrupos basadas en su expresión de CD4 y CD8. (D) Las Mono-DCs del cerebro fueron identificadas dividiendo las células CD45⁺ en base a su positividad de F4/80 y CD11b, los cuales fueron además seleccionados positivamente para CD206a y MHCII.

Resultados

Resultados

Capítulo I: Relevancia del estado tiroideo en el modelo animal de infección con *PbA*

1. El hipotiroidismo aumenta la supervivencia a la malaria cerebral experimental.

La infección con *PbA* causó un 100% de letalidad en los días 6-7 post-infección (p.i.) en ratones eutiroideos. Sin embargo, en ratones hipotiroideos sometidos a una dieta pobre en iodo y tratamiento antitiroideo en la bebida durante el mes previo a la infección se observó un 40% de supervivencia a día 15 p.i. (Figura 8A).

A día 5 después de la infección, todos los ratones eutiroideos presentaban síntomas específicos de MC, incluidos parálisis y ataxia (etapa 3). A día 6 normalmente padecían convulsiones y alcanzaban un estado de coma (etapa 4) que suele ser un estadio previo a la muerte. Sin embargo, alrededor del 40% de los ratones hipotiroideos no presentaron síntomas de MC, y fallecieron a día 18-20 p.i (Figura 8B), debido a la anemia severa causada por el parásito (Figura 8C). Los niveles de parasitemia fueron similares en ambos grupos durante el curso de la infección lo cual sugiere que el hipotiroidismo aumenta la supervivencia a la MC por un mecanismo de tolerancia a la enfermedad (Figura 8D).

A día 6 p.i. ambos grupos de ratones perdieron aproximadamente un 10% del peso corporal (Figura 8E), aunque el grupo hipotiroideo tenía un peso más bajo el día de la infección, ya que la depleción de HT provoca la esperada reducción en la ganancia de peso durante el desarrollo normal del ratón (Figura 8F).

Los ratones eutiroideos infectados padecían NTIS, con un marcado descenso de los niveles de T3 y T4 circulantes a día 6 p.i. en comparación con sus valores basales el día 0 de la infección (Figura 9A). Como era previsible, el hipotiroidismo causó una fuerte disminución de los niveles circulantes de HT (Figura 9A). Consecuentemente, se observó que los cambios en los niveles circulantes de hormonas tiroideas se traducían en un cambio de los niveles de mRNA de la *Desiodasa 1* hepática, un gen diana de las HT usado comúnmente como marcador de la acción de estas en el organismo (150). Los niveles de *Desiodasa 1* fueron concordantes con los niveles de T4 y T3 encontrados en los diferentes grupos tanto antes de la infección como a día 6 p.i (Figura 9B).

Resultados

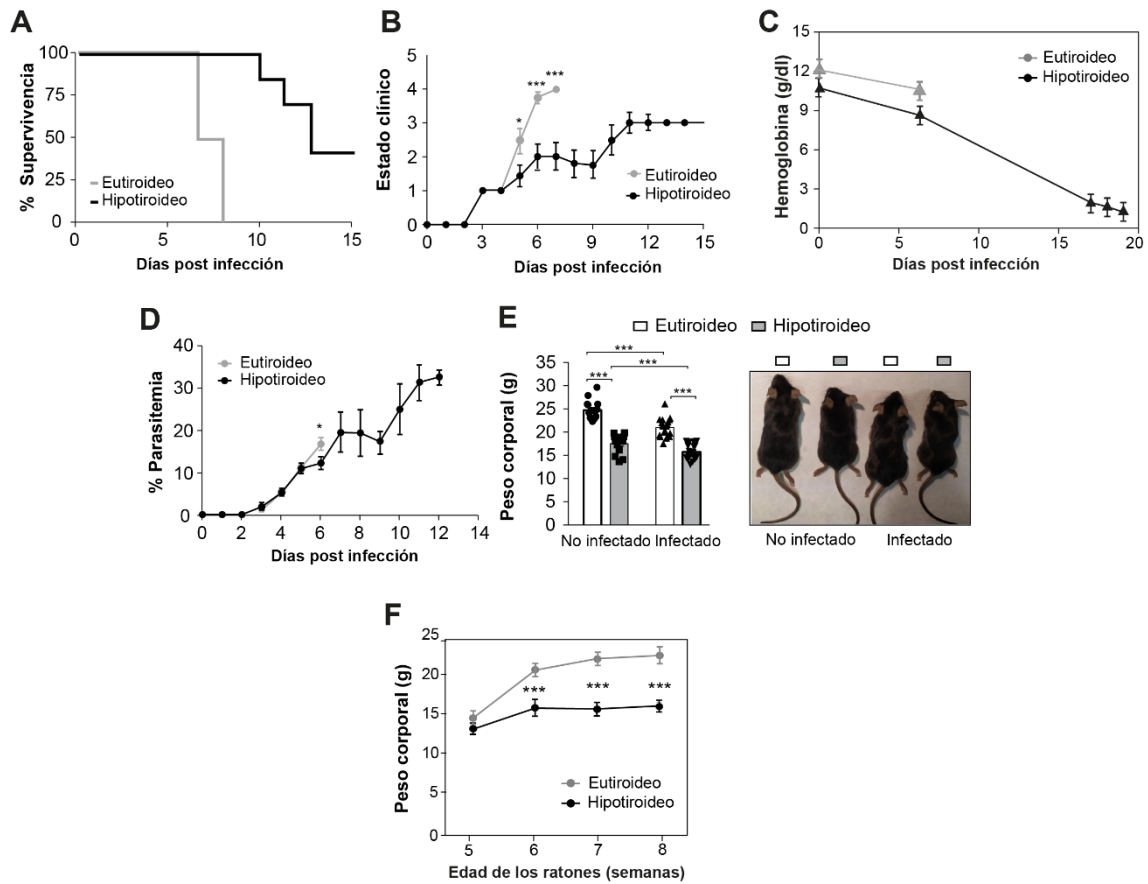


Figura 8 - El hipotiroidismo protege de la MC. (A) Diagrama de Kaplan-Meier de animales eutiroides (alimentados con una dieta con un contenido normal de yodo) y ratones hipotiroideos (alimentados durante 4 semanas con una dieta pobre en yodo suplementada con PTU y con $KClO_4$ en el agua de bebida). A día 0 los ratones fueron infectados con *Pba*, $n=34-36$. (B) Estado clínico de los ratones, de acuerdo con la aparición de síntomas neurológicos, $n=28-34$. (C) Niveles de hemoglobina en ratones eutiroides e hipotiroideos en los tiempos indicados, comenzando el día de la infección por *Pba* hasta la muerte, $n=8$. (D) Parasitemia expresada en % de eritrocitos infectados, $n=14$. (E) Peso corporal de los animales eutiroides e hipotiroideos el día de la infección y en el día 6 posterior a la infección, $n=11-13$. (F) Incremento del peso corporal en los ratones eutiroides e hipotiroideos durante las 4 semanas previas a la infección, $n=8$, test *t* de Student no pareado. Los datos representados son medias \pm SEM. En los paneles B, D y F se hizo el test de *t* Student no pareado * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. En el panel E se hizo un ANOVA unidireccional seguido de comparaciones múltiples con el test Tukey * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Resultados

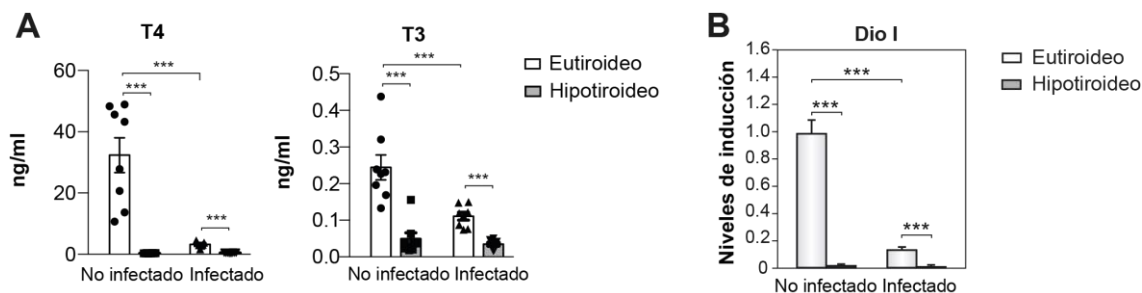


Figura 9 - Niveles circulares de hormonas tiroideas y niveles hepáticos de *desiodasa 1* en ratones eutiroides e hipotiroideos. (A) Niveles circulares de T4 y T3 a día 0 y 6 de infección, n=8-12. **(B)** Niveles de ARNm de *desiodasa I* en el hígado de ratones eutiroides e hipotiroideos en el día de la infección y en el día 6 tras la infección, n=5-10. Los datos representados son medias \pm SEM. En todos los paneles se hizo un ANOVA unidireccional seguido de comparaciones múltiples con el test Tukey *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

2. Los cambios en los niveles de hormonas tiroideas alteran la supervivencia a la malaria cerebral.

En ratones eutiroides el cambio de una dieta normo tiroidea a una dieta hipotiroidea a día 0 inhibió el desarrollo de MC y los animales sobrevivieron a la enfermedad. Sin embargo, cuando el cambio se realizó a día 3 p.i. no se observó un incremento en la supervivencia (Figura 10A). Por otro lado, el cambio de ratones hipotiroideos a una dieta control más la adición de T3 y T4 a la bebida desde el mismo día de la inoculación del parásito aceleró la muerte al día 6, comportándose de manera similar a los ratones eutiroides. Cuando el cambio de dieta y la administración de T3 y T4 se realizó a día 3 p.i, la mortalidad de los ratones también aumentó, presentando un 80% de mortalidad a día 10 p.i (Figura 10B). Para completar el estudio del modelo y la influencia de las HT sobre el desarrollo de la MC, comprobamos si la administración diaria de T3 de manera intracerebroventricular durante 6 días a ratones hipotiroideos desde el día de la infección era también capaz de acelerar la muerte. Mientras que más del 80% de los animales inoculados con el vehículo fueron capaces de sobrevivir a día 7, solo el 50% de los animales inoculados con T3 estaban vivos a día 5 y el 17% murieron incluso a día 4. Cabe destacar que una vez terminado el tratamiento intracerebroventricular de T3, ambos grupos presentaron una supervivencia similar (Figura 10C). Esto sugiere que la acción de las HT es, al menos parcialmente, ejercida directamente en el cerebro. Sabiendo el impacto de los distintos niveles de HT en los organismos vivos, también estudiamos si distintos niveles de HT regulaban la respuesta a CM. La omisión de la droga antitiroidea KClO₄ en la bebida no redujo la supervivencia en los ratones hipotiroideos, indicando que un hipotiroidismo extremo no es necesario para una mayor tolerancia a la

Resultados

infección (Figura 10D). Finalmente, observamos que los ratones hipertiroideos, tratados con HT durante 14 días previos a la infección, mostraban una mayor sensibilidad a la MC que los animales eutiroides, ya que todos los ratones hipertiroideos murieron a día 5, un día antes que los ratones eutiroides (Figura 10D).

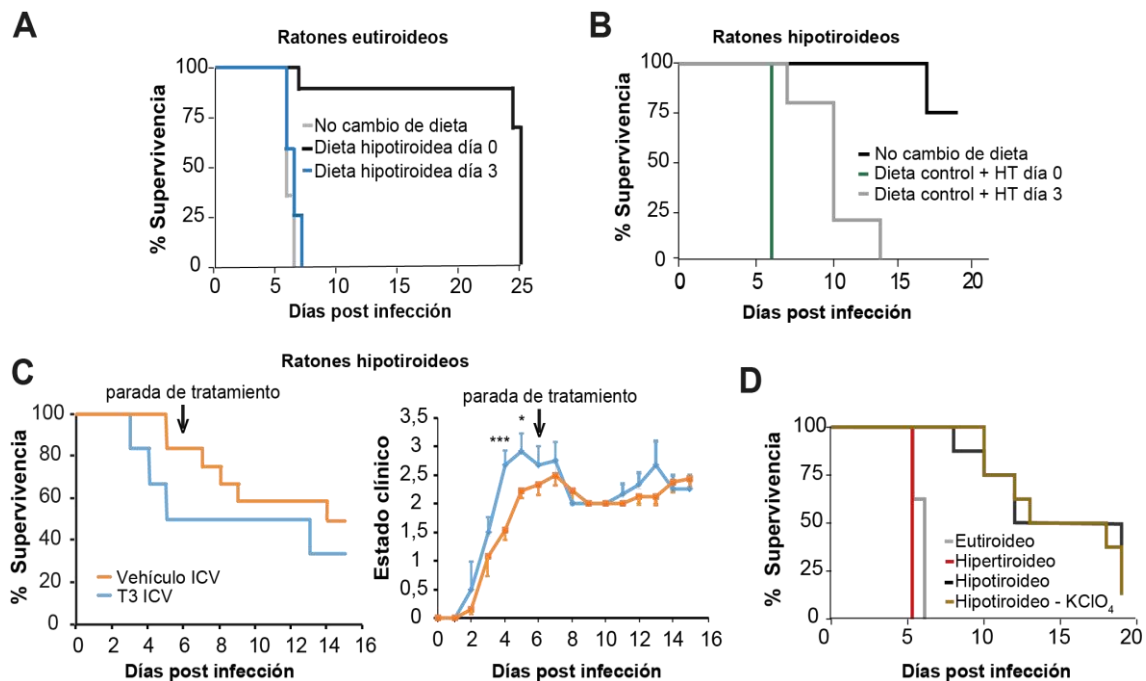


Figura 10 - Cambios en los niveles de hormonas tiroideas modulan la supervivencia a la MC. (A) Diagrama de Kaplan-Meier de animales eutiroides cambiados a tratamiento hipotiroideo en los días 0 o 3 después de la infección con *PbA*, n=7-10. (B) Diagrama de Kaplan-Meier de ratones hipotiroideos infectados con *PbA* y cambiados a dieta iodada normal con adición de T4 y T3 en la bebida los días 0 o 3 posteriores a la infección, n=5. (C) Diagrama de Kaplan-Meier de ratones hipotiroideos después de la administración intracerebroventricular (ICV) de vehículo o de 16 ng de T3 durante los primeros 6 días de la infección empezando el día de la infección. El panel derecho muestra el estado clínico de los animales, n=12-13. (D) Supervivencia de ratones infectados con *PbA* con diferentes estados tiroideos: eutiroides, hipotiroideos, dieta hipotiroidea pero sin KClO₄ en la bebida y el grupo hipertiroideo (dieta con contenido normal de yodo y tratamiento con T4 y T3 en la bebida durante 14 días antes de la inoculación del parásito), n=8. Los datos representados son medias ± SEM. En todos los paneles se hizo un test de *t* Student no pareado **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001.

Se ha descrito que la eliminación de las glándulas adrenales incrementa la mortalidad a la enfermedad producida por las cepas de parásitos *Plasmodium berghei* Edinburg (*PbNK65-EPbNK65*) y New York (*PbNK65-NY*), debido al desarrollo de una hipoglucemia muy severa en los días 7-10 post infección (55). Estudiamos si el sistema adrenal podía tener alguna interacción con nuestro modelo murino hipotiroideo. Sin embargo, tanto en ratones

Resultados

eutiroides como hipotiroideos la adrenalectomía no produjo variaciones significativas en la supervivencia (Figura 11A), desarrollo de síntomas neurológicos (Figura 11B) o niveles de glucemia (Figura 11C), tras la infección con *PbA*.

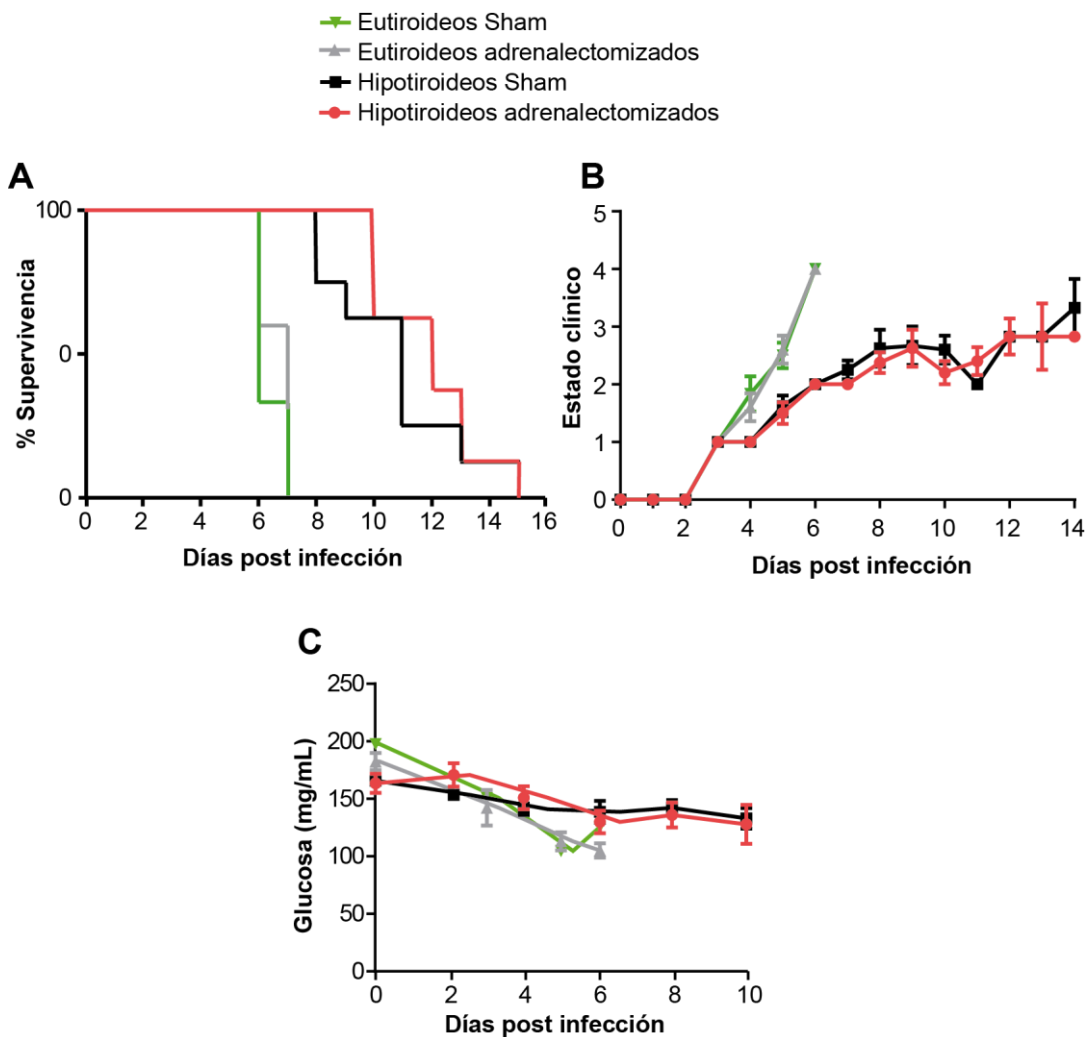


Figura 11 – La adrenalectomía no revierte el efecto protector del hipotiroidismo. (A) Diagrama de Kaplan-Meier de ratones eutiroides e hipotiroideos operados (adrenalectomizados) o falsamente operados (Sham) entre 7-10 días antes de la infección con *PbA*. (B) Estado clínico de los animales. (C) Niveles de glucosa circulante. Los datos representados son medias \pm SEM, n=5-8.

Todos estos datos indican que el estado tiroideo tiene un papel importante en el desarrollo de la MC y que regula la tolerancia a esta enfermedad. Quisimos también investigar si las HT afectaban el desarrollo de la malaria no cerebral con la inoculación de *Plasmodium yoelii* en el mismo modelo murino. En este caso no se observaron los mismos resultados que en el modelo de MC, ya que ni el hipotiroidismo (Figura 12A), ni el hipertiroidismo (Figura 12B) afectaron la supervivencia, niveles de parasitemia o grado de anemia de los animales.

Resultados

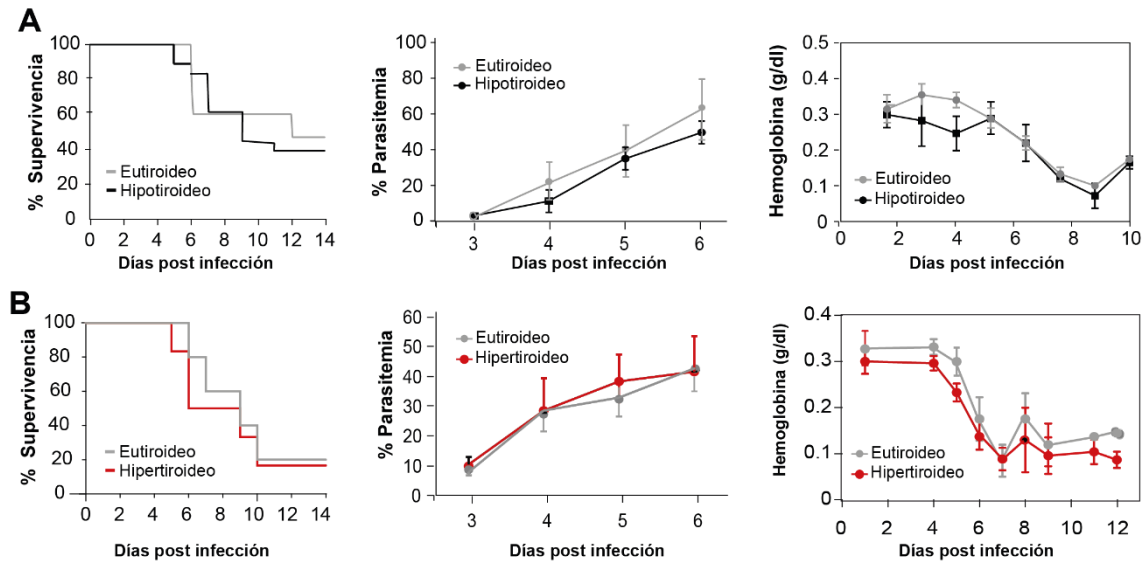


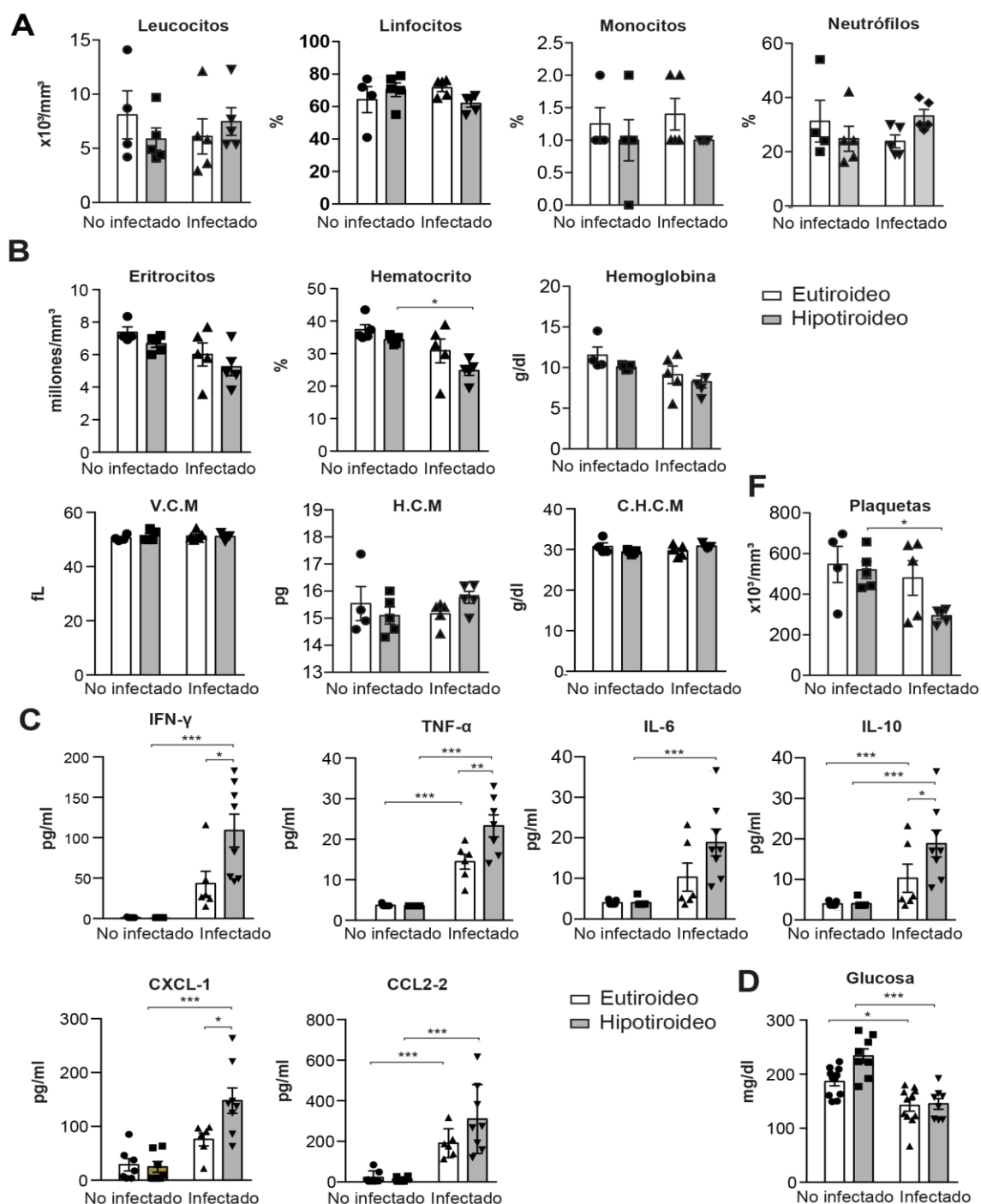
Figura 12 - El hipotiroidismo no confiere tolerancia a la malaria no cerebral causada por el *Plasmodium yoelii*. (A) De izquierda a derecha, diagrama de Kaplan Meier representado la supervivencia de los animales, n=18-15, niveles de parasitemia, n=7, y niveles de hemoglobina circulante, n=7, de animales eu- e hipotiroideos infectados con *Plasmodium yoelii*. (B) Parámetros descritos en A realizados en ratones hiper- y euthiroideos infectados con *Plasmodium yoelii*, n=5-6. Los datos representados son medias \pm SEM.

Resultados

Capítulo II: Caracterización fisiopatológica del modelo de hipotiroidismo murino y su respuesta a la infección por *PbA*.

3. Sangre

Ambos grupos de ratones, eu- e hipotiroideos, presentaban hemogramas similares durante el curso de la enfermedad (Figura 13A y 13B), con la excepción de que el grupo hipotiroideo presentaba una mayor reducción del hematocrito y de las plaquetas a día 6 después de la infección con *PbA*.



Resultados

Figura 13 - Parámetros sanguíneos en ratones eutiroideos e hipotiroideos tras la infección con *PbA*. (A) Niveles circulantes de leucocitos, linfocitos, monocitos y neutrófilos en animales eutiroideos e hipotiroideos en los días 0 y 6 tras la infección con *PbA*, n=5. (B) Eritrocitos circulantes, hematocrito, hemoglobina, volumen corpuscular medio (M.C.V), hemoglobina corpuscular media (M.C.H), concentración de hemoglobina corpuscular media (M.C.H.C.) y plaquetas circulantes, n=5. (C) Niveles circulantes de las citoquinas y quimioquinas indicadas, n=7-9. (D) Niveles de glucosa circulante, n=7-12. Los datos representados son medias \pm SEM. En todos los paneles se hizo un ANOVA unidireccional seguido de comparaciones múltiples con el test de Tukey. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p<0.001.

La MC causa una fuerte reacción inflamatoria que se traduce en un aumento de las citoquinas circulantes (151). Los niveles de las diferentes citoquinas analizadas en suero aumentaron en ambos grupos de animales a día 6 p.i. Sin embargo, los ratones hipotiroideos mostraron un mayor incremento de los niveles de IFN- γ y de CXCL-1, una tendencia a niveles más altos de TNF- α , IL-6 y CCL2 y un mayor aumento de la IL-10 (Figura 13C).

Es también conocido que la MC causa hipoglucemia en distintos modelos de *Plasmodium murinos* (55). Los niveles de glucosa circulante fueron similares antes de la infección, y disminuyeron de forma similar en ratones eu- e hipotiroideos el día 6 después de la infección con *PbA* (Figura 13D).

4. Bazo

El bazo es un órgano crucial para generar una respuesta inmune adecuada frente a la malaria (26). Aunque el hipotiroidismo generó una atrofia notable del bazo en condiciones basales, a día 6 p.i los ratones presentaban una esplenomegalia exacerbada con un incremento significativo de tamaño y peso del bazo incluso comparativamente mayor al observado en los ratones eutiroideos. Los ratones hipotiroideos no infectados presentaban una disminución significativa del peso absoluto del bazo y del peso del bazo relativo al peso corporal. Sin embargo, ambos parámetros eran similares en los ratones eutiroideos e hipotiroideos tras la infección (Figura 14A). El análisis histológico de los bazos infectados de ambos grupos mostraba una apariencia típica de un proceso infeccioso de malaria: abundantes células eritrocíticas y una hiperplasia de los nódulos linfáticos con una infiltración extendida en la pulpa roja en ambos tipos de ratones (Figura 14B).

Resultados

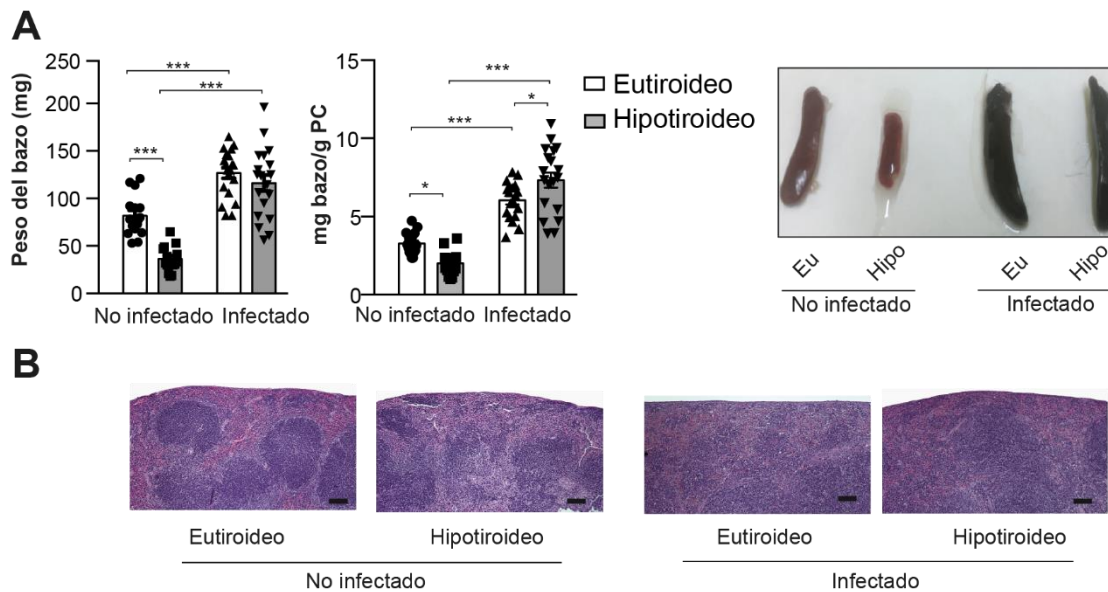


Figura 14 – La MC causa esplenomegalia severa en ratones eu- e hipotiroideos. (A) Peso del bazo, peso del bazo corregido por el peso corporal (PC), $n=15-20$, y fotografías representativas de los bazos de animales hipotiroideos y eutiroideos sin infectar y a día 6 posterior a la infección. **(B)** Imágenes representativas de tinciones histológicas de H&E de los bazos a un aumento 10x. Barra de escala=100 μm , $n=5$. En el panel A, los datos representados son medias \pm SEM y se hizo un ANOVA unidireccional seguido de comparaciones múltiples con el test de Tukey. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

En paralelo a los cambios de peso del bazo, los ratones hipotiroideos sin infectar tenían un número menor de esplenocitos; pero a día 6 p.i la celularidad esplénica, incluidos los eritrocitos, presentaban un incremento notable y mayor que en el grupo de ratones eutiroideos (Figura 15A). Los diferentes estados de diferenciación de los eritroblastos se identificaron según el análisis por citometría de flujo similar al descrito previamente (145). A día 6 p.i los ratones hipotiroideos mostraban un reducido número de Ery B con respecto a los ratones eutiroideos. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los niveles de Ery A y de Ery C (Figura 15B).

Respecto a los leucocitos, se analizaron por citometría de flujo las células mieloides, y dentro de este grupo las células dendríticas tipo 1 y 2 y las Mo-DCs (Figura 7A y 7B, en Materiales y Métodos). Los niveles de las distintas poblaciones mieloides y los linajes de células T implicadas en el proceso infeccioso de esta enfermedad estaban reducidos en el hipotiroidismo previamente a la infección y aumentaron significativamente tras la inoculación del parásito. Este hecho no se observó en los ratones eutiroideos (Figura 15C). Los niveles de células B estaban también significativamente reducidos en los bazos hipotiroideos previamente a la infección, pero se incrementaron en ambos grupos

Resultados

experimentales después de la infección, alcanzando valores similares a día 6 p.i. (Figura 15D).

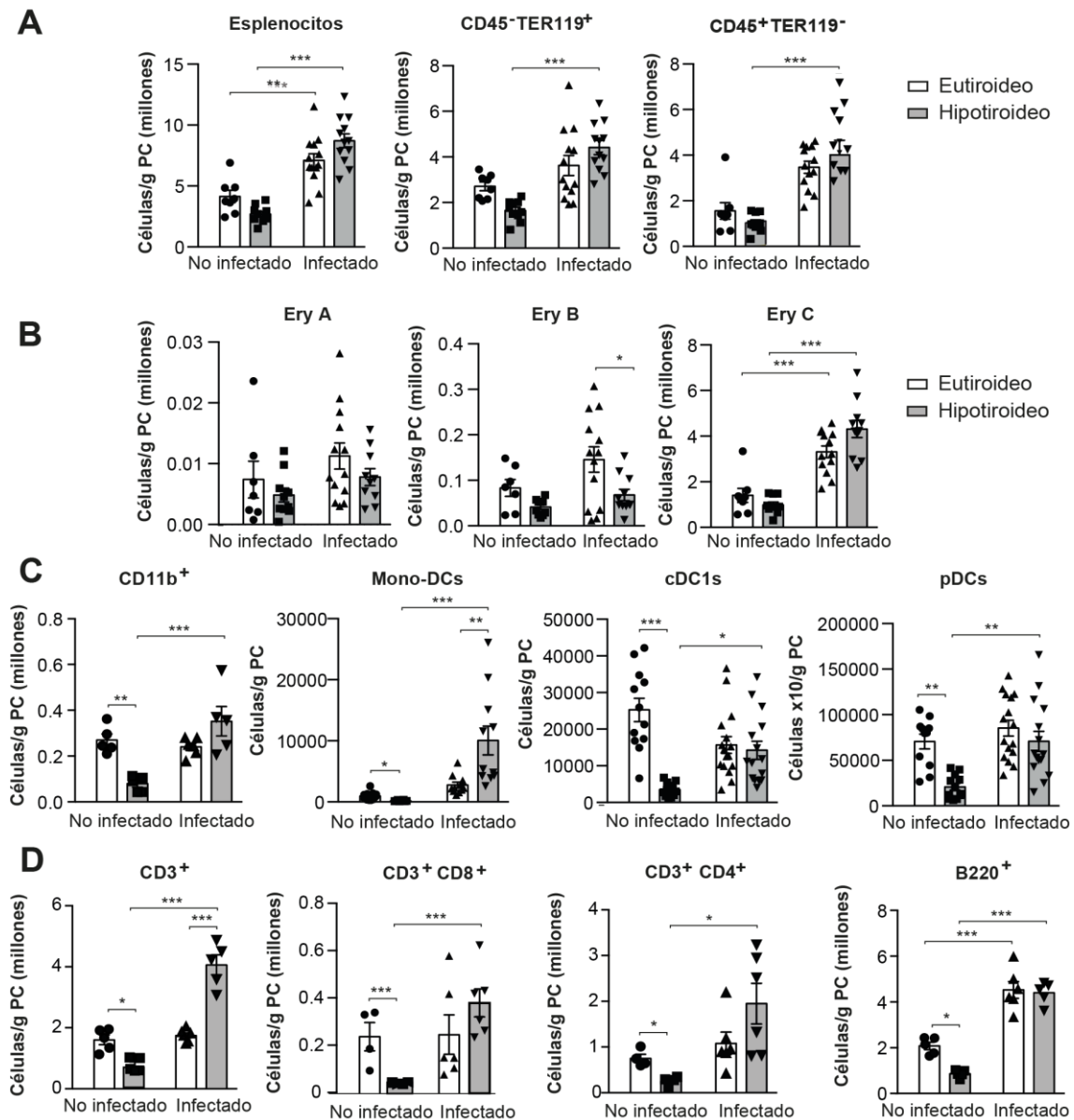
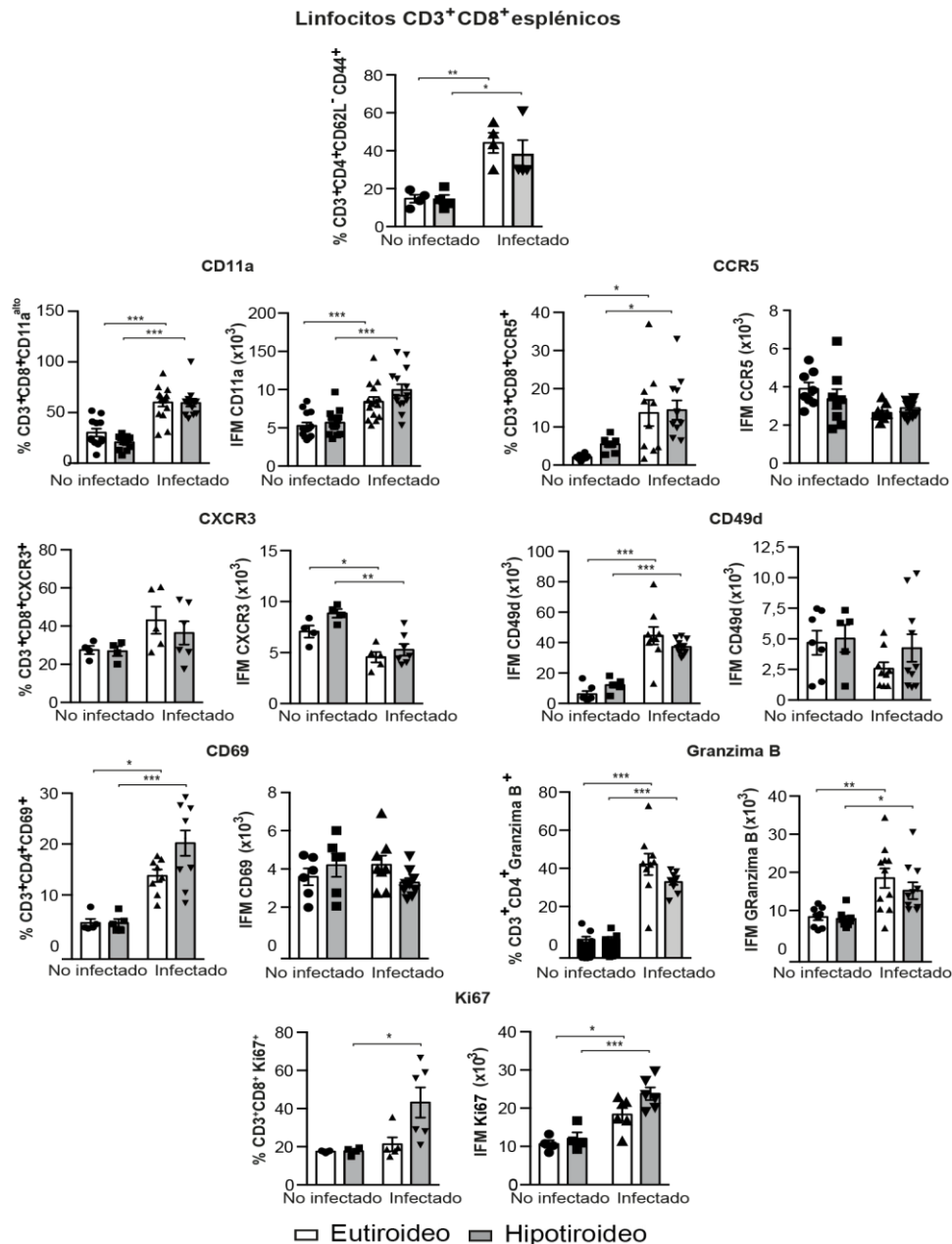


Figura 15 – La MC causa activación del sistema inmune y la hematopoyesis en ratones hipotiroides. (A) Número de esplenocitos totales, leucocitos esplénicos (CD45⁺ Ter119⁺), y eritrocitos esplénicos (CD45⁻ Ter119⁺) n=8-13, en ratones eutiroides e hipotiroides no infectados y a día 6 después de la infección. (B) Número de eritroblastos (Ery) esplénicos tipo A (CD45⁻TER119⁺CD71⁺FCS-A^{alto}), B (CD45⁻TER119⁺CD71⁺FCS-A^{bajo}) y C (CD45⁻TER119⁺CD71⁻), n=8-13. (C) Número de células mieloides CD11b⁺, células dendríticas derivadas de monocitos (Mono-DCs, F4/80⁺CD11b⁺CD206a⁺MHCII⁺), células dendríticas convencionales de tipo 1 (DC1s, CD11c⁺MHCII⁺Siglec H⁺CD8a⁺), y células dendríticas plasmacitoides (pDCs, CD11c⁺MHCII⁺Siglec H⁻CD8a⁺), n=11. (D) Número de linfocitos T (CD3⁺), T cooperadores (CD3⁺CD4⁺) y T citotóxicos (CD3⁺CD8⁺). Número de linfocitos B (B220⁺), n=5-6. (A-D) El número de células está corregido por el peso corporal (PC) y los datos representados son medias ± SEM. En todos los paneles se hizo un ANOVA unidireccional seguida de comparaciones múltiples con el test de Tukey. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

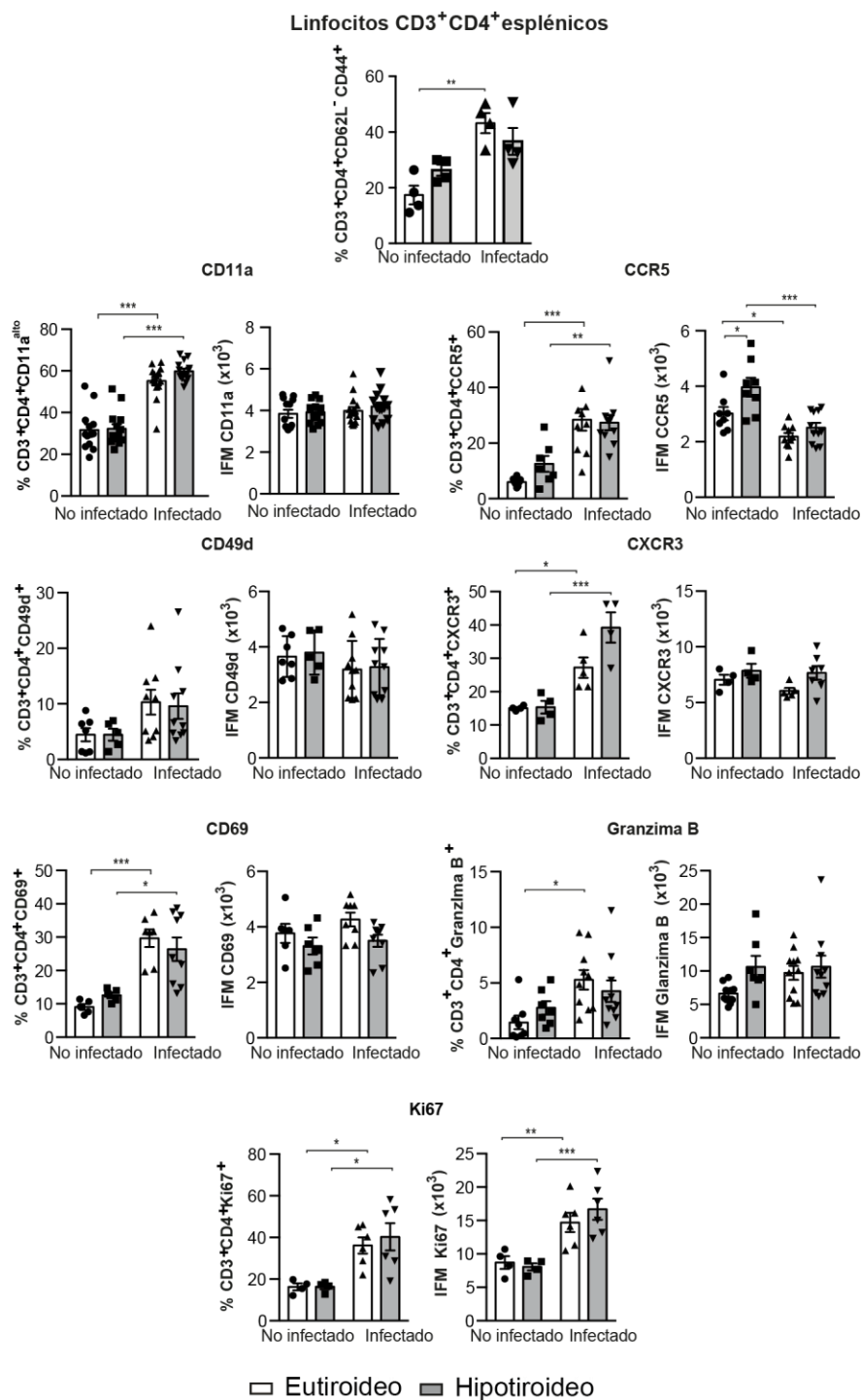
Resultados

Tras la infección, aumenta el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ memoria (CD62L⁻ CD44⁺CD3⁺CD8⁺) tanto en el grupo de animales eutiroides como hipotiroideos (Figura 16) (151). La expresión de CD49d y CD11a, que define el desarrollo del linaje específico de células T en respuesta a *PbA* (152); de CXCR3 y CCR5, receptores de quimiocinas implicados en la migración al cerebro (153, 154) ; del marcador de activación CD69 (155); de Granzima B, una proteasa requerida para el desarrollo de la malaria cerebral (42, 43) y de Ki67, un marcador de proliferación celular (156), revelaron un estado basal de activación de los linfocitos T CD8⁺ y de los linfocitos T CD4⁺ del bazo similar en los ratones eutiroides e hipotiroideos. La inoculación con *PbA* causó un aumento significativo del porcentaje de linfocitos que expresan los marcadores de activación, y este aumento fue también generalmente similar en ambos grupos de animales (Figuras 16 y 17).



Resultados

Figura 16 - Expresión de marcadores de activación de linfocitos T CD8⁺ en los bazo de los ratones eutiroides e hipotiroideos infectados con *PbA*. Porcentaje de linfocitos T CD8⁺ esplénicos que expresan los marcadores indicados y sus correspondientes valores de intensidad de fluorescencia media (IFM) en ratones hipotiroideos y eutiroides no infectados y a día 6 después de la infección, n=4-12. Los datos representados son medias \pm SEM. En todos los paneles se hizo un ANOVA unidireccional seguida de comparaciones múltiples con el test de Tukey *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.



Resultados

Figura 17 - Expresión de marcadores de activación en los linfocitos T cooperadores en los bazos de ratones eutiroides e hipotiroideos infectados con *PbA*. Porcentaje de linfocitos T CD4⁺ positivas para los marcadores indicados y sus correspondientes valores de intensidad de fluorescencia media (IFM) en ratones eutiroides e hipotiroideos sin infectar y a día 6 posterior a la infección, n=4-12. Los datos representados son medias \pm SEM. En todos los paneles se hizo un ANOVA unidireccional seguida de comparaciones múltiples con el test de Tukey. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

Las células dendríticas plasmacitoides (pDCs) mostraron un incremento en la expresión del marcador de CD86 en los bazos hipotiroideos y no en los eutiroides, pero esa diferencia no se observaba en las células dendríticas convencionales de tipo 1 (cDC1) (Figura 18). Todos estos datos indicaron que la infección por *PbA* compensa la atrofia del bazo generada por el hipotiroidismo, causando un incremento masivo en el número de células de las distintas poblaciones esplénicas, que presentan además un estado de activación similar en ambos grupos de ratones y que es el esperado en el desarrollo de la MC.

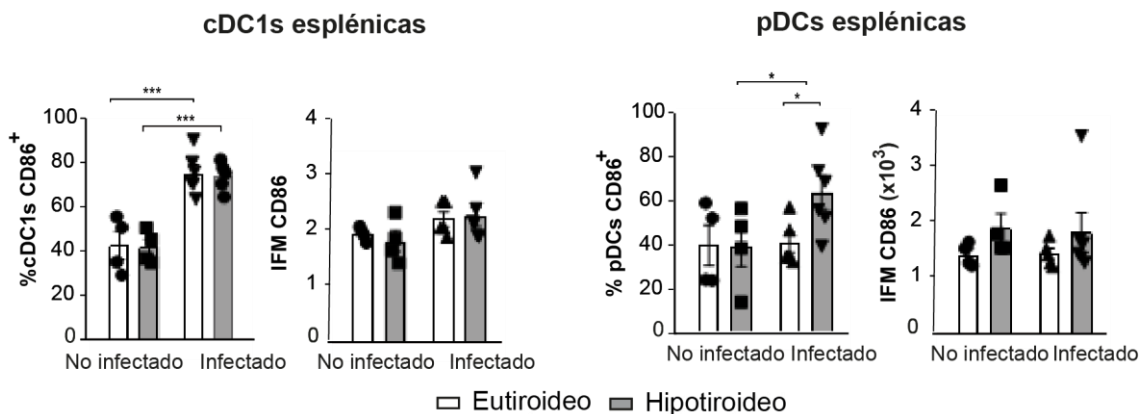


Figura 18 - Activación de la expresión de CD86 en células dendríticas del bazo de animales eutiroides e hipotiroideos infectados con *PbA*. Porcentaje de células cDC1s y de células pDCs positivas para CD86 y sus correspondientes valores de intensidad media de fluorescencia (IFM) en ratones eutiroides e hipotiroideos sin infectar y a día 6 posterior a la infección, n=4-6. Los datos representados son medias \pm SEM. Se hizo un ANOVA unidireccional seguida de comparaciones múltiples con el test de Tukey. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0,001.

Resultados

5. Cerebro

5.1. Rotura de la barrera hematoencefálica y estudio de poblaciones celulares por citometría de flujo

A pesar de la reducción del peso corporal, los ratones hipotiroideos mantienen un tamaño normal del cerebro (Figura 13A). La rotura de la barrera hematoencefálica es uno de los eventos más importantes en el desarrollo de la CM (12) y el hipotiroidismo no protege la integridad de la barrera hematoencefálica, como comprobamos por la extravasación del Azul de Evans, analizada 1 hora después de su inyección intravenosa en el seno retro orbital a día 6 después de la inoculación de *PbA* (Figura 19A y 19B). El análisis por resonancia magnética a día 6 después de la infección y tras 15 min de la inyección de un agente de contraste tipo gadolinio, también revelaba la disrupción de la barrera hematoencefálica confirmando los resultados obtenidos con el ensayo de Azul de Evans, pero con este método detectamos algunas diferencias en algunas zonas del cerebro entre los ratones eu- e hipotiroideos. Así, mientras que la señal fue similar en cerebelo, hipotálamo o hipocampo de ratones hipo o eutiroideos, en otras regiones los valores fueron menores en los ratones hipotiroideos (Figura 19C y 19D).

La rotura de la barrera hematoencefálica permite la infiltración de células inmunes en el cerebro. El número total de células CD45⁺, de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺, así como de DC-derivadas de monocitos, identificados como se muestra en la Figura 7C y 7D en Materiales y Métodos, fueron similares en los cerebros de los ratones eu- e hipotiroideos (Figura 20A). Además, el porcentaje de linfocitos CD3⁺CD8⁺ positivos para CD11a, CD49d y Granzima B fue similar tras la infección en ambos grupos de ratones, lo cual sugería unos niveles similares de activación de estas células en ambos modelos animales (Figura 20B). Por otra parte, los niveles de mRNA en *Granzima B* y *Perforina* mostraron también una inducción análoga, y el análisis de los transcritos de *IL-6* y de *IFN-γ* reveló un microambiente proinflamatorio similar en el cerebro de ambos grupos de ratones infectados. Tampoco se encontraron diferencias significativas en los niveles de mRNA de *PbA* entre ambos grupos de ratones (Figura 20C). Todos estos datos confirmaron la disrupción de la barrera hematoencefálica y una infiltración similar de leucocitos y del parásito en el cerebro de los ratones hipotiroideos y eutiroideos, a pesar de la resistencia que confiere el hipotiroidismo a la MC.

Resultados

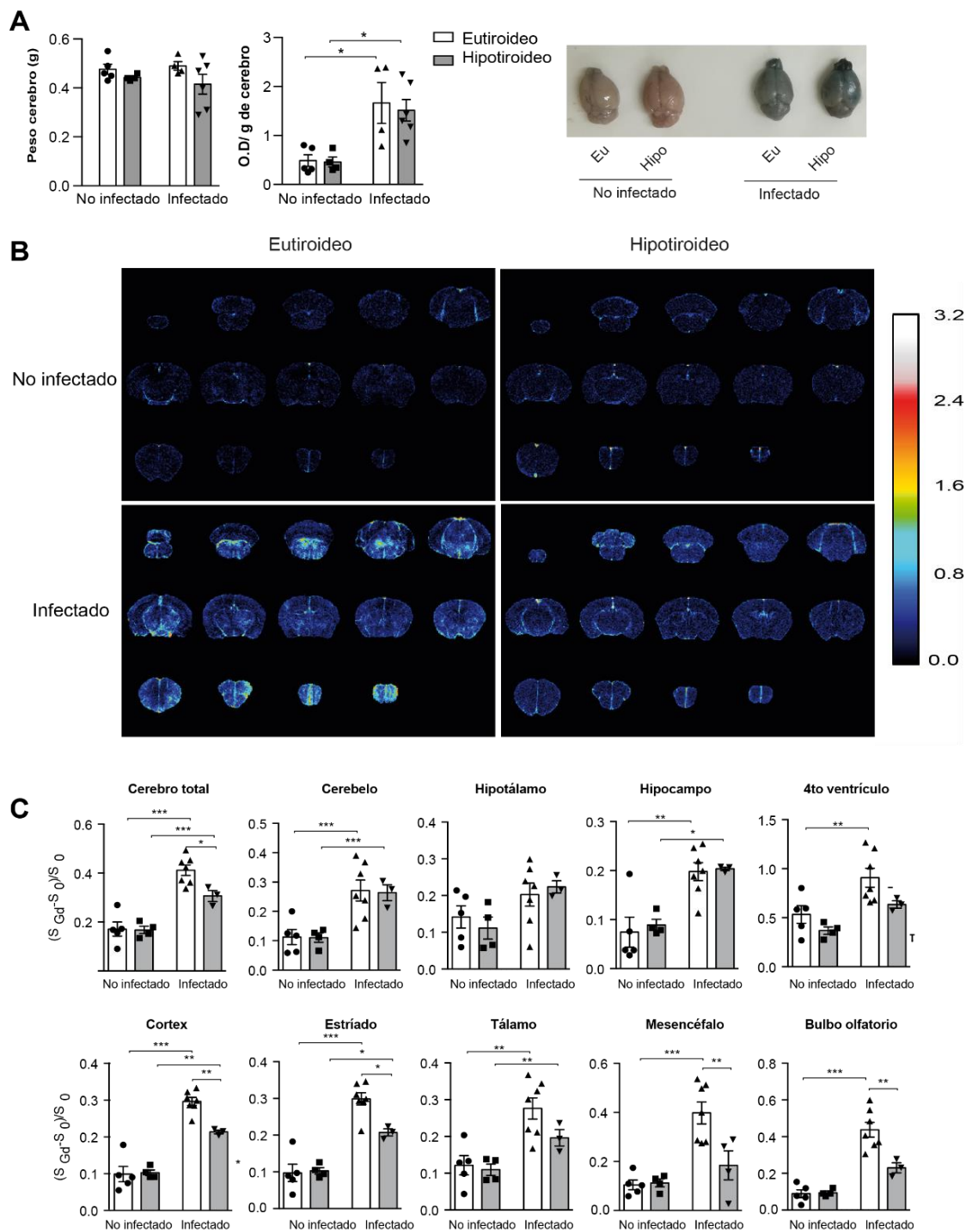


Figura 19 - El hipotiroidismo no protege la integridad de la barrera hematoencefálica tras la infección con *Pba*. (A) A la izquierda, peso del cerebro y cuantificación de la tinción de los cerebros con Azul de Evans, n=5-6. A la derecha, imágenes representativas de la tinción en los cerebros de ratones eu- e hipotiroides sin infectar y a día 6 posterior a la infección. (B) Imágenes axiales en T1 representativas de los cerebros de ratones sin infectar y a día 6 posterior a la infección, 15 minutos después de la inyección de un agente de contraste basado en Gadolinio. (C) Cuantificación de la intensidad de la señal en todo el cerebro y en las regiones indicadas. Los datos representados son medias \pm SEM. En los paneles A y C se hizo ANOVA unidireccional seguida de comparaciones múltiples con el test de Tukey. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0,001$.

Resultados

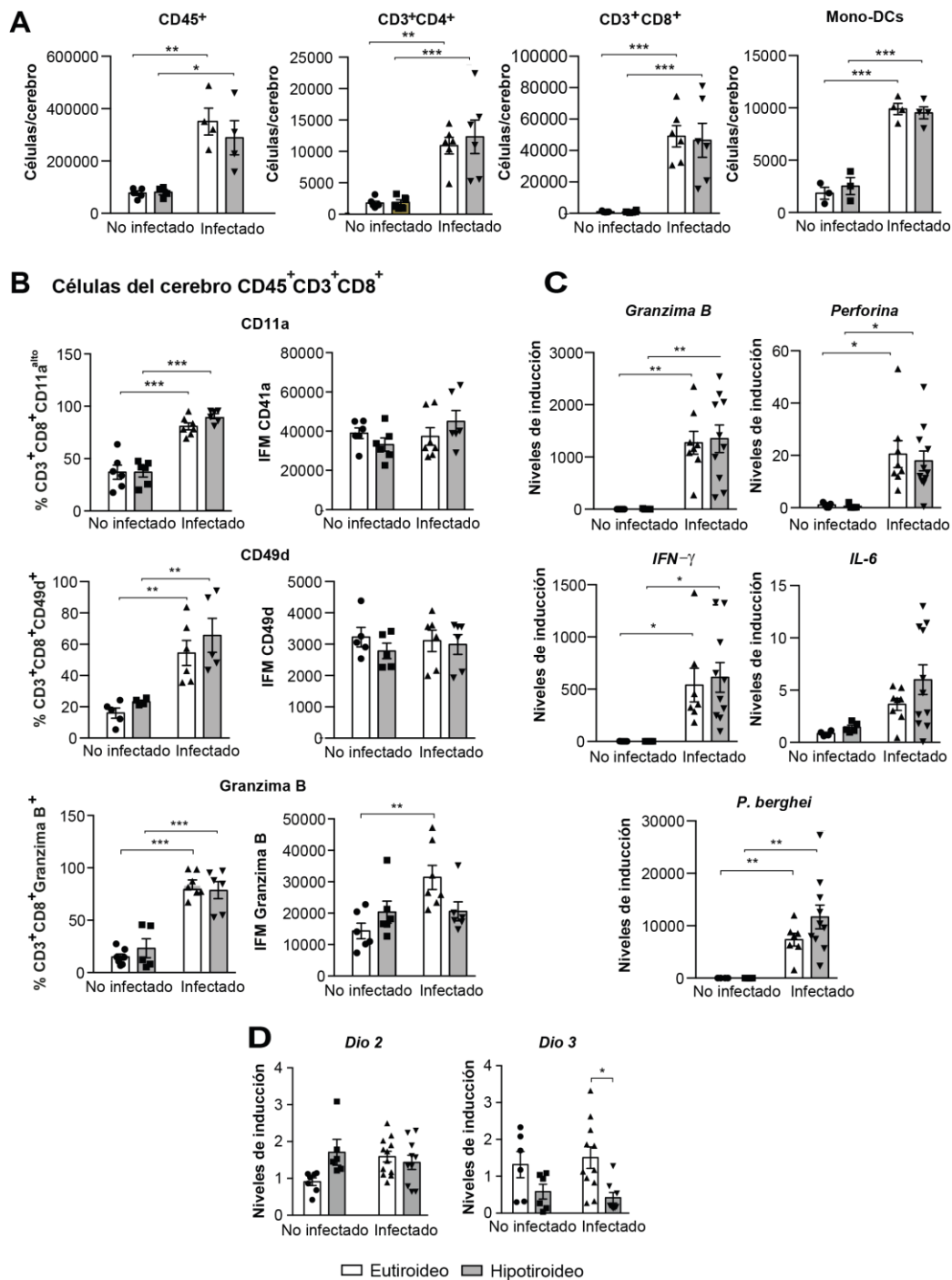


Figura 20 - El hipotiroidismo no protege de la infiltración de células inmunes en el cerebro. (A) Número de leucocitos (CD45⁺), linfocitos T cooperadores (CD45⁺CD3⁺CD4⁺), linfocitos T citotóxicos (CD45⁺CD3⁺CD8⁺) y Mo-DCs (CD45⁺F4/80⁺CD11b⁺CD206a⁺MHCII⁺), infiltrados en el cerebro de los ratones eu- e hipotiroides sin infectar y a día 6 posterior a la infección, n=5-7. (B) Porcentaje de linfocitos T citotóxicos que expresan los marcadores de activación CD11a, CD49d y Granzima B y sus correspondientes valores de intensidad media de fluorescencia, n=5-6. (C) Niveles de transcritos de *Granzima B*, *Perforina*, *IFN- γ* , *IL-6* y *PbA* en cerebro, n=5-6. (D) Niveles de transcritos de *Desiodasa 2* y *3*, n=6-12. Los datos representados son medias \pm SEM. En todos los paneles se hizo un ANOVA unidireccional seguida de comparaciones múltiples con el test de Tukey. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

Resultados

El hipotiroidismo cerebral fue caracterizado por una tendencia al incremento de los niveles de mRNA de *Desiodasa 2* cerebral previos a la infección, la cual regula la generación de T3 a partir de T4, y también por la reducción de los valores de mRNA de *Desiodasa 3*, la enzima responsable de la degradación de T3 (Figura 20D).

5.2. Estudio del daño y compresión cerebral por MRI

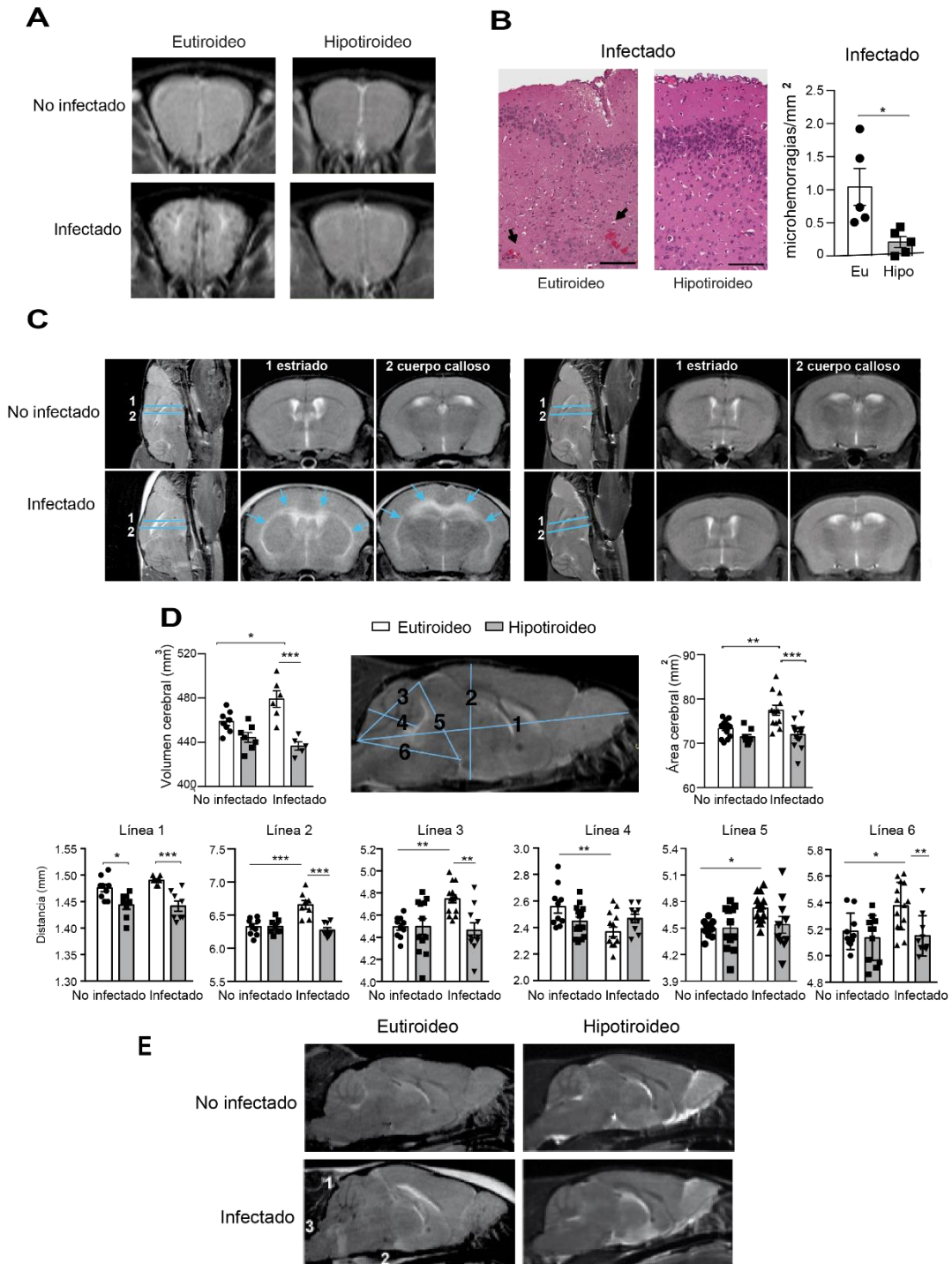
La CM está asociada con la inflamación del cerebro y la aparición de lesiones parenquimáticas (156). Para analizar el daño cerebral producida por el parásito, se estudió el cerebro por RMI y se tomaron imágenes en T2 del bulbo olfatorio, una región que tiene un papel importante en la patogénesis de la MC por ser una vía principal de entrada de los linfocitos TCD8⁺ al cerebro (157). Este análisis mostró la existencia de áreas hipointensas (compatibles con la existencia de microhemorragias) acompañadas por hiperintensidad (que indican la existencia de edema) en el área central de los bulbos olfatorios de todos los ratones eutiroides infectados. Estas áreas no se detectaron en los ratones hipotiroideos (Figura 21A).

Las tinciones de hematoxilina eosina (H&E) de todo el cerebro corroboraron que los ratones eutiroides infectados presentaban un número significativamente mayor de microhemorragias que los hipotiroideos (Figura 21B). En animales eutiroides a día 6 después de la infección, pero no en los hipotiroideos, el edema también se propagaba desde el bulbo hacia la vía rostral migratoria, la zona subventricular y el centro migratorio dorsal, alcanzando el estriado y el cuerpo caloso y causando el engrosamiento del cerebro (Figura 21C).

El aplastamiento del cerebelo y la herniación del tallo cerebral que contiene el centro respiratorio, como consecuencia del edema, es considerado tanto en el modelo experimental de MC (39) como en niños con MC la causa mayor de muerte (158). La infección por *PbA* incrementó notablemente tanto la superficie como el volumen del cerebro en ratones eutiroides, pero no en hipotiroideos (Figura 21D). Para cuantificar los cambios morfológicos debidos al edema, las distancias ilustradas en la Figura 21D fueron medidas en imágenes de un corte medio sagital en T2. Mientras que la longitud total del cerebro no se vio afectada por la infección (línea 1), el grosor del cerebro (línea 2) aumentó en los animales eutiroides tras la infección, lo que no ocurrió en los hipotiroideos. La compresión del cerebro también produjo un cambio en la forma del cerebelo en los ratones eutiroides, pero no en los hipotiroideos. La longitud del cerebelo (línea 3) se incrementó y el ancho del cerebelo (línea 4) se redujo en los animales eutiroides, pero no en los hipotiroideos, tras la infección. La

Resultados

distancia entre la glándula hipofisaria y la zona anterior y posterior del cerebelo (líneas 5 y 6) también aumentó en ratones eutiroides tras la infección, mientras que no se alteró en los ratones hipotiroideos infectados.



Resultados

Figura 21 – Los ratones hipotiroideos infectados con *PbA* presentan una inflamación y daño cerebral reducidos (A) Imágenes representativas axiales en T2 del bulbo olfatorio obtenidas por MRI en ratones eutiroideos e hipotiroideos sin infectar y a día 6 posterior a la infección. **(B)** Tinciones representativas de H&E a un aumento 100x de la corteza cerebral de los animales infectados. Barra de escala: 1 mm. Las hemorragias están señaladas con flechas. El panel derecho muestra la cuantificación del número de microhemorragias/mm² de tejido cerebral total, n=6. Los datos representados son medias ± SEM, y se hizo un test *t* de Student no pareado. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001. **(C)** Imágenes representativas en T2 de las regiones del cerebro indicadas por las líneas 1 y 2 en las imágenes sagitales, correspondientes al estriado y al cuerpo calloso, de ratones eutiroideos e hipotiroideos sin infectar y el día 6 tras la infección. El edema, caracterizado por la presencia de áreas hipertensas, está señalado con flechas. **(D)** Volumen de cerebro, medido en imágenes de T2 por MRI, n=5-7. Los datos representados son medias ± SEM. ANOVA unidireccional seguida de comparaciones múltiples con el test de Tukey. Imagen medio-sagital en T2 mostrando las líneas del 1 al 6 utilizadas para la medición de las distancias cerebrales y cerebelares en ratones eutiroideos e hipotiroideos sin infectar e infectados 6 días antes con *PbA*. El área cerebral fue calculada desde la elipse determinada por las líneas 1 y 2, n= 10-14. Los datos representados son medias ± SEM. ANOVA unidireccional seguida de comparaciones múltiples con el test de Tukey. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001. **(E)** Imágenes representativas mostrando el aplastamiento del cerebelo (1) aplastamiento de la glándula hipofisaria (2), herniación del tallo cerebral en el foramen magnum (3) que sólo se observa en animales eutiroideos infectados.

Estos resultados confirman que hay una compresión significativa, como consecuencia del edema cerebral en ratones eutiroideos, que no ocurre en los hipotiroideos, los cuales muestran resistencia a la MC. La inspección visual de las imágenes del cerebro mostró además de un aplastamiento del cerebelo en los ratones eutiroideos y un hundimiento del tallo cerebral dentro del foramen magnum, algo que no se observa en los animales hipotiroideos (Figura 21E).

5.3. Medida de la presión intracraneal y angiografías cerebrales

Los resultados anteriores son compatibles con un menor aumento de la presión intracraneal (PIC) en los ratones hipotiroideos en comparación con los ratones eutiroideos durante el proceso de infección con *PbA*. Un incremento de la PIC afecta de manera proporcional y directa al espacio existente en el espacio perióptico del nervio óptico, causando un ensanchamiento del diámetro del nervio (147). La medida de la PIC antes y a día 6 después de la infección indicó un aumento de esta en animales eutiroideos, pero no en animales hipotiroideos, tras la infección (Figura 22A). Estos cambios fueron independientes de la presión arterial periférica que es más baja basalmente en animales hipotiroideos y que se reduce de manera similar en ambos grupos tras la infección (Figura 22B). La gravedad y posible muerte por MC está asociada a la compresión de los vasos sanguíneos y a la reducción

Resultados

del flujo sanguíneo como consecuencia de la inflamación del cerebro y el incremento de la presión intracraneal (39). Las angiografías mostraron que los animales hipotiroideos presentan basalmente una marcada reducción del flujo sanguíneo, observable en los planos axial, sagital y coronal (Figura 22C). Paralelamente al incremento de la PIC, los animales eutiroides infectados presentan un colapso de los vasos cerebrales y una reducción significativa del flujo sanguíneo 6 días después de la infección. Sin embargo, los mapas de flujo sanguíneo eran similares entre los ratones hipotiroideos infectados y sin infectar (Figura 22C), hecho que concuerda con la ausencia de compresión cerebral y la ausencia de variaciones significativas en la PIC durante el curso de la enfermedad en estos ratones.

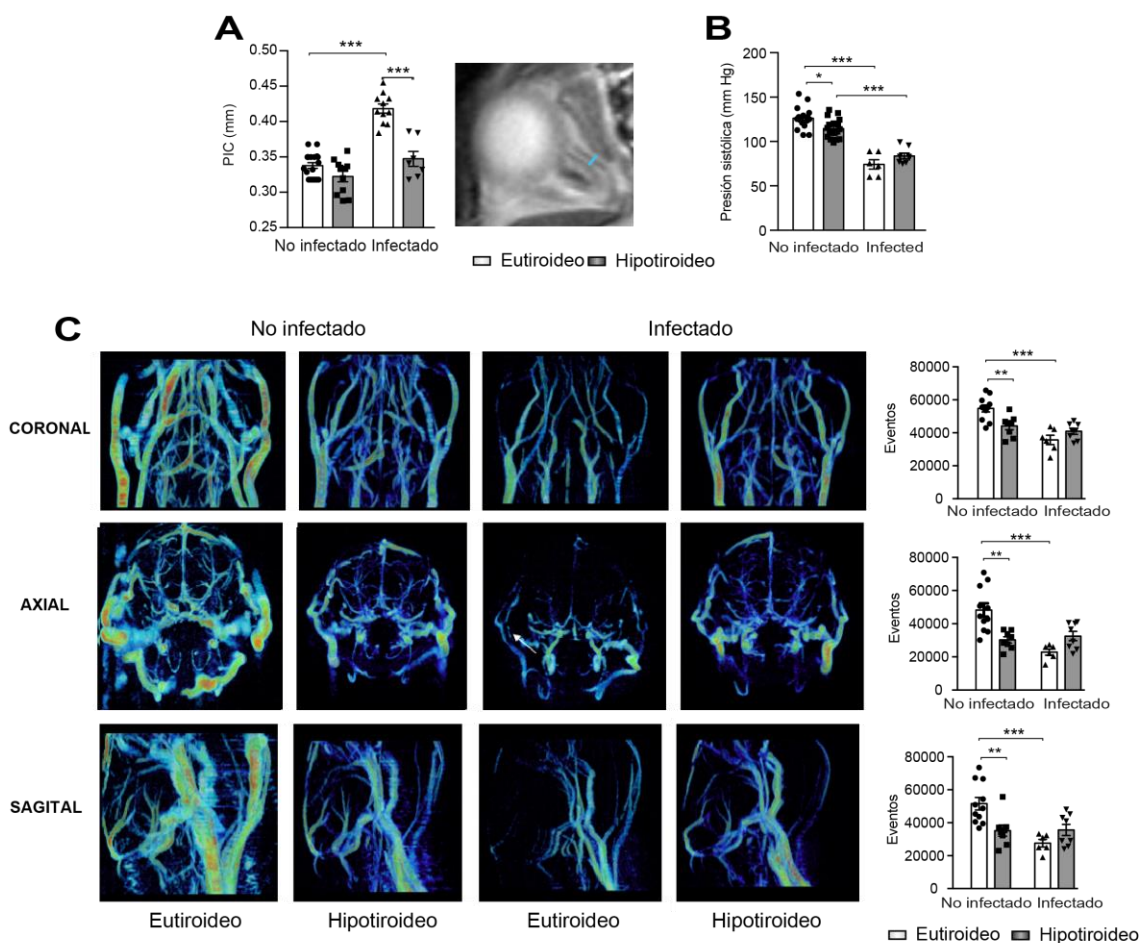
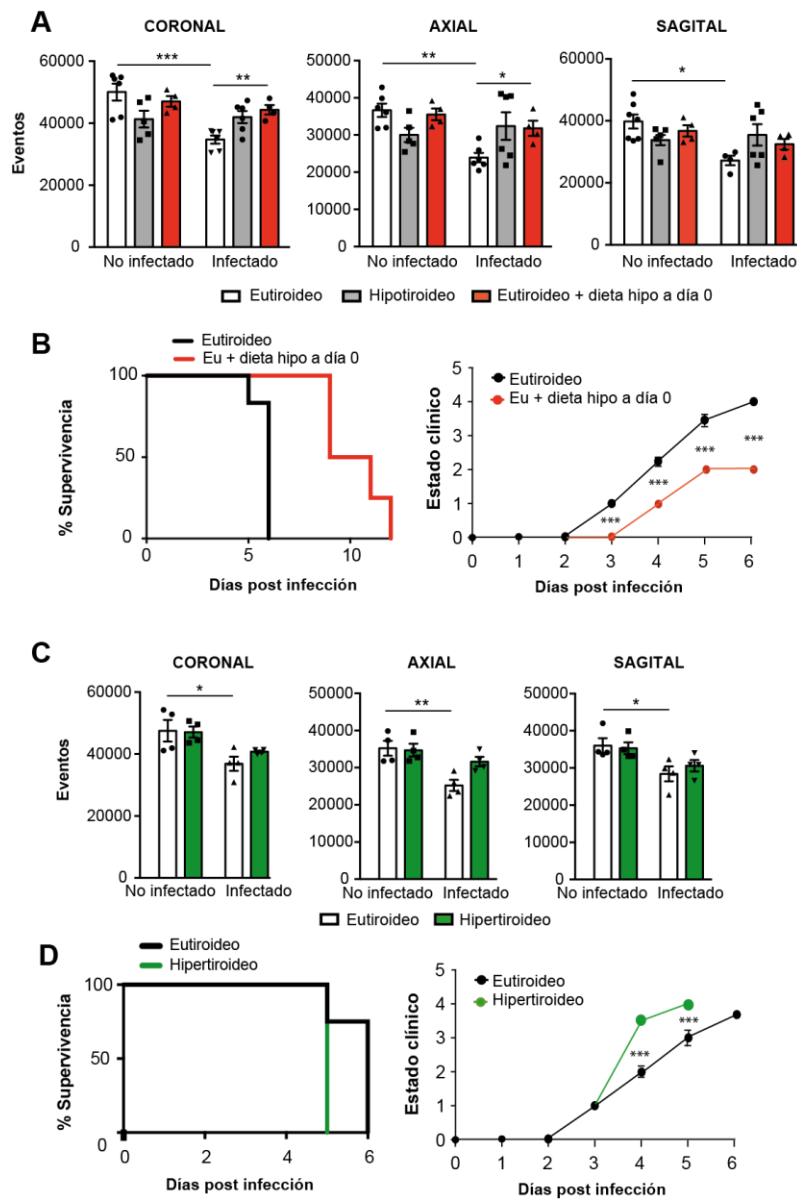


Figura 22 – El hipotiroidismo protege del incremento de la presión intracraneal y del colapso de la circulación cerebral. (A) Presión intracraneal (PIC) en ratones eutiroides e hipotiroideos sin infectar y el día 6 posterior a la infección, n=7-18. A la derecha se muestra una imagen representativa en T2 usada para la medición de la vaina del nervio óptico. (B) Presión sanguínea sistólica en los mismos animales, n=6-18. (C) Proyecciones de máxima intensidad representativas en los planos, coronal, axial, y sagital en un angiograma tridimensional. En los paneles derechos se muestra la cuantificación de la intensidad de la señal, n=7-11. Los datos representados son medias \pm SEM. En todos los paneles se hizo un ANOVA unidireccional seguida de comparaciones múltiples con el test de Tukey. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

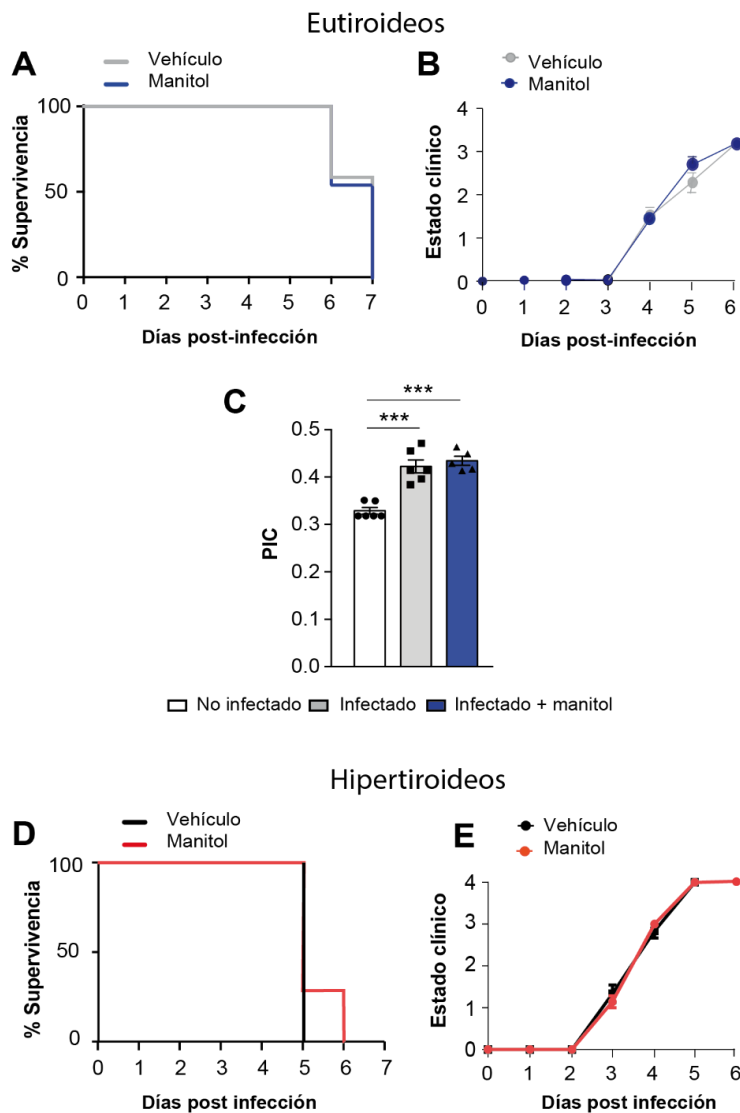
Resultados

El cambio de los animales eutiroides a una dieta hipotiroidea el mismo día de la infección por *PbA* fue suficiente para prevenir el colapso de los vasos sanguíneos (Figura 23A y 23B), lo cual explica la reducción de la sintomatología asociada a MC y el incremento de la supervivencia a la enfermedad (ver Figura 10A). Con respecto a los animales hipertiroideos infectados con *PbA*, se observó que el hipertiroidismo adelantó la muerte y la aparición de los síntomas neurológicos y que a día 5, día hasta el que sobreviven presentaban una reducción del flujo sanguíneo similar al observado en ratones eutiroides a día 6 post infección (Figura 23C), día hasta el que sobreviven los ratones eutiroides (Figura 23D y Figura 8A).



Resultados

Figura 23 – El cambio en el estado tiroideo altera el flujo sanguíneo cerebral durante la infección con *PbA*. (A) Cuantificación de la intensidad de la señal en los planos coronal, axial y sagital de angiogramas de ratones eutiroideos, ratones hipotiroideos y ratones eutiroideos con cambio a dieta hipotiroidea desde el mismo día de la infección. Se muestran los datos de ratones sin infectar y a día 6 después de la infección, n=4-6. Los datos representados son medias \pm SEM. ANOVA unidireccional seguida de comparaciones múltiples con el test de Tukey. (B) Diagrama de supervivencia de Kaplan Meier y estado clínico de los mismos animales. Los datos representados son medias \pm SEM. Se hizo un test *t* de Student no pareado (C) Cuantificación de los angiogramas obtenidos en ratones eutiroideos e hipertiroideos no infectados e infectados. Los angiogramas de los animales eutiroideos se obtuvieron el día 6 posterior a la infección y los de los animales hipertiroideos el día 5 posterior a la infección, n=4. Los datos representados son medias \pm SEM. ANOVA unidireccional seguida de comparaciones múltiples con el test de Tukey. (D) Diagrama de Kaplan Meier representado la supervivencia de los ratones y estado clínico de los mismos animales. Los datos representados son medias \pm SEM. Se hizo un test *t* de Student no pareado. En todos los paneles **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001.



Resultados

Figura 24 – El tratamiento con manitol no reduce la PIC en ratones infectados. (A) Diagrama de supervivencia de ratones eutiroides infectados tratados diariamente con manitol o con el vehículo comenzando el día 0 de la infección con *PbA*. (B) Estado clínico de los ratones. Los datos representados son medias \pm SEM, n=5-7. (C) PIC en ratones eutiroides. Diámetro (mm) del nervio óptico medido el día 6 post infección, n=5-7. Los datos representados son medias \pm SEM. Se hizo un ANOVA unidireccional seguido de comparaciones múltiples con el test de Tukey. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p<0,001. (D) Diagrama de supervivencia de ratones hipertiroideos infectados y sometidos al tratamiento indicado en A. (E) Estado clínico de los ratones hipertiroideos tratados con manitol o con el vehículo de inoculación, n=6-7. Los datos representados son medias \pm SEM.

El manitol ha sido propuesto como tratamiento adyuvante para la MC en humanos (159). Sin embargo, la administración diaria de manitol a ratones eutiroides desde el día inicial de la infección con *PbA* no incrementó la supervivencia ni tampoco disminuyó la PIC ni mejoró la sintomatología clínica durante el proceso infeccioso. Tampoco se observaron efectos del manitol en la presión intracraneal, en la supervivencia o en la progresión de los signos neurológicos en ratones hipertiroideos (Figura 24).

Todos estos datos indican que el hipotiroidismo reduce drásticamente el daño cerebral y la PIC, y mantiene el flujo sanguíneo en ratones infectados, sin prevenir la rotura de la barrera hematoencefálica ni la entrada de leucocitos y parásitos en el cerebro.

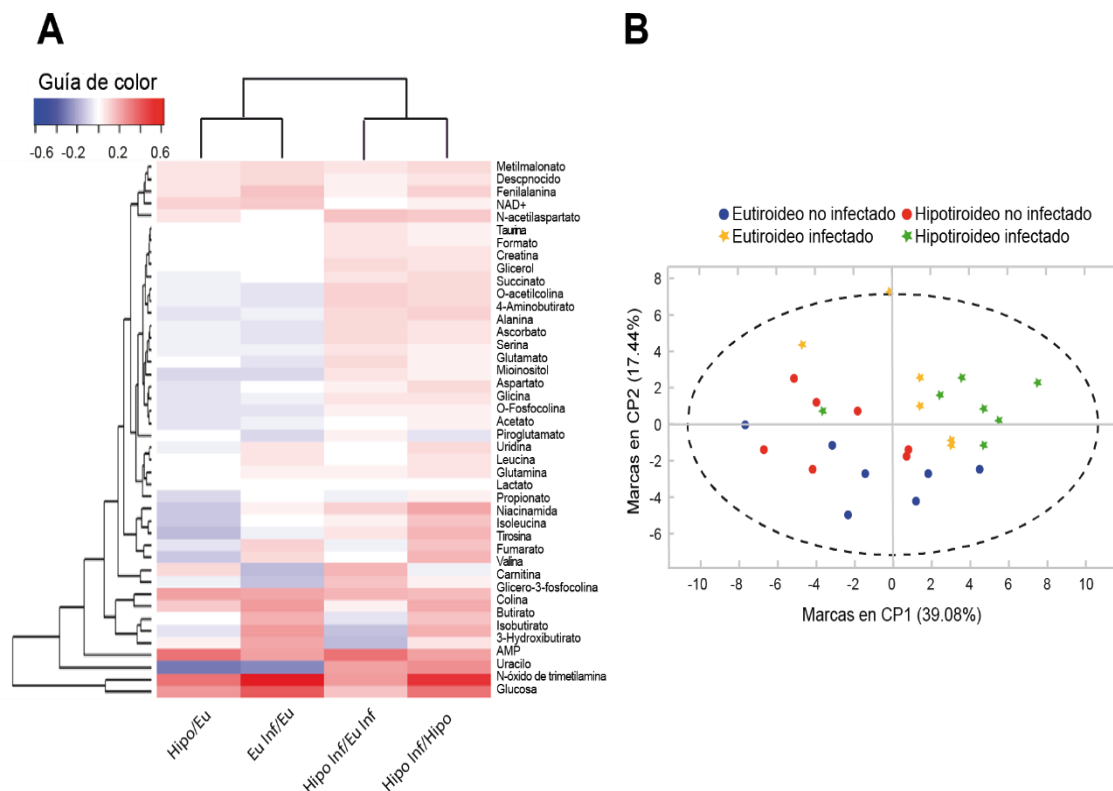
5.4. Análisis de metabolitos en cerebro

Para analizar si el distinto impacto de la enfermedad en los ratones eutiroides e hipotiroideos se extendía también a posibles diferencias metabólicas en el cerebro, realizamos un análisis metabolómico de metabolitos de bajo peso molecular por espectroscopia de resonancia magnética nuclear en los cerebros de ambos modelos de ratón previamente a la infección y a los 6 días p.i. El análisis mostró que previamente a la infección los cerebros de los ratones hipotiroideos ya tenían un perfil metabólico distinto al de los ratones eutiroides, presentando en rasgos generales una subexpresión de múltiples metabolitos en relación con los animales eutiroides. A día 6 de la infección se observó un cambio del perfil metabólico distinto en ratones eutiroides e hipotiroideos, con un incremento de varios metabolitos en los ratones hipotiroideos, pero no en los eutiroides (Figura 25A), existiendo diferencias significativas en 22 metabolitos entre ambos grupos (Figura 26). En ratones hipotiroideos los cambios metabólicos indicaban un metabolismo anaerobio y una producción más eficiente de energía con un incremento en los niveles de lactato y niveles de creatina más altos (148, 159). Los cuerpos cetónicos producidos a partir de los ácidos grasos de cadena corta pueden constituir

Resultados

una importante fuente de energía para el metabolismo del cerebro y en ratones eutiroides los niveles de 3-hidroxiacetil-CoA se incrementaron notablemente indicando que responden a la infección activando el metabolismo de los cuerpos cetónicos. Los niveles de glutamina aumentaron significativamente a día 6 p.i. tanto en ratones eu- como hipotiroideos, pero éstos últimos tenían también los niveles de N-acetil aspartato y alanina incrementados, lo que representa un mecanismo protector para paliar los efectos adversos de la acumulación de glutamina en el cerebro (56). Los marcadores de densidad celular y viabilidad, glicero-fosfocolina y N-acetil aspartato (148, 159), estaban significativamente reducidos en los animales eutiroides, pero no en hipotiroideos, después de la infección. Esto indica de nuevo una mejor respuesta metabólica a la infección de los ratones hipotiroideos. El análisis de componentes principales (CP) (Figura 25B) revela la separación entre los cerebros infectados y no infectados a lo largo del segundo CP (CP2), que puede ser atribuido a la influencia de los altos niveles de glutamina en los ratones infectados y a los altos niveles de glicero-fosfocolina en los ratones no infectados. Además, los cerebros de los ratones eu- e hipotiroideos presentan una distribución distinta con respecto al CP1 después de la infección, debido principalmente a los distintos niveles de acetilaspartato, alanina, acetilcarnitina e 3-hidroxiacetil-CoA.

Estos datos indicaron la existencia de diferencias en el metabolismo cerebral entre ratones eutiroides y ratones hipotiroideos previa y posteriormente a la infección por *PbA*.



Resultados

Figura 25 - El hipotiroidismo modula el perfil metabólico del cerebro en respuesta a la infección con *PbA*. (A) Mapa de calor de la metabolómica obtenida por espectroscopía de MRN en el cerebro de ratones eu- e hipotiroideos sin infectar y el día 6 después de la infección, n=6-7. (B) Análisis de componentes principales (CP1 vs CP2) de los metabolitos del cerebro.

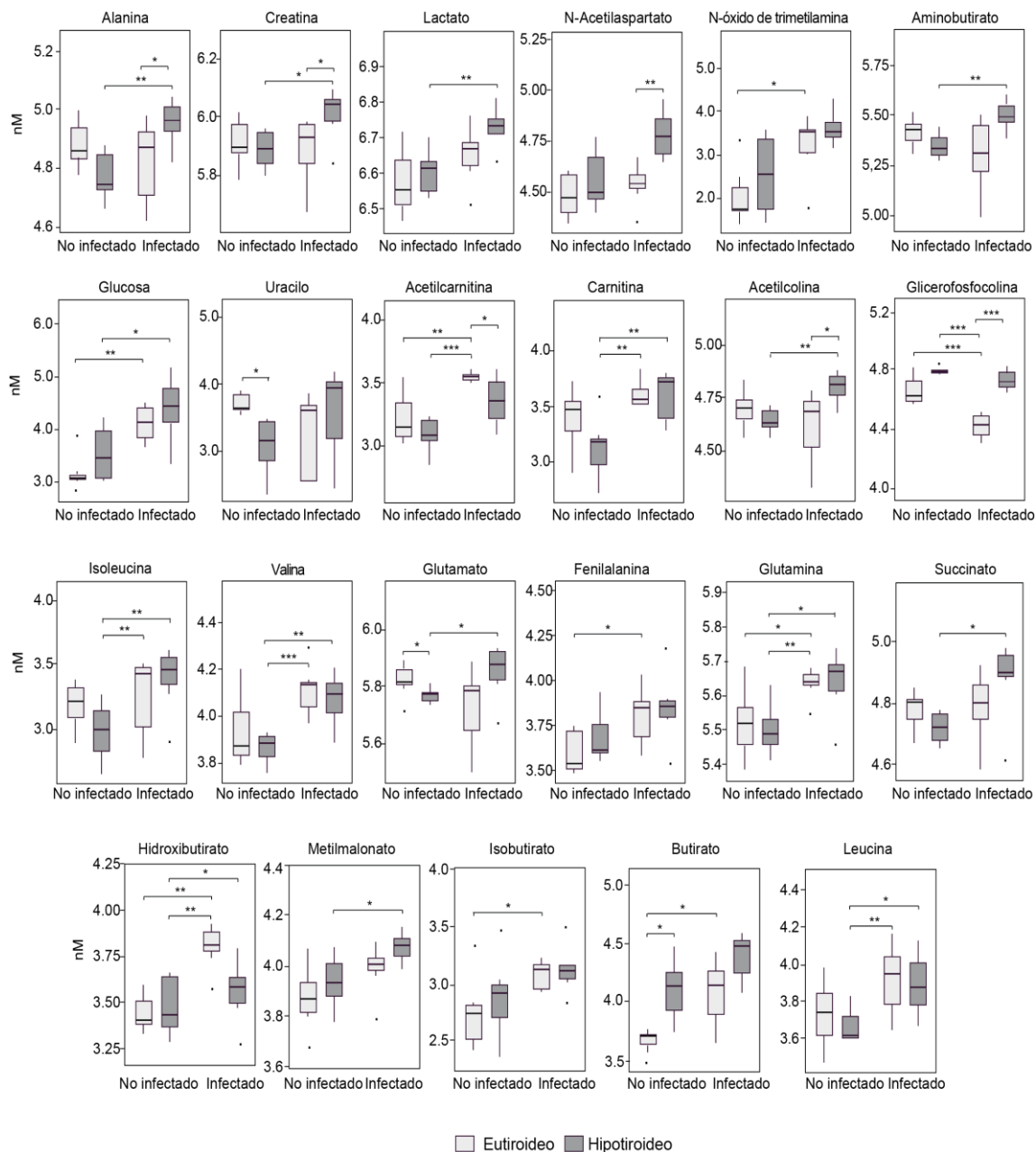


Figura 26 – Niveles de metabolitos en los cerebros de ratones eutiroides e hipotiroideos infectados con *PbA*. Diagramas de cajas de la concentración de los metabolitos indicados, que mostraron diferencias significativas entre los cerebros de los ratones eutiroides e hipotiroideos, sin infectar y a día 6 posterior a la infección, n=5-7. Los datos representados son medias \pm SEM. ANOVA unidireccional seguido de comparaciones múltiples con el test de Tukey. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Resultados

Capítulo III: Alteraciones metabólicas tras la infección con *PbA*

6. Fenomáster

En siguiente lugar evaluamos, mediante el uso de cajas metabólicas, cómo afecta la infección por *PbA* al comportamiento y a las funciones metabólicas de los ratones eu- e hipotiroideos. Los ratones son animales nocturnos y previamente a la infección y durante los siguientes 4 días los animales eutiroideos tuvieron una actividad locomotora mucho mayor que los hipotiroideos. Sin embargo, desde el día 4 p.i los distintos tipos de movimiento analizados disminuyeron drásticamente en los ratones eutiroideos, mientras que en los ratones hipotiroideos esta disminución fue mucho menor (Figura 27A). El consumo acumulado de comida y bebida también dejó de crecer forma abrupta en los ratones eutiroideos, viéndose menos afectado en los ratones hipotiroideos, los cuales previamente a la infección eran hipofágicos (Figura 27B y 27C). Durante los 4 primeros días tras la infección los ratones eutiroideos preservaron un buen ritmo circadiano con un volumen nocturno de consumo de O₂ y producción de CO₂ mayor que los hipotiroideos. Sin embargo, desde la cuarta noche, tanto el volumen de CO₂ como el volumen de O₂ disminuyeron fuertemente hasta la muerte en ratones eutiroideos, pero no en ratones hipotiroideos, y durante al menos los dos últimos días de vida los ratones eutiroideos, presentaron un menor intercambio de O₂ y CO₂ que los ratones hipotiroideos (Figura 27D y 27E). El cociente de intercambio respiratorio (RER) (V_{CO_2}/V_{O_2}) da una indicación sobre el tipo de fuente de energía usada por el organismo. Durante las 4 primeras noches los animales eutiroideos presentaban valores con cercanos a 1, mientras que los hipotiroideos presentaban valores más bajos. Sin embargo, en los estadios más tardíos de la enfermedad, el valor de RER disminuyó en los animales eutiroideos indicando que hay un alto consumo de ácidos grasos, lo cual no fue tan evidente en hipotiroideos (Figura 27F). Tal como esperábamos (115), los ratones eutiroideos tuvieron un mayor consumo de energía que los ratones hipotiroideos antes y al inicio de la aparición de los síntomas de la infección. Sin embargo, la tasa de consumo de energía del grupo eutiroideo disminuyó claramente y de manera continuada a partir de la cuarta noche después de la inoculación de *PbA*, hasta el fallecimiento a día 6 o 7 p.i, mientras que los ratones hipotiroideos fueron capaces de mantener un gasto energético mucho más estable durante el transcurso de la enfermedad (Figura 27G). Todos estos datos indican que los ratones hipotiroideos presentan una mayor resiliencia a los cambios conductuales, respirométricos y de consumo energético durante las fases más tardías de la MC (Figura 27H).

Resultados

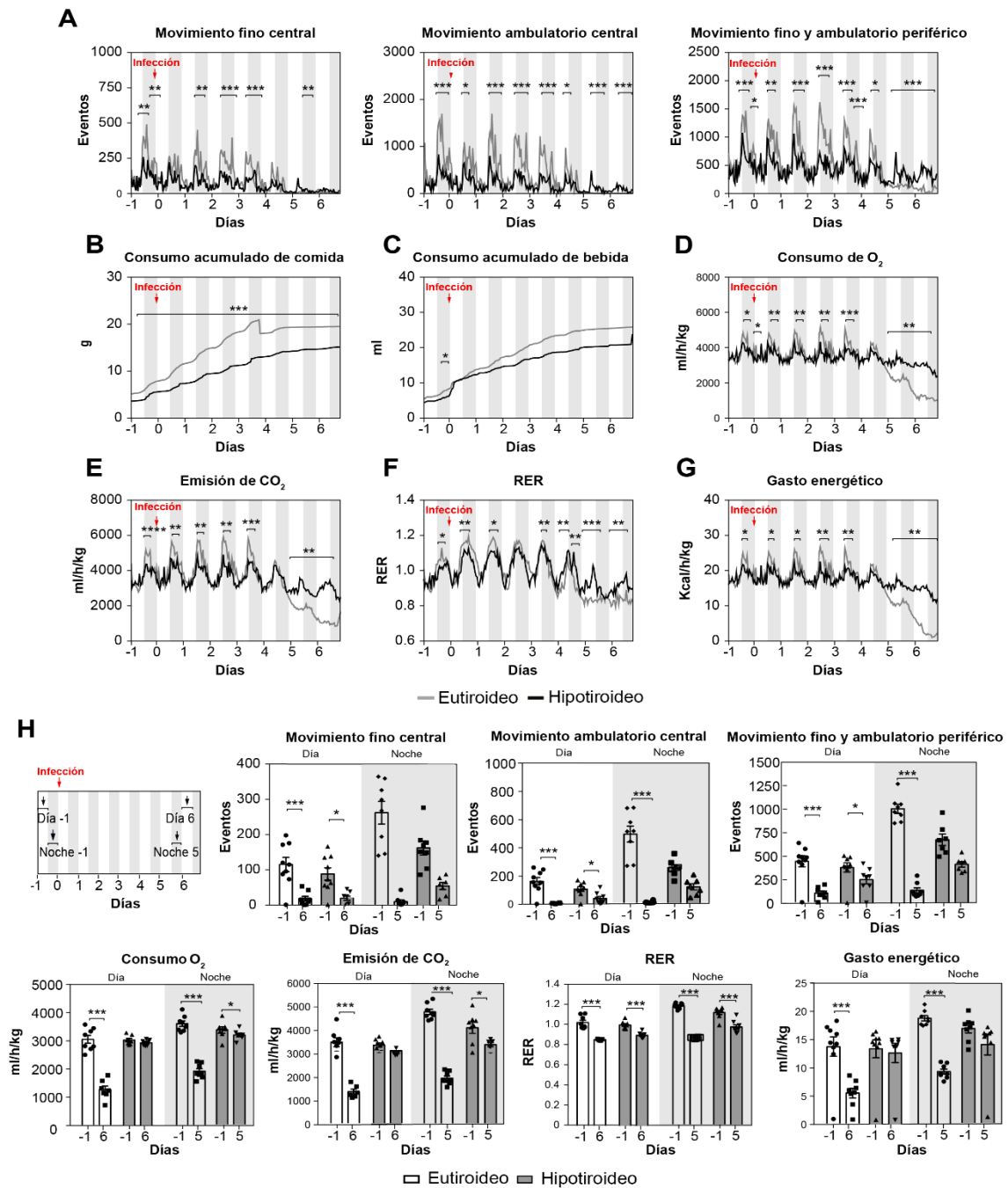


Figura 27 - Comportamiento y parámetros respirométricos durante el curso de la infección *Pba* en ratones eutiroides e hipotiroides. (A) Movimientos registrados en los animales eu- e hipotiroides previamente a la infección y tras la infección. El momento de la inoculación de *Pba* está indicado con una flecha. Las luces están apagadas (columnas grises) entre las 8 p.m y las 8 a.m. y están encendidas (columnas blancas) en la otra franja horaria. (B-C) Consumo acumulado de agua y de bebida (D-G) Consumo de O₂, emisión de CO₂, cociente de intercambio respiratorio (RER) y consumo de energía, n=8-7 (H) Diagrama mostrando la media de valores obtenidos en los días indicados antes y después de la infección por *Pba*, n=7-8. En los paneles A-G los datos representados son medias \pm SEM. Se hizo el test *t* Student no pareado **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001. En el panel H los datos representados son medias \pm SEM y se hizo un ANOVA unidireccional seguido de comparaciones múltiples con el test de Tukey **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001.

Resultados

7. Expresión de proteínas de señalización.

Uno de los efectos metabólicos descritos de las HT es la regulación de la deacetilasa Sirt1. (149). El análisis de la expresión de la proteína Sirt1 en el hígado, un órgano metabólico fundamental, indicó que los niveles de Sirt1 disminuyeron a día 6 p.i tanto en ratones eutiroides como hipotiroideos (Figura 28). Para determinar la actividad de Sirt1, se analizaron los niveles de NF- κ B p65 acetilado (160), observándose que los ratones eutiroides presentaban menores niveles de Acetil-NF- κ B p65 que los ratones hipotiroideos antes de la infección. Sin embargo, los niveles de Acetil-NF- κ B p65 se incrementaron a día 6 p.i en los animales eutiroides, pero no en los hipotiroideos, indicando que la actividad de Sirt1 disminuye en la MC solo en las condiciones eutiroides. Este hecho ocurre pese a una reducción de los niveles de NF- κ B p65 total, que fue similar en ambos grupos de ratones. (Figura 28).

mTORC1 modula la síntesis de proteínas y otras reacciones anabólicas y su actividad está regulada por las hormonas tiroideas (117). Para estudiar el grado de activación de mTORC1, se determinó el estado de fosforilación de p70 S6K, sustrato de mTORC1, y de S6, sustrato de p70 S6k. La infección por *PbA* disminuyó la fosforilación de p70 S6K y de S6, especialmente en ratones eutiroides, los cuales mostraron unos niveles de fosforilación más elevados que los hipotiroideos a día 6 p.i (Figura 23). La leptina incrementa la actividad de mTORC1 y se ha descrito que la leptina disminuye la supervivencia a la MC en ratones con dieta restringida (53). Los ratones hipotiroideos presentaron niveles disminuidos de leptina en sangre (Figura 29A). Sin embargo, la administración de una dosis alta de leptina desde día 0 no fue capaz de alterar la letalidad del animal hipotiroideo en respuesta a la infección por *PbA* (Figura 29B).

AMPK es también una quinasa esencial en la regulación del metabolismo, que se modula por las TH (119, 161). Antes de la infección los ratones hipotiroideos presentaron mayores niveles de AMPK y de su forma fosforilada, pero a día 6 p.i los niveles de P-AMPK se redujeron presentando tanto en ratones eu- como hipotiroideos niveles muy similares (Figura 28). Todos estos datos indican que los ratones eutiroides e hipotiroideo presentan diferencias en el estado de activación de las 3 enzimas claves en la regulación del metabolismo antes y después de 6 días de la infección por *PbA*, siendo el estado metabólico del hospedador un factor clave en la tolerancia a las infecciones.

Resultados

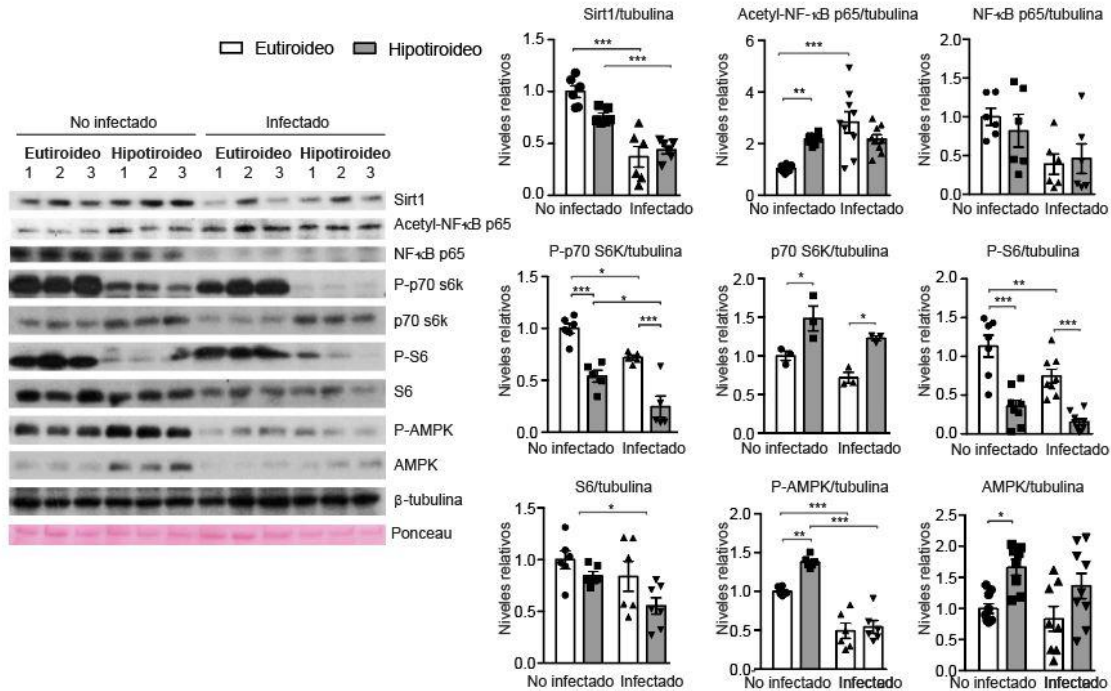


Figura 28 - El hipotiroidismo modula la actividad hepática de enzimas clave en la regulación de la actividad metabólica en ratones sin infectar e infectados con *Pba*. A la izquierda, imágenes de uno de los westerns blots llevados a cabo para la identificación de las proteínas totales y fosforiladas indicadas en el hígado de animales eutiroides e hipotiroides el día de la infección con *Pba* y tras 6 días de infección. A la derecha, las gráficas representan la cuantificación los niveles de inducción de las proteínas indicadas en relación con los valores obtenidos en los animales eutiroides sin infectar, después de normalizar los valores por los niveles β -tubulina utilizados como control de carga, $n=6$. Los datos representados son medias \pm SEM. En todos los paneles mostrados se hizo un ANOVA unidireccional seguido de comparaciones múltiples con el test de Tukey * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

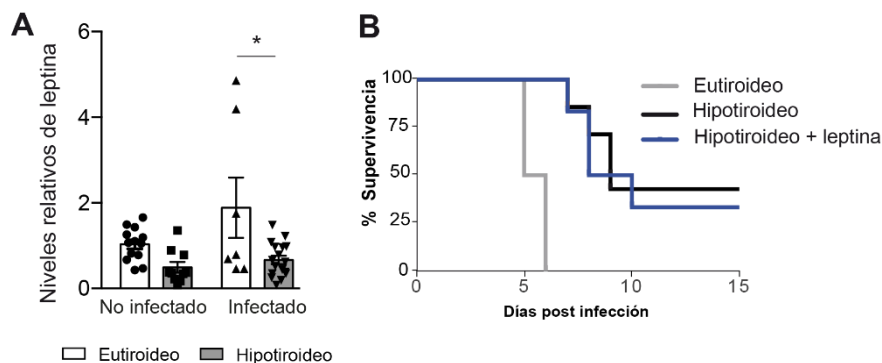
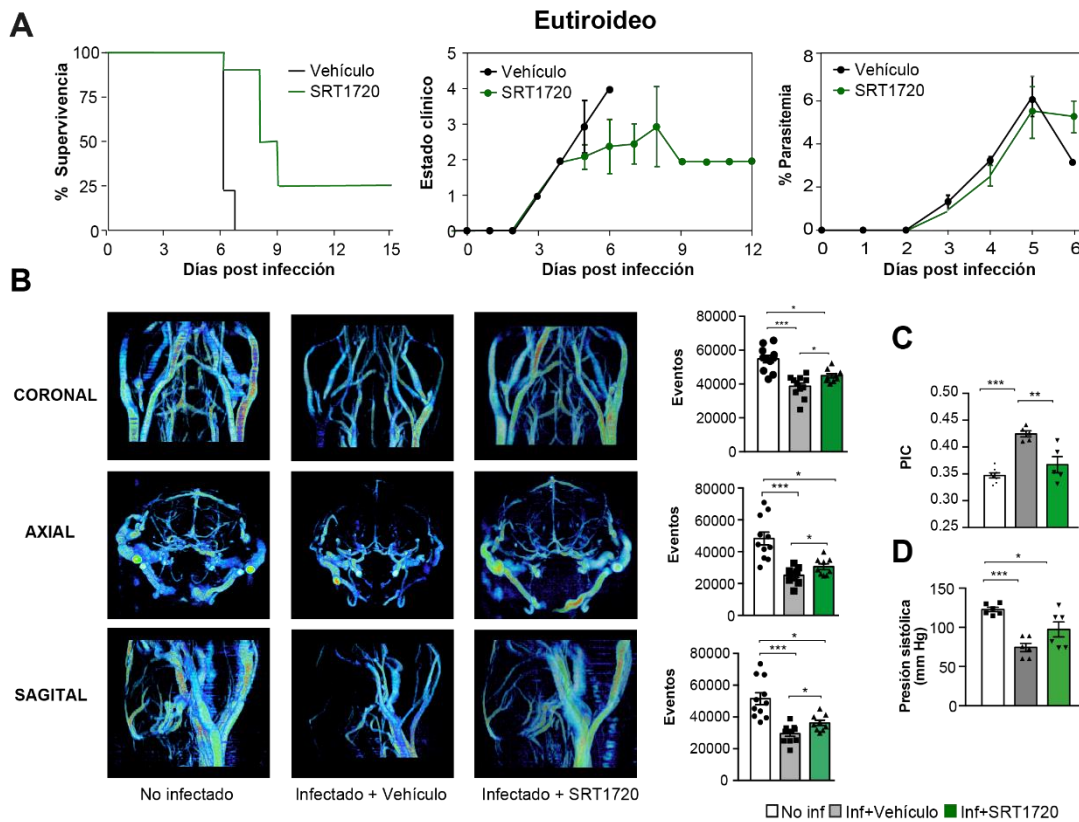


Figura 29 – La leptina no modula la tolerancia a la MC inducida por el hipotiroidismo. (A) Niveles de leptina circulante en ratones eutiroides e hipotiroides sin infectar y el día 6 posterior a la infección, $n=7-17$. Los datos representados son medias \pm SEM. Se hizo un ANOVA unidireccional seguido de comparaciones múltiples con el test de Tukey. * $p < 0.05$. **(B)** Supervivencia de los ratones eutiroides, hipotiroides inyectados con vehículo e hipotiroides inyectados con leptina (20 μ g cada 12 horas) durante 15 días, según diagrama de Kaplan Meier.

Resultados

8. Efecto de las alteraciones de la actividad de Sirt1 en la MC.

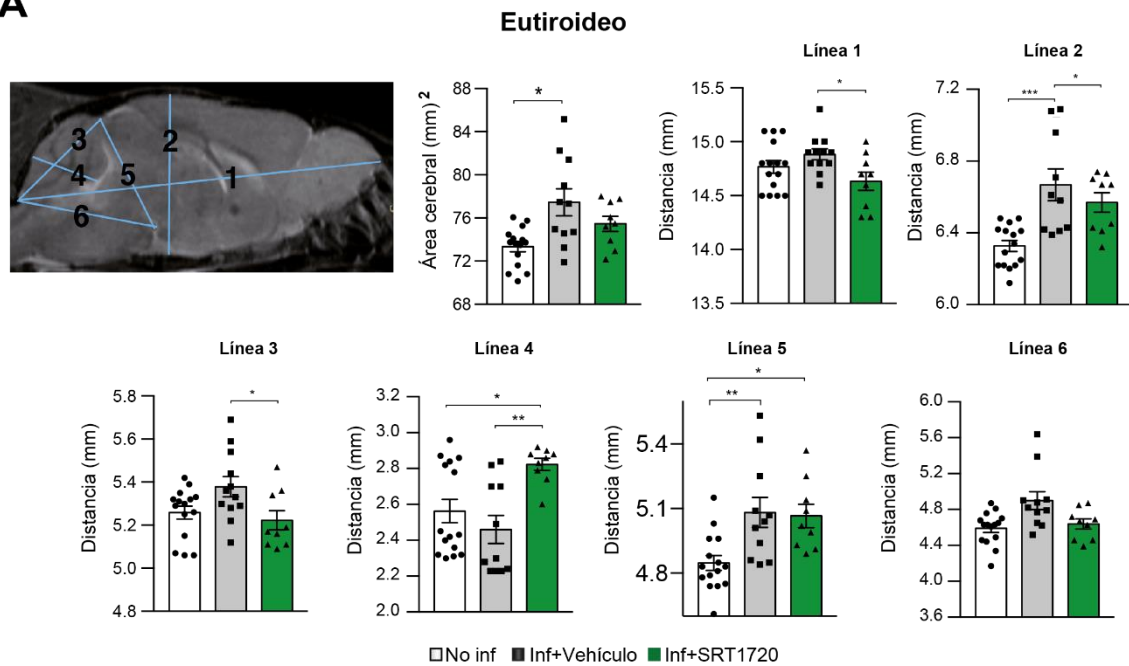
Hemos visto que tanto la actividad de Sirt1 como el consumo de energía disminuían drásticamente en los ratones eutiroides, pero no en los hipotiroideos, después de la infección con *PbA*. Ya que Sirt1 activa el consumo energético (63, 162, 163), decidimos analizar la posibilidad de que la actividad de Sirt1 regulara la tolerancia a la MC. Para ello, tratamos diariamente desde el día de la infección a ratones eutiroides con SRT1720, un activador de Sirt1 (142). Este tratamiento incrementó significativamente la supervivencia y cerca de un 25% de los ratones no desarrollaron síntomas de MC, sin alterar significativamente los niveles de parasitemia (Figura 30A), indicando que la activación de Sirt1 aumenta la tolerancia a la enfermedad. Además, el tratamiento de ratones eutiroides con SRT1720 redujo la PIC (Figura 30C) y el colapso de los vasos cerebrales causados por la infección (Figura 30B), mientras que aumentó la presión sistólica sanguínea (Figura 30D). El incremento del ancho del cerebro, y el cambio de forma del cerebelo en respuesta a *PbA* fueron también menores en los animales eutiroides tratados con SRT1720 (Figura 31A), y este tratamiento causó una clara mejoría del estado del bulbo olfatorio (Figura 31B) y una reducción del edema en otras áreas cerebrales (Figura 31C).



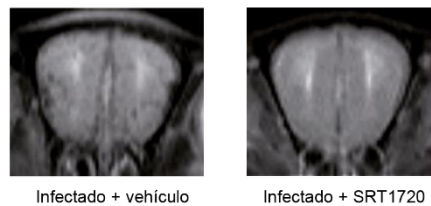
Resultados

Figura 30 – El activador de Sirt1, SRT1720, aumenta la supervivencia de los ratones eutiroides en la infección por *PbA*. (A) Diagrama de Kaplan Meier, estado clínico y parasitemia en animales eutiroides tratados diariamente con vehículo o con SRT1720 desde el día 0, n=8, test *t* de Student no pareado. (B) Angiogramas representativos en los planos coronal axial y sagital y sus cuantificaciones en ratones eutiroides sin infectar e infectados a día 6 después del mismo tratamiento con SRT1720, n=9-11. (C) Valores de presión intracraneal (PIC) en los mismos grupos de ratones, n=5-8. (D) Presión sistólica sanguínea en los mismos animales, n=5-8. En los paneles B-D Los datos representados son medias \pm SEM. Se hizo un ANOVA unidireccional seguida de comparaciones múltiples con el test de Tukey. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0,001.

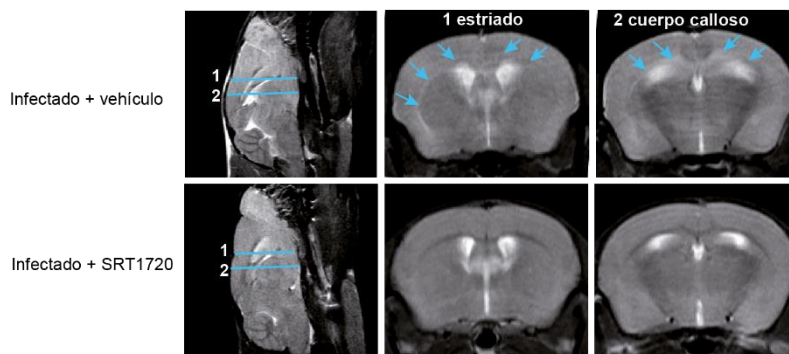
A



B



C



Resultados

Figura 31 – Disminución del daño cerebral en ratones eutiroides tratados con SRT1720 durante la infección por *PbA*. (A) Imágenes mediales sagitales en T2, mostrando las líneas usadas para medir las distancias 1-6 en ratones eutiroides tratados con vehículo o con SRT 1720 a día 6 tras la infección, n=13-9. Los datos representados son medias \pm SEM. Se hizo un ANOVA unidireccional seguida de comparaciones múltiples con el test de Tukey. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. (B) Imágenes axiales en T2 representativas del bulbo olfatorio en los mismos grupos. (C) Imágenes axiales en T2 representativas del estriado (línea 1 en la imagen sagital) y cuerpo calloso (línea 2 en la imagen sagital). Las flechas indican la presencia de edema.

Por otro lado, la inhibición de la actividad de Sirt1 en ratones hipotiroideos mediante el tratamiento diario con el inhibidor EX-527 (143) desde el día de la infección, redujo la supervivencia, adelantando la muerte con síntomas de MC a los días 5-10 p.i. EX-527 no afectó a la supervivencia de ratones hipotiroideos sin infectar, descartando un posible efecto tóxico de este compuesto en estos animales (Figura 32A). Las angiografías revelaron que los ratones hipotiroideos tratados con EX-527 mostraron un colapso de los vasos cerebrales tras la infección (Figura 32B) y un aumento significativo de la PIC (Figura 32C), que no se observó en los animales que recibieron el vehículo. Por otra parte, el tratamiento con EX-527 no alteró la presión arterial sistólica en los ratones hipotiroideos infectados (Figura 32D). El análisis por RMI indicó que el EX527 produjo un aumento tanto del área tanto cerebral como de la anchura del cerebro (Figura 33A), un aplastamiento del cerebelo (Figura 33A) y un edema detectable en el bulbo olfatorio y en otras áreas posteriores del cerebro (Figura 33B y 33C). Estos resultados indican que la modulación de la actividad de Sirt1 está involucrada en la tolerancia a la MC inducida por el hipotiroidismo y que la activación de Sirt1 en animales eutiroides incrementa la tolerancia a la enfermedad mejorando la supervivencia.

Resultados

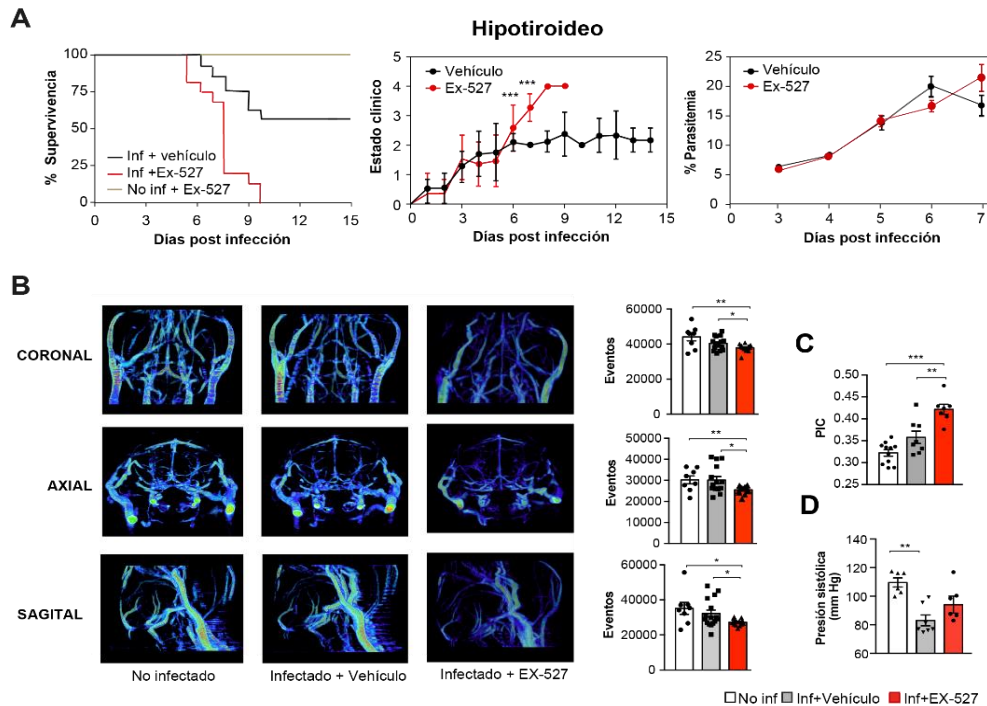


FIGURA 32 – El inhibidor de Sirt1 EX-527 disminuye la supervivencia de ratones hipotiroideos a la infección por *PbA*. (A) Diagrama de Kaplan Meier, representando la supervivencia de los ratones, estado clínico y parasitemia en ratones hipotiroideos tratados diariamente comenzando a día 0 de la infección con vehículo o EX527, n=17-13. Los datos representados son medias \pm SEM. Test *t* de Student no pareado, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (B) Angiogramas representativos de ratones hipotiroideos sin infectar y a día 6 tras la infección después del mismo tratamiento, n =8-13. (C) Valores de presión intracraneal (PIC) en los mismos grupos experimentales, n=7-11. (D) Presión sistólica sanguínea en los mismos grupos, n=5-6. En los paneles B-D los datos representados son medias \pm SEM. Se hizo un ANOVA unidireccional seguida de comparaciones múltiples con el test de Tukey. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Resultados

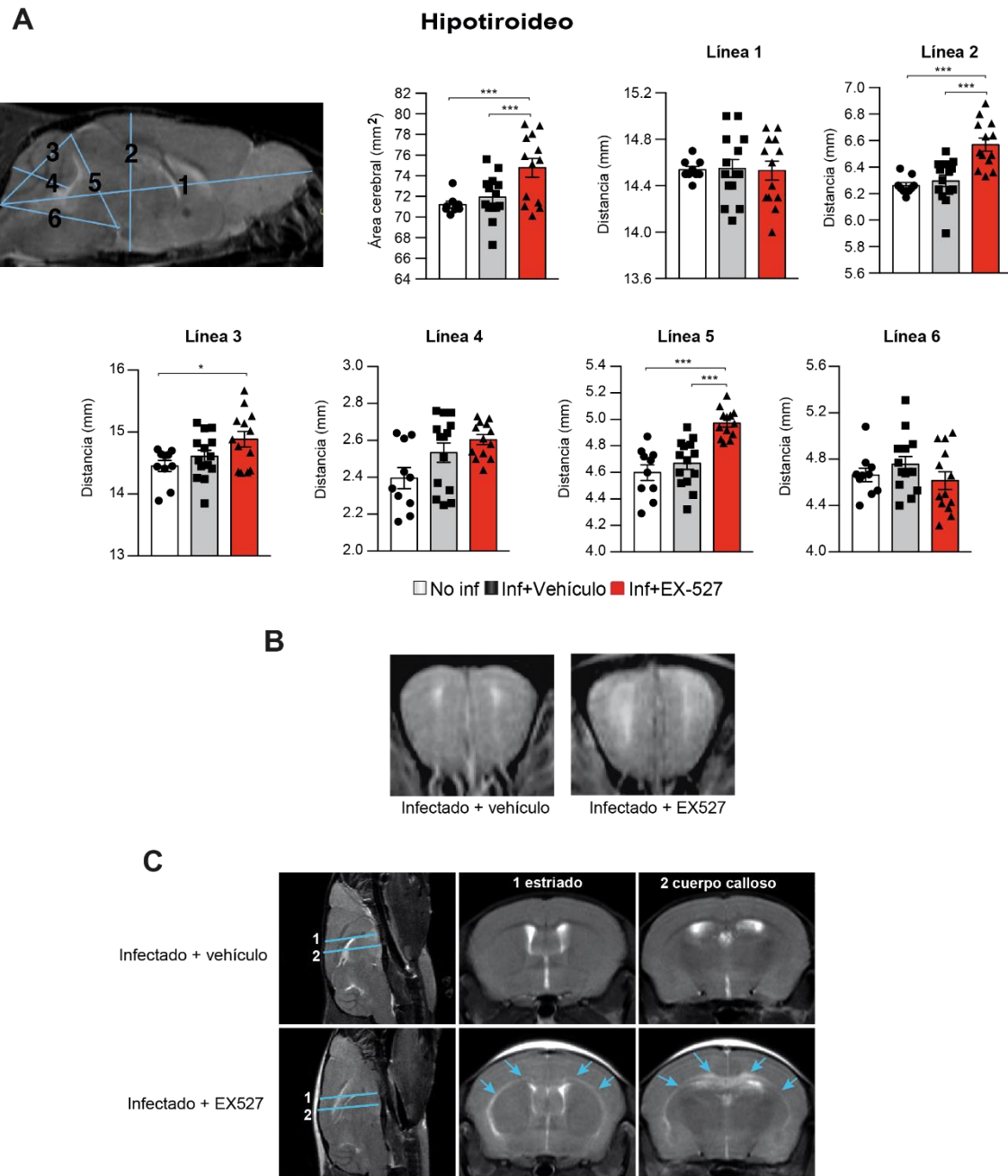


Figura 33 – Daño cerebral en ratones hipotiroides tratados con EX527 durante la infección con *PbA*. (A) Imágenes en T2 medio-sagitales, mostrando las líneas usadas para medir las distintas distancias (1-6) en ratones hipotiroides tratados o no con EX527 a días 0 y 6 tras la infección, n=13-8. Los datos representados son medias \pm SEM. Se hizo un ANOVA unidireccional seguida de comparaciones múltiples con el test de Tukey. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (B) Imágenes axiales en T2 representativas del bulbo olfatorio en los diferentes grupos de animales. (C) Imágenes axiales en T2 representativas del estriado (línea 1 en la imagen sagital) y del cuerpo calloso (línea 2 en la imagen sagital). Las flechas indican la presencia de edema.

Discusión

Discusión

En este trabajo se ha demostrado que el hipotiroidismo confiere tolerancia a la malaria cerebral experimental. Esto se manifiesta en un aumento de la supervivencia a la infección por *Plasmodium berghei* y en la prevención del desarrollo de síntomas neurológicos severos característicos de la enfermedad, sin alteración de la carga del patógeno. También observamos que el hipertiroidismo provoca una aparición más temprana de los síntomas patológicos tras la infección y que los animales hipertiroideos mueren un día antes que los animales eutiroideos. Asimismo, si tratamos ratones hipotiroideos con T3 y T4 comenzando el día de la infección y manteniendo su administración durante el proceso observamos que, sin alterar la carga del parásito, disminuye la supervivencia a la enfermedad de forma considerable. Por último, el cambio de ratones eutiroideos a una dieta deficiente en yodo y tratamiento antitiroideo desde el día de la infección causa una mejora sustancial de la supervivencia. En conjunto todos estos datos demuestran la importancia del estado tiroideo en supervivencia a la infección por *PbA*.

Hace décadas se describió que en voluntarios normales inoculados con *P.falciparum* existe una desregulación de la función tiroidea (135). Asimismo, se ha observado que en los pacientes que sufren MS causada por el mismo parásito se produce una disfunción de la glándula hipofisaria con hipofunción de las células tirotropas que consecuentemente desencadena una reducción de la función tiroidea. Esto indicaría que el estrés causado por la infección genera una disminución de los niveles tanto de TSH como de HT, causando NTIS (134). Estos autores también describieron un aumento del cortisol circulante, que podría contribuir al NTIS. En este trabajo, hemos observado que los ratones eutiroideos con MC sufren también NTIS con unos niveles de hormonas tiroideas ligeramente superiores al modelo murino hipotiroideo, pero con una depresión de los valores de hormonas circulantes muy marcada en relación con su grupo control eutiroideo sin infectar. De acuerdo con estos resultados, la disfunción tiroidea observada en los ratones podría ser muy similar a la que sufren los pacientes humanos en casos de MS, lo cual podría constituir un mecanismo de defensa del organismo con el objetivo de paliar la gravedad de la enfermedad.

La MC es una enfermedad endémica en distintas regiones del planeta que a su vez solapan parcialmente con zonas de deficiencia endémica de yodo y bocio endémico. Antes de nuestro trabajo cabía la hipótesis de que la deficiencia de yodo, y el consecuente hipotiroidismo, exacerbaba los efectos dañinos de la MC y resultara en una mayor morbilidad contribuyendo a agravar la situación de los niños que viven en estas regiones (164). Sin embargo, nuestros resultados experimentales hacen concebible que el hipotiroidismo que pueden padecer los

Discusión

habitantes de estas regiones podría constituir una ventaja que confiere protección contra el daño cerebral que puede llegar a causar *P.falciparum*.

La evolución permite la selección positiva determinados genotipos que confieren al individuo una serie de características potencialmente ventajosas para adaptarse y ‘coexistir’ con distintas enfermedades; dicho de otra forma, de alcanzar un estado de tolerancia a distintas infecciones. Un ejemplo claro de tolerancia a la enfermedad lo constituyen las hemoglobinopatías o mutaciones con defectos en la producción de hemoglobina observadas en poblaciones africanas de malaria endémica (52). Las α -talasemias o la variante de hemoglobina S causan la formación de células eritroides falciformes. A pesar de que estos genotipos en condiciones normales pueden causar anemia crónica e incluso la muerte (52, 165), confieren al ser humano una ventaja de supervivencia frente a la malaria en regiones endémicas. Esto mismo se ha observado en modelos animales murinos, en los que la anemia falciforme constituye, de la misma forma que en humanos, un mecanismo de tolerancia a la malaria cerebral (52). De forma análoga, la deficiencia de iodo protegería frente a la enfermedad, aunque en este caso no sería un defecto genético sino más bien la carencia en un micronutriente lo que conferiría la ventaja.

Es conveniente destacar que dependiendo del tipo de patógeno los huéspedes requieren un estado metabólico específico para alcanzar una tolerancia eficiente a la enfermedad. Esto significa que un mismo estado metabólico puede tener consecuencias muy distintas dependiendo de la etiología de la enfermedad. Así, se ha descrito que el ayuno y la administración de glucosa pueden tener consecuencias opuestas en el proceso de tolerancia a las infecciones dependiendo de la causa de la patología. El ayuno supone una ventaja de supervivencia en la sepsis bacteriana, mientras que la suplementación de glucosa es perjudicial. Sin embargo, la administración de glucosa en un modelo de sepsis vírica de gripe supone una condición determinante para garantizar la supervivencia a la enfermedad vírica (59).

En relación con la malaria, la administración de un análogo de la glucosa, la 2-deoxiglucosa (que inhibe la glucólisis), es suficiente para incrementar la supervivencia de los ratones a la infección por *PbA* (58), mientras que incrementa la letalidad de manera rotunda en la infección causada por *Plasmodium Chabaudi AJ*, un modelo de malaria no cerebral en ratones y generalmente no letal (166).

Dicho esto, nosotros estudiamos la posibilidad de que el hipotiroidismo también indujera tolerancia a otra variante de malaria murina no cerebral causada *Plasmodium yoelli YM*. De acuerdo con la idea de que la tolerancia a diferentes patógenos implica mecanismos

Discusión

específicos, nuestros resultados mostraron que el hipotiroidismo no protege frente a la malaria experimental no cerebral causada por esta cepa del parásito.

Ya que la adrenalectomía en ratones C57BL6J incrementa la mortalidad de las cepas del parásito *PbNK65-E* o *PbNK65-NY* acelerando la muerte por hipoglucemia a los días 7-10 post infección (55), también analizamos si el sistema adrenal podría influir en nuestro modelo experimental. Sin embargo, la adrenalectomía no altera la letalidad por *PbA* en los ratones eutiroides, los cuales fallecen a día 6 sin llegar a desarrollar una fuerte hipoglucemia. Además, la adrenalectomía no es capaz de revertir el incremento de la supervivencia causado por el hipotiroidismo. Pese a la ya descrita interacción entre el sistema simpato-adrenal y las HT (167), el hipotiroidismo conserva la defensa frente a la MC en los ratones adrenalectomizados, sugiriendo que su rol protector es independiente de este sistema.

Se sabe que el bazo juega un papel fundamental en la respuesta inmune a la malaria cerebral (26), ya que debe tratar de compensar la anemia causada por la pérdida de los eritrocitos infectados y generar una respuesta inmune eficaz, en el que participan distintos tipos de células del sistema inmune para eliminar los parásitos y combatir la enfermedad. Antes de la infección los ratones hipotiroideos presentaban una hipoplasia del bazo muy marcada en relación con el grupo control eutiroides, como ya habíamos observado previamente (132). Sin embargo, esta condición se revierte de manera notable durante el transcurso de la infección con *PbA*. En los ratones hipotiroideos el bazo sufre un proceso de esplenomegalia muy marcada con un incremento masivo del número de poblaciones de los tres linajes hematopoyéticos principales, de forma que en fases avanzadas de la enfermedad ambos grupos, eu- e hipotiroideo, alcanzan un número de células esplénicas muy similar, que además presentan unos niveles de activación semejantes. Estos resultados, junto con el hecho de que los ratones hipotiroideos infectados presenten unos hemogramas no muy diferentes a los de los eutiroides, una hipoglucemia similar y unos niveles de citoquinas circulantes incluso más altos que los ratones eutiroides descarta la posibilidad de que la falta de síntomas neurológicos y la mayor supervivencia pudieran ser mediadas por una menor respuesta inmunitaria esplénica.

Una de las características de la malaria cerebral humana, que recrea con fidelidad el modelo animal de *PbA*, es que en etapas avanzadas de la enfermedad se produce una infiltración de células inmunes en el cerebro a causa de la rotura de la barrera hematoencefálica. La relocalización al cerebro de algunos linajes de células inmunes como los linfocitos T CD8⁺, tiene un papel determinante en la patogenicidad de la enfermedad. Se ha demostrado que la capacidad de los linfocitos T CD8⁺ de producir proteasas, como la granzima B o la perforina,

Discusión

sus interacciones con las células endoteliales y su acumulación junto con los eritrocitos infectados en la vasculatura cerebral tienen un papel decisivo en el desarrollo de la patología (42, 43). Nuestros resultados demostraron que la rotura de la barrera hematoencefálica se produce tanto en ratones eu- como hipotiroideos. Cuantitativamente, la rotura fue similar en los dos grupos cuando se analizó tras 1h de la inyección de Azul de Evans, el método convencional de estudio de la rotura de la barrera hematoencefálica. Sin embargo, cuando se analizó por RMI tras 15 min de la inyección de Gadolinio, se pudo detectar una discreta disminución de la entrada del contraste en algunas áreas específicas del cerebro, sugiriendo la existencia de una menor permeabilidad inicial. Sin embargo, estas diferencias no parecen tener una importancia funcional a largo plazo, ya que en los cerebros de ambos grupos de animales infectados se detectaron niveles similares de células dendríticas y de linfocitos T con un estado de activación similar, además de una expresión semejante de los transcritos de *Granzima B* y *Perforina*, de citoquinas, e incluso de *PbA*. Estos datos confirman que la rotura de la barrera hematoencefálica, la infiltración de células inmunes y la entrada de parásitos fue similar en los cerebros de los ratones eutiroideos e hipotiroideos, a pesar de que estos últimos no presentan síntomas neurológicos de MC.

Los resultados observados en el modelo animal hipotiroideo se asemejan bastante a otro de los modelos estudiados de MC, ya que los ratones tratados con 2-desoxiglucosa, sobreviven al mismo modelo de infección pese a mostrar rotura de la barrera hematoencefálica, entrada de parásitos y números similares de células infiltradas en el cerebro con un estado semejante de activación (58).

Todos estos resultados refuerzan la idea de que el efecto protector del hipotiroidismo contra la MC causada por *PbA* recae en un proceso de tolerancia a la enfermedad que disminuye el daño cerebral. En este trabajo observamos que la administración intracerebroventricular de T3 a los ratones hipotiroideos aceleró el desarrollo de la MC e incrementó la mortalidad, lo cual sugiere que las hormonas tiroideas ejercen un efecto directo sobre el parénquima cerebral durante el transcurso de la enfermedad que sería, al menos parcialmente, responsable del fenómeno de tolerancia.

Se ha descrito que la causa principal de muerte en la MC es la compresión cerebral y la reducción del flujo sanguíneo (158). La inflamación del cerebro causa un incremento notable de la presión intracraneal que en última instancia destruye las neuronas responsables del control motor de las funciones cardiovasculares y pulmonares, lo cual es consistente con que la herniación del tallo cerebral en el foramen magnum sea una causa de muerte en la MC (168). Nuestros resultados demostraron que el hipotiroidismo previene de la aparición de

Discusión

síntomas neurológicos disminuyendo el daño cerebral y el edema; limitando el aumento del volumen cerebral y por consiguiente de la presión intracraneal; evitando el aplastamiento cerebelar y la herniación del tallo cerebral y frenando el colapso de los vasos sanguíneos cerebrales. Además, el número de focos hemorrágicos localizados en el parénquima cerebral, otro signo ya descrito de MC (22), es significativamente menor en el grupo de animales hipotiroideos.

La aparición de edema cerebral durante el transcurso de la infección por *PbA* en los ratones eutiroideos en fases tardías de la infección, algo no observado en el grupo hipotiroideo, nos hizo sopesar la posibilidad de que la modulación de la presión sanguínea con agentes diuréticos pudiera disminuir el edema cerebral en los ratones eutiroideos. Sin embargo, el tratamiento diario con manitol, un agente diurético previamente propuesto para tratar el edema en la MC (159), no mejoró la condición de los ratones eutiroideos, ni la de los hipertiroideos, en fases avanzadas de la infección. El manitol no fue efectivo al no ser capaz de reducir la presión intracraneal ni la aparición de síntomas neurológicos en ambos grupos de animales.

El hipotiroidismo en humanos es una causa potencial de rigidez aórtica (169, 170) que puede llegar a causar una hipertensión secundaria, lo que podría a su vez reducir el flujo sanguíneo cerebral. Sin embargo, los ratones hipotiroideos no infectados presentaban una presión sanguínea sistólica menor que el grupo de ratones eutiroideos, sugiriendo que la disminución del flujo sanguíneo cerebral observado en los animales hipotiroideos antes de la infección no es secundaria a la hipertensión arterial. Aún no conocemos la causa de esta disminución basal del flujo sanguíneo cerebral en el grupo hipotiroideo, pero claramente un aumento de la presión arterial periférica no es el desencadenante de este proceso. Por otra parte, el colapso de los vasos cerebrales que ocurre en los ratones eutiroideos tras la infección por *PbA* parece ser también independiente de la presión sanguínea periférica, ya que ésta disminuye en lugar de aumentar en los animales con MC. Por tanto, la aparición de un marcado edema cerebral sería la causa del incremento de la presión intracraneal y esta a su vez de la disminución del flujo sanguíneo en el grupo eutiroideo, en contraposición con los resultados obtenidos en el grupo hipotiroideo en los que la mejoría de la supervivencia a la infección estaría asociada a la falta de aumento de la presión intracraneal y al mantenimiento del flujo sanguíneo cerebral. Esta hipótesis se encuentra reforzada por el hecho de que el cambio de los ratones eutiroideos a una dieta hipotiroidea el mismo día de la infección mejoró el flujo sanguíneo cerebral, juntamente con el aumento de la supervivencia y la inhibición del desarrollo de síntomas neurológicos en fases tardías de la infección por *PbA*.

Discusión

Uno de los efectos más destacados de las hormonas tiroideas es la regulación del metabolismo y del consumo de energía (100, 111, 171). Los ensayos del análisis del comportamiento y respirometría en cajas metabólicas confirmaron que en condiciones previas a la infección por *PbA* el grupo de animales hipotiroideos tiene un gasto energético metabólico significativamente menor que el grupo eutiroideo. Sin embargo, en fases avanzadas de la enfermedad únicamente el grupo eutiroideo, que presentaba síntomas neurológicos, sufrió una disminución abrupta de la actividad locomotora, del consumo de O₂ y la emisión de CO₂, y del consumo de energía. Estas variaciones fueron sustancialmente menores en los animales hipotiroideos que no muestran signos de MC. Los cambios observados en los ratones eutiroideos infectados ocurrían sin que presentasen una hipoglucemia severa o una anemia marcada, lo cual refuerza la hipótesis de que la causa de la muerte podría ser un fallo respiratorio, entre otros motivos por compresión del centro nervioso respiratorio que desplomaría el consumo de O₂. Por otra parte, estos resultados reforzarían la idea de que el estado metabólico en la condición hipotiroidea, con una disminución en la actividad locomotora y respiratoria y un menor gasto energético permitiría a los ratones mejorar su tolerancia/resiliencia al estrés causado por la infección por *PbA*.

El gran impacto de la MC en el cerebro sugiere que el hipotiroidismo podría conferir tolerancia a la enfermedad alterando el metabolismo cerebral y provocando consecuentemente una adaptación a la enfermedad distinta con respecto a la de los ratones eutiroideos. Desde el punto de vista metabólico el cerebro de los ratones hipotiroideos se adapta mejor a la infección con una reducción de marcadores del daño tisular como la glutamina (56). Los linfocitos T CD8⁺ tras su activación y posterior infiltración en el cerebro reprograman su metabolismo para satisfacer la demanda energética necesaria y ejercer sus funciones contra la enfermedad. Como consecuencia, se induce el metabolismo glicolítico aerobio y la glutaminólisis, hecho determinante para el desarrollo de la sintomatología en fases tardías de la infección por *PbA* (56). El hipotiroidismo parece ser capaz de contrarrestar el impacto de este metabolito en la enfermedad. Asimismo, los animales hipotiroideos muestran tras la infección un cambio en el metabolismo distinto al de los ratones eutiroideos. Utilizan rutas de obtención energética alternativas, como la vía de la creatinina, a diferencia del grupo eutiroideo, que tras la infección por *PbA* estimula un metabolismo basado en los cuerpos cetónicos.

Los ensayos de respirometría concuerdan con lo observado en el metabolismo cerebral. Los datos mostraron que los animales eutiroideos durante el transcurso de la enfermedad modulan su metabolismo para la obtención de energía procedente de sus reservas endógenas de grasa.

Discusión

Así, el valor del RER cayó en los ratones eutiroideos a valores próximos a 0,8. Un valor próximo a 1 de este parámetro respiratorio indica que la principal fuente de energía son los carbohidratos, mientras que valores próximos a 0,7 señalan que los ácidos grasos se han convertido en la fuente primordial energética del organismo. Por el contrario, el ratón hipotiroideo mantuvo unos valores de RER más estables y similares a los observados al comienzo de la infección.

Estos resultados muestran que la enfermedad induce un perfil metabólico distinto en el cerebro de los ratones eutiroideos e hipotiroideos. Sin embargo, es conveniente destacar que no podemos concluir que estos cambios metabólicos cerebrales sean los responsables únicos y/o directos de la resiliencia del grupo hipotiroideo a la enfermedad.

En las acciones de las hormonas tiroideas está implicada la regulación de enzimas y vías de transducción de señales de gran relevancia metabólica tanto el cerebro como en los tejidos periféricos (116-122). Una de estas enzimas sobre las que las hormonas tiroideas tienen gran influencia es mTORC1. Se ha descrito que la leptina aumenta durante la infección con *PbA* y que la restricción calórica confiere protección contra la MC mediante la disminución de la producción de leptina y de la consiguiente disminución de la activación de mTORC1 (53). Consecuentemente, la administración de leptina disminuye la capacidad de supervivencia a la MC de los ratones sometidos a restricción calórica. Observamos que tras la infección los ratones hipotiroideos presentaban una activación hepática de mTORC1 menor que los ratones eutiroideos y unos niveles más bajos de leptina circulante, que además no aumentaban tras la infección como ocurría con los ratones eutiroideos. Sin embargo, la administración de leptina exógena al grupo hipotiroideo no supuso ninguna variación en la supervivencia a la enfermedad, lo cual nos hizo descartar esta vía metabólica como el mecanismo principal de tolerancia a la malaria cerebral en el hipotiroidismo.

La AMPK α , un modulador crucial del gasto energético, es otra de las enzimas cuya actividad está regulada por las hormonas tiroideas. Se ha demostrado que la T3 es capaz de reprimir de manera directa a nivel hipotalámico la actividad de AMPK α y que esta regulación tiene un papel muy importante en la regulación del balance de energía por estas hormonas (118, 119). Nuestros datos concuerdan con lo descrito ya que, en fases previas a la infección, los ratones del grupo hipotiroideo presentaban niveles hepáticos de AMPK totales y fosforilados más elevados que los del grupo eutiroideo. Sin embargo, los niveles de fosforilación de AMPK α disminuyeron de forma similar en ambos grupos de estudio tras la infección. Esto refuerza la idea de que ambos grupos parten de un estado metabólico distinto, que podría conferir una

Discusión

ventaja al grupo hipotiroideo, aunque para determinar la función de la AMPK α de una forma más precisa en el proceso de tolerancia a la MC serían necesarios más experimentos.

La desacetilasa Sirt1 ha sido descrita como un mediador determinante en los procesos de restricción calórica y ayuno, al ser una enzima metabólica altamente responsable de los beneficios de estas conductas alimenticias y de la regulación del consumo de energía (60-63). Además, el solapamiento de las acciones de las HT y Sirt1 en procesos metabólicos de enorme relevancia en el organismo como la gluconeogénesis, la oxidación de ácidos grasos o funciones mitocondriales hace que consecuentemente Sirt1 y las HT cooperen en la modulación de diversos procesos metabólicos (129). Sirt1 desacetila PGC-1 α y FOXO1 activándolos y permitiendo su disponibilidad como dianas de acción de las HT (121). Asimismo, Sirt1 es capaz de interactuar directamente con el TR β , incrementando su actividad transcripcional (122). Esto sugería la posibilidad de que el estado tiroideo pudiera regular la actividad de Sirt1 durante la infección por *PbA*. Observamos que la actividad hepática de esta desacetilasa pese a estar basalmente disminuida en hipotiroideos, hecho que concuerda con lo previamente descrito (121, 122), disminuía muy fuertemente tras la infección por *PbA* en los ratones eutiroideos, mientras que no se alteraba en los ratones hipotiroideos resistentes a la MC en los que el consumo energético permanecía constante. El ratón hipotiroideo ya estaba previamente a la infección adaptado a un estado metabólico óptimo para combatir la infección por *Plasmodium*. Todo esto sugería que el mantenimiento de la actividad de Sirt1 podría ser determinante en la modulación de la tolerancia a la MC. En efecto, la inhibición de la actividad de Sirt1 por tratamiento diario de los ratones hipotiroideos con el inhibidor EX-527 supuso en fases avanzadas de la enfermedad un incremento de la presión intracraneal, una mayor compresión de los vasos sanguíneos cerebrales y, por consiguiente, un aumento de la mortalidad. Por otro lado, observamos que un tratamiento diario de ratones eutiroideos durante la infección con el activador de Sirt1, SRT1720, disminuyó la presión intracraneal de estos animales en fases tardías de la infección, mejorando la circulación cerebral, y consecuentemente la supervivencia a la enfermedad. En ambos casos los cambios en la supervivencia ocurrieron sin cambios en la parasitemia, demostrando el importante papel de la actividad de Sirt1 en el fenómeno de tolerancia a la MC (Figura 34).

Aunque nuestros resultados indican que Sirt1 tiene un papel determinante en la protección contra la malaria experimental cerebral previniendo el incremento de la presión intracraneal, no definen el mecanismo por el cual el hipotiroidismo es capaz de mantener los niveles de actividad de Sirt1 durante el transcurso de la infección, ni tampoco qué poblaciones celulares

Discusión

están implicadas en ello, por lo que serán necesarios nuevos experimentos para aclarar este punto.

De nuestros datos se deduce que las drogas antitiroideas podrían mejorar la respuesta de los pacientes frente a la malaria cerebral. Sin embargo, está descrito que el hipotiroidismo tiene efectos gravemente perjudiciales para la salud, sobre todo en la infancia, ya que las hormonas tiroideas son esenciales para el desarrollo cerebral (136-138). La identificación de Sirt1 como un mediador de la acción de las hormonas tiroideas en la respuesta contra la malaria cerebral, sugiere una función beneficiosa de los activadores de Sirt1 para el tratamiento de la enfermedad. A pesar de la capacidad del activador de Sirt1 o del hipotiroidismo de rescatar de la MC, los animales acaban falleciendo a consecuencia de un largo período de anemia, debido a la eliminación de eritrocitos no infectados y a la incapacidad para reponer la pérdida eritrocítica (172). Por tanto, el uso de activadores de Sirt1 en combinación con drogas que inhiben la replicación del parásito podría ser muy útil para el tratamiento de la enfermedad, que actualmente sigue suponiendo un gravísimo problema de salud pública en las zonas endémicas de malaria. La mayor parte de los niños menores de 5 años que sufren MC mueren durante el transporte a los centros sanitarios debido a que suelen existir graves limitaciones en las condiciones socioeconómicas de las poblaciones afectadas, o durante las primeras 24 horas tras la admisión (173). Una terapia coadyuvante con activadores de Sirt1 podría suponer un avance en la búsqueda de nuevas terapias contra la malaria cerebral, previniendo el daño cerebral y ayudando a reducir las altas cifras de mortalidad de esta patología.

Discusión

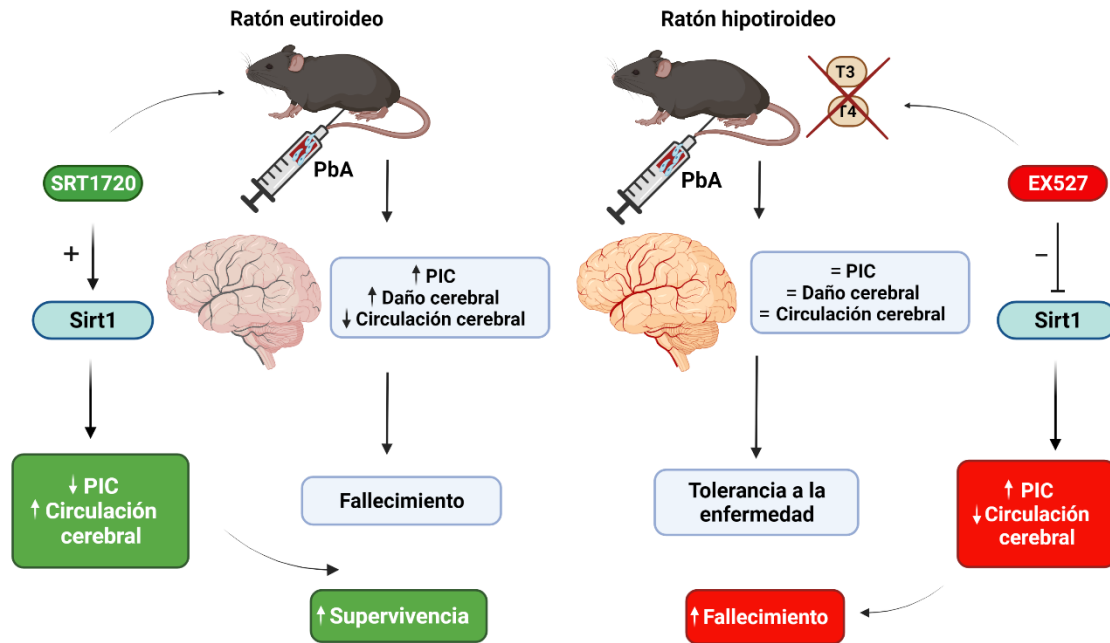


Figura 34 – La modulación de Sirt1 determina el proceso de tolerancia a la infección por *PbA*. La MC inducida por *PbA* en ratones eutiroides incrementa la presión intracraneal (PIC) e impide una correcta circulación cerebral lo que supone a consecuencia un aumento global del daño cerebral sufrido durante la infección, la causa principal de la mortalidad de la patología, y consecuentemente causa el fallecimiento. La activación de Sirt1 por tratamiento con SRT1720 disminuye la PIC y mejora la circulación cerebral sanguínea permitiendo aumentar la supervivencia a la infección. El hipotiroidismo confiere tolerancia a la infección por *PbA* ya que impide el incremento de la PIC manteniendo estable la circulación cerebral por lo que no se induce el daño cerebral típico causado por el parásito en condiciones eutiroides. La inhibición de Sirt1 con el uso de EX527 en ratones hipotiroideos revierte estos efectos, aumentando la PIC y disminuyendo la circulación cerebral, causando un incremento notable de la mortalidad a la patología.

Conclusiones

Conclusiones

Las conclusiones de esta Tesis Doctoral son:

1. El estado tiroideo modula el proceso de tolerancia a la MC causada por *PbA*. El hipotiroidismo confiere tolerancia a la enfermedad aumentando la supervivencia sin alterar la carga parasitaria, mientras que el hipertiroidismo adelanta la letalidad.
2. A pesar de presentar una importante hipoplasia del bazo antes de la infección, los ratones hipotiroideos exhiben una fuerte respuesta esplénica a la infección, alcanzando un número de células inmunitarias similar y con un parecido estado de activación al de los ratones eutiroideos.
3. El hipotiroidismo no impide la rotura de la barrera hematoencefálica, hecho determinante en la patología de la MC y permite, por tanto, la infiltración de células inmunes y del parásito en el cerebro.
4. El hipotiroidismo previene la aparición de síntomas neurológicos protegiendo del daño cerebral típicamente causado por *PbA* en condiciones eutiroideas:
 - Disminuye el edema cerebral.
 - Limita el aumento del volumen cerebral e impide el incremento de la presión intracraneal.
 - Evita el colapso de los vasos sanguíneos cerebrales.
 - Impide el aplastamiento cerebelar y la herniación del tallo cerebral.
 - Disminuye los focos hemorrágicos localizados en el cerebro.
5. La infección con *PbA* produce un cambio del perfil metabólico distinto en los cerebros de los ratones eutiroideos e hipotiroideos. El cerebro de los ratones hipotiroideos muestra una mejor respuesta adaptativa a la infección y utiliza rutas de obtención energética diferentes.
6. El estado hipotiroideo limita la actividad locomotora y respiratoria, además de disminuir el gasto energético. Sin embargo, en los animales hipotiroideos estos parámetros se modulan mucho menos durante la infección por *PbA*.
5. El hipotiroidismo altera la actividad hepática de vías de señalización con un papel esencial en la regulación del metabolismo. La infección por *PbA* también afecta al estado de activación de estas rutas.
6. Sirt1 tiene un papel relevante en la protección del hipotiroidismo contra la malaria cerebral. Sin alterar la parasitemia, su activación en ratones eutiroideos disminuye el daño cerebral, mejorando el flujo sanguíneo cerebral y consecuentemente la supervivencia. Sin embargo, su inhibición en ratones hipotiroideos impide el proceso de tolerancia a la enfermedad, empeorando el daño cerebral y aumentando la mortalidad.

Bibliografía

Bibliografía

1. Phillips MA, Burrows JN, Manyando C, van Huijsduijnen RH, Van Voorhis WC, Wells TNC. Malaria. *Nat Rev Dis Primers*. 2017; 3:17050.
2. WHO. (2021). World Malaria Report 2020. World Health Organization. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240040496>
3. Ricci F. Social implications of malaria and their relationships with poverty. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2012;4(1): e2012048.
4. Ashley EA, Pyae Phyo A, Woodrow CJ. Malaria. *Lancet*. 2018;391(10130):1608-21.
5. Dattoo MS, Natama MH, Some A, Traore O, Rouamba T, Bellamy D, et al. Efficacy of a low-dose candidate malaria vaccine, R21 in adjuvant Matrix-M, with seasonal administration to children in Burkina Faso: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2021;397(10287):1809-18.
6. Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K. Malaria: Biology and Disease. *Cell*. 2016;167(3):610-24.
7. Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med*. 1976;295(6):302-4.
8. Sutherland CJ, Tanomsing N, Nolder D, Oguike M, Jennison C, Pukrittayakamee S, et al. Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite *Plasmodium ovale* occur globally. *J Infect Dis*. 2010;201(10):1544-50.
9. Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, Ratnam S, et al. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis*. 2008;46(2):165-71.
10. Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J, et al. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet*. 2004;363(9414):1017-24.
11. Nkumama IN, O'Meara WP, Osier FHA. Changes in Malaria Epidemiology in Africa and New Challenges for Elimination. *Trends Parasitol*. 2017;33(2):128-40.
12. Wassmer SC, Grau GE. Severe malaria: what's new on the pathogenesis front? *Int J Parasitol*. 2017;47(2-3):145-52.
13. Prudencio M, Rodriguez A, Mota MM. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nat Rev Microbiol*. 2006;4(11):849-56.

Bibliografía

14. Good MF, Xu H, Wykes M, Engwerda CR. Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. *Annu Rev Immunol.* 2005; 23:69-99.
15. Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science.* 2006;313(5791):1287-90.
16. Baer K, Klotz C, Kappe SH, Schnieder T, Frevert U. Release of hepatic *Plasmodium yoelii* merozoites into the pulmonary microvasculature. *PLoS Pathog.* 2007;3(11): e171.
17. Silvie O, Mota MM, Matuschewski K, Prudencio M. Interactions of the malaria parasite and its mammalian host. *Curr Opin Microbiol.* 2008;11(4):352-9.
18. Winzeler EA. Applied systems biology and malaria. *Nat Rev Microbiol.* 2006;4(2):145-51.
19. Frosch T, Koncarevic S, Zedler L, Schmitt M, Schenzel K, Becker K, et al. In situ localization and structural analysis of the malaria pigment hemozoin. *J Phys Chem B.* 2007;111(37):11047-56.
20. Hausmann K. The European Congress of Protistology (ECOP). *Eur J Protistol.* 2009;45(3):165.
21. de Souza JB, Hafalla JC, Riley EM, Couper KN. Cerebral malaria: why experimental murine models are required to understand the pathogenesis of disease. *Parasitology.* 2010;137(5):755-72.
22. Lou J, Lucas R, Grau GE. Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(4):810-20, table of contents.
23. Idro R, Jenkins NE, Newton CR. Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. *Lancet Neurol.* 2005;4(12):827-40.
24. Carvalho LJ. Murine cerebral malaria: how far from human cerebral malaria? *Trends Parasitol.* 2010;26(6):271-2.
25. Hunt NH, Grau GE, Engwerda C, Barnum SR, van der Heyde H, Hansen DS, et al. Murine cerebral malaria: the whole story. *Trends Parasitol.* 2010;26(6):272-4.
26. 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.

Bibliografia

27. Lakkavaram A, Lundie RJ, Do H, Ward AC, de Koning-Ward TF. Acute Plasmodium berghei Mouse Infection Elicits Perturbed Erythropoiesis with Features That Overlap with Anemia of Chronic Disease. *Front Microbiol.* 2020; 11:702.
28. Engwerda CR, Beattie L, Amante FH. The importance of the spleen in malaria. *Trends Parasitol.* 2005;21(2):75-80.
29. Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(8):606-16.
30. Hirako IC, Ataide MA, Faustino L, Assis PA, Sorensen EW, Ueta H, et al. Splenic differentiation and emergence of CCR5(+) CXCL9(+) CXCL10(+) monocyte-derived dendritic cells in the brain during cerebral malaria. *Nat Commun.* 2016; 7:13277.
31. Gazzinelli RT, Kalantari P, Fitzgerald KA, Golenbock DT. Innate sensing of malaria parasites. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(11):744-57.
32. Gowda NM, Wu X, Gowda DC. TLR9 and MyD88 are crucial for the development of protective immunity to malaria. *J Immunol.* 2012;188(10):5073-85.
33. Imai T, Ishida H, Suzue K, Taniguchi T, Okada H, Shimokawa C, et al. Cytotoxic activities of CD8(+) T cells collaborate with macrophages to protect against blood-stage murine malaria. *Elife.* 2015;4.
34. Artavanis-Tsakonas K, Riley EM. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J Immunol.* 2002;169(6):2956-63.
35. Kumar R, Loughland JR, Ng SS, Boyle MJ, Engwerda CR. The regulation of CD4(+) T cells during malaria. *Immunol Rev.* 2020;293(1):70-87.
36. Nishanth G, Schluter D. Blood-Brain Barrier in Cerebral Malaria: Pathogenesis and Therapeutic Intervention. *Trends Parasitol.* 2019;35(7):516-28.
37. Hviid L, Jensen AT. PfEMP1 - A Parasite Protein Family of Key Importance in Plasmodium falciparum Malaria Immunity and Pathogenesis. *Adv Parasitol.* 2015; 88:51-84.
38. Bernabeu M, Danziger SA, Avril M, Vaz M, Babar PH, Brazier AJ, et al. Severe adult malaria is associated with specific PfEMP1 adhesion types and high parasite biomass. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(23): E3270-9.

Bibliografia

39. White NJ, Turner GD, Day NP, Dondorp AM. Lethal malaria: Marchiafava and Bignami were right. *J Infect Dis.* 2013;208(2):192-8.
40. Penet MF, Viola A, Confort-Gouny S, Le Fur Y, Duhamel G, Kober F, et al. Imaging experimental cerebral malaria in vivo: significant role of ischemic brain edema. *J Neurosci.* 2005;25(32):7352-8.
41. Dunst J, Kamena F, Matuschewski K. Cytokines and Chemokines in Cerebral Malaria Pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017; 7:324.
42. Chua CL, Brown G, Hamilton JA, Rogerson S, Boeuf P. Monocytes, and macrophages in malaria: protection or pathology? *Trends Parasitol.* 2013;29(1):26-34.
43. Renia L, Howland SW, Claser C, Charlotte Gruner A, Suwanarusk R, Hui Teo T, et al. Cerebral malaria: mysteries at the blood-brain barrier. *Virulence.* 2012;3(2):193-201.
44. Schmid U, Stenzel W, Koschel J, Raptaki M, Wang X, Naumann M, et al. The Deubiquitinating Enzyme Cylindromatosis Dampens CD8(+) T Cell Responses and Is a Critical Factor for Experimental Cerebral Malaria and Blood-Brain Barrier Damage. *Front Immunol.* 2017; 8:27.
45. Pai S, Qin J, Cavanagh L, Mitchell A, El-Assaad F, Jain R, et al. Real-time imaging reveals the dynamics of leukocyte behaviour during experimental cerebral malaria pathogenesis. *PLoS Pathog.* 2014;10(7): e1004236.
46. Medzhitov R, Schneider DS, Soares MP. Disease tolerance as a defense strategy. *Science.* 2012;335(6071):936-41.
47. Soares MP, Gozzelino R, Weis S. Tissue damage control in disease tolerance. *Trends Immunol.* 2014;35(10):483-94.
48. Weis S, Carlos AR, Moita MR, Singh S, Blankenhaus B, Cardoso S, et al. Metabolic Adaptation Establishes Disease Tolerance to Sepsis. *Cell.* 2017;169(7):1263-75 e14.
49. Soares MP, Teixeira L, Moita LF. Disease tolerance and immunity in host protection against infection. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(2):83-96.
50. Ayres JS, Freitag N, Schneider DS. Identification of *Drosophila* mutants altering defense of and endurance to *Listeria monocytogenes* infection. *Genetics.* 2008;178(3):1807-15.
51. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends Biochem Sci.* 2014;39(4):199-218.

Bibliografia

52. Gozzelino R, Andrade BB, Larsen R, Luz NF, Vanoaica L, Seixas E, et al. Metabolic adaptation to tissue iron overload confers tolerance to malaria. *Cell Host Microbe*. 2012;12(5):693-704.
53. Ferreira A, Marguti I, Bechmann I, Jeney V, Chora A, Palha NR, et al. Sickle hemoglobin confers tolerance to Plasmodium infection. *Cell*. 2011;145(3):398-409.
54. Oliveira-Lima OC, Almeida NL, Almeida-Leite CM, Carvalho-Tavares J. Mice chronically fed a high-fat diet are resistant to malaria induced by Plasmodium berghei ANKA. *Parasitol Res*. 2019;118(10):2969-77.
55. Vandermosten L, Pham TT, Knoop S, De Geest C, Lays N, Van der Molen K, et al. Adrenal hormones mediate disease tolerance in malaria. *Nat Commun*. 2018;9(1):4525.
56. Carr EL, Kelman A, Wu GS, Gopaul R, Senkevitch E, Aghvanyan A, et al. Glutamine uptake and metabolism are coordinately regulated by ERK/MAPK during T lymphocyte activation. *J Immunol*. 2010;185(2):1037-44.
57. Gordon EB, Hart GT, Tran TM, Waisberg M, Akkaya M, Kim AS, et al. Targeting glutamine metabolism rescues mice from late-stage cerebral malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(42):13075-80.
58. Wang A, Huen SC, Luan HH, Baker K, Rinder H, Booth CJ, et al. Glucose metabolism mediates disease tolerance in cerebral malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(43):11042-7.
59. Wang A, Huen SC, Luan HH, Yu S, Zhang C, Gallezot JD, et al. Opposing Effects of Fasting Metabolism on Tissue Tolerance in Bacterial and Viral Inflammation. *Cell*. 2016;166(6):1512-25 e12.
60. Rahman S, Islam R. Mammalian Sirt1: insights on its biological functions. *Cell Commun Signal*. 2011; 9:11.
61. Chen D, Bruno J, Easlson E, Lin SJ, Cheng HL, Alt FW, et al. Tissue-specific regulation of SIRT1 by calorie restriction. *Genes Dev*. 2008;22(13):1753-7.
62. Hayashida S, Arimoto A, Kuramoto Y, Kozako T, Honda S, Shimeno H, et al. Fasting promotes the expression of SIRT1, an NAD⁺-dependent protein deacetylase, via activation of PPARalpha in mice. *Mol Cell Biochem*. 2010;339(1-2):285-92.
63. Graham TE, Saltin B. Estimation of the mitochondrial redox state in human skeletal muscle during exercise. *J Appl Physiol* (1985). 1989;66(2):561-6.

Bibliografía

64. Yoshino J, Mills KF, Yoon MJ, Imai S. Nicotinamide mononucleotide, a key NAD (+) intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice. *Cell Metab.* 2011;14(4):528-36.
65. Li X. SIRT1 and energy metabolism. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2013;45(1):51-60.
66. Kim HJ, Kim JH, Noh S, Hur HJ, Sung MJ, Hwang JT, et al. Metabolomic analysis of livers and serum from high-fat diet induced obese mice. *J Proteome Res.* 2011;10(2):722-31.
67. Pfluger PT, Herranz D, Velasco-Miguel S, Serrano M, Tschop MH. Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(28):9793-8.
68. Banks AS, Kon N, Knight C, Matsumoto M, Gutierrez-Juarez R, Rossetti L, et al. SirT1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. *Cell Metab.* 2008;8(4):333-41.
69. Moynihan KA, Grimm AA, Plueger MM, Bernal-Mizrachi E, Ford E, Cras-Meneur C, et al. Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice. *Cell Metab.* 2005;2(2):105-17.
70. Kauppinen A, Suuronen T, Ojala J, Kaarniranta K, Salminen A. Antagonistic crosstalk between NF-kappaB and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders. *Cell Signal.* 2013;25(10):1939-48.
71. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(4):251-62.
72. Habets DD, Coumans WA, El Hasnaoui M, Zarrinpashneh E, Bertrand L, Viollet B, et al. Crucial role for LKB1 to AMPKalpha2 axis in the regulation of CD36-mediated long-chain fatty acid uptake into cardiomyocytes. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1791(3):212-9.
73. Sakamoto K, Holman GD. Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;295(1): E29-37.
74. Barnes K, Ingram JC, Porras OH, Barros LF, Hudson ER, Fryer LG, et al. Activation of GLUT1 by metabolic and osmotic stress: potential involvement of AMP-activated protein kinase (AMPK). *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 11):2433-42.
75. Marsin AS, Bouzin C, Bertrand L, Hue L. The stimulation of glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-phosphofructo-2-kinase. *J Biol Chem.* 2002;277(34):30778-83.

Bibliografía

76. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.* 2011;13(2):132-41.
77. Davies SP, Carling D, Munday MR, Hardie DG. Diurnal rhythm of phosphorylation of rat liver acetyl-CoA carboxylase by the AMP-activated protein kinase, demonstrated using freeze-clamping. Effects of high fat diets. *Eur J Biochem.* 1992;203(3):615-23.
78. Muoio DM, Seefeld K, Witters LA, Coleman RA. AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target. *Biochem J.* 1999;338 (Pt 3):783-91.
79. Clarke PR, Hardie DG. Regulation of HMG-CoA reductase: identification of the site phosphorylated by the AMP-activated protein kinase in vitro and in intact rat liver. *EMBO J.* 1990;9(8):2439-46.
80. Jorgensen SB, Nielsen JN, Birk JB, Olsen GS, Viollet B, Andreelli F, et al. The alpha2-5'AMP-activated protein kinase is a site 2 glycogen synthase kinase in skeletal muscle and is responsive to glucose loading. *Diabetes.* 2004;53(12):3074-81.
81. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell.* 2008;30(2):214-26.
82. Hoppe S, Bierhoff H, Cado I, Weber A, Tiebe M, Grummt I, et al. AMP-activated protein kinase adapts rRNA synthesis to cellular energy supply. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(42):17781-6.
83. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell.* 2017;169(2):361-71.
84. Holz MK, Ballif BA, Gygi SP, Blenis J. mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell.* 2005;123(4):569-80.
85. Brunn GJ, Hudson CC, Sekulic A, Williams JM, Hosoi H, Houghton PJ, et al. Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science.* 1997;277(5322):99-101.

Bibliografía

86. Parmigiani A, Nourbakhsh A, Ding B, Wang W, Kim YC, Akopiants K, et al. Sestrins inhibit mTORC1 kinase activation through the GATOR complex. *Cell Rep.* 2014;9(4):1281-91.
87. Porstmann T, Santos CR, Griffiths B, Cully M, Wu M, Leevers S, et al. SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metab.* 2008;8(3):224-36.
88. Peterson TR, Sengupta SS, Harris TE, Carmack AE, Kang SA, Balderas E, et al. mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell.* 2011;146(3):408-20.
89. Ben-Sahra I, Hoxhaj G, Ricoult SJH, Asara JM, Manning BD. mTORC1 induces purine synthesis through control of the mitochondrial tetrahydrofolate cycle. *Science.* 2016;351(6274):728-33.
90. Ben-Sahra I, Howell JJ, Asara JM, Manning BD. Stimulation of de novo pyrimidine synthesis by growth signaling through mTOR and S6K1. *Science.* 2013;339(6125):1323-8.
91. Cheng SC, Quintin J, Cramer RA, Shepardson KM, Saeed S, Kumar V, et al. mTOR- and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science.* 2014;345(6204):1250684.
92. Martina JA, Chen Y, Gucek M, Puertollano R. mTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy.* 2012;8(6):903-14.
93. Inoki K, Kim J, Guan KL. AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2012; 52:381-400.
94. Ruderman NB, Xu XJ, Nelson L, Cacicedo JM, Saha AK, Lan F, et al. AMPK and SIRT1: a long-standing partnership? *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;298(4): E751-60.
95. Hou X, Xu S, Maitland-Toolan KA, Sato K, Jiang B, Ido Y, et al. SIRT1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 2008;283(29):20015-26.
96. Lan F, Cacicedo JM, Ruderman N, Ido Y. SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation. *J Biol Chem.* 2008;283(41):27628-35.

Bibliografía

97. Canto C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*. 2009;458(7241):1056-60.
98. Igarashi M, Guarente L. mTORC1 and SIRT1 Cooperate to Foster Expansion of Gut Adult Stem Cells during Calorie Restriction. *Cell*. 2016;166(2):436-50.
99. Ling NXY, Kaczmarek A, Hoque A, Davie E, Ngoei KRW, Morrison KR, et al. mTORC1 directly inhibits AMPK to promote cell proliferation under nutrient stress. *Nat Metab*. 2020;2(1):41-9.
100. Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. *J Clin Invest*. 2012;122(9):3035-43.
101. Mullur R, Liu YY, Brent GA. Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiol Rev*. 2014;94(2):355-82.
102. Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev*. 2001;81(3):1097-142.
103. Dumitrescu AM, Liao XH, Abdullah MS, Lado-Abeal J, Majed FA, Moeller LC, et al. Mutations in SECISBP2 result in abnormal thyroid hormone metabolism. *Nat Genet*. 2005;37(11):1247-52.
104. St Germain DL, Galton VA, Hernandez A. Minireview: Defining the roles of the iodothyronine deiodinases: current concepts and challenges. *Endocrinology*. 2009;150(3):1097-107.
105. Chang CY, Lei YF, Tseng CH, Shih SR. Thyroid segmentation and volume estimation in ultrasound images. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2010;57(6):1348-57.
106. Flamant F, Gauthier K, Samarut J. Thyroid hormones signaling is getting more complex: STORMs are coming. *Mol Endocrinol*. 2007;21(2):321-33.
107. Lazar MA. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr Rev*. 1993;14(2):184-93.
108. Refetoff S, Dumitrescu AM. Syndromes of reduced sensitivity to thyroid hormone: genetic defects in hormone receptors, cell transporters and deiodination. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2007;21(2):277-305.
109. Williams GR. Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. *Mol Cell Biol*. 2000;20(22):8329-42.

Bibliografía

110. Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev.* 2010;31(2):139-70.
111. Oetting A, Yen PM. New insights into thyroid hormone action. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2007;21(2):193-208.
112. Fox CS, Pencina MJ, D'Agostino RB, Murabito JM, Seely EW, Pearce EN, et al. Relations of thyroid function to body weight: cross-sectional and longitudinal observations in a community-based sample. *Arch Intern Med.* 2008;168(6):587-92.
113. Oh JY, Sung YA, Lee HJ. Elevated thyroid stimulating hormone levels are associated with metabolic syndrome in euthyroid young women. *Korean J Intern Med.* 2013;28(2):180-6.
114. Brent GA. Clinical practice. Graves' disease. *N Engl J Med.* 2008;358(24):2594-605.
115. Chaker L, Bianco AC, Jonklaas J, Peeters RP. Hypothyroidism. *Lancet.* 2017;390(10101):1550-62.
116. Yau WW, Singh BK, Lesmana R, Zhou J, Sinha RA, Wong KA, et al. Thyroid hormone (T3) stimulates brown adipose tissue activation via mitochondrial biogenesis and MTOR-mediated mitophagy. *Autophagy.* 2019;15(1):131-50.
117. Varela L, Martinez-Sanchez N, Gallego R, Vazquez MJ, Roa J, Gandara M, et al. Hypothalamic mTOR pathway mediates thyroid hormone-induced hyperphagia in hyperthyroidism. *J Pathol.* 2012;227(2):209-22.
118. Videla LA, Fernandez V, Cornejo P, Vargas R. Metabolic basis for thyroid hormone liver preconditioning: upregulation of AMP-activated protein kinase signaling. *ScientificWorldJournal.* 2012; 2012:475675.
119. Lopez M, Varela L, Vazquez MJ, Rodriguez-Cuenca S, Gonzalez CR, Velagapudi VR, et al. Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nat Med.* 2010;16(9):1001-8.
120. Thakran S, Sharma P, Attia RR, Hori RT, Deng X, Elam MB, et al. Role of sirtuin 1 in the regulation of hepatic gene expression by thyroid hormone. *J Biol Chem.* 2013;288(2):807-18.
121. Rodgers JT, Lerin C, Gerhart-Hines Z, Puigserver P. Metabolic adaptations through the PGC-1 alpha and SIRT1 pathways. *FEBS Lett.* 2008;582(1):46-53.

Bibliografía

122. Suh JH, Sieglaff DH, Zhang A, Xia X, Cvorov A, Winnier GE, et al. SIRT1 is a direct coactivator of thyroid hormone receptor beta1 with gene-specific actions. *PLoS One*. 2013;8(7): e70097.
123. Kawa MP, Grymula K, Paczkowska E, Baskiewicz-Masiuk M, Dabkowska E, Koziolok M, et al. Clinical relevance of thyroid dysfunction in human haematopoiesis: biochemical and molecular studies. *Eur J Endocrinol*. 2010;162(2):295-305.
124. Vitale G, Fatti LM, Prolo S, Girola A, Caraglia M, Marra M, et al. Screening for hypothyroidism in older hospitalized patients with anemia: a new insight into an old disease. *J Am Geriatr Soc*. 2010;58(9):1825-7.
125. Angelin-Duclos C, Domenget C, Kolbus A, Beug H, Jurdic P, Samarut J. Thyroid hormone T3 acting through the thyroid hormone alpha receptor is necessary for implementation of erythropoiesis in the neonatal spleen environment in the mouse. *Development*. 2005;132(5):925-34.
126. Zhang Y, Xue Y, Cao C, Huang J, Hong Q, Hai T, et al. Thyroid hormone regulates hematopoiesis via the TR-KLF9 axis. *Blood*. 2017;130(20):2161-70.
127. Kendrick TS, Payne CJ, Epis MR, Schneider JR, Leedman PJ, Klinken SP, et al. Erythroid defects in TRalpha^{-/-} mice. *Blood*. 2008;111(6):3245-8.
128. Gianoukakis AG, Leigh MJ, Richards P, Christenson PD, Hakimian A, Fu P, et al. Characterization of the anaemia associated with Graves' disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009;70(5):781-7.
129. Foster MP, Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K. Proliferation of bone marrow pro-B cells is dependent on stimulation by the pituitary/thyroid axis. *J Immunol*. 1999;163(11):5883-90.
130. Arpin C, Pihlgren M, Fraichard A, Aubert D, Samarut J, Chassande O, et al. Effects of T3R alpha 1 and T3R alpha 2 gene deletion on T and B lymphocyte development. *J Immunol*. 2000;164(1):152-60.
131. Mascanfroni ID, Del Mar Montesinos M, Alamino VA, Susperreguy S, Nicola JP, Ilarregui JM, et al. Nuclear factor (NF)-kappaB-dependent thyroid hormone receptor beta1 expression controls dendritic cell function via Akt signaling. *J Biol Chem*. 2010;285(13):9569-82.

Bibliografía

132. Sanchez A, Contreras-Jurado C, Rodriguez D, Regadera J, Alemany S, Aranda A. Hematopoiesis in aged female mice devoid of thyroid hormone receptors. *J Endocrinol.* 2020;244(1):83-94.
133. Fliers E, Boelen A. An update on non-thyroidal illness syndrome. *J Endocrinol Invest.* 2021;44(8):1597-607.
134. Davis TM, Supanaranond W, Pukrittayakamee S, Krishna S, Hart GR, Burrin JM, et al. The pituitary-thyroid axis in severe falciparum malaria: evidence for depressed thyrotroph and thyroid gland function. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1990;84(3):330-5.
135. Wartofsky L, Martin D, Earll JM. Alterations in thyroid iodine release and the peripheral metabolism of thyroxine during acute falciparum malaria in man. *J Clin Invest.* 1972;51(9):2215-32.
136. Markou K, Georgopoulos N, Kyriazopoulou V, Vagenakis AG. Iodine-Induced hypothyroidism. *Thyroid.* 2001;11(5):501-10.
137. Delange F. The role of iodine in brain development. *Proc Nutr Soc.* 2000;59(1):75-79. doi:10.1017/s0029665100000094
138. Kapil U. Health consequences of iodine deficiency. *Sultan Qaboos Univ Med J.* 2007;7(3):267-272.
139. Iodine Global Network. Global Map of Iodine Nutrition (2021). https://www.ign.org/cm_data/IGN_Global_Scorecard_MAP_2021_SAC_-_7_May_2021.pdf
140. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):676-82.
141. Linares M, Marin-Garcia P, Perez-Benavente S, Sanchez-Nogueiro J, Puyet A, Bautista JM, et al. Brain-derived neurotrophic factor and the course of experimental cerebral malaria. *Brain Res.* 2013; 1490:210-24.
142. Gano LB, Donato AJ, Pasha HM, Hearon CM, Jr., Sindler AL, Seals DR. The SIRT1 activator SRT1720 reverses vascular endothelial dysfunction, excessive superoxide production, and inflammation with aging in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2014;307(12):H1754-63.

Bibliografía

143. Xian W, Li T, Li L, Hu L, Cao J. Maresin 1 attenuates the inflammatory response and mitochondrial damage in mice with cerebral ischemia/reperfusion in a SIRT1-dependent manner. *Brain Res.* 2019; 1711:83-90.
144. Obregon MJ, Morreale de Escobar G, Escobar del Rey F. Concentrations of triiodo-L-thyronine in the plasma and tissues of normal rats, as determined by radioimmunoassay: comparison with results obtained by an isotopic equilibrium technique. *Endocrinology.* 1978;103(6):2145-53.
145. Sanchez A, Orizaola MC, Rodriguez-Munoz D, Aranda A, Castrillo A, Alemany S. Stress erythropoiesis in atherogenic mice. *Sci Rep.* 2020;10(1):18469.
146. Geeraerts T, Newcombe VF, Coles JP, Abate MG, Perkes IE, Hutchinson PJ, et al. Use of T2-weighted magnetic resonance imaging of the optic nerve sheath to detect raised intracranial pressure. *Crit Care.* 2008;12(5): R114.
147. Lofgren L, Forsberg GB, Stahlman M. The BUME method: a new rapid and simple chloroform-free method for total lipid extraction of animal tissue. *Sci Rep.* 2016; 6:27688.
148. Sheikh AS, Sheikh SA, Mohamed MA. Changes in brain metabolites in experimental cerebral malaria infection with plasmodium berghei ANKA: a literature review. *J Pak Med Assoc.* 2014;64(10):1179-85.
149. Singh BK, Sinha RA, Yen PM. Novel Transcriptional Mechanisms for Regulating Metabolism by Thyroid Hormone. *Int J Mol Sci.* 2018;19(10).
150. Berry MJ, Kates AL, Larsen PR. Thyroid hormone regulates type I deiodinase messenger RNA in rat liver. *Mol Endocrinol.* 1990;4(5):743-8.
151. Gerberick GF, Cruse LW, Miller CM, Sikorski EE, Ridder GM. Selective modulation of T cell memory markers CD62L and CD44 on murine draining lymph node cells following allergen and irritant treatment. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1997;146(1):1-10.
152. Kimura D, Miyakoda M, Kimura K, Honma K, Hara H, Yoshida H, et al. Interleukin-27-Producing CD4(+) T Cells Regulate Protective Immunity during Malaria Parasite Infection. *Immunity.* 2016;44(3):672-82.
153. Belnoue E, Kayibanda M, Deschemin JC, Viguier M, Mack M, Kuziel WA, et al. CCR5 deficiency decreases susceptibility to experimental cerebral malaria. *Blood.* 2003;101(11):4253-9.

Bibliografía

154. Campanella GS, Tager AM, El Khoury JK, Thomas SY, Abrazinski TA, Manice LA, et al. Chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9 and CXCL10 are required for the development of murine cerebral malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(12):4814-9.
155. Cibrian D, Sanchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur J Immunol*. 2017;47(6):946-53.
156. Sun X, Kaufman PD. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*. 2018;127(2):175-86.
157. Zhao H, Aoshi T, Kawai S, Mori Y, Konishi A, Ozkan M, et al. Olfactory plays a key role in spatiotemporal pathogenesis of cerebral malaria. *Cell Host Microbe*. 2014;15(5):551-63.
158. Seydel KB, Kampondeni SD, Valim C, Potchen MJ, Milner DA, Muwalo FW, et al. Brain swelling and death in children with cerebral malaria. *N Engl J Med*. 2015;372(12):1126-37.
159. Okoromah CA, Afolabi BB. Mannitol and other osmotic diuretics as adjuncts for treating cerebral malaria. *Cochrane Database Syst Rev*. 2004(4):CD004615.
160. Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, et al. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J*. 2004;23(12):2369-80.
161. Martinez-Sanchez N, Seoane-Collazo P, Contreras C, Varela L, Villarroya J, Rial-Pensado E, et al. Hypothalamic AMPK-ER Stress-JNK1 Axis Mediates the Central Actions of Thyroid Hormones on Energy Balance. *Cell Metab*. 2017;26(1):212-29 e12.
162. Canto C, Menzies KJ, Auwerx J. NAD (+) Metabolism and the Control of Energy Homeostasis: A Balancing Act between Mitochondria and the Nucleus. *Cell Metab*. 2015;22(1):31-53.
163. Bai P, Canto C, Brunyanszki A, Huber A, Szanto M, Cen Y, et al. PARP-2 regulates SIRT1 expression and whole-body energy expenditure. *Cell Metab*. 2011;13(4):450-60.
164. Walker SP, Wachs TD, Grantham-McGregor S, Black MM, Nelson CA, Huffman SL, et al. Inequality in early childhood: risk and protective factors for early child development. *Lancet*. 2011;378(9799):1325-38.

Bibliografía

165. Williams TN, Mwangi TW, Wambua S, Peto TE, Weatherall DJ, Gupta S, et al. Negative epistasis between the malaria-protective effects of alpha⁺-thalassemia and the sickle cell trait. *Nat Genet.* 2005;37(11):1253-7.
166. Cumnock K, Gupta AS, Lissner M, Chevee V, Davis NM, Schneider DS. Host Energy Source Is Important for Disease Tolerance to Malaria. *Curr Biol.* 2018;28(10):1635-42 e3.
167. Silva JE, Bianco SD. Thyroid-adrenergic interactions: physiological and clinical implications. *Thyroid.* 2008;18(2):157-65.
168. Swanson PA, 2nd, Hart GT, Russo MV, Nayak D, Yazew T, Pena M, et al. CD8⁺ T Cells Induce Fatal Brainstem Pathology during Cerebral Malaria via Luminal Antigen-Specific Engagement of Brain Vasculature. *PLoS Pathog.* 2016;12(12):e1006022.
169. Saito I, Ito K, Saruta T. Hypothyroidism as a cause of hypertension. *Hypertension.* 1983;5(1):112-5.
170. Jankauskas SS, Morelli MB, Gambardella J, Lombardi A, Santulli G. Thyroid hormones regulate both cardiovascular and renal mechanisms underlying hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2021;23(2):373-81.
171. Kim B. Thyroid hormone as a determinant of energy expenditure and the basal metabolic rate. *Thyroid.* 2008;18(2):141-4.
172. Evans KJ, Hansen DS, van Rooijen N, Buckingham LA, Schofield L. Severe malarial anemia of low parasite burden in rodent models results from accelerated clearance of uninfected erythrocytes. *Blood.* 2006;107(3):1192-9.
173. Dzeing-Ella A, Nze Obiang PC, Tchoua R, Planche T, Mboza B, Mbounja M, et al. Severe falciparum malaria in Gabonese children: clinical and laboratory features. *Malar J.* 2005; 4:1.

Anexo

Anexo

El trabajo descrito y desarrollado en esta memoria de tesis doctoral ha dado lugar a la publicación que se incluye a continuación:

- Rodríguez-Muñoz D, Sánchez Á, Pérez-Benavente S, et al. Hypothyroidism confers tolerance to cerebral malaria. *Sci Adv.* 2022;8(14): eabj7110

HEALTH AND MEDICINE

Hypothyroidism confers tolerance to cerebral malaria

Diego Rodríguez-Muñoz¹, Ángela Sánchez¹, Susana Pérez-Benavente², Constanza Contreras-Jurado^{3,4}, Ana Montero-Pedrazuela³, Marta Toledo-Castillo¹, María Gutiérrez-Hernández¹, Raquel Rodríguez-Díez^{5,6}, Cintia Folgueira⁷, Ana M. Briones^{5,6}, Guadalupe Sabio⁷, Ignacio Monedero-Cobeta⁸, Irene Chávez-Coira⁹, David Castejón¹⁰, Encarnación Fernández-Valle¹⁰, Javier Regadera⁹, José M. Bautista², Ana Aranda^{3,11,12*}, Susana Alemany^{1,11*}

The modulation of the host's metabolism to protect tissue from damage induces tolerance to infections increasing survival. Here, we examined the role of the thyroid hormones, key metabolic regulators, in the outcome of malaria. Hypothyroidism confers protection to experimental cerebral malaria by a disease tolerance mechanism. Hypothyroid mice display increased survival after infection with *Plasmodium berghei* ANKA, diminishing intracranial pressure and brain damage, without altering pathogen burden, blood-brain barrier disruption, or immune cell infiltration. This protection is reversed by treatment with a Sirtuin 1 inhibitor, while treatment of euthyroid mice with a Sirtuin 1 activator induces tolerance and reduces intracranial pressure and lethality. This indicates that thyroid hormones and Sirtuin 1 are previously unknown targets for cerebral malaria treatment, a major killer of children in endemic malaria areas.

INTRODUCTION

Malaria, caused by *Plasmodium falciparum*, is a devastating disease that results in the infection of millions of people each year (1) (www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/). Cerebral malaria (CM), which affects mainly children under the age of 5, is the most lethal form of the disease (2). CM is characterized by disruption of the blood-brain barrier (BBB), brain swelling leading to an increase in intracranial pressure (ICP) with compression of cerebral vessels, and hemorrhaging, which causes altered consciousness, seizures, paralysis, coma, and ultimately death. Infection with *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) strain in C57BL/6 mice is widely used as a model of experimental CM (ECM), recapitulating the progression of CM in humans (3). Control of infections involves not only pathogen clearance by activation of the immune system but also disease tolerance (4), which enables the host tissues to limit the consequences of the infection without interfering directly with the host's pathogen load (5). Metabolic reprogramming is required for disease tolerance, diminishing tissue damage, and maintaining homeostatic parameters within a dynamic range compatible with the host survival (6). The master regulators of metabolism Sirtuin 1 (Sirt1), adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), and mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) are key energy sensors

that respond to energy, nutrient, and stress stimuli. Sirt1 increases energy expenditure (7, 8) and is associated with metabolic and age-related health benefits (9, 10). AMPK plays a key role in the regulation of protein and lipid metabolism in response to changes in fuel availability (11), and mTORC1 also controls many fundamental processes, from protein synthesis to autophagy (12).

Several disease tolerance mechanisms have been reported in the host response to malaria. The malaria survival advantage conferred by human hemoglobin variants (13) in a mice model of ECM with sickle cell trait has been shown to occur irrespective of parasite load (14). Dietary restriction (15), a high-fat diet (16, 17), adrenal hormones (18), targeting glutamine metabolism with a glutamine analog (19), or inhibiting glycolysis (20) also protects against ECM, reinforcing the idea that the host metabolic state plays a major role in tolerance against this disease. One of the most recognized actions of the thyroid hormones (THs; thyroxine or T4 and triiodothyronine or T3) is the regulation of the metabolic cycles, increasing energy expenditure (21). THs regulate energy expenditure via the central nervous system (22–24) and through a direct role in the major metabolic tissues (25). Under conditions of severe infection, a decline of TH levels is a common phenomenon called the “euthyroid sick syndrome” or “nonthyroidal illness syndrome” (NTIS) (26), diminishing the metabolic rate of the host, which could represent an emergency response to the infection. Although it has been reported that thyroid gland function decreases during malaria infection (27, 28), the role of the thyroidal status in experimental models of malaria has not yet been examined. Iodine deficiency is still today an important public health problem (29). In underdeveloped countries where malaria prevails, there are endemic areas of iodine deficiency and consequently of insufficient TH secretion, as iodine is an essential component of the TH molecule (see www.ign.org/cm_data/IGN_Global_Map_AllPop_30May2017.pdf and www.cdc.gov/malaria/about/distribution.html). Reduction of thyroid gland activity during malaria infection could aggravate the outcome of the disease, but it could also constitute a defense mechanism.

Here, we show that hypothyroidism confers tolerance to CM in mice, reducing ICP and increasing survival without altering pathogen load. Sirt1 is involved in this effect, since this protection is reversed by treatment with the Sirt1 inhibitor EX-527. Furthermore, treatment

Copyright © 2022
The Authors, some
rights reserved;
exclusive licensee
American Association
for the Advancement
of Science. No claim to
original U.S. Government
Works. Distributed
under a Creative
Commons Attribution
NonCommercial
License 4.0 (CC BY-NC).

¹Departament de Metabolism and Cell Signaling, Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain. ²Department of Biochemistry and Molecular Biology, Research Institute Hospital 12 de Octubre (Imas12), Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain. ³Department of Endocrine and Nervous System Pathophysiology, Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain. ⁴Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Alfonso X El Sabio, Villanueva de la Cañada, Madrid, Spain. ⁵Department of Pharmacology, Instituto de Investigación Hospital La Paz, Universidad Autónoma de Madrid, 28029 Madrid, Spain. ⁶CIBER de Enfermedades Cardiovasculares, ISCIII, Madrid, Spain. ⁷Department of Myocardial Pathophysiology, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, ISCIII, 28029 Madrid, Spain. ⁸Department of Physiology, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain. ⁹Department of Anatomy, Histology and Neuroscience, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain. ¹⁰MNR Unit (CAI de Bioimagen), Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain. ¹¹Bio-medicine Unit (Unidad Asociada al CSIC), Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas, Spain. ¹²Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), ISCIII, Madrid, Spain.

*Corresponding author. Email: aaranda@iib.uam.es (A.A.); salemany@iib.uam.es (S.A.)

of normal thyroid function mice with the Sirt1 activator SRT1720 mimics the effect of hypothyroidism, promoting tolerance and reducing ICP and lethality. Our findings suggest that targeting Sirt1 is a potential adjuvant treatment for CM.

RESULTS

Hypothyroidism promotes survival in ECM

Infection with PbA of euthyroid mice caused 100% lethality at days 6 to 7 after infection. In contrast, more than 40% of hypothyroid mice receiving a low-iodine diet and antithyroidal drugs were still alive at day 15 (Fig. 1A). At day 5 after infection, all euthyroid mice presented ECM symptoms, including paralysis and ataxia (stage 3). At day 6, they usually suffered convulsions and coma (stage 4) before death, while infected hypothyroid mice presented no ECM symptoms (Fig. 1B and movies S1 and S2). About 40% of the hypothyroid mice never presented clear symptoms of ECM, but they eventually died from anemia at days 18 to 20 after infection (fig. S1A). Parasitemia levels were similar in both groups during the course of the infection (Fig. 1C), suggesting that hypothyroidism may confer tolerance to ECM. At day 6 after infection, both euthyroid and hypothyroid mice lost about 10% of body weight (BW; Fig. 1D), regardless of the fact that hypothyroid mice had a lower BW on the day of the infection, since hypothyroidism resulted in strongly reduced weight gain (fig. S1B). Infected euthyroid mice presented NTIS, with a marked decrease of total circulating T3 and T4 levels at day 6 after infection. Predictably, hypothyroid mice displayed a severe decrease of circulating THs at the times tested (Fig. 1E). In addition, the levels of hepatic *Deiodinase I* mRNA, a widely used readout of TH action (30), faithfully reproduced the levels of circulating hormones (fig. S1C).

Shifting euthyroid mice to hypothyroid diet at day 0, but not at day 3 of PbA infection, arrested ECM development, and animals survived (Fig. 1F). Switching of hypothyroid animals to control diet and treatment with TH in the drinking water at day 3 after infection accelerated their death, and when the switch was made on the same day of infection, they died on day 6. (Fig. 1G). Intracerebroventricular (ICV) administration of T3 to hypothyroid mice for 6 days also accelerated death and appearance of ECM symptoms. While more than 80% of the animals injected with vehicle survived at day 7, only 50% of the animals injected with T3 were alive at day 5 and 17% died as early as day 4. Once the treatment stopped, both groups showed a similar survival (Fig. 1H). These results suggest that the effects of the TH are at least partially exerted directly in the brain. In addition, omission of the antithyroidal drug KClO_4 did not reduce survival of hypothyroid mice, indicating that extremely severe hypothyroidism is not required for protection against ECM. Last, hyperthyroidism increased the sensitivity to ECM, as all hyperthyroid-infected mice died at day 5, 1 day earlier than the euthyroid mice (Fig. 1I). Adrenalectomy, which has been shown to enhance mortality in C57BL/6 mice infected with the parasite strains *P. berghei* Edinburgh (*PbNK65-EPbNK65*) or New York (*PbNK65-NY*), accelerating death by hypoglycemia at days 7 to 10 after infection (18), did not alter lethality by PbA in euthyroid mice, which died at day 6 before developing strong hypoglycemia. In addition, adrenalectomy did not reverse the effect of hypothyroidism on increased survival (fig. S2). These data indicate that the thyroidal status plays an important role in the outcome of ECM. However, this TH-driven effect was lost in the outcome of non-CM caused by *Plasmodium yoelii* YM (Fig. 1, J and K) and did not render BALB/c mice susceptible to ECM when infected

with PbA, as both euthyroid and hyperthyroid mice died without developing ECM symptoms (not illustrated).

Enhanced splenic response in PbA-infected hypothyroid mice

Infected euthyroid and hypothyroid mice displayed similar hemograms (fig. S3, A and B), with the exception of a somewhat stronger reduction of red blood cell and platelet values in hypothyroid mice at day 6 after infection. Besides, infected hypothyroid mice showed increased levels of interferon- γ (IFN- γ) and CXCL-1, a tendency toward a higher circulating tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 (IL-6), and CCL-2, and a significant increase of IL-10 (fig. S3C). Circulating glucose levels were reduced in both groups to a similar extent upon infection (fig. S3D). Thus, hypothyroid mice show reduced severe ECM pathology despite having similar hemograms and glycemia, and a higher cytokine display than euthyroid mice.

Spleen is crucial for a proper immune response to malaria (31). Although hypothyroid mice displayed noticeable spleen atrophy, at day 6 after infection, they showed a marked splenomegaly, with a significantly higher increase in spleen size and weight than euthyroid mice (fig. S4A). Histological analysis of infected spleens from both groups showed the typical malaria infection appearance: abundant erythroid cells and hyperplastic lymphoid follicles with an extended infiltration into red pulp (fig. S4B). In parallel to splenic weight changes, uninfected hypothyroid mice displayed a reduced number of splenocytes, but at day 6 after infection, hypothyroid mice showed a stronger increase in splenic cellularity, including erythroid cells, than euthyroid mice (fig. S4C). Among the different late erythroblasts, gated as described in (32) and fig. S5 (A and B), infected hypothyroid mice showed a reduced number of Ery B with respect to the euthyroid mice, and Ery C supported in both groups the major increase at day 6 after infection (fig. S4D). Splenic leukocytes and different myeloid and T cell lineages included therein were reduced in the hypothyroid mice before infection and augmented significantly in these mice, but not in euthyroid mice, upon infection (fig. S4E). Before infection, the number of B cells was reduced in hypothyroid spleens, but increased in both groups after infection, reaching similar values (fig. S4F).

Expression of CD49d and CD11c (which defines the PbA-specific T cells) (33), of CXCR3 and CCR5 (chemokine receptors required for their migration to the brain) (34, 35), of the activation marker CD69, of Granzyme B (required for the development of CM) (36), and of Ki67 (a marker of cell proliferation) revealed a rather similar activation state on splenic T helper and cytotoxic cells between euthyroid and hypothyroid mice before the infection and at day 6 after the PbA inoculation (figs. S6 and S7). Plasmacytoid dendritic cells showed increased expression of the activation marker CD86 in infected hypothyroid mice with respect to the euthyroid mice, a difference that could not be observed in type 1 conventional dendritic cells (fig. S8). All these data indicate that PbA infection compensates the spleen atrophy generated by hypothyroidism with a massive increase in the number of different splenic cell types with the expected activation state at the late ECM stage.

Hypothyroidism does not prevent BBB disruption in ECM

Despite their reduced BW, hypothyroid mice maintained a normal brain weight (Fig. 2A). BBB breakdown is a hallmark of ECM (2), and hypothyroidism did not protect its integrity, as assessed by

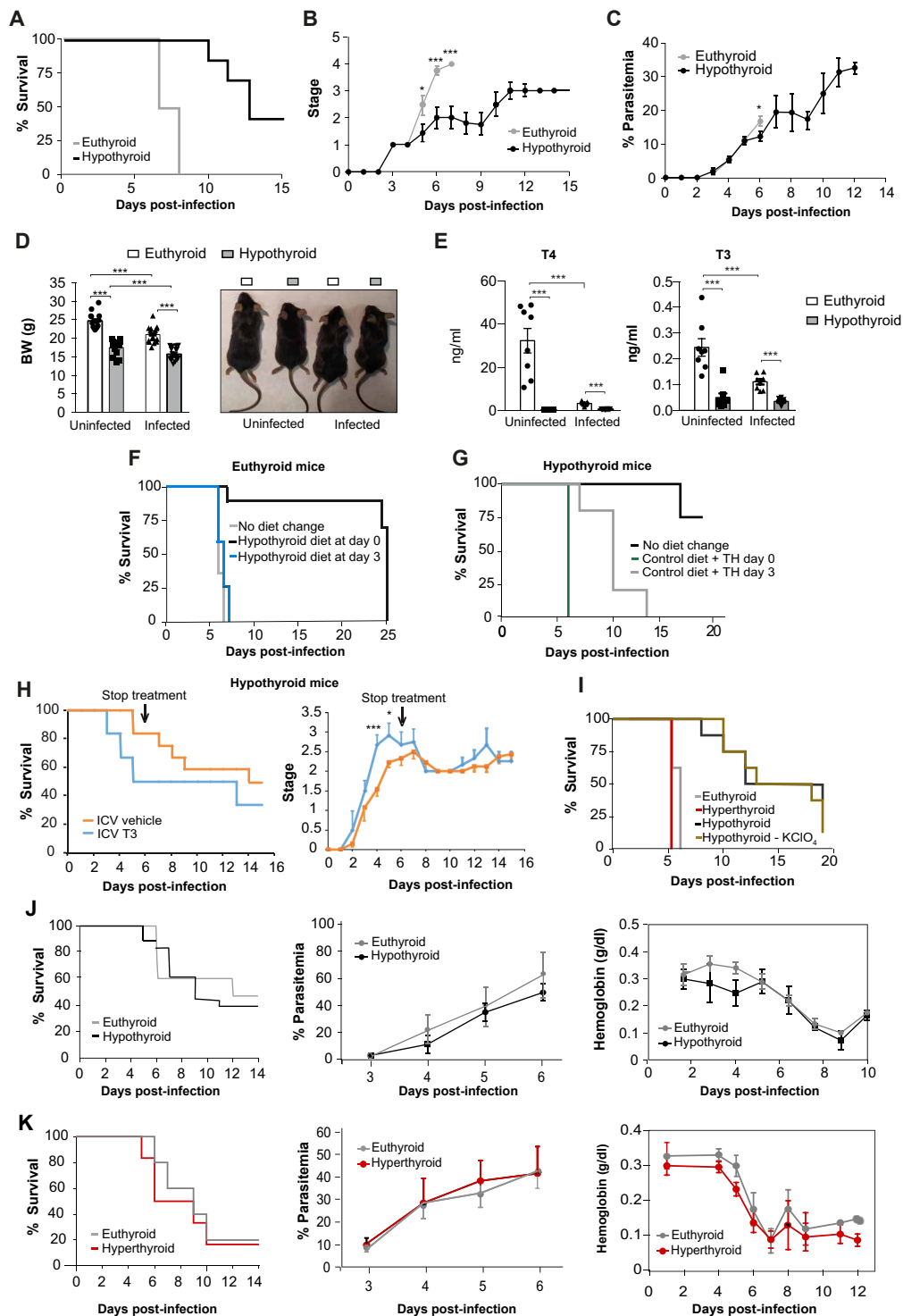


Fig. 1. Hypothyroidism protects from ECM. (A) Kaplan-Meier plot of euthyroid mice (fed a normal iodine diet) and hypothyroid mice (fed a low iodine diet with propylthiouracil and KClO₄ in the drinking water) infected with PbA (n = 34, 36). (B) Clinical stage of the mice (n = 28, 34). (C) Parasitemia expressed as % of infected erythrocytes (n = 14). (D) Body weight (BW) of euthyroid and hypothyroid mice at the day of PbA infection and at day 6 after infection (n = 11 to 13). (E) Total circulating T4 and T3 (n = 8 to 12). (F) Kaplan-Meier plot of euthyroid mice infected with PbA and shifted to hypothyroid treatment at days 0 and 3 after infection (n = 7 to 10). (G) Kaplan-Meier plot of hypothyroid mice infected with PbA and shifted to normal iodine diet and T4 and T3 treatment at days 0 and 3 after infection (n = 5). (H) Kaplan-Meier plot of hypothyroid-infected mice after daily intracerebroventricular (ICV) administration of vehicle or 16 ng of T3 for the first 6 days starting at day 0 of infection. Right: Clinical stage of the animals (n = 12 to 13). (I) Survival of PbA-infected mice with different thyroidal states: euthyroid, hypothyroid, hypothyroid diet without KClO₄, and hyperthyroid (normal iodine diet and T3 pretreatment for 14 days and maintained during the course of the infection, n = 8). (J) Kaplan-Meier plot (n = 18, 15), parasitemia (n = 7), and circulating hemoglobin (n = 7) of euthyroid and hypothyroid mice infected with *P. yoelii* YM. (K) Same parameters in hyperthyroid and euthyroid mice (n = 5, 6). In all panels, error bars represent means ± SEM [one-way analysis of variance (ANOVA) followed by multiple comparisons Tukey test]. *P < 0.05 and ***P < 0.001.

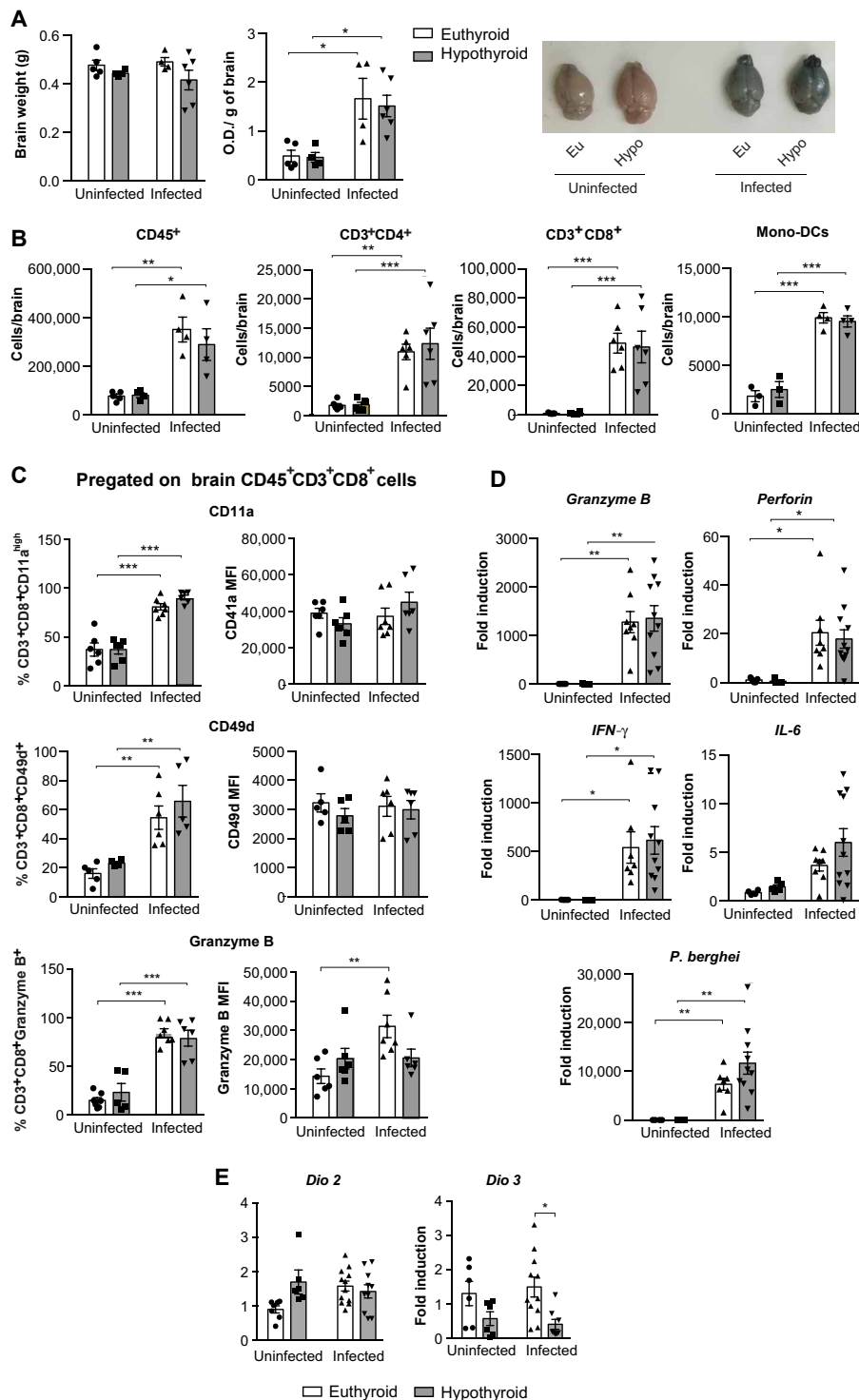


Fig. 2. Hypothyroidism does not protect the integrity of the BBB. (A) Brain weight, Evans blue staining ($n = 5$ to 6), and representative brain images of the uninfected mice and at day 6 after infection. O.D., optical density. (B) Number of brain-infiltrating leukocytes (CD45⁺), T helper (CD45⁺CD3⁺CD4⁺), T cytotoxic (CD45⁺CD3⁺CD8⁺) lymphocytes, and monocyte-derived dendritic cells (Mono-DCs; CD45⁺F4/80⁺CD11b⁺CD206a⁺MHCII⁺) ($n = 5$ to 7). (C) Percentage of cytotoxic T lymphocytes positive for CD11a, CD49d, and intracellular Granzyme B expression, and their corresponding mean fluorescence intensity (MFI) values ($n = 5$ to 6). (D) Levels of the indicated transcripts in the brains ($n = 5$ to 6). (E) Levels of brain *Deiodinase* 2 and 3 transcripts ($n = 6$ to 12). In all panels, error bars represent \pm SEM, one-way ANOVA followed by multiple comparisons Tukey test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$.

extravasation of Evans blue 1 hour after intravenous injection at day 6 after PbA infection (Fig. 2A). Analysis by magnetic resonance imaging (MRI) after 15 min of an intraperitoneal injection of a contrast agent based on gadolinium also revealed BBB disruption in infected euthyroid mice, although some quantitative differences in discrete areas with respect to the euthyroid mice were observed. Thus, while signal intensity was similar in cerebellum, hypothalamus, or hippocampus of infected euthyroid and hypothyroid mice, in other regions values were lower in the hypothyroid animals (fig. S9). The total number of brain-infiltrated helper and cytotoxic T lymphocytes, and monocyte-derived dendritic cells, identified as indicated in fig. S5 (C and D), was similar in infected euthyroid and hypothyroid mice (Fig. 2B). In addition, the percentage of CD3⁺CD8⁺ cells positive for CD11a, CD49d, and Granzyme B showed a similar increase in both groups, suggesting a comparable activation state (Fig. 2C). Brain mRNA levels of *granzyme B* and *perforin* also showed an analogous induction, and analysis of *IL-6* and *IFN- γ* transcripts revealed a similar pro-inflammatory microenvironment in the brain of both groups of infected mice. In addition, no significant differences between euthyroid and hypothyroid mice in the levels of *PbA* mRNA were found (Fig. 2D). All these data confirm BBB disruption and similar infiltration of leukocytes and entry of parasites into the brain in both groups of mice. Brain hypothyroidism was characterized by a tendency toward an increase in transcript levels of *Deiodinase 2* before infection, which regulate the generation of T3 from T4, as well as with a reduction of *Deiodinase 3* transcripts, the enzyme responsible for T3 degradation (Fig. 2E).

Hypothyroidism protects from ECM-induced swelling and brain damage

ECM is associated with brain swelling and parenchymal lesions (37). T2-weighted MR images of the olfactory bulb, which plays a key role in the pathogenesis of ECM (38), showed the existence of hypointense areas (compatible with microhemorrhages) accompanied by hyperintensity (edema) in the central area in all infected euthyroid mice, but not in hypothyroid mice (Fig. 3A). Hematoxylin and eosin (H&E)-stained sections of the whole brain corroborated that infected euthyroid mice exhibited a significantly higher number of microhemorrhages (Fig. 3B). In infected euthyroid mice, but in none of the hypothyroid mice, edema was also propagated from the bulb to the rostral migratory stream, the subventricular zone, and the dorsal migratory stream, reaching the striatum and the corpus callosum and causing brain thickening (Fig. 3C).

Crushing of the cerebellum and brainstem herniation as a consequence of brain edema is considered to be a major cause of death in ECM (37) and in children with CM (39). PbA infection significantly increased brain volume and the cerebral area in euthyroid but not in hypothyroid mice (Fig. 3D). To quantify changes due to edema, the distances illustrated in Fig. 3D were measured in mid-sagittal T2-weighted images. While total brain length was not altered by infection (line 1), brain thickness (line 2) augmented in the euthyroid mice upon infection without changing in the hypothyroid mice. Brain compression also led to a change in the shape of the cerebellum in euthyroid but not in hypothyroid mice, as cerebellar length (line 3) increased, while cerebellar width (line 4) was reduced upon infection only in euthyroid animals. The distance from the pituitary gland to the anterior and posterior end of the cerebellum (lines 5 and 6) was also longer after PbA infection in euthyroid mice without changing in hypothyroid mice. These results confirm that significant compression,

as a consequence of brain swelling, did not happen in hypothyroid mice that showed resistance to ECM. Visual inspection of the brain images (Fig. 3E) shows not only crushing of the cerebellum and the pituitary gland in the infected euthyroid mice but also engulfment of the brainstem into the foramen magnum.

Hypothyroidism protects from increased ICP and cerebral blood flow damage

The above results are compatible with reduced ICP in infected hypothyroid mice when compared with infected euthyroid mice. An increase in ICP directly and proportionally affects the perioptic nerve space, causing an enlargement of the optic nerve diameter (40). PbA infection significantly increased ICP in euthyroid but not in hypothyroid mice (Fig. 4A). These changes appear to be independent of effects on peripheral blood pressure that was lower in the hypothyroid mice before infection and was reduced upon infection, reaching similar levels in both groups of mice (Fig. 4B). Mannitol has been proposed as an adjuvant to treat brain edema in CM (41). However, daily administration of mannitol, starting the day of infection, did not increase survival and did not modify the clinical score in infected euthyroid and hyperthyroid mice. Furthermore, mannitol was ineffective in reducing ICP or neurological symptoms in infected euthyroid mice (fig. S10).

Fatal outcome in ECM is also associated with compression of the cerebral vessels and impairment of the cerebral blood flow (CBF) as a consequence of brain swelling and increased ICP (37). Angiographies showed that uninfected hypothyroid mice displayed a markedly reduced CBF in coronal, axial, and sagittal images (Fig. 4C), which to our knowledge has not been previously reported. In parallel with increased ICP, infected euthyroid mice showed strong collapse of cerebral vessels and a significant reduction of the CBF. In contrast, CBF maps were quite similar in uninfected and infected hypothyroid mice (Fig. 4C and movie S3), which agrees with the absence of brain compression. Thus, hypothyroidism markedly reduces brain damage, precluding ICP increase and maintaining the CBF in PbA-infected mice without preventing BBB breakdown and parasite and leukocyte infiltration into the brain. Shifting euthyroid mice to hypothyroid diet at day 0 of PbA infection was sufficient to prevent brain vessel collapse, reducing ECM stage and increasing survival, while CBF was similarly reduced in euthyroid mice at day 6 and in hyperthyroid mice at day 5 after infection (fig. S11).

Hypothyroid mice display altered brain metabolic profile after PbA infection

To analyze whether brain metabolic changes could be involved in the different outcomes of the disease in euthyroid and hypothyroid mice, we next conducted an analysis of brain aqueous low-molecular weight metabolites by nuclear MR spectroscopy before infection and at day 6 after infection. Clustering analysis showed that, before infection, hypothyroid brains display metabolic differences with respect to the euthyroid brains, with a predominance of underexpressed metabolites. In euthyroid mice, infection resulted in underexpression of multiple metabolites, whereas in hypothyroid mice a general increase was observed. Furthermore, upon infection, a distinct clustering of euthyroid and hypothyroid samples was observed, with increase in various metabolites in the hypothyroid animals that was not detected in euthyroid mice (Fig. 5A). We observed statistically significant differences in 22 metabolites, with a distinct profile depending on the thyroidal status and the infection

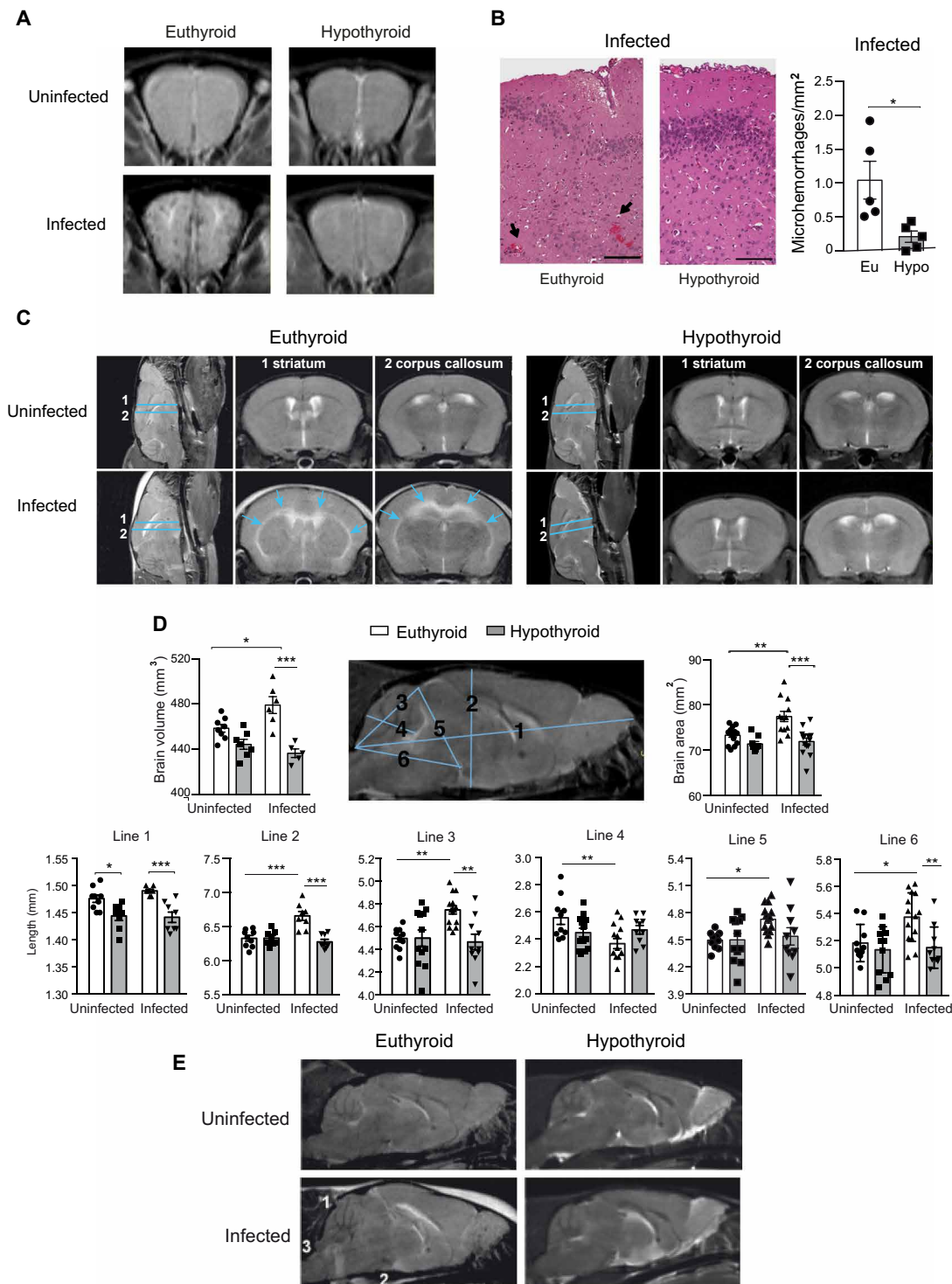


Fig. 3. Brain damage and inflammation are reduced in infected hypothyroid mice. (A) Representative olfactory bulb–axial T2-weighted MR images in euthyroid and hypothyroid uninfected mice and at day 6 after infection. (B) Representative H&E staining at $\times 100$ of the cerebral cortex and number of microhemorrhages per square millimeter of total cerebral tissue. Means \pm SEM, unpaired *t* test. $n = 6$. Scale bars, 1 mm. (C) Representative T2-weighted axial images of the brain regions indicated by lines 1 and 2 in the sagittal images, corresponding to the striatum and corpus callosum, of euthyroid and hypothyroid mice uninfected and 6 days after infection. Edema, characterized by the presence of hyperintense areas, is shown with arrows. (D) Brain volume, measured from T2-weighted MR images. Midsagittal T2-weighted MR image showing lines 1 to 6 used to measure cerebral and cerebellar distances in euthyroid and hypothyroid mice uninfected and at day 6 after infection. Cerebral area was calculated from the ellipse determined by lines 1 and 2. Means \pm SEM, $n = 10$ to 14, one-way ANOVA followed by multiple comparisons Tukey test. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$. (E) Representative images showing crushing of the cerebellum (1) and the pituitary gland (2) as well as brainstem herniation (3) only in infected euthyroid mice.

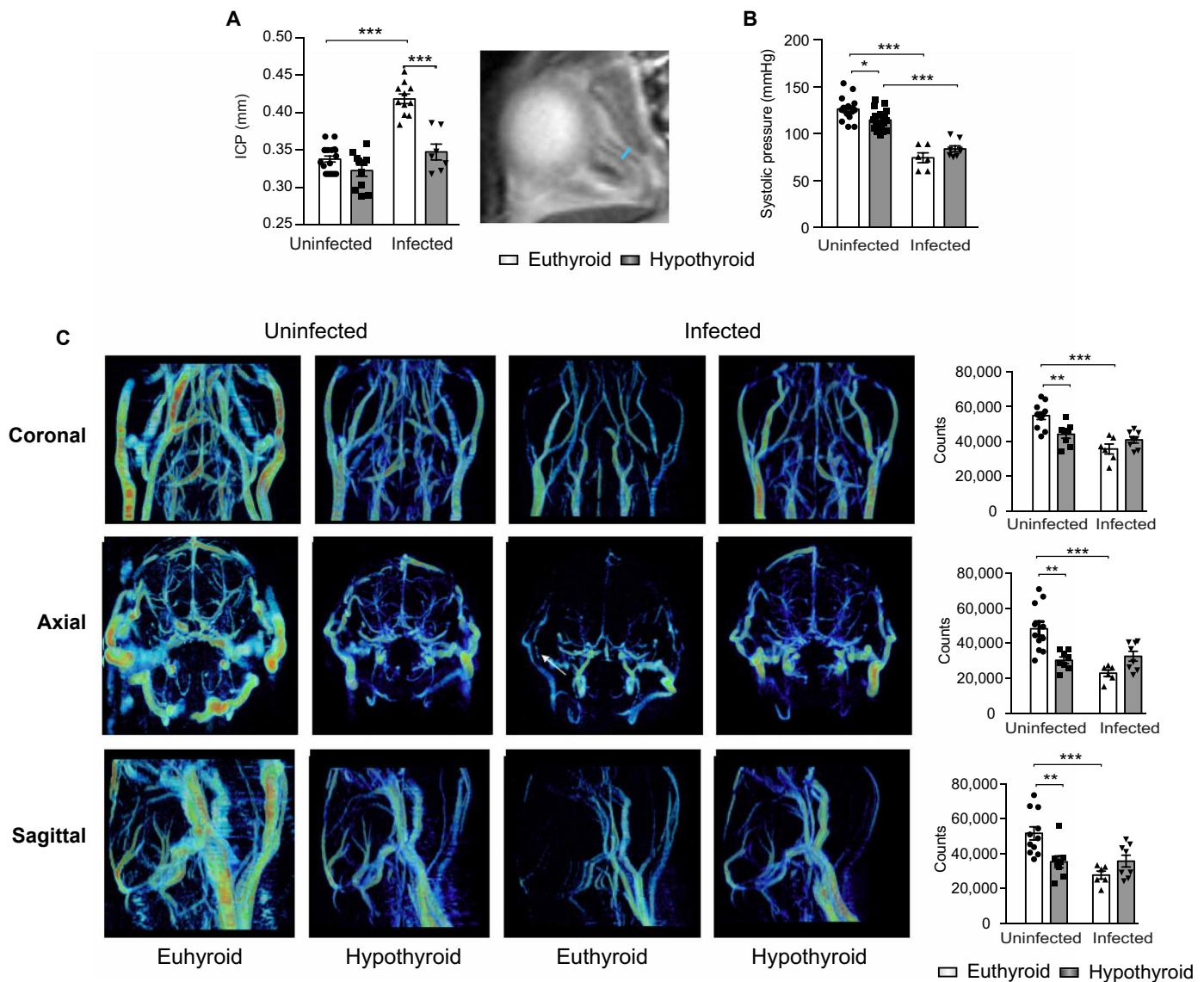


Fig. 4. Hypothyroidism protects from increased intracranial pressure and brain vessel compression. (A) Intracranial pressure (ICP) in euthyroid and hypothyroid uninfected mice and at day 6 after infection. A representative T2-weighted image used for measurement of the nerve sheath diameter is shown at the right ($n = 7$ to 18). (B) Systolic blood pressure in the same animals ($n = 6$ to 18). (C) Representative coronal, axial, and sagittal maximum intensity projections of a three-dimensional time-of-flight angiogram and quantification of the angiograms in euthyroid and hypothyroid mice not infected and at day 6 after infection and quantification of signal intensity ($n = 7$ to 11). (A to C) Means \pm SEM, one-way ANOVA followed by multiple comparisons Tukey test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$.

(fig. S12). The metabolic changes indicated a more efficient anaerobic metabolism in infected hypothyroid mice with a higher increase in the levels of lactate and a more efficient energy production with higher creatine levels (42, 43). A significant increase in glutamine levels was observed upon infection in euthyroid and hypothyroid brains, but in hypothyroid mice, the levels of *N*-acetylaspartate and alanine were also increased, which represents a protective mechanism to palliate the deleterious effects of glutamine accumulation. Both glycerophosphocholine and *N*-acetylaspartate, markers of cell density and viability (42, 43), were significantly reduced in euthyroid mice but not in hypothyroid mice after infection. This indicates again a better response against the infection in hypothyroid mice. Ketone bodies, produced from short-chain fatty acids, could be an

important source of fuel for brain metabolism. The levels of 3-hydroxybutyrate increased strongly only in euthyroid mice, indicating that they respond to infection with an enhanced ketone body-based metabolism, whereas hypothyroid mice used anaerobic glycolysis and creatine pathways to obtain energy. Principal components (PC) analysis (Fig. 5B) revealed separation between infected and noninfected individuals along the second PC (PC2), which may be attributed to the influence of higher levels of lactate and glutamine in infected mice and to higher levels of glycerophosphocholine in noninfected mice. Upon infection, euthyroid and hypothyroid mice displayed a different distribution with respect to PC1 for which acetylaspartate, alanine, acetylcarnitine, and hydroxybutyrate would be responsible. These data indicate the existence of metabolomic

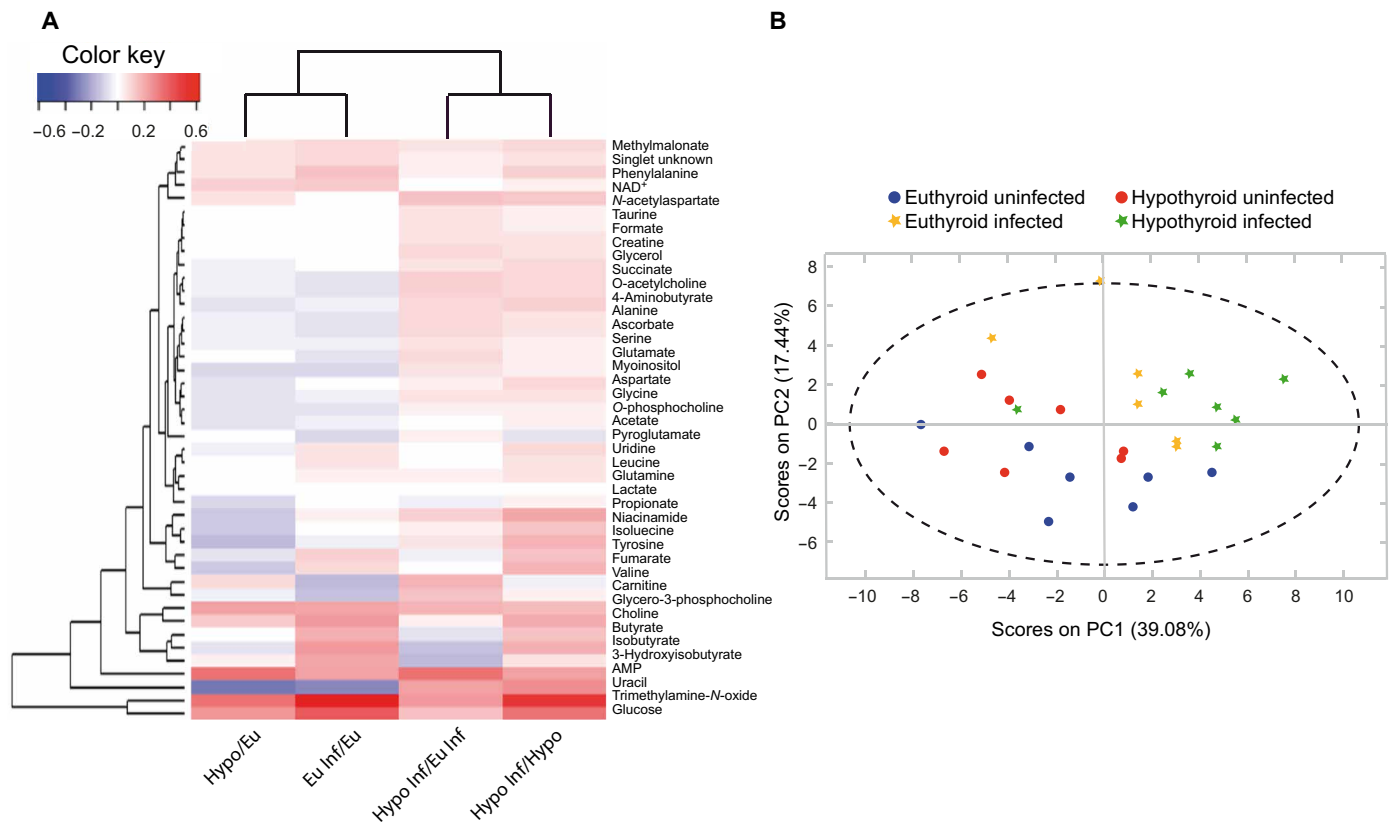


Fig. 5. Hypothyroidism modulates the brain metabolic profile in response to PbA infection. (A) Heat map analysis of nuclear MR spectroscopy metabolomics from brains of euthyroid and hypothyroid mice uninfected and at day 6 after infection ($n = 6$ to 7). (B) Principal components analysis (PC1 versus PC2) of the brain metabolites.

differences in the brain of euthyroid and hypothyroid mice before and during *P. berghei* infection.

Hypothyroidism prevents behavioral and respirometric changes in ECM

Next, we evaluated how PbA infection affects global behavioral and metabolic functions in euthyroid and hypothyroid mice using respirometry cages (Fig. 6). Mice are nocturnal animals, and before the infection and during the following four nights, euthyroid mice had a much higher locomotor activity than hypothyroid mice. However, from day 4 after infection, euthyroid mice stopped moving, while the movements of hypothyroid mice were better preserved (Fig. 6A). The accumulated slope of food and drink consumption also abruptly stopped rising in infected euthyroid mice at this time, being less affected in the hypothyroid mice that are hypophagic (Fig. 6, B and C). During the first 4 days following infection, euthyroid mice showed a preserved circadian rhythm with higher nocturnal oxygen uptake (VO_2) and CO_2 output (VCO_2) than hypothyroid mice. However, from the fourth night, VO_2 and VCO_2 sharply decreased until death in euthyroid mice, but not in hypothyroid mice, and during these last 2 days, the situation was reversed (Fig. 6, D and E). The respiratory exchange ratio (RER; VCO_2/VO_2) gives an indication about the type of fuel source used. During the first four nights, euthyroid mice presented RER values above 1 and the hypothyroid mice values were somewhat lower. However, at the late stages of ECM, RER value decreased in euthyroid mice, indicating a higher rate of fat consumption, which was not so evident in infected hypothyroid mice

(Fig. 6F). As expected, euthyroid mice also displayed higher energy expenditure than hypothyroid mice before and at the onset of ECM symptoms. Again, from the fourth night of infection, energy expenditure showed a marked constant decrease until death at days 6 to 7 after infection in euthyroid mice, whereas hypothyroid mice displayed more stable energy expenditure values during the course of the disease (Fig. 6G). All these data indicate that hypothyroidism confers resilience to changes in the behavioral, respirometric, and energy expenditure parameters at the late stages of the ECM (Fig. 6H).

Regulation of ECM outcome by Sirt1 modulation

Regulation of Sirt1 activity appears to be involved in the metabolic effects of the TH (44). Analysis of Sirt1 protein expression in the liver, a major metabolic tissue, revealed a decrease in Sirt1 levels at day 6 after infection in both euthyroid and hypothyroid mice (fig. S13A). As a readout of Sirt1 activity, nuclear factor κB (NF- κB) p65 acetylation levels were determined (45). Before infection, acetyl-NF- κB p65 levels were lower in euthyroid than in hypothyroid mice. However, NF- κB p65 acetylation increased at day 6 after infection in euthyroid but not in hypothyroid mice, indicating a major decrease in Sirt1 activity during the course of PbA infection only under euthyroid conditions. This occurred despite a reduction of the total NF- κB p65 levels, which was similar in both groups of infected mice. mTORC1, another key metabolic enzyme, is also involved in the metabolic actions of the TH (24), and as a readout of its activity, the phosphorylation state of p70 S6K and of its substrate S6 was determined. PbA infection decreased phosphorylation of p70 S6K

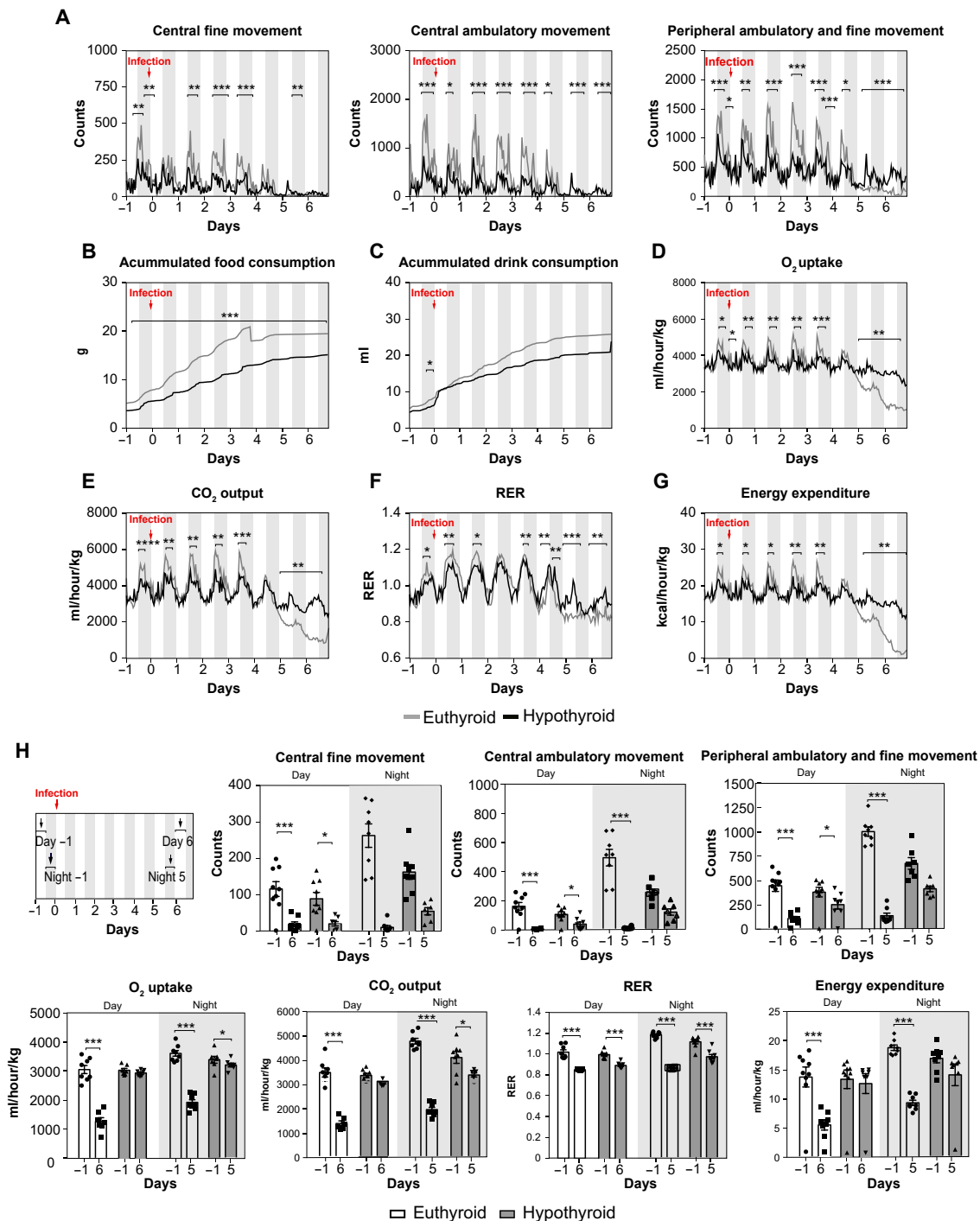


Fig. 6. Hypothyroid mice maintain behavioral and respirometric parameters during the course of PbA infection. (A) Recorded movements of euthyroid and hypothyroid mice before infection and after PbA infection. Lights are off (gray columns) between 8 p.m. and 8 a.m. and are on (white columns) otherwise. (B and C) Food and drink consumption. (D to G) O₂ uptake, CO₂ output, respiratory exchange ratio (RER), and energy expenditure ($n=8, 7$), unpaired t test. (H) Time diagram in which the phenomaster values were chosen for a more detailed representation of their mean values before infection and at the late ECM stage. Means \pm SEM, $n=8, 7$, one-way ANOVA followed by multiple comparisons Tukey test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$.

and S6, particularly in euthyroid mice, which showed higher phosphorylation of both proteins than hypothyroid mice (fig. S13A). Dietary restriction increases resistance to ECM by a mechanism that involves a reduction of leptin and mTORC1 activity, and administration

of leptin to mice with dietary restriction decreases survival (15). Circulating leptin levels were significantly reduced in the hypothyroid mice and did not increase upon infection, as observed in euthyroid mice (fig. S13B). However, administration of a high dose of leptin

from day 0 of infection did not alter lethality in hypothyroid mice (fig. S13C), suggesting that hypothyroidism does not induce tolerance by a leptin-mediated mechanism. AMPK is also an essential kinase in metabolic regulation and is modulated by the TH (23, 46). Both total and phosphorylated AMPK (P-AMPK) levels were higher in the hypothyroid animals before infection, but P-AMPK levels were similarly reduced in euthyroid- and hypothyroid-infected mice (fig. S13A). All these data indicate that PbA infection affects the activation state of different key enzymes involved in metabolic control and suggest that their distinct regulation in hypothyroid mice might be involved in the improved disease tolerance to ECM.

Both Sirt1 and energy expenditure displayed a major decrease in infected euthyroid mice, but not in infected hypothyroid mice. Since Sirt1 activates energy expenditure (7, 8, 47), we next analyzed the possibility that modulation of Sirt1 activity could improve tolerance to ECM. Thus, we treated euthyroid mice, starting at the day of infection, with the Sirt1 activator SRT1720 (48). SRT1720 treatment significantly increased survival, and about 25% of the mice never developed ECM symptoms, without altering significantly parasitemia (Fig. 7A). Treatment of infected euthyroid mice with SRT1720 resulted in reduced cerebral vessel collapse and increased CBF (Fig. 7B and movie S4), concomitantly with reduced ICP (Fig. 7C) and increased systolic blood pressure (Fig. 7D). SRT1720 also caused partial reversal of the cerebral width increase and of the cerebellum change of shape (fig. S14A), a clear improvement of the olfactory bulb damage and reduced edema in other central brain areas (fig. S14, B and C). On the other hand, inhibition of Sirt1 activity in hypothyroid mice by treatment with EX-527 (49) reduced survival to PbA infection, as all hypothyroid-infected mice treated with the Sirt1 inhibitor died within 5 to 10 days with ECM symptoms. EX-527 did not affect survival of uninfected hypothyroid mice (Fig. 7E). Angiographies revealed that hypothyroid-infected mice treated with EX-527 displayed increased collapse of cerebral vessels, resulting in a significant reduction of the CBF (Fig. 7F and movie S5). This was also correlated with a significant increase in ICP without a significant alteration of the systolic blood pressure (Fig. 7, G and H), with a change of cerebral and cerebellar area and thickness, suggestive of brain swelling, as well as in detectable edema in the olfactory bulb and in other central brain areas (fig. S15). These results indicate that modulation of Sirt1 activity is involved in hypothyroidism-induced tolerance to ECM and that activation of Sirt1 in euthyroid mice increases tolerance, improving the outcome of the disease.

DISCUSSION

In this study, we proved that hypothyroidism confers disease tolerance to ECM. Without altering the pathogen load, hypothyroidism prevents the development of severe neurological symptoms and increases survival. In contrast, hyperthyroid mice die 1 day earlier than mice with normal thyroid function, further indicating that thyroidal status is an important determinant for the outcome of fatal CM.

Thyroidal dysfunction (28) and pituitary hyporesponsiveness (27) occur in patients suffering complicated malaria, suggesting that hypothalamic-pituitary thyroid axis dysregulation is involved in an emergency response to the stress situation generated by the infection. We show here that mice with CM also develop NTIS with a strong reduction of circulating TH, although the attained levels are not as low as those existing in the hypothyroid mice. According to

our results, it is likely that the thyroidal dysfunction observed in the experimental murine model and in malaria patients could represent a defense mechanism trying to diminish the severity of the disease. Since millions of people live in areas of endemic iodine deficiency, which can be partially superimposed with endemic malaria, it is conceivable that the consequent hypothyroidism could confer some protection against the cerebral form of the disease. This would be reminiscent of the survival advantage that sickle human hemoglobin confers to individuals living in endemic areas of malaria (13), although in this case a genetic defect rather than a micronutrient deficiency would be responsible. Mice expressing sickle hemoglobin also survive to CM by a disease tolerance mechanism (14).

Depending on the type of pathogen, the host requires a specific metabolic state to achieve optimal disease tolerance. In a seminal study, Wang *et al.* (50) described opposite effects of fasting and glucose metabolism on tolerance to bacterial and viral infection in mice. Thus, glucose supplementation is detrimental in bacterial sepsis but protects against mortality in the case of viral infection. These effects are independent of the pathogen load. This is also applicable to malaria, as administration of 2-deoxyglucose increases survival against PbA (20), while the same compound results in strongly increased lethality in mice infected with *Plasmodium chabaudi* AJ, which causes non-CM from which most animals recover (51). As a previously unknown driver in developing CM, we show here the importance of TH in tolerance to PbA infection. However, accordingly, with the specific mechanisms required to attain disease tolerance to a specific pathogen, our data also show that hypothyroidism does not protect against non-CM in the experimental model of lethal infection with the *P. yoelii* YM parasite.

Hypothyroid mice displayed noticeable spleen hypoplasia before infection. However, upon malaria infection, these animals displayed marked splenomegaly with a massive increase in the number of different splenic cell populations of the three major hematopoietic lineages. At the late stage of ECM, euthyroid and hypothyroid mice reached a similar number and activation state of different splenic hematopoietic cells and showed a similar infiltration of immune cells into the brain, including CD8⁺ T lymphocytes, which are critical in the pathogenesis of CM (36, 52, 53). Concomitantly, both types of infected mice presented BBB disruption and similar expression of PbA and cytokines in the brain at the late ECM stage. These results in hypothyroid mice are similar to those found in mice treated with 2-deoxyglucose, which survive to PbA infection despite showing BBB breakdown, nonaltered brain cytokine transcripts, and similar number and activation of the immune cells infiltrating the brain (20). Together, these results reinforce the idea that the protective effect of hypothyroidism against CM specifically relays in a disease tolerance mechanism that reduces brain damage. The finding that intracerebral administration of T3 to hypothyroid mice accelerates ECM development and increases mortality suggests a direct effect of the hormone on the brain parenchymal tissue.

The cause of death in CM has been attributed to brain compression and reduction of the blood flow (39). Brain swelling causes uncontrollable pressure that ultimately kills brainstem neurons responsible for heart and lung function, which is consistent with cerebral herniation as a cause of death (52). Hypothyroidism prevents the appearance of neurological symptoms, reducing the impact on brain damage, with no evident increase in ICP, brain volume, cerebellar crushing, or brainstem herniation and with no collapse of the major cerebral vessels upon PbA infection. Besides, the number of

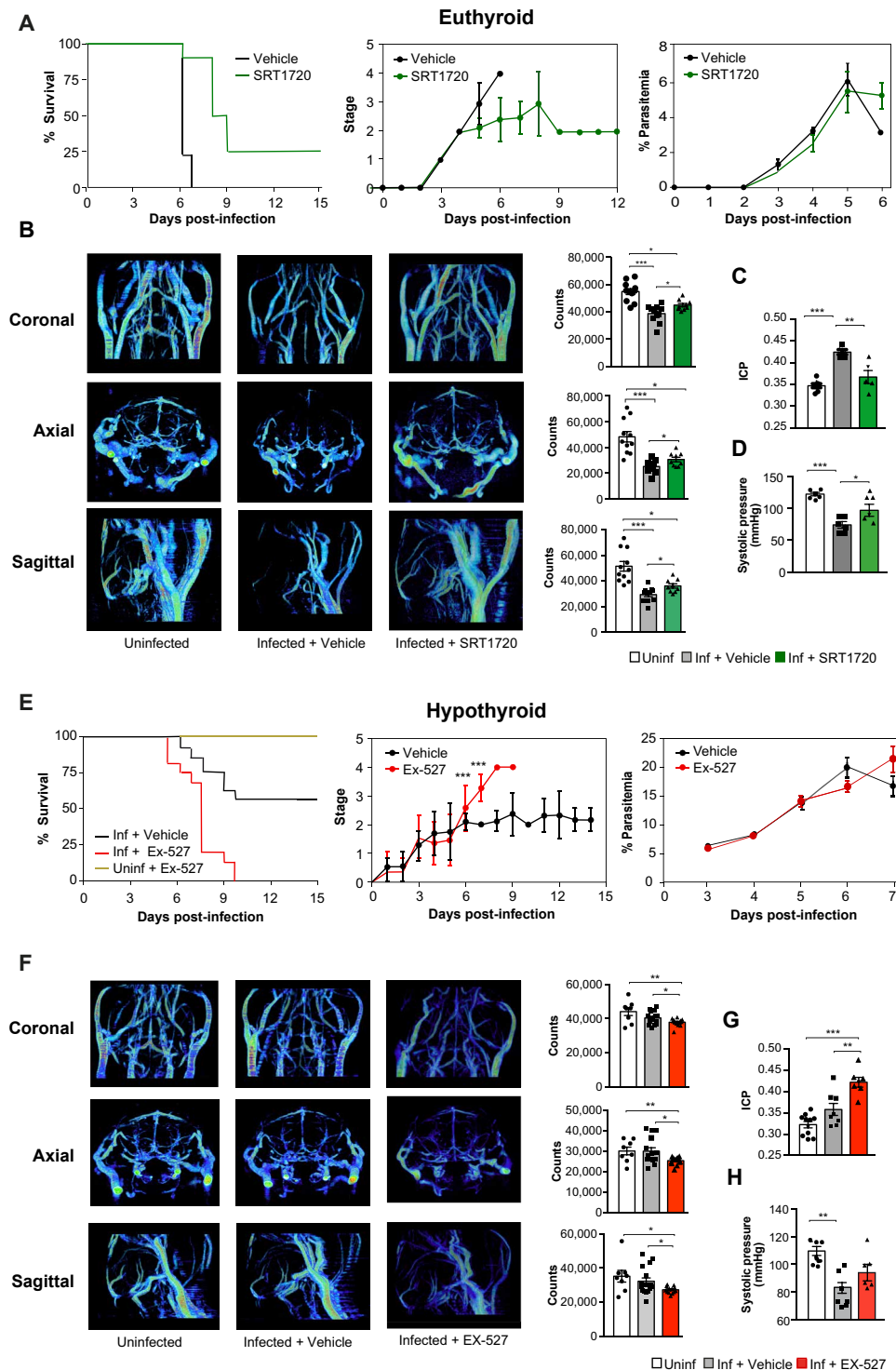


Fig. 7. Sirt1 activity regulates ECM outcome. (A) Kaplan-Meier plot, clinical stage, and parasitemia (unpaired *t* test) in euthyroid-infected mice treated daily with vehicle or with the Sirt1 activator SRT1720 from day 0 (*n* = 8). (B) Representative coronal, axial, and sagittal angiograms and quantifications in euthyroid uninfected (Uninf) mice and in infected (Inf) mice at day 6 after infection after the same treatments (*n* = 9 to 11). (C) ICP values in the same groups at day 6 after infection (*n* = 5 to 8). (D) Systolic blood pressure in the same animals. One-way ANOVA followed by multiple comparisons Tukey test. (E) Kaplan-Meier plot, clinical stage, and parasitemia in hypothyroid mice treated daily starting at day 0 of infection with vehicle or with the Sirt1 inhibitor EX-527 (*n* = 17 to 13). (F) Representative angiograms and quantifications in uninfected hypothyroid mice and in infected mice at day 6 after infection after the same treatments (*n* = 8 to 13). (G) ICP values in the same experimental groups at day 6 after infection (*n* = 7 to 11). (H) Systolic blood pressure in the same groups (*n* = 5 to 6). (B, C, F, and G) One-way ANOVA followed by multiple comparisons Tukey test. In all panels, error bars represent mean ± SEM. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.001.

hemorrhagic foci, other hallmark of brain damage in CM, is also significantly reduced in the infected hypothyroid mice. The sympathoadrenal system interacts with the TH at various levels (54), but hypothyroidism maintains the defense against ECM in adrenalectomized mice, suggesting that the protective role of hypothyroidism is independent of that system. Furthermore, hypothyroidism can be associated with arterial stiffness and secondary hypertension in humans (55), which in turn could reduce cerebral perfusion. However, uninfected hypothyroid mice showed decreased blood pressure, suggesting that changes in ICP, independent of peripheral blood pressure, underlie the effect of hypothyroidism in ECM. Furthermore, edema, herniation, and impaired CBF occur in infected euthyroid mice with increased ICP, but not in hypothyroid mice in which ICP does not increase upon infection, strongly suggesting that the improved survival of hypothyroid mice is a result of reduced ICP.

One of the most recognized actions of the TH is the regulation of metabolism, increasing energy expenditure (21, 56). Behavioral and respirometry studies showed that, before infection and at early stages of PbA infection, hypothyroid mice display a significant reduction of energy expenditure. At later stages, only euthyroid mice, which show neurological symptoms of CM, underwent an abrupt decrease in locomotor activity, O₂ and CO₂ exchange, and energy expenditure. These changes were much less apparent in hypothyroid-infected mice. The drop in metabolic respiratory activity occurred in sick euthyroid mice without presenting a clear hypoglycemia or significant anemia, which suggests that a central respiratory failure could be the mechanism responsible and supports the idea that the metabolic state achieved under hypothyroid conditions, with lower locomotor and respiratory activity, allows the mice to display improved tolerance/resilience to the stress caused by PbA infection.

Hypothyroidism might induce tolerance to CM by altering brain metabolism, and accordingly, metabolic adaptation to infection differs between euthyroid and hypothyroid animals. Hypothyroid brains show an improved adaptive response with reduced tissue injury and protection against the deleterious effects of glutamine (19). In addition, they show a shift toward a glycolytic anaerobic metabolism and to the use of creatine pathway to obtain adenosine triphosphate (ATP), while euthyroid mice respond to infection with enhanced ketone body-based metabolism. This metabolic signature shows that hypothyroidism induces a distinct metabolic status in the brains that are resistant to the damage induced by the parasite. However, it cannot be directly concluded from these results that these metabolic changes are responsible for resilience to ECM. Respirometric studies also suggest that infected euthyroid mice skew their whole-body metabolism to rely upon stored endogenous fat energy. After infection, the RER value fell to 0.8 in the euthyroid mice. A value of 1 or above indicates carbohydrate consumption, while 0.7 signifies that fat is the main fuel source.

The actions of the TH involve the regulation of key enzymes in both the brain and peripheral tissues (22–24). One of these pathways involves mTORC1, which mediates protection against CM by caloric restriction via a reduction of leptin production (15). Although circulating leptin levels were reduced in hypothyroid mice, leptin administration did not increase lethality in these animals, discarding this pathway as a main mediator of tolerance to CM in hypothyroidism. Sirt1 has been connected to the beneficial effects elicited by calorie restriction or fasting, increasing energy expenditure (9, 10, 57). There is a significant overlap between the actions of the TH and Sirt1 in the regulation of metabolic processes such as gluconeogenesis, fatty

acid oxidation, or mitochondrial function (25, 58). Our results suggest that Sirt1 activity is involved in the modulation of tolerance to CM. Treatment of hypothyroid mice with a Sirt1 inhibitor increases ICP, brain vessel compression, and lethality, while maintenance of Sirt1 activity during the course of the infection in normal animals diminishes ICP and improves CBF and survival, without significant variation in the parasitemia levels. Thus, Sirt1 activator, as well as hypothyroidism, appears to protect against ECM lethality by preventing increased ICP. However, our results do not provide the ultimate mechanism/s by which hypothyroidism preserves Sirt1 activity during infection and which are the specific cells involved. Therefore, the functional relationship between THs, Sirt1, and ECM requires further investigation.

In conclusion, our results indicate that anti-thyroidal drugs could improve the outcome of CM but hypothyroidism is harmful to health, especially in children, as THs are essential for brain development (59). However, the identification of Sirt1 as a mediator of the action of the TH in the outcome of CM suggests a beneficial function of Sirt1 activators for the treatment of the disease. Although hypothyroidism or Sirt1 activation rescued mice from CM, they ultimately died during the long period of anemia, probably caused by accelerated clearance of uninfected erythrocytes associated to the inability to compensate for red blood cell loss (60). Therefore, the use of Sirt1 activators, in combination with the drugs used to inhibit parasite replication, might be useful for the treatment of human CM, which still represents a major clinical problem in endemic countries. Most children under 5 years old presenting CM die while traveling to the nearest health care centers or within the first 24 hours of admission (61). Thus, we can speculate that early adjuvant therapy based on Sirt1 activators to prevent tissue and brain damage could help to reduce the high intrinsic mortality due to the disease.

MATERIALS AND METHODS

Mice

C57BL/6 mice from Charles River Laboratories, maintained in the animal house of the Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols,” were used in this study. All animal experiments were done following the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) guidelines in agreement with the European Community Law (86/609/EEC) and the Spanish law (R.D. 1201/2005), with approval of the Ethics Committee of the Consejo Superior de Investigaciones Científicas and Comunidad de Madrid.

Generation of hypothyroid, euthyroid, and hyperthyroid mice

To induce hypothyroidism, 4- to 5-week-old male mice were fed with an iodine-deficient diet containing 0.15% of the antithyroidal drug propylthiouracil (E15551-04, Sniff) and with KClO₄ (10 g/liter) (460494, Merck) in the drinking water for 4 weeks before the experiment. Control euthyroid animals were fed with a control diet (E15552-24, Sniff), the same diet without propylthiouracil but supplemented with potassium iodide to contain 1.15 mg/kg. Mice fed with the control diet were made hyperthyroid by adding T4 (25 ng/g of mice; IRMM468, Sigma-Aldrich) and T3 (95 ng/g of mice; T-2877, Sigma-Aldrich) in the drinking water, from 14 days before infection until the end of the experiment. Drinking water was changed every day. Unless otherwise indicated, mice were maintained with the chosen diet until the end of the experiment.

Design of the ECM model

Only 8- to 9-week-old male mice were infected with *P. berghei* strain ANKA (PbA, MRA-311, BEI Resources) or with *P. yoelii* YM (MRA755, BEI Resources), by an intraperitoneal injection of 1×10^6 infected red blood cells obtained from previously infected donor mice. Mice received food ad libitum, and drinking water was supplemented with para-amino benzoic acid at 0.05% to ensure in vivo parasite growth. Parasitemia was monitored from blood smears fixed with methanol, stained with Wright's solution (1013830500, Merck) under $\times 100$ magnification, and calculated using Fiji program. Mice were monitored daily for clinical stage of ECM. Stages were defined by the presentation of no symptoms (0), piloerection (1), medium piloerection and mild ataxia (2), ataxia and paralysis (3), and convulsions and coma (4) (62). Videos of the different mice were performed with video edition software Canva. When mice showed severe ECM (stage 4), they were sacrificed by CO₂ asphyxiation according to ethical guidelines, and the day of death was considered to be the following day.

Mice treatments

Euthyroid mice were injected intraperitoneally daily starting the day of the infection with the Sirt1 activator SRT1720 (HY-15145, MedChemExpress) (48) at a dose of 20 mg/kg in 100 μ l. SRT1720 was dissolved in 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) (D2438, Sigma-Aldrich) and 20% 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (H5784, Merck) in phosphate-buffered saline (PBS). Hypothyroid mice were treated daily, starting at the day of the infection with the Sirt1 inhibitor EX-527 (E7034, Sigma-Aldrich) (49), at a dose of 10 mg/kg in 50 μ l. EX-527 was dissolved in 4% DMSO and 10% 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin in PBS. In parallel, other sets of mice were treated with the corresponding vehicle without the drug. Twenty micrograms per mice of recombinant mouse leptin (498-OB, R&D Systems) dissolved in PBS was administered twice a day by intraperitoneal injection, starting the day of the infection. Five hundred microliters of mannitol (25% in 0.9% saline; Sigma-Aldrich) or vehicle (control) was daily injected in mice starting at day 0 of infection. For ICV treatment, cannulae were stereotaxically implanted into hypothyroid mice as previously described (24, 46) using the following coordinates: 1.2 mm lateral to bregma, 0.6 mm posterior, 2 mm deep. Four days after implantation, animals were inoculated with PbA and T3 (16 ng in 4 μ l of saline; Sigma-Aldrich) or vehicle was administered ICV daily for 6 days until the cannulae collapsed. ICV administration was performed 1 hour before turning the lights off. Adrenal glands were surgically removed from euthyroid and hypothyroid mice, and the corresponding control animals were sham-operated. The drinking water of the adrenalectomized animals was supplemented with 0.9% NaCl. Mice were allowed to recover from the surgery for 14 days before PbA inoculation.

Hemograms

Mice were sacrificed using CO₂ overdose exposure, according to ethics guidelines. Blood samples were collected in EDTA tubes (1591126, EVEREST) by heart puncture. Hemograms from EDTA blood samples (400 μ l) were determined at SEROLAB S.L (Madrid). Peripheral blood hemoglobin was determined by lysis of 10 μ l of whole blood in 1 ml of water followed by optical density reading at 540 nm in the BioTek EL340 Microplate Reader and subsequently converted to the corresponding concentration.

Determination of circulating cytokines

Serum plasma was obtained by centrifugation of blood samples for 5 min at 2000 rpm. Circulating cytokines were determined using the Cytokine Response Panel Kit (740622, BioLegend) according to the manufacturer's instructions, and samples were subsequently subjected to flow cytometry analysis on CytoFLEX S (Beckman and Coulter). The concentration of the different cytokines was calculated using the software LEGENDplex V8.0 supplied by BioLegend.

Quantification of glucose and leptin

Glucose measurement was carried out in blood drops from tails using an Accu-Check Aviva detector (6453970037, Roche). Leptin levels were measured in serum samples, obtained by centrifugation of blood samples for 5 min at 2000 rpm, by using the Mouse Leptin ELISA Kit (90030, Cristalchem), following the manufacturer's instructions.

Quantification of total circulating T3 and T4

High-specific activity ¹²⁵I-T3 and ¹²⁵I-T4 (3000 μ Ci/ μ g) were obtained using radioactive iodine (NEZ033A, Perkin Elmer) and (3-5)-T2 (D0629, Sigma-Aldrich) and T3 (T2877, Sigma-Aldrich) as substrates, respectively, as previously described (63). The separation of the labeled products was modified using ascending paper chromatography for 16 hours in the presence of butanol:ethanol:ammonia 0.5 N (5:1:2) as solvent. ¹²⁵I-T3 and ¹²⁵I-T4 were eluted and kept in ethanol at 4°C. TH concentration was analyzed by radioimmunoassays (RIAs) after extraction and purification of plasma samples. Briefly, tracer amounts of ¹²⁵I-T3 or ¹²⁵I-T4 were added to individual 80- μ l aliquots of plasma and total T3 and T4 were extracted with methanol (1:6), evaporated to dryness, and dissolved in RIA buffer for determinations. The dynamic range was 0.4 to 100 pg of T3 per tube and 2.5 to 320 pg of T4 per tube. Samples were processed in duplicate, and the final results were calculated on the basis of the amount of hormone detected in the assay, the recovery of the tracers added, and the volume of the extracted plasma sample. High-specific activity ¹²⁵I-T4 and ¹²⁵I-T3 as well as anti-T3 and anti-T4 antisera (originally generated by M. J. Obregon) were provided by A. Guadaño-Ferraz, IIBM.

Identification of splenic hematopoietic cells by flow cytometry (FACS)

Splenocytes were collected and purified using a gentleMACS dissociator and Mouse Spleen Dissociation kit (130-095-926, Miltenyi), according to the manufacturer's instruction. Cell suspensions were filtered through a 70- μ m cell strainer and pelleted by centrifugation at 300g for 5 min. To lyse erythrocytes, pelleted cells were resuspended in 1 ml of VersaLyse lysing solution (A09777, Beckman Coulter); 2 min later, 3 ml of fluorescence-activated cell sorting (FACS) buffer [PBS, 2% fetal bovine serum (FBS), and 5 mM EDTA] was added, and cells were centrifuged and washed. The different cell samples (0.5×10^6 to 2×10^6 cells) were stained for the indicated surface markers required (see table S1) for 20 min at room temperature and subsequently washed twice with FACS buffer. For intracellular staining, cells were fixed, permeabilized with the use of a fixation/permeabilization kit (00-5523-00, Thermo Fisher Scientific), and incubated with the corresponding antibody. When possible, live and dead cells were distinguished by adding SYTOX Green (S7020, Life Technologies) or 4',6-diamidino-2-phenylindole

(D9542, Sigma-Aldrich) 5 min before flow cytometry analysis. Unstained cells were used as a negative control to establish the flow cytometer voltage settings, and single-color positive controls were used to adjust compensation. To identify the different splenic cells, without treatment with lysis solution, cells were subjected to flow cytometry analysis as described (32, 64). The absolute number of cells was calculated by adding Perfect-Count Microspheres (CYTPCM-100, Cytognos) to the flow cytometry samples. The flow cytometry data were acquired using FACSCanto II (Becton and Dickinson) or CytoFLEX S (Beckman and Coulter) and analyzed with FlowJo or CytoExpert software.

Identification of infiltrated hematopoietic cells in brain by flow cytometry

To identify brain-infiltrated leukocytes by flow cytometry, brain samples were carefully extracted just after animal sacrifice, minced, and processed in the gentleMACS dissociator using the Adult Brain Dissociation Kit (130-107-677, Miltenyi). Samples were subsequently filtered through a 70- μ m cell strainer, and cells were centrifuged in a 36% Percoll gradient (P1644, Sigma-Aldrich)/Dulbecco's modified Eagle's medium–Hepes (DF-041, Sigma-Aldrich), enriched with 10% FBS (10270-106, Gibco) and 0.4% Hanks' balanced salt solution (14185-045, Gibco) for 30 min at 800g at room temperature. Erythrocytes were lysed in 400 μ l of VersaLyse lysing solution (A09777, Beckman Coulter), as described above, and cells were stained for the indicated surface markers (see table S1). Cell number determination and FACS analysis were performed as described above.

Systolic blood pressure

Blood pressure was measured by tail-cuff plethysmography. For this, animals were trained for 1 week before initial blood pressure measurements and 1 day before PbA infection. Then, blood pressure was measured at day 6 after infection in the BP-2000 Blood Pressure Analysis System (Visitech Systems, USA). Measurements were done always at the same time of the day from 8 a.m. to 10 a.m. At least 10 individual observations were performed and averaged for each animal.

Brain-blood barrier permeability

Mice were injected intravenously through the retro-orbital venous sinus with 100 μ l of Evans blue (E2129, Sigma-Aldrich) diluted at 10 mg/ml in PBS, at day 6 after infection. After 1 hour, brains were extracted, weighted, and incubated in formamide (295876, Sigma-Aldrich) at 37°C for 2 days. Absorbance was measured spectrophotometrically in the BioTek 340 Microplate Reader at 620 nm, and data were corrected by brain weight.

Histopathological studies

Brains and spleens were removed without any perfusion. Spleen and one cerebral hemisphere for each animal were fixed in 4% buffered formalin (141328, PanReac AppliChem) during 72 hours. Coronal sections were embedded in paraffin wax (253211, PanReac AppliChem). Serial 5- μ m sections were stained with H&E (75290, PanReac AppliChem; 4530, Merck). The number of hemorrhages was quantified using Fiji ImageJ software (65). Hemorrhages were estimated using a Max-Entropy thresholding method for the eosin intensity values, determined by the "Colour deconvolution" tool and posteriorly visually identified and revised in the original image for each section.

The area of the brain tissue in each section was also quantified using Fiji ImageJ software, using an Otsu thresholding method of the 8-bit image. Data collected from quantification of the sections for each mouse were expressed as the number of microhemorrhages per square millimeter of cerebral tissue.

Western blot analysis

Mouse livers were homogenized in ice with cold lysis buffer [50 mM Hepes (3375 Sigma-Aldrich), 1% Triton X-100 (T8787, Sigma-Aldrich), 50 mM sodium pyrophosphate tetrabasic (P8010, Sigma-Aldrich), 0.1 mM sodium fluoride (S7920, Sigma-Aldrich), 10 mM EDTA (E9884, Sigma-Aldrich), 10 mM sodium orthovanadate (S6508, Sigma-Aldrich), and 1:100 protease inhibitor mix (GE80-6501-23, GE Healthcare, pH 7.5)]. Samples were centrifuged at 14,000 rpm for 30 min at 4°C, the supernatant was collected, and protein concentration was measured using the Pierce BCA Protein Assay Kit (23227, Thermo Fisher Scientific). Protein samples (30 to 50 μ g) were diluted with lysis buffer (20 μ l per sample). After the addition of 2 \times Laemmli buffer (S3401, Sigma-Aldrich), samples were boiled for 5 min and loaded onto 4 to 15% SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (4561086, Bio-Rad) gel gradient, together with protein molecular weight standard (B4MWP03, CultiK). Gels were transferred to polyvinylidene difluoride membranes (IPVH00010, Merck Millipore), subsequently incubated with the corresponding primary antibodies, and developed with an anti-rabbit peroxidase-labeled antibody or with anti-mouse peroxidase-labeled antibody (see table S1). Blots were imaged using medical x-ray films blue (Agfa) in a medical film processor (model SRX-101A, Konica) and analyzed by quantitative densitometry using ImageJ software. Protein levels were normalized with respect to β -tubulin, used as a loading control.

Quantitative real-time PCR assays

Tissue from liver, brain, and spleen was frozen immediately after dissection and homogenized in RNase-Free Disposable Pellet Pestles (16339635, Fisher Scientific). RNA was extracted with TRI Reagent Solution (AM9738, Invitrogen) and quantified in NanoDrop ND-100 (Thermo Fisher Scientific). One microgram of RNA was treated with RNase-Free DNase (79254, Qiagen), and cDNA synthesis was performed with the iScript cDNA Synthesis Kit (170-8891, Bio-Rad) with oligo-dT and Random hexamer primers in a reaction protocol of 5 min at 25°C, 30 min at 42°C, and 5 min at 85°C. Quantitative polymerase chain reaction (PCR) was performed with Fast SYBR Green Master Mix (4385612, Applied Biosystems) on a Stratagene Mx3005P Real-Time PCR machine with the primers shown in table S2. The thermal cycling conditions used were activation of the polymerase at 95°C for 20 s, 40 cycles of denaturation at 95°C for 3 s, and annealing and extend step at 60°C for 30 s. Data analysis was done using the comparative cycle threshold (C_T) method, and transcripts were normalized to the internal control hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT).

Analysis of mice behavioral and respirometric parameters

Respiratory and metabolic analysis was performed at the animal facility of the IIBM (Madrid, Spain). Metabolic parameters were measured using a 16-chamber TSE Phenomaster monitoring system (TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Germany). Animals were placed into the Phenomaster room 72 hours before the onset of the experiment to ensure a correct adaptation. Then, mice were housed

individually in cages and, 48 hours later, inoculated with PbA. Data on food and water consumption, energy expenditure, periphery and central movements, VO_2 , and VCO_2 were captured every hour during 8 days and stored using the TSE Phenomaster software. Respiratory exchange rate (RER) corresponds to coefficient VCO_2/VO_2 , and energy expenditure was calculated as $(3.185 + 1.232 \times \text{RER}) \times \text{VO}_2$. Day was considered between 8 a.m. and 8 p.m. when lights are on.

Magnetic resonance imaging

MRI experiments were performed at the High Field Magnetic Resonance Imaging Service (IIBM, Madrid, Spain; www.iib.uam.es/portal/web/siermac). MRI acquisitions were performed on a Bruker BioSpec MRI system (Bruker Medical GmbH, Ettlingen, Germany) using a 7.0-T horizontal-bore superconducting magnet, equipped with a ^1H selective birdcage resonator of 23 mm and a Bruker gradient insert with 90 mm of diameter (maximum intensity, 36 G/cm). The animals were first placed in an anesthesia induction chamber with 3% IsoFlo (Ecuphar) and pure oxygen as carrier gas at a flow rate of 0.8 liter min^{-1} for 4 min. Subsequently, anesthetized animals were placed on the bed of the MRI system. All data were acquired using a Hewlett-Packard console running ParaVision 7 software (Bruker Medical GmbH) operating on a Linux platform. The mice, placed into the center of the volume radio frequency coil and positioned in the magnet, were under continuous inhalation of anesthesia via a nose cone with a mask connected to the anesthetic gas maintained between 1.5 and 2% IsoFlo with the help of the spectrometer to maintain the respiratory cycle between 60 and 80 beats per minute. The temperature of the animal was maintained with a recirculating water bed at 37°C, and its physiological status was monitored using the BioTrig physiological monitoring system (SA Instruments, Stony Brook, NY), which displays the respiratory cycle and body temperature. T1-weighted (T1W) spin-echo anatomical images were acquired with a multislice multiecho sequence and the following parameters: repetition time (TR) = 350 ms; echo time (TE) = 10 ms; averages (Av) = 3; field of view (FOV) = 2.3 cm; acquisition matrix = 256 × 256 corresponding to an in-plane resolution of 89 × 89 μm^2 ; slice thickness = 1.00 mm; and number of slices = 14 axial, 10 sagittal, and 6 coronal. T2W spin-echo anatomical images were acquired with a rapid acquisition with relaxation enhancement (RARE) sequence and the following parameters: TR = 2500 ms; TE = 26 ms; RARE factor = 8; Av = 4; FOV = 2.3 cm; acquisition matrix = 256 × 256 corresponding to an in-plane resolution of 89 × 89 μm^2 ; slice thickness = 1.00 mm; and number of slices = 14 axial, 10 sagittal, and 6 coronal. Angiograms were acquired with two-dimensional (2D) gradient echo time-of-flight sequence MR angiography without contrast agent and displayed in maximum intensity projection with the following parameters: TR = 15 ms, TE = 2.6 ms, TR = 15 ms, FA (flip angle) = 80°, 160 slices of 0.3 mm without gap, matrix = 256 × 256, and FOV = 38 × 38 mm. Angiography images were obtained from a 3D construction made with ImageJ with the effect “Thermal Lut.” Data were quantified using the same brightness threshold parameters for all animals. Angiography videos were performed with Fiji program, treated all with the same brightness/contrast parameters. BBB permeability was assessed by contrast-enhanced T1W imaging and axial images, which were taken 15 min after intraperitoneal injection of gadolinium–diethylenetriamine pentaacetic acid (0.3 mmol/kg, Magnevist, Bayer Health Care Pharmaceuticals). 2D-axial T1W precontrast and postcontrast images were used to calculate gadolinium

enhancement maps. The index was calculated as the difference between the postcontrast and precontrast image signal divided by the precontrast image signal in a pixel-by-pixel way, and the mean value of different brain structures was computed. Brain volume was calculated as the summation of the volumes of all the T1 axial and midsagittal slices with ImageJ. Two researchers measured independently the brain surface and distances from mid-sagittal images with ImageJ and RadiAnt DICOM Viewer software. Brain surface was calculated using the length between the olfactory bulb and the posterior end of the cerebellum and from the brain height stemming from the pituitary gland.

Intracranial pressure

ICP was determined measuring the optic nerve sheath diameter in T2-weighted coronal MRI images (40), with slice thickness of 1.00 mm, in both eyes, and the mean value was calculated.

Brain ^1H -NMR spectrophotometry metabolomic analysis

Brain samples, lyophilized and pulverized (50 mg of dry brain), were shipped on dry ice to Biosfer Teslab (Reus, Spain; <https://biosferleslab.com>) for the analysis by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. Tissue samples were homogenized by ultrasonication during 10 min. Aqueous extracts were obtained from the brain tissue using the 1-butanol:methanol method (66) with slight modifications. BUME was optimized for batch extractions with di-isopropyl ether replacing heptane as the organic solvent, and the aqueous phase was subjected to three subsequently lipid extraction cycles. Aqueous extracts were recovered and completely dried in SpeedVac until evaporation of organic solvents and frozen at -80°C until ^1H -NMR analysis. Aqueous extracts were reconstituted in deuterated PBS containing 2.32 mM trimethylsilyl propionate and transferred to 5-mm NMR glass tubes. ^1H -NMR spectra were measured at 600.20 MHz using an Avance III-600 Bruker spectrometer. 1D ^1H pulse experiments were carried out using the nuclear Overhauser effect spectroscopy presaturation sequence to suppress the residual water peak at around 4.7 parts per million for aqueous extracts. For the analysis of the metabolites, the NMR area associated with the concentration of each metabolite was obtained after the spectral analysis by using an in-house line-shape fitting based on algorithm developed to deconvolute the preprocessed NMR spectra by using Lorentzian and Gaussian functions to minimize the fitting error (43). The NMR areas were transformed into concentration units by using specific conversion factors depending on the proton numbers of the molecular structure generating the signal and a trimethylsilylpropanoic acid internal standard as previously described (42). Each metabolite was identified by checking for all its resonances along the spectra and then quantified using line-shape fitting methods on one of its signals.

Statistical analysis

Two-tailed Student's *t* tests were used for comparisons between two groups. One-way analysis of variance (ANOVA) with post hoc Tukey test was used to compare all pairs of columns from at least three different groups, and survival curves were analyzed with Kaplan-Meier test. The results are always expressed as means ± SEM. $P < 0.05$ was considered statistically significant. The significance of ANOVA posttest or the Student's *t* test in the experimental groups indicated in the figures is shown as * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$. Statistics was performed with GraphPad Prism 7.0 software.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary material for this article is available at <https://science.org/doi/10.1126/sciadv.abj7110>

[View/request a protocol for this paper from Bio-protocol.](#)

REFERENCES AND NOTES

- I. N. Nkumama, W. P. O'Meara, F. H. A. Osier, Changes in malaria epidemiology in Africa and new challenges for elimination. *Trends Parasitol.* **33**, 128–140 (2017).
- S. C. Wassmer, G. E. Grau, Severe malaria: What's new on the pathogenesis front? *Int. J. Parasitol.* **47**, 145–152 (2017).
- A. G. Craig, G. E. Grau, C. Janse, J. W. Kazura, D. Milner, J. W. Barnwell, G. Turner, J. Langhorne; on behalf of the participants of the Hinxtion Retreat meeting on "Animal Models for Research on Severe Malaria", The role of animal models for research on severe malaria. *PLoS Pathog.* **8**, e1002401 (2012).
- J. S. Ayres, D. S. Schneider, Tolerance of infections. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 271–294 (2012).
- M. P. Soares, L. Teixeira, L. F. Moita, Disease tolerance and immunity in host protection against infection. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 83–96 (2017).
- S. Weis, A. R. Carlos, M. R. Moita, S. Singh, B. Blankenhaus, S. Cardoso, R. Larsen, S. Rebelo, S. Schäuble, L. D. Barrio, G. Mithieux, F. Rajas, S. Lindig, M. Bauer, M. P. Soares, Metabolic adaptation establishes disease tolerance to sepsis. *Cell* **169**, 1263–1275.e14 (2017).
- A. S. Banks, N. Kon, C. Knight, M. Matsumoto, R. Gutiérrez-Juárez, L. Rossetti, W. Gu, D. Accilli, SirT1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. *Cell Metab.* **8**, 333–341 (2008).
- C. Canto, K. J. Menzies, J. Auwerx, NAD(+) metabolism and the control of energy homeostasis: A balancing act between mitochondria and the nucleus. *Cell Metab.* **22**, 31–53 (2015).
- L. Bordone, L. Guarente, Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: Understanding longevity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 298–305 (2005).
- R. H. Houtkooper, E. Pirinen, J. Auwerx, Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 225–238 (2012).
- D. G. Hardie, F. A. Ross, S. A. Hawley, AMPK: A nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 251–262 (2012).
- R. A. Saxton, D. M. Sabatini, mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell* **169**, 361–371 (2017).
- T. N. Williams, T. W. Mwangi, S. Wambua, T. E. A. Peto, D. J. Weatherall, S. Gupta, M. Recker, B. S. Penman, S. Uyoga, A. Macharia, J. K. Mwacharo, R. W. Snow, K. Marsh, Negative epistasis between the malaria-protective effects of alpha+-thalassaemia and the sickle cell trait. *Nat. Genet.* **37**, 1253–1257 (2005).
- A. Ferreira, I. Marguti, I. Bechmann, V. Jeney, Á. Chora, N. R. Palha, S. Rebelo, A. Henri, Y. Beuzard, M. P. Soares, Sickle hemoglobin confers tolerance to Plasmodium infection. *Cell* **145**, 398–409 (2011).
- P. Mejia, J. H. Treviño-Villarreal, C. Hine, E. Harputlugil, S. Lang, E. Calay, R. Rogers, D. Wirth, M. T. Duraisingh, J. R. Mitchell, Dietary restriction protects against experimental cerebral malaria via leptin modulation and T-cell mTORC1 suppression. *Nat. Commun.* **6**, 6050 (2015).
- O. C. Oliveira-Lima, N. L. Almeida, C. M. Almeida-Leite, J. Carvalho-Tavares, Mice chronically fed a high-fat diet are resistant to malaria induced by Plasmodium berghei ANKA. *Parasitol. Res.* **118**, 2969–2977 (2019).
- V. Zuzarte-Luis, J. Mello-Vieira, I. M. Marreiros, P. Liehl, A. F. Chora, C. K. Carret, T. Carvalho, M. M. Mota, Dietary alterations modulate susceptibility to Plasmodium infection. *Nat. Microbiol.* **2**, 1600–1607 (2017).
- L. Vandermosten, T. T. Pham, S. Knoop, C. de Geest, N. Lays, K. van der Molen, C. J. Kenyon, M. Verma, K. E. Chapman, F. Schuit, K. de Bosscher, G. Opdenakker, P. E. van den Steen, Adrenal hormones mediate disease tolerance in malaria. *Nat. Commun.* **9**, 4525 (2018).
- E. B. Gordon, G. T. Hart, T. M. Tran, M. Waisberg, M. Akkaya, A. S. Kim, S. E. Hamilton, M. Pena, T. Yazew, C. F. Qi, C. F. Lee, Y. C. Lo, L. H. Miller, J. D. Powell, S. K. Pierce, Targeting glutamine metabolism rescues mice from late-stage cerebral malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, 13075–13080 (2015).
- A. Wang, S. C. Huen, H. H. Luan, K. Baker, H. Rinder, C. J. Booth, R. Medzhitov, Glucose metabolism mediates disease tolerance in cerebral malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **115**, 11042–11047 (2018).
- R. Mullur, Y. Y. Liu, G. A. Brent, Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiol. Rev.* **94**, 355–382 (2014).
- B. Cannon, J. Nedergaard, Thyroid hormones: Igniting brown fat via the brain. *Nat. Med.* **16**, 965–967 (2010).
- N. Martínez-Sánchez, P. Seoane-Collazo, C. Contreras, L. Varela, J. Villarroya, E. Rial-Pensado, X. Buqué, I. Aurrekoetxea, T. C. Delgado, R. Vázquez-Martínez, I. González-García, J. Roa, A. J. Whittle, B. Gomez-Santos, V. Velagapudi, Y. C. L. Tung, D. A. Morgan, P. J. Voshol, P. B. Martínez de Morentin, T. López-González, L. Liñares-Pose, F. Gonzalez, K. Chatterjee, T. Sobrino, G. Medina-Gómez, R. J. Davis, N. Casals, M. Orešič, A. P. Coll, A. Vidal-Puig, J. Mittag, M. Tena-Sempere, M. M. Malagón, C. Diéguez, M. L. Martínez-Chantar, P. Aspichueta, K. Rahmouni, R. Nogueiras, G. Sabio, F. Villarroya, M. López, Hypothalamic AMPK-ER stress-JNK1 axis mediates the central actions of thyroid hormones on energy balance. *Cell Metab.* **26**, 212–229.e12 (2017).
- L. Varela, N. Martínez-Sánchez, R. Gallego, M. J. Vázquez, J. Roa, M. Gándara, E. Schoenmakers, R. Nogueiras, K. Chatterjee, M. Tena-Sempere, C. Diéguez, M. López, Hypothalamic mTOR pathway mediates thyroid hormone-induced hyperphagia in hyperthyroidism. *J. Pathol.* **227**, 209–222 (2012).
- R. A. Sinha, B. K. Singh, P. M. Yen, Direct effects of thyroid hormones on hepatic lipid metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* **14**, 259–269 (2018).
- E. Fliers, A. Boelen, An update on non-thyroidal illness syndrome. *J. Endocrinol. Invest.* **44**, 1597–1607 (2021).
- T. M. Davis, W. Supanaranond, S. Pukrittayakamee, S. Krishna, G. R. Hart, J. M. Burrin, S. Looreesuwan, N. Vilaiwana, N. J. White, The pituitary-thyroid axis in severe falciparum malaria: Evidence for depressed thyrotroph and thyroid gland function. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84**, 330–335 (1990).
- L. Wartofsky, D. Martin, J. M. Earll, Alterations in thyroid iodine release and the peripheral metabolism of thyroxine during acute falciparum malaria in man. *J. Clin. Invest.* **51**, 2215–2232 (1972).
- J. L. Gorstein, J. Bagriansky, E. N. Pearce, R. Kupka, M. B. Zimmermann, Estimating the health and economic benefits of universal salt iodization programs to correct iodine deficiency disorders. *Thyroid* **30**, 1802–1809 (2020).
- M. J. Berry, A. L. Kates, P. R. Larsen, Thyroid hormone regulates type I deiodinase messenger RNA in rat liver. *Mol. Endocrinol.* **4**, 743–748 (1990).
- H. A. Del Portillo, M. Ferrer, T. Brugat, L. Martin-Jaular, J. Langhorne, M. V. G. Lacerda, The role of the spleen in Malaria. *Cell. Microbiol.* **14**, 343–355 (2012).
- A. Sanchez, M. C. Orizaola, D. Rodríguez-Muñoz, A. Aranda, A. Castrillo, S. Alemany, Stress erythropoiesis in atherogenic mice. *Sci. Rep.* **10**, 18469 (2020).
- D. Kimura, M. Miyakoda, K. Kimura, K. Honma, H. Hara, H. Yoshida, K. Yui, Interleukin-27-producing CD4(+) T cells regulate protective immunity during Malaria parasite infection. *Immunity* **44**, 672–682 (2016).
- E. Belnoue, M. Kayibanda, J. C. Deschemin, M. Viguier, M. Mack, W. A. Kuziel, L. Rénia, CCR5 deficiency decreases susceptibility to experimental cerebral malaria. *Blood* **101**, 4253–4259 (2003).
- G. S. Campanella, A. M. Tager, J. K. El Khoury, S. Y. Thomas, T. A. Abrazinski, L. A. Manice, R. A. Colvin, A. D. Luster, Chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9 and CXCL10 are required for the development of murine cerebral malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 4814–4819 (2008).
- A. Haque, S. E. Best, K. Unosson, F. H. Amante, F. de Labastida, N. M. Anstey, G. Karupiah, M. J. Smyth, W. R. Heath, C. R. Engwerda, Granzyme B expression by CD8+ T cells is required for the development of experimental cerebral malaria. *J. Immunol.* **186**, 6148–6156 (2011).
- M. F. Penet, A. Viola, S. Confort-Gouny, Y. le Fur, G. Duhamel, F. Kober, D. Ibarrola, M. Izquierdo, N. Coltel, B. Gharib, G. E. Grau, P. J. Cozzone, Imaging experimental cerebral malaria in vivo: Significant role of ischemic brain edema. *J. Neurosci.* **25**, 7352–7358 (2005).
- H. Zhao, T. Aoshi, S. Kawai, Y. Mori, A. Konishi, M. Ozkan, Y. Fujita, Y. Haseda, M. Shimizu, M. Kohyama, K. Kobiyama, K. Eto, J. Nabekura, T. Horii, T. Ishino, M. Yuda, H. Hemmi, T. Kaisho, S. Akira, M. Kinoshita, K. Tohyama, Y. Yoshioka, K. J. Ishii, C. Coban, Olfactory plays a key role in spatiotemporal pathogenesis of cerebral malaria. *Cell Host Microbe* **15**, 551–563 (2014).
- K. B. Seydel, S. D. Kampondeni, C. Valim, M. J. Potchen, D. A. Milner, F. W. Muwalo, G. L. Birbeck, W. G. Bradley, L. L. Fox, S. J. Glover, C. A. Hammond, R. S. Heyderman, C. A. Chilungulo, M. E. Molyneux, T. E. Taylor, Brain swelling and death in children with cerebral malaria. *N. Engl. J. Med.* **372**, 1126–1137 (2015).
- T. Geeraerts, V. F. J. Newcombe, J. P. Coles, M. Abate, I. E. Perkes, P. J. A. Hutchinson, J. G. Outtrim, D. A. Chatfield, D. K. Menon, Use of T2-weighted magnetic resonance imaging of the optic nerve sheath to detect raised intracranial pressure. *Crit. Care* **12**, R114 (2008).
- C. A. Okoromah, B. B. Afolabi, E. C. Wall, Mannitol and other osmotic diuretics as adjuncts for treating cerebral malaria. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2011**, CD004615 (2011).
- S. Ghosh, A. Sengupta, S. Sharma, H. M. Sonawat, Metabolic fingerprints of serum, brain, and liver are distinct for mice with cerebral and noncerebral malaria: A ¹H NMR spectroscopy-based metabolomic study. *J. Proteome Res.* **11**, 4992–5004 (2012).
- A. S. Sheikh, S. A. Sheikh, M. A. Mohamed, Changes in brain metabolites in experimental cerebral malaria infection with Plasmodium berghei ANKA: A literature review. *J. Pak. Med. Assoc.* **64**, 1179–1185 (2014).
- B. K. Singh, R. A. Sinha, P. M. Yen, Novel transcriptional mechanisms for regulating metabolism by thyroid hormone. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
- F. Yeung, J. E. Hoberg, C. S. Ramsey, M. D. Keller, D. R. Jones, R. A. Frye, M. W. Mayo, Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J.* **23**, 2369–2380 (2004).

46. M. Lopez, L. Varela, M. J. Vázquez, S. Rodríguez-Cuenca, C. R. González, V. R. Velagapudi, D. A. Morgan, E. Schoenmakers, K. Agassandian, R. Lage, P. B. M. de Morentin, S. Tovar, R. Nogueiras, D. Carling, C. Lelliott, R. Gallego, M. Oresic, K. Chatterjee, A. K. Saha, K. Rahmouni, C. Diéguez, A. Vidal-Puig, Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nat. Med.* **16**, 1001–1008 (2010).
47. P. Bai, C. Canto, A. Brunyánszki, A. Huber, M. Szántó, Y. Cen, H. Yamamoto, S. M. Houten, B. Kiss, H. Oudart, P. Gergely, J. Menissier-de Murcia, V. Schreiber, A. A. Sauve, J. Auwerx, PARP-2 regulates SIRT1 expression and whole-body energy expenditure. *Cell Metab.* **13**, 450–460 (2011).
48. L. B. Gano, A. J. Donato, H. M. Pasha, C. M. Hearon Jr., A. L. Sindler, D. R. Seals, The SIRT1 activator SRT1720 reverses vascular endothelial dysfunction, excessive superoxide production, and inflammation with aging in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **307**, H1754–H1763 (2014).
49. W. Xian, T. Li, L. Li, L. Hu, J. Cao, Maresin 1 attenuates the inflammatory response and mitochondrial damage in mice with cerebral ischemia/reperfusion in a SIRT1-dependent manner. *Brain Res.* **1711**, 83–90 (2019).
50. A. Wang, S. C. Huen, H. H. Luan, S. Yu, C. Zhang, J.-D. Gallezot, C. J. Booth, R. Medzhitov, Opposing effects of fasting metabolism on tissue tolerance in bacterial and viral inflammation. *Cell* **166**, 1512–1525.e12 (2016).
51. K. Cumnock, A. S. Gupta, M. Lissner, V. Chevee, N. M. Davis, D. S. Schneider, Host energy source is important for disease tolerance to Malaria. *Curr. Biol.* **28**, 1635–1642.e3 (2018).
52. P. A. Swanson II, G. T. Hart, M. V. Russo, D. Nayak, T. Yazew, M. Pena, S. M. Khan, C. J. Janse, S. K. Pierce, D. B. McGavern, CD8⁺ T cells induce fatal brainstem pathology during cerebral Malaria via luminal antigen-specific engagement of brain vasculature. *PLoS Pathog.* **12**, e1006022 (2016).
53. A. Villegas-Mendez, R. Greig, T. N. Shaw, J. B. de Souza, E. Gwyer Findlay, J. S. Stumhofer, J. C. R. Hafalla, D. G. Blount, C. A. Hunter, E. M. Riley, K. N. Couper, IFN- γ -producing CD4⁺ T cells promote experimental cerebral malaria by modulating CD8⁺ T cell accumulation within the brain. *J. Immunol.* **189**, 968–979 (2012).
54. J. E. Silva, S. D. Bianco, Thyroid-adrenergic interactions: Physiological and clinical implications. *Thyroid* **18**, 157–165 (2008).
55. I. Saito, K. Ito, T. Saruta, Hypothyroidism as a cause of hypertension. *Hypertension* **5**, 112–115 (1983).
56. B. Kim, Thyroid hormone as a determinant of energy expenditure and the basal metabolic rate. *Thyroid* **18**, 141–144 (2008).
57. H. C. Chang, L. Guarente, SIRT1 and other sirtuins in metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* **25**, 138–145 (2014).
58. S. Thakran, P. Sharma, R. R. Attia, R. T. Hori, X. Deng, M. B. Elam, E. A. Park, Role of sirtuin 1 in the regulation of hepatic gene expression by thyroid hormone. *J. Biol. Chem.* **288**, 807–818 (2013).
59. I. Velasco, S. C. Bath, M. P. Rayman, Iodine as essential nutrient during the first 1000 days of life. *Nutrients* **10**, 290 (2018).
60. K. J. Evans, D. S. Hansen, N. van Rooijen, L. A. Buckingham, L. Schofield, Severe malarial anemia of low parasite burden in rodent models results from accelerated clearance of uninfected erythrocytes. *Blood* **107**, 1192–1199 (2006).
61. A. Dzeing-Ella, P. C. Nze Obiang, R. Tchoua, T. Planche, B. Mboza, M. Mbounja, U. Muller-Roemer, J. Jarvis, E. Kendjo, E. Ngou-Milama, P. G. Kremser, S. Krishna, M. Kombila, Severe falciparum malaria in Gabonese children: Clinical and laboratory features. *Malar. J.* **4**, 1 (2005).
62. M. Linares, P. Marín-García, S. Pérez-Benavente, J. Sánchez-Nogueiro, A. Puyet, J. M. Bautista, A. Diez, Brain-derived neurotrophic factor and the course of experimental cerebral malaria. *Brain Res.* **1490**, 210–224 (2013).
63. M. J. Obregon, G. Morreale de Escobar, F. Escobar del Rey, Concentrations of triiodo-L-thyronine in the plasma and tissues of normal rats, as determined by radioimmunoassay: Comparison with results obtained by an isotopic equilibrium technique. *Endocrinology* **103**, 2145–2153 (1978).
64. A. Sanchez, C. Contreras-Jurado, D. Rodríguez, J. Regadera, S. Alemany, A. Aranda, Hematopoiesis in aged female mice devoid of thyroid hormone receptors. *J. Endocrinol.* **244**, 83–94 (2020).
65. J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J. Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, A. Cardona, Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
66. L. Lofgren, G. B. Forsberg, M. Stahlman, The BUMe method: A new rapid and simple chloroform-free method for total lipid extraction of animal tissue. *Sci. Rep.* **6**, 27688 (2016).

Acknowledgments: We thank T. N. Herrán (IIB) for NMR data acquisition, C. Palomo (UAM) for histological preparations, and L. Molero (UAM) for flow cytometry assistance. **Funding:** This work was funded by grants SAF2017-83289-R to S.A. and A.A., SAF2017-90604REDT to A.A., and BIO2016-77430-R to J.M.B. from the Ministerio de Economía y Competitividad; B2017/BMD-3724 to S.A. and A.A. from the Comunidad de Madrid; and CIBERONC CB/16/00228 to A.A. from the Instituto de Salud Carlos III. **Author contributions:** Conceptualization, writing—original draft, project administration, and funding acquisition: A.A. and S.A. Investigation: D.R.-M., Á.S., S.P.-B., C.C.-J., A.M.-P., M.T.-C., M.G.-H., R.R.-D., and C.F. Formal analysis: D.C., E.F.-V., I.M.-C., I.C.-C., and J.R. Supervision: J.M.B., A.M.B., and G.S. Writing—review and editing: A.A. and S.A. **Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests. **Data and materials availability:** All data needed to evaluate the conclusions in the paper are present in the paper and/or the Supplementary Materials.

Submitted 27 May 2021
 Accepted 11 February 2022
 Published 6 April 2022
 10.1126/sciadv.abj7110